



**HAL**  
open science

# Effets des microorganismes sur l'altération des pierres calcaires en milieu urbain pollué.

Paloma Reboah

► **To cite this version:**

Paloma Reboah. Effets des microorganismes sur l'altération des pierres calcaires en milieu urbain pollué.. Sciences de l'environnement. UPEC UP12 - Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2024. Français. NNT: . tel-04777374

**HAL Id: tel-04777374**

**<https://hal.science/tel-04777374v1>**

Submitted on 12 Nov 2024

**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.

Public Domain

# THÈSE DE DOCTORAT



## Effets des microorganismes sur l'altération des pierres calcaires en milieu urbain pollué

**Thèse de doctorat de l'Université Paris-Est Créteil (UPEC)**  
Ecole doctorale n°531, Sciences, Ingénierie et Environnement (SIE)  
*Département Sciences de la terre et de l'univers, espace*

Thèse préparée au **Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphérique (LISA)** et au **Laboratoire Eau, Environnement et Systèmes Urbains (LEESU)**,  
sous la direction de **Anne CHABAS**, Professeure,  
la co-direction de **Aurélie VERNEY-CARRON**, Maître de conférences,  
le co-encadrement de **Clarisse BALLAND BOLOU-BI**, Maître de conférences,  
et le co-encadrement de **Samir ABBAD ANDALOUSSI**, Maître de conférences.

Présentée par

**Paloma REBOAH**

Pour l'obtention du grade de docteur de l'université Paris Est Créteil

**Thèse soutenue à Créteil le 25 juin 2024, devant le jury composé de :**

<b>Patrick DI MARTINO</b> Professeur, Université de Cergy-Pontoise	Rapporteur
<b>Vincent GLOAGUEN</b> Professeur, Université de Limoges	Rapporteur
<b>Faisl BOUSTA</b> , Ingénieur de recherche, LRMH	Examineur
<b>Stéphanie EYSSAUTIER</b> , Ingénieure de recherche, Université de Reims	Examinatrice
<b>Françoise LUCAS</b> , Professeure, Université Paris-Est Créteil	Présidente du jury



## REMERCIEMENTS :

Je remercie chaleureusement mes encadrants de thèse de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet depuis bientôt cinq ans. À **Anne Chabas**, merci de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner dès ma première année, d'avoir toujours été à mon écoute et d'avoir été un réel soutien du point de vue moral et scientifique. À **Aurélié Verney-Carron**, je ne saurais comment te remercier de ton implication et de ton soutien dans les moments les plus compliqués de cette thèse. À **Clarisse Balland Bolou bi**, merci de m'avoir fait confiance dès mon M2 puis pour cette aventure, de m'avoir encouragée à participer aux différents congrès ainsi qu'aux formations qui m'ont été très utiles pour réaliser ce travail. Enfin merci à toi, **Samir Abbad**, d'avoir été un réel soutien durant ces années, merci d'avoir pris de ton temps pour m'épauler et surtout quand j'en avais le plus besoin (surtout pour mes 300 boîtes de Petri à la semaine).

Dans un premier temps, je souhaiterais remercier l'ensemble des membres du jury : **Patrick Di Martino, Vincent Gloaguen, Françoise Lucas, Stéphanie Eyssautier et Faisl Bousta** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je souhaiterais aussi remercier **Isabelle Rouget et Stéphane Moularat**, qui ont participé à mon suivi de comité de thèse. Merci pour votre disponibilité et votre écoute et pour tous les nombreux conseils que vous avez pu me donner. Nos échanges ont toujours été chaleureux et bienveillants.

Je souhaite à présent remercier mes deux labos, le LISA et le LEESU, pour leur accueil durant toutes ces années, mais aussi mes collègues et amis. À toi, **Vanessa Alphonse**, bureau des pleurs officiel du P3, la personne la plus chaleureuse et bienveillante du labo, merci d'avoir toujours été là pour moi, dans les bons comme les mauvais jours. Tu as toujours su être présente que cela soit au niveau perso, au niveau réflexion scientifique et pendant les manips et ces années n'auraient pas été les mêmes sans toi. Merci à toi, **Alexandre Livet**, tes discussions sur les végans et les poissons vont peut-être me manquer (ou pas), ça a été un réel plaisir de discuter avec toi. Je souhaite aussi remercier **Olivier Lauret**, avec qui, au final j'ai passé pas mal d'heures en Chromato ionique (avec mes 400 échantillons), merci d'avoir pris le temps de me former que cela soit au lavage en salle propre ainsi aux traitements des chromatogrammes. Je remercie aussi **Sophie Nowak**, qui a pris le temps réaliser les analyses DRX ainsi que de me former aux traitements des diffractogrammes sur différents logiciels.

Je remercie également l'ensemble des autres membres du LEESU : **My-Dung Jusselme, Nourredine Bousserhine et Marouane Mkhinini**, pour toutes les discussions et les moments de convivialité que l'on a pu avoir. Enfin je ne peux pas finir de remercier les gens du P3 sans remercier mes deux compatriotes de longue date **Julia Roux et Sadia Bagagnan**, on a vécu tellement de moments différents dans ce bureau, en passant des rires, aux pleurs, le bureau n'est plus pareil sans vous. Enfin, je remercie aussi **Lina Chebbi**, que j'ai connue stagiaire et qui a fini doctorante, merci pour ta douceur, tu as apaisé notre bureau lorsque tu es arrivée.

Je remercie également la cellule technique du P4 : **Stéphanie Giusti-Miller, Sophie Frechault et Nicolas Mazuras** avec qui j'ai passé des moments de convivialité de qualité. Nos discussions, les moments de rires et mes petits aller-retour dans votre bureau vont me manquer.

Je remercie également mes collègues de l'ICMPE, **Davy-Louis Versace** avec qui j'ai pu longuement échanger et être en binôme en TP de chimie orga, on a bien rigolé. Je remercie

également ma co-doctorante sur le projet MIAM, **Lucie Pierau**, avec qui on a passé de beaux moments au café, en manip et sur le terrain. Je souhaite aussi remercier **Christine Elian**, tu as toujours été d'une douceur et d'une bienveillance incroyable.

Je remercie également les différents stagiaires que j'ai pu encadrer, mais surtout, **Noura Boukessassa**, avec qui j'ai travaillé sur la mise en place des simulations dans CIME 2. Ce stage n'a pas été évident, mais ton investissement et ta joie de vivre ont fait passer ces journées amères (par les échecs) en très bon souvenir. Je remercie aussi **Karim Akretche**, qui a travaillé sur les tests antibactériens des polymères sur les calcaires, avec qui j'ai bossé longuement sur la partie bio.

Enfin je souhaite remercier tout particulièrement ma famille, mes parents et ma sœur, merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir toujours épaulée et soutenue dans tous mes projets et surtout durant cette thèse.

Merci à toi Mohamed, d'être qui tu es, tu m'as appris à prendre la vie avec plus de légèreté, a relativisé sur tellement de choses. Tu as été mon plus grand soutien et surtout ces derniers mois. Merci d'avoir veillé avec moi, toutes ces nuits pendant que je travaillais sur cette thèse.

# RÉSUMÉ

La pierre calcaire est largement utilisée comme pierre de construction en France, notamment pour les monuments historiques. Ces derniers se dégradent au cours du temps, notamment à cause des facteurs climatiques, anthropiques (pollution) et de la colonisation biologique. Ainsi, afin de mieux pouvoir les préserver en leur appliquant des solutions de conservation – restauration adaptées, il est nécessaire de bien comprendre l'influence de ces différents facteurs environnementaux et leurs synergies sur la dégradation des pierres et de déterminer les mécanismes de réaction. Dans ce contexte, nous nous sommes focalisés sur l'effet des microorganismes sur l'altération des calcaires en milieu urbain pollué.

Pour cela, deux types d'échantillons issus du cimetière du Père-Lachaise ont été prélevés, des coupons de calcaire sain exposés pendant 5 ans sur le site et des prélèvements sur des tombes, localisées dans trois divisions du cimetière qui ont subi environ 200 ans d'altération. Les faciès d'altération ont été caractérisés et les communautés microbiennes (bactériennes et fongiques) identifiées par séquençage NGS. Les résultats mettent en évidence des différences minéralogiques selon le temps d'exposition. Sur les tombes anciennes, le gypse a majoritairement été identifié, tandis qu'à court temps d'exposition du  $\text{KNO}_3$  a été retrouvé. L'analyse des communautés microbiennes a montré une influence importante de l'exposition (verticale vs. horizontale), de la situation (abritée vs. exposée aux pluies) et de la saison sur la composition des communautés bactériennes et fongiques. Par ailleurs, une proportion importante de bactéries a été identifiée comme participant au cycle de l'azote, notamment par une action dénitrifiante, indiquant une adaptation des communautés bactériennes à la pollution atmosphérique actuelle.

Pour confirmer ces résultats, différentes simulations en laboratoire ont été réalisées afin d'examiner l'effet de différents types de pollution (gazeuse et particulaire, sulfatée, nitratée et ammonifiée) caractéristiques de différentes périodes ( $\text{SO}_2$  et suies au début du XIX<sup>ème</sup> siècle,  $\text{NO}_x$  et  $\text{NH}_3$  pour le futur). Des expériences ont été réalisées en flacon de culture avec de l'eau de pluie synthétique, du calcaire Saint Maximin Roche Fine et un inoculum microbien issu d'une tombe du Père-Lachaise. Les pollutions sulfatées et azotées ( $\text{NH}_4$  et  $\text{NO}_3$ ) ont montré des patines d'altération très différentes, respectivement orange et vertes. L'analyse des communautés microbienne met en évidence l'influence de la présence du calcaire sur le développement des microorganismes ainsi qu'une sélectivité des microorganismes en fonction du type de pollution. Néanmoins très peu de différences ont été identifiées pour les échantillons soumis à la pollution particulaire et gazeuse.

Mots-clés : Construction – Matériaux, Calcaire, Bio-détérioration, Communautés microbiennes, Pollution atmosphérique.

# ABSTRACT

Limestone is widely used as building stone in France, particularly for historic monuments. The latter deteriorate over time, notably due to climatic factors, anthropogenic factors (pollution) and biological colonization. So, in order to better preserve them by applying appropriate conservation-restoration solutions, it is necessary to fully understand the influence of these different environmental factors and their synergies on stone degradation, and to determine the reaction mechanisms. In this context, we focused on the effect of microorganisms on limestone weathering in polluted urban environments.

Two types of samples were taken from the Père-Lachaise cemetery: limestone slab exposed for 5 years on site, and samples from tombs in three divisions of the cemetery that had undergone some 200 years of weathering. Alteration facies were characterized and microbial communities (bacterial and fungal) identified by NGS sequencing. The results reveal mineralogical differences according to exposure time. In ancient tombs, gypsum was predominantly identified, while  $\text{KNO}_3$  was found in short exposure times. Analysis of microbial communities showed a significant influence of exposure (vertical vs. horizontal), situation (sheltered vs. exposed to rain) and season on the composition of bacterial and fungal communities. Furthermore, a significant proportion of bacteria were identified as participating in the nitrogen cycle, notably through a denitrifying action, indicating an adaptation of bacterial communities to current atmospheric pollution.

To confirm these results, various laboratory simulations were carried out to examine the effect of different types of pollution (gaseous and particulate, sulfated, nitrated and ammonified) characteristic of different periods ( $\text{SO}_2$  and soot in the early 19<sup>th</sup> century,  $\text{NO}_x$  and  $\text{NH}_3$  in the future). Experiments were carried out in culture flasks using synthetic rainwater, Saint Maximin Roche Fine limestone and microbial inoculum from a Père-Lachaise tomb. Sulfate and nitrogen ( $\text{NH}_4$  and  $\text{NO}_3$ ) pollution showed very different weathering patinas, orange and green respectively. Analysis of the microbial communities revealed the influence of the presence of limestone on the development of microorganisms, as well as a selectivity of microorganisms according to the type of pollution. Nevertheless, very few differences were identified for samples subjected to particulate and gaseous pollution.

Key words: Construction – Materials, Limestone, Bio-deterioration, Microbial community, Atmospheric pollutant.

# TABLE DES MATIÈRES :

REMERCIEMENTS :	3
RÉSUMÉ	5
TABLE DES MATIÈRES :	7
INTRODUCTION GÉNÉRALE :	11
CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART – LE CALCAIRE PARISIEN, AGENT ET PROCESSUS	13
1. La pierre et ses faciès d'altération	14
1.1. Calcaire des monuments	14
1.2. Les faciès d'altération et processus	17
2. Les différents agents d'altération du calcaire	19
2.1. Le climat - les facteurs météorologiques	19
2.2. De la pollution atmosphérique à l'altération des monuments	20
2.3. Agents biologiques dans l'altération des pierres	24
3. Bio-détérioration	27
3.1. La colonisation biologique	27
3.2. Les mécanismes de bio-détérioration	28
4. Synergie entre les différents agents d'altération	30
4.1. Climat et Microorganismes	30
4.2. Pollution et microorganismes	42
5. Bilan & Objectif de la thèse	44
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	45
1. Démarche expérimentale	46
1.1. Description du site d'étude	46
2. Échantillonnage	47
2.1. Altération avancée du calcaire : les stèles du cimetière Père Lachaise	47
2.2. Premiers stades d'altération du calcaire : les coupons	49
3. Caractérisation du vieillissement naturel des calcaires	51
3.1. Analyses biologiques	51
3.2. Analyses physico-chimiques	55
4. Vieillissement artificiel en conditions contrôlées : protocole, suivi et analyses	57
4.1. Protocole	57
4.2. Suivi expérimental hebdomadaire	60
4.3. Caractérisation des patines altération	62
4.3.1. Colorimétrie	62



5. Analyses statistiques	63
CHAPITRE 3 : ÉTUDE DU VIEILLISSEMENT NATUREL DES PIERRES CALCAIRES	65
Chapitre 3.1 : Étude du vieillissement naturel de la pierre calcaire à court terme	67
Chapitre 3.2 : Étude du vieillissement naturel de la pierre calcaire à long terme : site du Père-Lachaise	109
1. Analyse des phases cristallines par diffraction à rayon X (DRX).	110
2. Analyse de la fraction soluble	111
3. Dénombrement microbien	114
4. Analyse de l'activité enzymatique totale	116
5. Communautés microbiennes	117
5.1. Communautés bactériennes	117
5.2. Communautés fongiques	127
5.3. Communautés algaires	137
5.3.1. Analyse de la diversité algaire	137
5.3.2. Composition des communautés algaires	140
6. Corrélations entre les espèces ioniques et les phyla microbiens	143
6.1. Bactéries	143
6.2. Champignons	145
7. Discussion	145
7.1. Bilan comparatif de la colonisation biologique et de l'altération sur le court et long terme	145
7.2. Sélection des communautés par l'environnement	149
7.3. Interactions pollution - microorganismes	151
7.4. Rôle des microorganismes sur la bio-altération	154
CHAPITRE 4 : ALTÉRATION EXPERIMENTALE DE LA PIERRE CALCAIRE	156
Chapitre 4.1 : Altération du calcaire sain en présence de pluie en conditions statiques	159
1. Évolution de la composition des microcosmes	160
2. Caractérisation des échantillons	165
2.1. Observations microscopiques et colorimétrie	165
3. Communautés microbiennes	167
3.1. Bactéries	167
3.2. Champignons	172
3.3. Algues	175
3.3.1. Indice de biodiversité	175
3.3.2. Abondance relatives des phyla et genres algaires	176

4. Conclusion	178
Chapitre 4.2 : Altération du calcaire soumis à la pollution (particulaire et gazeuse) en présence de pluie en conditions statiques	180
1. Évolution de la composition des microcosmes	182
2. Caractérisation des calcaires après 63 jours d'altération :	185
3. Communautés microbiennes	187
3.1. Bactéries	187
3.2. Champignons	191
3.3. Algues	194
3.3.1. Indice de biodiversité	194
3.3.2. Communautés algaires	195
4. Comparaison entre PC et S	198
Chapitre 4.3 : Altération du calcaire en présence de pluie polluée	201
1. Évolution de la composition des microcosmes au cours de l'étude	202
2. Résultats après 63 jours d'altérations	212
3. Communautés microbiennes	215
3.1. Bactéries	215
3.2. Champignons	225
3.3. Algues	232
3.3.1. Indice de biodiversité	232
3.3.2. Composition des communautés algaires	236
4. Discussion	244
4.1. Influence du type de pollution sur la bio-altération du calcaire	244
4.2. Influence du type de pollution sur la colonisation biologique du calcaire	245
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES :	250
1. Faciès d'altération du calcaire en milieu urbain pollué	250
2. Communautés microbiennes	251
2.1. Effet du climat	251
2.2. Effet de la pollution atmosphérique	252
3. Scénario pour le futur	252
4. Perspectives d'études :	256
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	258
Liste des figures	275
Liste des tableaux	280
ANNEXES :	282



# INTRODUCTION GÉNÉRALE :

La préservation du patrimoine bâti est un défi économique pour les municipalités. En effet, outre la valeur culturelle et historique des monuments, leur entretien, souvent irrégulier et tardif, entraîne des coûts de restauration rendus élevés de par l'ampleur des dommages accumulés au cours des années. En effet, depuis leur mise en œuvre, les bâtiments en pierre sont exposés à des actions physiques, chimiques et biologiques qui conduisent à différents types d'altération, tels que la perte de matière, les transformations minéralogiques et les changements de patine.

Différents agents jouent un rôle déterminant dans ces altérations tels que : les facteurs météorologiques et climatiques (précipitations, température et humidité relative), la pollution (particulaire et gazeuses) et l'activité biologique. Ces facteurs affectent les processus d'altération, en fonction de la nature de l'environnement (rural, industriel et urbain). Au-delà de l'inconvénient esthétique, ces changements affectent la durabilité des monuments. Par conséquent, afin de proposer des traitements de conservation et de restauration appropriés (nettoyage, remplacement partiel, traitement de surface, etc.), il est nécessaire de comprendre en amont l'impact des facteurs environnementaux et les mécanismes d'altération abiotiques et biotiques qui en résultent.

D'après la base MONUMAT du BRGM, plus de 50 % du patrimoine bâti utilise le calcaire comme pierre de construction. De nombreux bâtiments historiques sont situés dans des zones urbaines, dans des parcs ou des jardins, et sont donc exposés à la pollution atmosphérique et à la colonisation biologique. Cette double contribution peut conduire à des mécanismes et des cinétiques d'altération différents. Par conséquent, pour étudier et comprendre les mécanismes d'altération, il est nécessaire d'adopter une approche multidisciplinaire associant sciences des matériaux et sciences environnementales.

Souvent, les études sur l'altération des pierres calcaires abordent séparément l'impact des polluants atmosphériques et celui des agents biologiques. Cependant, la combinaison des deux peut avoir un effet synergique. Par exemple, la pollution peut modifier la composition des communautés microbiennes avec un comportement agressif envers la pierre en modifiant le réseau de poreux de la pierre calcaire ou alors catalyser la fixation des polluants atmosphériques. L'élimination ou l'apparition de nouvelles communautés microbiennes à la surface des monuments en pierre en fonction des facteurs environnementaux et leur influence sur la dégradation de la pierre doivent être soigneusement évaluées.

C'est dans ce cadre que le projet MIAM (2016-2024), financé d'abord par un appel d'offres interne de l'OSU Effluve et ensuite par l'Agence Nationale de la Recherche a vu le jour. Ce projet s'articule autour de deux grands axes :

- 1) La compréhension de la dégradation du calcaire en fonction de la composition des communautés microbiennes.
- 2) L'élaboration d'un revêtement biocide eco-friendly

Ce travail de thèse s'inscrit dans la première partie du projet ANR MIAM. Pour réaliser cette étude, deux approches ont été déployées : en site réel et en laboratoire.

Le cimetière du Père-Lachaise a été choisi pour l'étude in-situ. En effet, la plupart des tombes datant du XIX<sup>ème</sup> siècle sont en calcaire du bassin parisien et n'ont pas été restaurées contrairement aux bâtiments historiques. Ceci permet donc d'observer des altérations anciennes datées d'après les inscriptions présentes sur les tombes. Le site combine un environnement

urbain pollué au centre de Paris et une partie centrale très végétalisée. Le cimetière du Père-Lachaise est donc un site idéal pour étudier conjointement les actions chimiques et biologiques sur l'altération des roches calcaires.

La première partie de ce travail a été réalisée à partir de données de « terrain » : les tombes du Père-Lachaise (altération à long terme, ~ 200 ans d'exposition) et coupons de calcaire installés dans le cimetière en 2016 (altération à court terme, ~ 5 ans d'exposition). Sur ces échantillons, différentes analyses biologiques et chimiques ont été réalisées afin de 1) quantifier et identifier les microorganismes présents à la surface de la pierre et de 2) caractériser les faciès d'altérations de la pierre.

La seconde partie de ce travail a eu pour but de simuler l'altération du calcaire en présence de microorganismes et de pollution en conditions contrôlées afin de comprendre quels sont les effets de la pollution atmosphérique ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , suies) sur les populations microbiennes et de comprendre quel est l'effet de ces synergies sur l'altération de la pierre calcaire.

Ce mémoire de thèse s'organise ainsi en cinq chapitres :

- Le **premier chapitre** correspond à un inventaire de l'état des connaissances actuelles sur les faciès et processus d'altération de la pierre, des polluants, et les microorganismes ayant un rôle dans la bio détérioration. Un volet sur l'influence des climats et de la pollution sur la bio détérioration des monuments en pierre a aussi été réalisé.
- Le **deuxième chapitre** présente la démarche expérimentale employée au cours de ce travail. Il présente le matériel et les méthodes utilisées afin de mener à bien le bilan des altérations sur le site du Père-Lachaise, ainsi que les simulations d'altération de la pierre en milieu contrôlé.
- Le **troisième chapitre** intitulé « L'altération naturelle de la pierre calcaire » présente les grands résultats d'identification des faciès d'altérations et d'identification des microorganismes présents à la surface des calcaires à court et long terme d'exposition à l'environnement urbain parisien. Les résultats obtenus après 5 ans d'exposition seront présentés sous forme d'article qui est soumis. La seconde partie de ce chapitre porte sur l'identification des faciès d'altération et les microorganismes identifiés sur les tombes du cimetière du Père-Lachaise, représentant environ 200 ans d'altération en milieu urbain.
- Le **quatrième chapitre**, intitulé « L'altération artificielle de la pierre calcaire », présente les principaux résultats des différentes simulations ayant été réalisés. Pour la première simulation, un système simplifié a été réalisé, du calcaire a été mis en contact avec des microorganismes et une eau de pluie synthétique ayant une composition semblable à une eau de pluie actuelle à Paris. Pour la deuxième simulation, le système a été complexifié en ajoutant une source de pollution particulaire et gazeuse au système précédent. Enfin la troisième simulation a été réalisée en faisant varier la composition de l'eau de pluie ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_2$  et  $\text{NH}_3$ ) afin de simuler une pluie passée, présente et future.
- Le **cinquième (et dernier) chapitre** de ce travail correspond à la conclusion générale de la thèse et aux perspectives d'études.

**CHAPITRE 1 :**  
**ETAT DE L'ART – LE CALCAIRE PARISIEN, AGENT ET**  
**PROCESSUS**

## 1. La pierre et ses faciès d'altération

### 1.1. Calcaire des monuments

#### 1.1.1. Le calcaire, pierre de construction ancienne

Les calcaires, du point de vue géologique, sont des roches sédimentaires composées d'au minimum 50 % de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). Ils se forment dans différents types d'environnement : marin ou lacustre, et contiennent fréquemment des bioclastes tels que des fragments de coquilles, des foraminifères ou bien des entroques. Les pierres calcaires, issues du bassin Parisien, ont été formées essentiellement au Jurassique, au Crétacé et à l'Éocène, et ont la particularité d'être riches en bioclastes.

Le calcaire du Lutétien (45 millions d'années, Eocène) est utilisé à Paris depuis l'époque gallo-romaine. De l'antiquité au Moyen Âge, l'exploitation de calcaire était principalement à ciel ouvert (Figure 1- A), notamment dans l'actuel Jardin des plantes de Paris (5<sup>ème</sup> arrondissement).

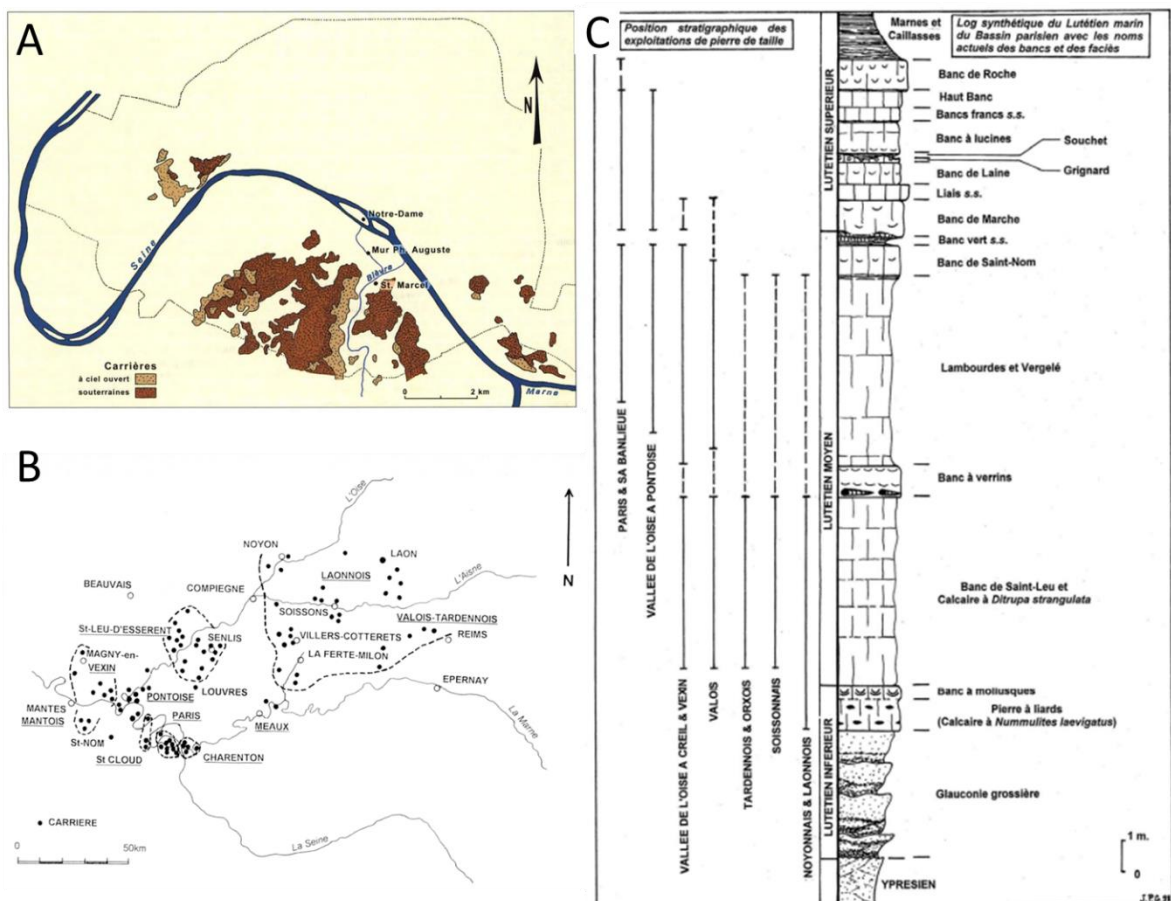


Figure 1 : Le calcaire parisien.(A) Carte des carrières localisées dans Paris intramuros (Blanc et al. 2001) ; (B) Carte des carrières dans le bassin parisien (Benoit et al. 2000) ; (C) log sédimentaire (Benoit et al. 2000).

Les carrières parisiennes étaient principalement localisées sur la rive gauche et desservie par trois réseaux : le premier vers Passy, le second dans le 12<sup>ème</sup> arrondissement et le troisième au niveau du bois de Vincennes. Jusqu'au Moyen Âge, de nombreuses carrières souterraines ou à ciel ouvert s'ouvrirent en banlieue parisienne de par l'accroissement de la demande en matériaux pour construire de nombreux édifices (Blanc et al., 2001). Le calcaire du Lutétien est décrit

précisément dans une grande partie du bassin parisien (Figure 1 – B). Il est composé de plusieurs bancs, avec des différences pétrographiques notables.

La Figure 1 – C représente le log stratigraphique des différents bancs du Lutétien retrouvé dans différentes régions. Les calcaires de type banc franc et liais ont été identifiés par exemple dans la construction des thermes de Cluny (Blanc and Lorenz, 1994).

Les calcaires de l'Oise, notamment le calcaire à Ditrupa (Figure 1 – C), sont arrivés sur Paris au cours du XIV<sup>ème</sup> siècle et ont été identifiés notamment sur l'église de Saint Severin (5<sup>ème</sup> arrondissement). À partir du XV<sup>ème</sup> siècle, le calcaire de l'Oise, provenant de Saint-Leu et/ou Troissy, a eu beaucoup de succès et fut notamment utilisé dans la construction du Palais du Louvre, de l'Hôtel des Invalides, du Palais Bourbon, de l'École Militaire ou encore de la Place de la Concorde. Au XVII<sup>ème</sup> siècle, Colbert ordonna à l'Académie royale d'Architecture de recenser toutes les carrières pouvant fournir du calcaire en grande quantité (Benoit et al., 2000).

Le liais des carrières parisiennes fut identifié sur de nombreux portails et sculptures localisés assez loin de Paris comme dans les cathédrales de Chartres, de Sens, des églises de Provins ou encore celles du Sénonais dès le XII<sup>ème</sup> siècle. La localisation de cette pierre à plus de 80 km de Paris montre donc l'importance du transport de la pierre par voie fluviale (Seine, Oise, Marne, Yonne ...), des ports parisiens jusqu'en province.

Le développement des transports terrestres et fluviaux a donc permis l'expansion de l'utilisation de certains calcaires locaux. Par exemple, la pierre d'Euville (calcaire dur, crinoïdale) était utilisée principalement en Lorraine depuis l'antiquité. En 1853, suite à l'ouverture de la gare ferroviaire de Commercy ainsi que par l'ouverture du canal de l'Est (entre la Marne et le Rhin), son utilisation se développa dans la capitale notamment dans l'entablement du petit Pont-Neuf, puis elle sera utilisée principalement dans le soubassement des monuments d'architecture haussmannienne.

Le Tableau 1 rassemble les principaux types de calcaire issus du Bassin parisien et utilisés dans la construction des monuments historiques.



## Chapitre 1 : Etat de l'art – Le calcaire parisien, agents et processus

Tableau 1: Calcaires du bassin Parisien, caractéristiques et utilisation dans les monuments historiques.

Types de calcaires	Formation géologique	Caractéristique de la roche	Monuments
Saint Maximin roche fine	Éocène, Lutétien	Calcaire à miliole et nummulite	Tour Saint-Jacques, opéra Garnier, Grand Boulevard
Saint-Leu	Éocène, Lutétien	Calcaire à miliole et nummulite	Église Saint- Eustache, Palais du Louvre, hôtel des Invalides, Élysée
Tuffeau	Crétacé supérieur, Turonien	Calcaire crayeux	Château de Chambord, Château de la Loire
Lens	Crétacé inférieur, Barrémien	Calcaire oolithique	Arènes de Nîmes Maison Carrée
Comblanchien	Jurassique moyen, Bathonien	Calcaire micritique	Dallage du Sacré- Cœur Église de Saint-Denis de nuit de St George
Euville	Jurassique supérieur, Oxfordien	Calcaire à entroque	Château de Commercy, opéra Garnier, pont Alexandre III
Savonnière	Jurassique supérieur, Portlandien	Calcaire oolithique et coquiller	Bâtiments du Barrois en Meuse, en remplacement de la pierre de Caen

### 1.1.2. Restauration des monuments en pierre calcaire

Au cours du temps, les monuments en pierre vont se détériorer et leur restauration devient nécessaire. Si la pierre calcaire est trop abîmée, elle doit être remplacée par une pierre provenant de la même carrière si possible. Aujourd'hui de nombreuses carrières étant fermées, les ingénieurs-géologues doivent trouver des pierres provenant d'autres carrières, mais qui doivent rester compatibles avec les pierres restées sur place. Ces pierres de remplacement doivent avoir des caractéristiques esthétiques (couleur, nature, taille de grains, présences de coquilles) et pétrologiques (porosité, capillarité, résistance mécanique, vitesse de propagation de la vitesse sonore ...) semblables afin de ne pas perturber la circulation de fluide par exemple qui pourrait entraîner des dégradations encore plus importantes (*Les monuments historiques et la pierre*, 2012).

En restauration, le calcaire Savonnière remplace, par exemple, la pierre de Caen qui est très peu exploitée depuis les années 1960, le St Maximin a été utilisé notamment pour les travaux de restauration du Panthéon, du Pont-Neuf ainsi que pour la tour Saint-Jacques. Enfin la pierre des Aucrais est utilisée dans la restauration de la cathédrale de Reims, car sa dureté, sa teinte et son type de grain qui est assez proche du Liais de Courville.

### 1.1.3. Le calcaire au cimetière du Père-Lachaise

Comme décrit précédemment, la pierre calcaire est donc un des matériaux les plus prisés au XIX<sup>ème</sup> siècle à Paris. C'est donc tout naturellement que ce matériau se retrouve en abondance au cimetière du Père-Lachaise, ouvert en 1804. Les monuments funéraires de cette époque appartenaient principalement aux familles aisées de la capitale, allant de tombes assez simples constituées d'une dalle et d'une stèle, à des caveaux familiaux de grande ampleur. Les calcaires utilisés pour leurs constructions étaient principalement du calcaire local (calcaire du Lutétien). Pour les monuments construits après 1850, du calcaire d'Euville (Jurassique supérieur) est employé pour le soubassement du monument sur lequel est posé le Lutétien, ou bien pour tout le monument. De nombreuses stèles et chapelles funéraires sont construites en Comblanchien (Jurassique moyen).

## 1.2. Les faciès d'altération et processus

La pierre de construction est depuis des dizaines, voire des centaines d'années soumise à différents facteurs environnementaux tels que l'eau, le vent, le gel, la pollution ou encore les communautés biologiques, pouvant la faire évoluer.

Le terme **altération** est défini par Jeannette (1992 a, b), comme étant le **résultat d'un ensemble de processus physique chimique et biologique qui induisent un changement de caractéristiques originelles du matériau.**

Afin de généraliser la nomenclature des faciès d'altération, le Comité International des monuments et des sites a publié en 2008 un glossaire de référence sur les formes d'altérations de la pierre (Vergès-Belmin, 2008).

La nomenclature ICOMOS décrit les différents faciès d'altération en 5 catégories (Figure 2) :

1. Fissure et déformation
2. Détachements
3. Figures induites par une perte de matière
4. Altération chromatique et dépôts
5. Colonisation biologique

Les fissures et déformations (Figure 2) correspondent à une altération physique de la pierre (dissociation partielle sans modification de la composition minéralogique) induite principalement par des mécanismes de structure et de mécanique.

Les détachements sont principalement causés par des phénomènes de stress thermique et/ou de cristallisation de sel en subsurface, qui vont induire un éclatement du réseau poreux en proche surface induisant un phénomène de desquamation.

Les pertes de matière correspondent à une altération de type chimique gouvernée par des phénomènes de dissolution. Elles peuvent être aggravées par les pluies acidifiées par la pollution atmosphérique.

L'érosion est due à l'action de poussières abrasives soulevées par le vent et à celle du pouvoir dissolvant de l'eau. Il en résulte principalement des faciès d'alvéolisation ainsi que des pertes de

matière des composants de la pierre ou encore de la matrice micritique ou sparitique autour des grains.

CRACK & DEFORMATION FISSURE & DÉFORMATION	DETACHMENT DÉTACHEMENT	FEATURES INDUCED BY MATERIAL LOSS FIGURES INDUITES PAR UNE PERTE DE MATIÈRE	DISCOLORATION & DEPOSIT ALTÉRATION CHROMATIQUE ET DÉPÔT	BIOLOGICAL COLONIZATION COLONISATION BIOLOGIQUE
<b>CRACK . FISSURE</b> Fracture . Fracture Star crack . Fissuration en étoile Hair crack . Microfissure Craquelle . Craquellement Splitting . Clivage	<b>BLISTERING . BOURSOUFFLURE</b> <b>BURSTING . ECLATEMENT</b> <b>DELAMINATION . DÉLITAGE</b> Exfoliation . Exfoliation	<b>ALVEOLIZATION . ALVÉOLISATION</b> Coving . Creusement	<b>CRUST . CROÛTE</b> Black crust . Croûte noire Salt crust . Croûte saline	<b>BIOLOGICAL COLONIZATION . COLONISATION BIOLOGIQUE</b>
<b>DEFORMATION . DÉFORMATION</b>	<b>DISINTEGRATION . DÉSAGRÉGATION</b> Crumbing . Emiettement Granular disintegration . Désagrégation granulaire Powdering, Chalking . Puvérolence, Farinage Sanding . Désagrégation sableuse Sugaring . Désagrégation saccharoïde	<b>EROSION . ÉROSION</b> Differential erosion . Erosion différentielle Loss . Perte : ■ of components . de constituants ■ of matrix . de matrice Rounding . Erosion en boule Roughening . Augmentation de rugosité	<b>DEPOSIT . DÉPÔT</b> <b>DISCOLOURATION . ALTÉRATION CHROMATIQUE</b> Colouration . Coloration Bleaching . Décoloration Moist area . Assombrissement dû à l'humidité Staining . Tache	<b>BIOLOGICAL COLONIZATION . COLONISATION BIOLOGIQUE</b> ALGA . ALGUE LICHEN . LICHEN MOSS . MOUSSE MOULD . MOISSISSURE PLANT . PLANTE
	<b>FRAGMENTATION . FRAGMENTATION</b> Splintering . Fragmentation en esquilles Chipping . Epaufrure	<b>MECHANICAL DAMAGE . DÉGÂT MÉCANIQUE</b> Impact damage . Trace d'impact Curt . Incision Scratch . Rayure Abrasion . Abrasion Keying . Bôchage	<b>EFFLORESCENCE . EFFLORESCENCE</b> <b>ENCRUSTATION . ENCROÛTEMENT</b> Concretion . Concrétion	
	<b>PEELING . PELAGE</b> <b>SCALING . DESQUAMATION</b> Flaking . Ecaillage Contour scaling . Desquamation en plaque	<b>MICROKARST . MICROKARST</b> <b>MISSING PART . PARTIE MANQUANTE</b> Gap . Trou	<b>FILM . FILM</b> <b>GLOSSY ASPECT . ASPECT LUISANT</b> <b>GRAFFITI . GRAFFITI</b> <b>PATINA . PATINE</b> Iron rich patina . Patine ferrugineuse Oxalate patina . Patine d'oxalates	
		<b>PERFORATION . PERFORATION</b> <b>PITTING . PITTING</b>	<b>SOILING . ENCRASSEMENT</b> <b>SUBFLORESCENCE . SUBFLORESCENCE</b>	

Figure 2 : Classification des faciès d'altération selon le glossaire ICOMOS.

Les altérations chromatiques et dépôts sont principalement décrits comme étant liés à la pollution atmosphérique, et notamment aux dépôts de suie de combustion donnant une couleur sombre aux monuments historiques. Les dépôts salins s'expriment à travers la cristallisation de sels en surface tels que le gypse ( $\text{CaSO}_4$ ), l'halite ( $\text{NaCl}$ ), Epsomite ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ou encore du salpêtre ( $\text{KNO}_3$ ) (Chabas and Jeannette, 2001; Fitzner et al., 2002; Cardell et al., 2003; Lopez-Arce et al., 2008; Kloppmann et al., 2014; Kramar et al., 2010; Chabas et al., 2022).

En zone urbaine, le sel le plus fréquemment identifié sur les monuments en calcaire est le gypse, sous forme de croûtes noires. Les croûtes noires correspondent donc à du gypse dans lequel sont incorporées des cendres volantes qui leur confèrent une couleur grise à noire (Camuffo et al., 1983; Ausset et al., 1999). Ces croûtes sont fréquemment associées à la pollution atmosphérique et notamment à une pollution soufrée, caractéristique de l'ère industrielle. Les suies de combustions (liée à la pollution atmosphérique) peuvent aussi être déposées directement à la surface de la pierre (sans être incorporées à une croûte saline), provoquant un encrassement et donc un changement chromatique en assombrissant la surface de la pierre.

Enfin, la colonisation biologique est directement liée à la présence d'organismes (et microorganismes) tels que les algues, les bactéries, les champignons, les lichens, les plantes ... Ces colonisations vont induire avant tout une altération esthétique d'ordre chromatique, mais qui peut évoluer en altération chimique (dissolution induite par leurs métabolites) et physique (fracture du réseau poreux).

Les altérations de la pierre peuvent être visibles à différentes échelles : de l'échelle nanométrique à l'échelle d'une façade entière. Le

Tableau 2, d'après les travaux de Fitzner and Heinrichs, 2001, décrit les différentes échelles de l'altération de la pierre, les paramètres environnementaux ainsi que les sciences impliquées dans ces phénomènes. Ceci illustre parfaitement le caractère multidisciplinaire des recherches menées sur l'altération de la pierre et la nécessité d'en identifier les différents agents.

Tableau 2 : Échelle des altérations de la pierre, paramètres et sciences impliquées (Fitzner and Heinrichs, 2001).

Échelle		Paramètres	Sciences impliquées
Altération non visible	Échelle nanométrique < mm	Changement des propriétés de la pierre Composition, texture, porosité...	Géosciences, sciences des matériaux, chimie, physique, microbiologie
	Échelle millimétrique mm à cm	Changement chromatique, perte de matière, micromorphologie	
Altération visible	Échelle centimétrique cm à m	Phénomène de détérioration - forme d'altération	
	Échelle métrique / Monument ou façade complète	Stabilité de la structure - esthétique	Architecture, ingénierie structurelle

## 2. Les différents agents d'altération du calcaire

### 2.1. Le climat - les facteurs météorologiques

L'eau est le facteur déterminant dans l'altération de la pierre. Cette eau est majoritairement apportée par les pluies, mais peut aussi provenir des sols par remontée capillaire, ou encore sous forme de vapeur d'eau dont la condensation est favorisée en milieu poreux et en surface en condition de fortes humidités relatives.

- La pluie

Les eaux de pluie sont composées de plusieurs ions majeurs et mineurs. La composition des eaux de pluie dépend des éléments présents dans l'atmosphère. Dans le cas des pluies parisiennes, les ions majeurs sont pour les cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  et pour les anions  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{Cl}^-$  (Beysens et al., 2017). Il existe une variabilité saisonnière de la concentration en éléments majeurs des

eaux de pluie en atmosphère urbaine (Kotowski et al., 2020). La composition des eaux de pluie est principalement contrôlée par les éléments présents dans l'atmosphère. Ainsi dans un milieu urbain et/ou pollué, elles contiennent des concentrations plus élevées en  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  ou encore en  $\text{NH}_4^+$  qui les rendent plus acides.

Les phénomènes de ravinement et de dissolution résultent principalement d'une action directe de ruissellement, tandis que les phénomènes de gélifraction, d'encroûtement de plaques ou d'alvéoles résultent de mécanismes plus complexes, qui font intervenir des phénomènes de capillarité, des cycles d'imbibition / séchage et les propriétés intrinsèques de la pierre.

- La température

Les variations de température saisonnières ont un impact important dans l'altération des roches. À Paris, les températures peuvent varier de  $-5^\circ\text{C}$  en hiver jusqu'à  $40^\circ\text{C}$  en plein été. Ces températures jouent un rôle sur le comportement des fluides dans le réseau poreux. L'eau rentre dans le réseau poreux par capillarité, de la surface vers le réseau interne de la roche. En hiver, lorsque la température descend en dessous de  $0^\circ\text{C}$ , l'eau liquide contenue dans les pores va se transformer en eau solide et augmenter de volume ( $\sim 9\%$ ), ce qui peut contribuer à un « éclatement » ou un agrandissement de ses pores ou bien encore créer des fissures.

De plus, la température joue un rôle essentiel dans la dynamique de cristallisation de sels. Dans le cas de la cristallisation du  $\text{NaCl}$ , par exemple, il a été démontré que la température jouait un rôle important dans la localisation de la formation de sel. En effet, plus la température est importante, plus les cristallisations de sels se réalisent en subsurface. Ainsi, à des températures autour de  $30^\circ\text{C}$ , le sel va se former quasiment en surface. (Gomez-Heras and Fort, 2007; Aly et al., 2015). Cette cristallisation de sel en subsurface en présence de températures élevées peut donc à terme entraîner des faciès d'altération de type écaillage ou débit en plaque (Gomez-Heras and Fort, 2007; Vergès-Belmin, 2008). À l'inverse, à faible température, la cristallisation se fait plus en profondeur. L'étude d'Angeli et al., 2010 a alors montré que la cristallisation de sulfate de sodium était plus destructrice à  $5^\circ\text{C}$  qu'à température ambiante ou encore à  $50^\circ\text{C}$ .

## 2.2. De la pollution atmosphérique à l'altération des monuments

### 2.2.1. Les polluants atmosphériques

Les polluants atmosphériques sont représentés par des gaz tels que  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{CO}_2$  ou des particules comme les  $\text{PM}_{2.5}$  et  $\text{PM}_{10}$  dont la description est rappelée dans les paragraphes suivants (Seinfeld and Pandis, 2016).

- **Particule ou poussière en suspensions (PM)**

Deux types de particules se distinguent de par leur mode de formation. Les particules **primaires** sont émises directement dans l'air et sont majoritairement issues de combustions incomplètes liées aux activités industrielles ou domestiques. Elles peuvent aussi être émises par l'agriculture et peuvent être d'origine naturelle comme les pollens par exemple. Les particules **secondaires** sont, quant à elles, formées dans l'atmosphère par des réactions physicochimiques.

Ces particules sont classées en fonction de leurs tailles : **PM<sub>10</sub>** pour les particules de diamètre inférieur à  $10\ \mu\text{m}$  (retenues au niveau du nez et des voies respiratoires supérieures) et les **PM<sub>2.5</sub>**

pour les particules de diamètre inférieur à 2,5 µm qui sont capables de pénétrer dans les voies respiratoires jusqu'aux alvéoles pulmonaires et passer dans la circulation sanguine.

Ces particules peuvent avoir des effets néfastes pour la santé et sont responsables des salissures présentes sur les monuments.

- **Dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>)**

Le dioxyde de soufre est un gaz émis naturellement notamment lors d'éruptions volcaniques. Il est également produit de manière anthropique, à partir de la combustion d'énergie fossile comme le fioul, le charbon ou encore le gazole. Il peut aussi être un précurseur de la formation de particules secondaires en se combinant avec les oxydes d'azote.

Du point de vue de la santé publique, le dioxyde de soufre peut provoquer une irritation des muqueuses, de la peau et des voies respiratoires.

Il est impliqué dans les phénomènes de pluie acide (décrits plus bas) et de dégradation de la pierre.

- **Oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>)**

Les oxydes d'azotes regroupent le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>).

Dans la nature, les NO<sub>x</sub> peuvent être créés par les volcans et les éclairs. De plus, certains processus biologiques peuvent émettre du NO, notamment par la transformation de l'azote dans le sol.

En zone urbaine, les NO<sub>x</sub> sont issus des processus de combustion (chauffage, production d'électricité, moteur thermique des véhicules ...). L'utilisation d'engrais peut dans certaines localisations induire aussi une pollution très importante en NO<sub>x</sub>, devenant la source de pollution majoritaire. Les NO<sub>x</sub> peuvent réagir, dans l'atmosphère, avec d'autres polluants tels que les COV pour former de l'ozone troposphérique ou encore avec de l'ammoniac sous forme de particules secondaires.

Le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) est un gaz irritant pour les bronches et favorise les crises d'asthme et les infections pulmonaires.

La pollution aux NO<sub>x</sub> est responsable de l'acidification des milieux aquatiques et l'eutrophisation qui peut conduire à une réduction de la biodiversité dans les sols.

- **Composés organiques volatils (COV)**

Les COV se composent d'une très grande famille de molécules tels que le benzène, l'acétone, le perchloroéthylène ...

Dans les régions industrialisées, les COV deviennent une source de pollution prépondérante, pouvant réagir avec d'autres sources de pollution dans l'atmosphère. Ils sont, en présence de méthane et de NO<sub>x</sub>, les précurseurs de l'ozone, de particules secondaires ou encore de gaz à effet de serre.

Ils provoquent principalement des irritations, une diminution des capacités respiratoires et des nuisances olfactives. Certains d'entre eux peuvent être cancérigènes.

- **L'ozone (O<sub>3</sub>)**

L'ozone est un des gaz majoritaires et indispensables à la vie sur terre. Dans les hautes couches de l'atmosphère (stratosphère), il absorbe la grande majorité des rayons UV du soleil et protège la terre d'un rayonnement trop important. Dans les basses couches de l'atmosphère (troposphère), c'est un polluant nocif pour la santé humaine, animale et végétale de par son caractère oxydant.

Les épisodes de pollution à l'ozone ont principalement lieu en été, sur des périodes ensoleillées et caniculaires, avec très peu de vents.

L'ozone est par ailleurs un catalyseur de certaines réactions chimiques pouvant aggraver et accélérer l'effet d'autres polluants.

- **Ammoniac (NH<sub>3</sub>)**

Les pollutions à l'ammoniac sont principalement reliées aux activités agricoles. Du point de vue de la santé publique, c'est un gaz irritant pouvant brûler les yeux et les poumons.

Dans l'environnement, il provoque l'acidification et l'eutrophisation des eaux et des sols. En se combinant avec d'autres polluants, ils peuvent aussi former des particules fines secondaires.

- **Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)**

Les HAP sont principalement issus d'une combustion incomplète, de l'utilisation de solvant ou encore de produit de remplissage de réservoirs automobiles. Ils provoquent principalement des irritations, une diminution des capacités respiratoires et une nuisance olfactive. Ils ont un rôle de précurseur dans la formation d'ozone.

### 2.2.2. Influence de la pollution sur l'altération des pierres

Ces différents polluants atmosphériques peuvent se déposer sous forme de dépôt sec ou de dépôt humide quand ils sont incorporés dans les pluies (Massey, 1999).

Les dépôts humides consistent en l'incorporation des polluants atmosphériques à l'intérieur des gouttes de pluie par piégeage durant leur chute (Charola and Ware, 2002). Les dépôts humides causent principalement des **pluies acides** connues pour leurs actions altérantes, notamment pour les pierres carbonatées. L'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est le principal composant acide de la pluie avec dans de plus faibles proportions du HNO<sub>3</sub> et du HCl. La présence de fer et de manganèse joue un rôle de catalyseur dans la transformation du SO<sub>2</sub> en SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Hutchinson et al., 1993).

Les **dépôts secs**, par définition, se réalisent en l'absence de pluies. Ils vont être activés au contact de brume ou d'atmosphère saturée en humidité (Camuffo, 1986). Ils résultent du dépôt de tous les polluants vus précédemment : SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> ou bien encore de métaux lourds (Garnaud et al., 1999). Les dépôts secs peuvent être enlevés de la surface par lessivage pluvial. La bruine, le brouillard et la rosée ne retirent pas les dépôts secs de la surface des monuments, mais offrent assez d'humidité pour activer chimiquement les dépôts secs, attaquant plus la pierre que les pluies acides (Camuffo, 1991; Charola and Ware, 2002)

Pour conclure, les dépôts humides affectent seulement les surfaces exposées aux pluies, tandis que les dépôts secs affectent ensemble, toute la surface du monument (Camuffo et al., 1984, 1988). L'un des faciès d'altération du calcaire par la pollution atmosphérique le plus connus est la formation de croûte noire. Ces croûtes noires correspondent à une sulfatation du calcaire formant ainsi du gypse dans lequel des particules de type cendres volantes ont été incorporées lui donnant une couleur allant du gris au noir. La composition de ces croûtes est dépendante de la pollution atmosphérique environnante (Camuffo et al., 1983; Ausset et al. 1999; Saiz-Jimenez, 1999).

Des tests en laboratoire ont montré qu'en présence d'une atmosphère acide riche en sulfate, un gain de matière du calcaire était observé notamment par la formation de gypse en deux phases : tout d'abord par la dissolution de calcite présente dans le calcaire puis la substitution de l'ion  $\text{CO}_3^{2-}$  par le  $\text{SO}_4^{2-}$  formant ainsi du gypse. Dans le cas d'un contact direct entre une solution sulfatée acide, l'effet principal sur la pierre est une perte de matière par dissolution de la calcite (Gibeaux et al., 2018).

### 2.2.3. Pollution à Paris : l'historique

Les pollutions atmosphériques sont mentionnées dès l'Antiquité. Elles sont notamment décrites au Royaume-Uni (Brimblecombe, 2012). Du XII<sup>ème</sup> au XV<sup>ème</sup> siècle, la pollution atmosphérique de Londres était induite par la combustion de charbon de mer (mines localisées sous la Manche) qui libérait des fumées si toxiques que beaucoup de londoniens présentaient des pathologies pulmonaires allant de la toux à l'asphyxie (Brake, 1975; Outram and Fishman, 2006). N'ayant pas de données aussi anciennes concernant les concentrations en  $\text{SO}_2$  à Paris, Brimblecombe et Lefèvre en 2021 ont estimé les concentrations potentielles de différents polluants à partir des données de Londres, en supposant que Paris utilisait moins de charbon. Suivant ce modèle, une augmentation du  $\text{SO}_2$  et des  $\text{PM}_{10}$  est visible en deux temps entre 1650 et 1875 puis de 1875 à 1950. La deuxième période correspond au début des importations de combustible à Paris (Figure 3).

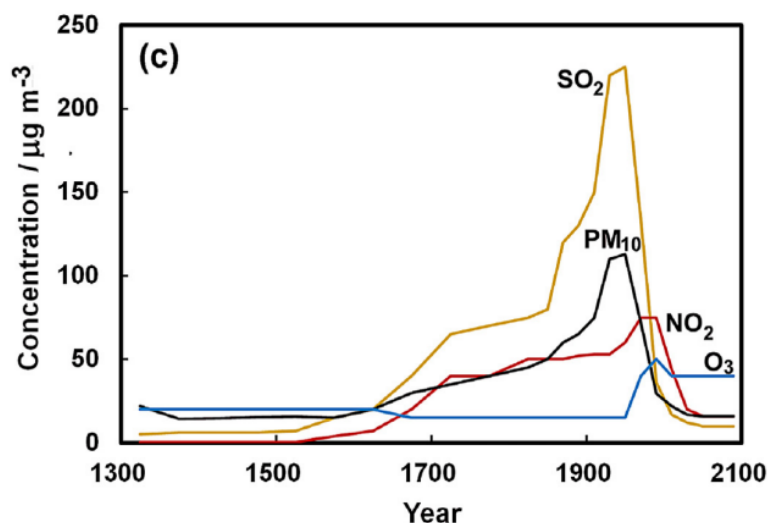


Figure 3: Estimation de l'évolution des différents polluants atmosphériques à Paris (Brimblecombe and Lefèvre, 2021).

L'attention sur la pollution atmosphérique s'est portée au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle sur les différents épisodes mortels de SMOG (Meuse 1930, Pennsylvanie 1948 et Londres 1952). Depuis les



années 1950, les pouvoirs publics ont cherché à réduire drastiquement les concentrations en SO<sub>2</sub> atmosphérique, avec succès (Figure 4). Depuis 2008, les concentrations en SO<sub>2</sub> sont en dessous des limites de détection des analyseurs, et ne font plus partie des objectifs à atteindre en termes de qualité de l'air.

D'autres polluants tels que le NO<sub>x</sub> et les PM sont cependant toujours surveillés. Les normes européennes fixent des seuils de concentration annuelle à 40 µg.m<sup>-3</sup> et 50 µg.m<sup>-3</sup> respectivement pour les NO<sub>2</sub> et les PM<sub>10</sub>. En 2019, la France a notamment été condamnée par la Cour de justice européenne pour non-respect des normes en termes de qualité de l'air pour « dépassement de manière systématique et persistant » des valeurs seuil en NO<sub>2</sub>, ainsi qu'en avril 2022 pour les mêmes faits, cette fois-ci pour les PM<sub>10</sub> ([https://www.citepa.org/fr/2022\\_05\\_a06/](https://www.citepa.org/fr/2022_05_a06/)).

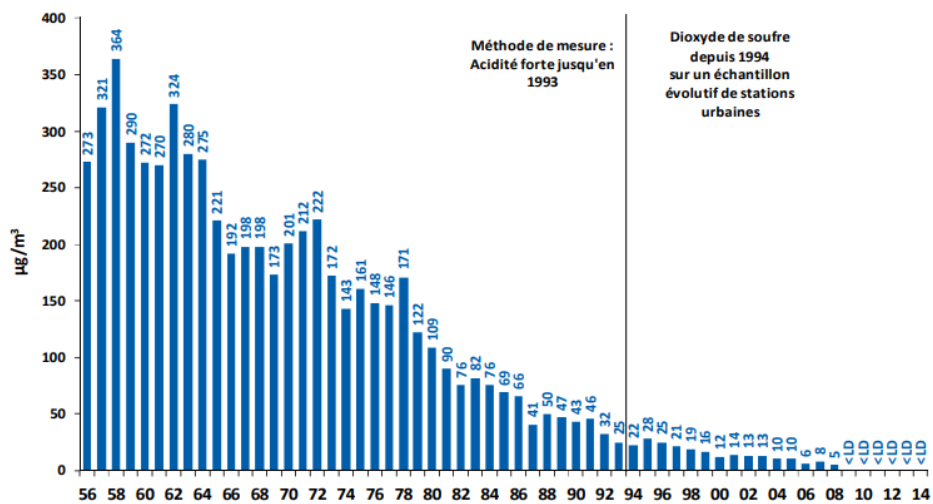


Figure 4 : Evolution de la concentration en SO<sub>2</sub> hivernal à Paris entre 1952 et 2014 (AIRPARIF, 2020)

### 2.3. Agents biologiques dans l'altération des pierres

Avant de décrire les microorganismes impliqués dans l'altération des pierres, il est important de définir certains termes, notamment le « type trophique ». Le « type trophique » correspond aux différentes sources d'énergie utilisées par les microorganismes comme nutriments afin de produire leurs propres matières organiques. Les différents types trophiques sont décrits dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents types trophiques.

Classe du besoin	Nature du besoin	Type trophique
Source d'énergie	lumineuse	phototrophie
	chimique	chimiotrophie
Substrat énergétique	minéral	lithotrophie
	organique	organotrophie
Source de carbone	CO <sub>2</sub> (minérale)	autotrophie
	organique	hétérotrophie
Facteurs de croissance	non indispensables	prototrophie
	indispensables	auxotrophie

Les microorganismes photosynthétiques utilisent la lumière comme sources d'énergie. Ils correspondent principalement aux algues et aux cyanobactéries, mais certaines espèces bactériennes sont tout de même en capacité de réaliser la photosynthèse. De plus les algues et cyanobactéries utilisent les composés azotés pour leurs croissances.

Les microorganismes synthétiques ou « chimiotrophe » utilise des composés chimiques pour produire leur énergie. C'est notamment le cas des bactéries impliqué dans le cycle de l'azote et du carbone (décrit plus bas).

Différents microorganismes sont fréquemment retrouvés sur les pierres calcaires. Ce sont principalement :

- **Les bactéries** sont des organismes extrêmement diversifiés et ubiquistes. Elles peuvent être classées en deux catégories suivant le type de carbone qu'elles utilisent : les autotrophes et les hétérotrophes. Les bactéries autotrophes vont avoir la particularité de produire de la matière organique à partir de composés inorganiques (comme le  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ...), tandis que les hétérotrophes vont utiliser du carbone organique préexistant. Les bactéries autotrophes peuvent utiliser les composés minéraux des pierres de construction comme source d'énergie au cours de différents cycles de transformation : cycle de l'azote, du soufre, du manganèse et du fer (Martinet and Quénée, 2008). Ces cycles vont permettre la formation de différents sels solubles comme le gypse (cycle du soufre) ou bien encore les nitrates de potassium (cycle de l'azote). L'altération chromatique d'un monument en pierre peut être due à l'action de certaines bactéries capables d'oxyder le fer ou bien encore le manganèse.

Les bactéries sont également capables de produire différents acides qui vont accentuer les phénomènes d'altération en fonction de l'espèce et bien sûr de leur type trophique. Pratiquement toutes les bactéries sont capables d'assimiler l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) ou les sels d'ammonium. Quelques-unes peuvent utiliser les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) ou même l'azote organique (ex : acides aminés). Par exemple, les bactéries qui interviennent dans le cycle de l'azote (Figure 5) sont capables de produire de l'acide nitrique.

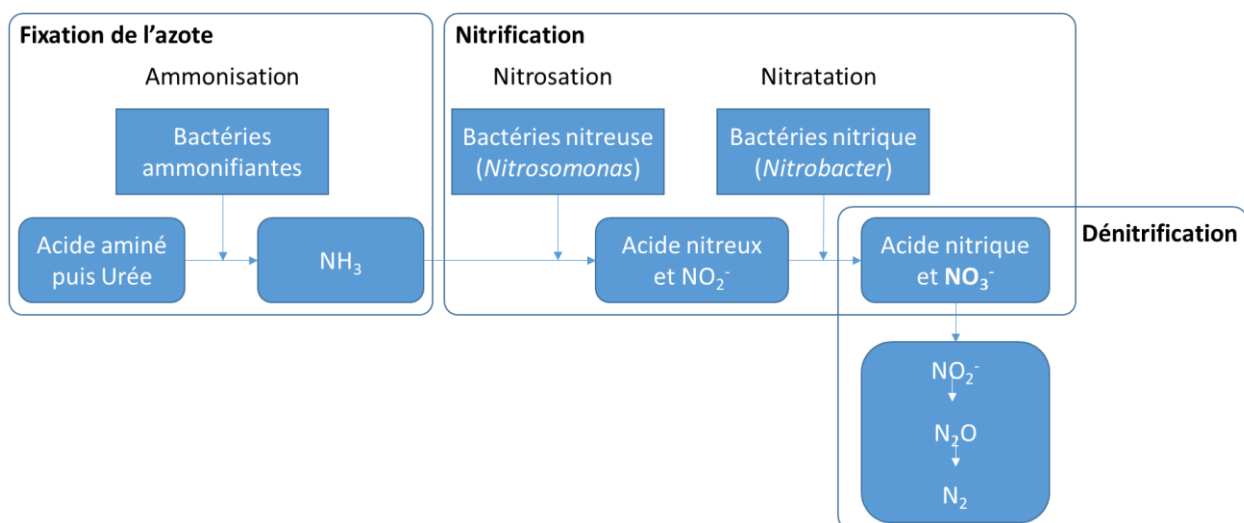


Figure 5: Schéma du cycle de l'azote et des microorganismes impliqués.

Le phénomène de nitrification est réalisé par les bactéries nitrifiantes. La nitrification entraîne la bio-détérioration du calcaire par l'acide nitrique ainsi qu'un enrichissement en nitrate du calcaire (Mansch and Bock, 1998).

Les bactéries hétérotrophes, quant à elles, vont cataboliser le carbone organique présent autour d'elles et peuvent sécréter après fermentation ou respiration, différents acides organiques comme notamment l'acide oxalique qui peut d'une part altérer la pierre par son acidité et d'autre part entraîner la formation d'oxalate de calcium (Martinet and Quénée, 2008). Ces acides organiques sont produits par différentes voies métaboliques comme le cycle de Krebs (Gottschalk, 1986).

- **Les algues** sont des organismes photosynthétiques unicellulaires nécessitant un fort taux d'humidité ou la présence d'eau stagnante pour se développer. Il existe plusieurs types d'algues : rouges, vertes... Ces dernières vont généralement se développer sous forme de biofilm alguaire à la surface des monuments. Étant produits par des organismes photosynthétiques, les biofilms formés vont apparaître colorés : de couleur verte pour les algues produisant de la chlorophylle à des teintes rouge orangé pour les algues produisant des pigments de type caroténoïde. Les algues au même titre que les bactéries sont considérées comme les premiers colonisateurs du milieu. En effet, elles vont se développer à la surface de la pierre dans les premières semaines d'exposition.

- **Les cyanobactéries** sont des organismes photosynthétiques, pouvant vivre sous des conditions extrêmes. Elles se développent préférentiellement dans les environnements pollués sous forme de biofilms et, comme les algues, dans des milieux riches en nutriments avec un fort taux d'humidité (Ortega-Calvo et al., 1991; Gaylarde, 2020). Il existe plusieurs types de cyanobactéries et un certain nombre d'entre elles sont capables de fixer l'azote atmosphérique (Carr and Whitton, 1982) notamment en environnement pollué.

- **Les champignons** sont des organismes microscopiques, nécessitant des apports organiques (hétérotrophes) et pouvant se développer sur des pierres en association. Les champignons ont la capacité à produire des enzymes qui en combinaison avec les acides organiques peuvent former des oxalates de calcium, responsables d'une patine brunâtre sur le calcaire (Martinet and Quénée, 2008). Ils peuvent conjointement altérer la pierre par action mécanique grâce à leurs hyphes qui pénètrent dans l'espace intergranulaire des pierres.

Deux grands types de champignons sont décrits dans la littérature, les hyphomycètes et les « black fungi »

Les hyphomycètes sont principalement des champignons présents dans l'air, pouvant établir leurs hyphes dans le réseau poreux de la pierre. Ils se retrouvent principalement dans les climats modérés à humides. Les principaux genres représentant les hyphomycètes sont : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Aureobasidium*, *Ulocladium* et *Phoma* (Scheerer et al., 2009; Sterflinger, 2010; Sterflinger and Piñar, 2013; Pinheiro et al., 2019).

Le terme « black fungi » (BF) dans la littérature regroupe de nombreux micro-champignons, ils peuvent avoir aussi d'autres appellations tels que « merisimatic fungi » ou encore « micro colonial fungi ». Ils ne sont pas reliés à un groupe phylogénétique, mais présentent une caractéristique commune, la présence de mélatonine dans leurs cellules, leur donnant leur couleur brune à noir (Hoog and Figueras, 1996; De Leo et al., 2022). Les « black fungi » sont des microorganismes ubiquistes, reconnus comme faisant partie des microorganismes pionniers dans la colonisation des monuments en pierre carbonatée et comme étant un des premiers types de microorganismes recolonisant les monuments après leurs nettoyages ou leur restauration. Dans les climats plutôt arides à semi-arides, les communautés fongiques sont plutôt composées de levures noires et des champignons formant des microcolonies, et notamment des genres *Hortaea*, *Sarcinomyces*,

*Conosporium*, *Capnobotryella*, *Exophiala*, *Knufia* et *Trimmatostroma* (Sterflinger, 2010; Pinheiro et al., 2019).

- **Les lichens** correspondent à une symbiose entre un champignon/moisissure et une algue ou une cyanobactérie. Ils se développent sur tout type de pierre et peuvent donner des aspects colorés. Il existe deux types de lichens : les foliacés (macrolichens) et les crustacés (microlichens) (Martinet and Quénée, 2008).

La majorité des lichens étudiés dans l'altération de la pierre sont principalement des lichens épilithiques (qui vivent en surface). Les thalles des lichens épilithiques sont principalement localisés en surface, mais leurs hyphes se développent en pénétrant le réseau poreux de la roche (Salvadori and Municchia, 2016).

- **Les mousses** se développent sur des zones constamment ou très souvent humides ou ombragées. Leur appareil racinaire (rhizoïdes) qui peut apporter de la matière organique et créer une sorte de microsol à la surface de la pierre.

### 3. Bio-détérioration

La bio-détérioration est définie comme étant une altération provoquée par les organismes vivants. Les organismes causent principalement des changements esthétiques, mais ils peuvent aussi induire des altérations chimiques et physiques, notamment par des sécrétions de métabolites ou encore par la pénétration d'hyphes dans le réseau poreux de la pierre.

D'après Sterflinger and Piñar (2013), la bio-détérioration des matériaux du patrimoine est dépendante de trois facteurs :

- la composition chimique et la nature du matériau
- le climat et l'exposition du matériau
- le mode et la fréquence du nettoyage du matériau.

#### 3.1. La colonisation biologique

La colonisation biologique est régie par deux principaux facteurs : les conditions climatiques environnantes et le principe de bio-réceptivité, défini par Guillitte (1995) comme la capacité d'un matériau à être colonisé par des organismes vivants. Les propriétés physico-chimiques de la pierre incluant sa porosité, sa rugosité, ou encore sa minéralogie sont les premiers facteurs déterminant son aptitude à être colonisée par les organismes (Guillitte, 1995; Miller et al., 2012; Favero-Longo and Viles, 2020). L'étude en laboratoire menée par Dias et al., 2023 a montré que les roches ayant une porosité ouverte plus importante étaient plus susceptibles d'être colonisées par des microorganismes endolithiques (en profondeur dans la roche). À contrario, une roche ayant une plus faible porosité ouverte était plus susceptible d'être colonisée par des microorganismes épilithiques (en surface) formant un biofilm.

La colonisation biologique visible débute principalement par les microorganismes phototrophes (tels que les microalgues ou les cyanobactéries) qui vont former un biofilm. La formation d'un biofilm se déroule en quatre étapes : (1) fixation des microorganismes à la surface de la pierre, (2) formation des micro-colonies, (3) développement et maturation du biofilm, et enfin (4) dispersion des cellules dans l'environnement proche (Scheerer et al., 2009; Negi and Sarethy, 2019).

Les microorganismes phototrophes (algues, cyanobactéries, bactéries) initient donc la colonisation biologique en formant un biofilm, utilisant la pierre comme substrat et sécrétant des polysaccharides formant une couche d'exopolysaccharide (EPS) facilitant l'accrochage des cellules à la surface de la pierre (Scheerer et al., 2009; Miller et al., 2012).

Les microorganismes chimiolithotrophes et hétérotrophes s'implantent au sein des biofilms formés utilisant la matière organique présente comme source d'énergie (Th. Warscheid and Braams, 2000; Scheerer et al., 2009; Negi and Sarethy, 2019; Ding et al., 2021).

Cependant les espèces et la succession biologique va être différentes selon son substrat et de l'environnement dans lequel elle évolue.

Le développement de biofilm peut être assez rapide. Des expérimentations en laboratoire sur les premiers stades de colonisation biologique ont montré la présence d'un biofilm après seulement un mois d'exposition. Ce biofilm est notamment composé des genres *Chlorella*, *Stichococcus*, *Trebouxia* et *Myrmecia* pour les Chlorophytes et des genres *Pleurocapsa* et *Leptolyngbya* pour les cyanobactéries (Miller et al., 2008).

La colonisation biologique par des microorganismes hétérotrophes est tout de même possible sans intervention de microorganismes phototrophes. Les microorganismes hétérotrophes vont utiliser des substrats organiques provenant de particules, de vapeur organique présente dans l'air ou encore de la matière organique naturellement présente dans la roche (Th. Warscheid and Braams, 2000; Scheerer et al., 2009)

### 3.2. Les mécanismes de bio-détérioration

#### 3.2.1. Changement chromatique

Le changement de couleur est un problème esthétique récurrent dans l'altération des monuments historiques. Ce changement peut être induit par différents microorganismes et est principalement dû aux pigments relâchés et/ou contenus dans leurs cellules (Th. Warscheid and Braams, 2000; Scheerer et al., 2009).

Les algues et les cyanobactéries provoquent de fortes variations chromatiques liées à la présence de pigments au sein de leurs cellules telles que la chlorophylle, le caroténoïde, la phycobiline, la mycosporine et la scytonemine. Gaylarde (2020) présente dans ses travaux une synthèse des différents pigments contenus dans les algues et les cyanobactéries, leurs fonctions biologiques et leurs couleurs résultantes (Tableau 4).

Tableau 4: Principaux pigments identifiés dans la littérature, pour les algues et les cyanobactéries, fonctions biologiques et couleurs associées (d'après Gaylarde, 2020)

Pigments	Fonction biologique	Couleurs associées
Chlorophylle	Absorption de la lumière pour la production d'énergie (photosynthèse)	Vert
Caroténoïde	Pigment accessoire, absorption de la lumière, photo protection	Orange, rouge, jaune, marron
Phycobiline	Pigment accessoire, récolte la lumière	Bleu, rouge
Acide aminé analogue de la Mycosporine	Protection UV	Marron foncé

Scytonemine

Protection UV

Marron foncé à rouge

La présence d'algues sur les monuments en pierre induit principalement des colorations vertes à cause de la présence de chlorophylle. Mais certaines algues, telles que *Trentepohlia*, produisent une pigmentation rouge apportée par le caroténoïde (Scheerer et al., 2009; Gaylarde et al., 2017)

Les champignons, notamment les « black fungi » contiennent dans leurs cellules de la mélatonine se traduisant par une couleur sombre allant du brun au noir (Hoog and Figueras, 1996; De Leo et al., 2022).

Mais les variations chromatiques n'ont pas que des conséquences esthétiques. Elles peuvent entraîner une absorption plus importante de lumière du soleil, engendrant des stress thermiques et donc une altération physique de la pierre (Scheerer et al., 2009).

### 3.2.2. Altération physique

Les champignons hyphomycètes insèrent leurs hyphes dans le réseau poreux de la pierre, entraînant une altération physique par éclatement (Scheerer et al., 2009; Sterflinger, 2010; Sterflinger and Piñar, 2013; Pinheiro et al., 2019)

Les champignons, de type « black fungi » pénètrent dans les espaces microcristallins contribuant à la perte et au détachement des cristaux entraînant la formation de petits cratères appelés « bio-pitting ». Ces derniers peuvent atteindre jusqu'à 2 cm de diamètre et pénètrent profondément dans la pierre. Ces puits se forment principalement dans le calcaire et dans le marbre. Les différences morphologiques de ces « bio-pitting » identifiées par Sterflinger et Krumbein (1997) sont dépendantes des variations de cohésion existantes au sein de la roche.

Les « bio-pitting » se forment suivant les étapes suivantes (Sterflinger and Krumbein, 1997):

- **Pré-pénétration** : lorsque les cellules fongiques atteignent le substratum, les zones de contact entre les cristaux, qui correspondent à des zones de faiblesse contrôlées par la cristallographie, peuvent être vulnérables à l'infection biologique.
- **Pénétration** des hyphes à l'intérieur de la roche.
- **Post-pénétration** : les hyphes suivent les fissures et les cavités présentes au sein de la roche jusqu'aux creux internes où une nouvelle colonie fongique commence à se développer.

L'altération physique des lichens est principalement induite par différents facteurs tels que la pression exercée par l'extension de compression du thalle, l'adhésion des rhizines dans le réseau poreux et la pénétration des hyphes (Salvadori and Municchia, 2016; Gaylarde, 2020).

### 3.2.3. Acides inorganiques

Les microorganismes peuvent produire des acides organiques et inorganiques pouvant altérer le calcaire. Les microorganismes impliqués dans le cycle de l'azote et du soufre sécrètent notamment respectivement de l'acide nitrique et de l'acide sulfurique.

L'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) est principalement produit par les bactéries intervenant dans le cycle de l'azote, comme les bactéries nitrifiantes appartenant aux genres *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosospira* et *Nitrobacter*. Leurs sources d'énergie sont l'ammonium, l'urée, les

nitrites et les oxydes d'azotes. Ces microorganismes peuvent croître sur la pierre fixant le CO<sub>2</sub> via le cycle de Calvin (Sand and Bock, 1991; Sand, 1997). Kauffman en 1952, dans ses travaux, a été l'un des premiers à montrer l'implication des bactéries nitrifiantes dans la bio-détérioration des monuments français. Le phénomène de nitrification entraîne la bio-détérioration du calcaire par l'acide nitrique ainsi qu'un enrichissement en nitrates du calcaire (Mansch and Bock, 1998). L'étude de Mansch and Bock, 1996 a montré que l'acide nitrique bio-formé est huit fois plus néfaste que la dégradation induite par un smog.

L'attaque par l'acide sulfurique bio formé est très largement citée dans la littérature comme induisant une bio-détérioration des pierres (Sand and Bock, 1991; Th. Warscheid and Braams, 2000; Scheerer et al., 2009). Elle est principalement réalisée par les bactéries sulfato-oxydantes telles que *Thiobacillus thiooxydans*, une bactérie aérobie qui peut oxyder le soufre et certains composés sulfureux incomplètement oxydés, en donnant de l'acide sulfurique.

### 3.2.4. Acides organiques

La sécrétion d'acides organiques est liée à la dégradation d'une source de carbone par les voies métaboliques des microorganismes, tels que le cycle de Krebs. La majorité des acides organiques formés et secrétés dans le milieu durant le cycle métabolique, sont liés à la dégradation d'une source de carbone. Certains composants organiques apparaissent en fin de cycle métabolique comme c'est le cas pour l'acide acétique produit par certains microorganismes sulfato-réducteurs ou par les bactéries acétiques (Sand, 1997).

La majorité des organismes endolithiques produisent des acides organiques. Ces derniers peuvent aussi être secrétés à la pointe des racines des plantes. Dans la littérature, différents acides organiques sont identifiés comme étant impliqués dans la bio-détérioration des monuments en pierre comme les acides oxalique, citrique, malique, malonique, acétique, lactique (Th. Warscheid and Braams, 2000; Scheerer et al., 2009; Pinheiro et al., 2019).

La plupart des études se focalisent sur l'acide oxalique produit par les champignons et les lichens. L'acide oxalique secrété par ces microorganismes est responsable de néo-cristallisations d'oxalates de calcium (Scheerer et al., 2009; Gaylarde, 2020).

Ces oxalates de calcium comme la whewellite et la weddelite sont les sels les plus communément produits biominéralogiquement. Ils se forment et se déposent de manière extracellulaire entre les hyphes. Ils peuvent aussi cristalliser dans différentes parties des lichens épilithiques, en fonction des espèces : seulement à la surface du thalle, à la surface et dans le thalle ou dans la totalité du thalle, y compris en profondeur jusqu'à la cellule atteinte par les hyphes.

## 4. Synergie entre les différents agents d'altération

### 4.1. Climat et Microorganismes

Ces travaux de thèse s'intéressent principalement aux microorganismes présents à la surface du calcaire en région parisienne (climat tempéré). Cependant chaque microorganisme possède des conditions de croissances optimales qui peuvent être induites par le climat dans lequel ils évoluent.

Le climat est défini comme un ensemble de conditions atmosphériques et météorologiques (humidité, pression atmosphérique, température ...) propres à une région. L'apport en eau (issue

des pluies ou de l'humidité relative) est le facteur le plus important en matière de colonisation biologique (Gaylarde, 2020).

Une grande quantité d'eau, transportée par capillarité dans les roches, influence positivement la bio-réceptivité pour les premiers colonisateurs phototrophes (Miller et al., 2017).

La température est l'un des facteurs les plus déterminants en termes de colonisation biologique, pouvant affecter le taux d'humidité de surface, notamment en extérieur où la température est intimement liée au soleil et donc au rayonnement UV (Gaylarde, 2020).

Cette partie correspond donc à un état des lieux (exostif) des microorganismes retrouvés à la surface des pierres en fonction de cinq climats régionaux. La classification de Köppen-Geiger (Figure 6) est une classification des climats essentiellement fondée sur les régimes de précipitations et de température de chaque région.

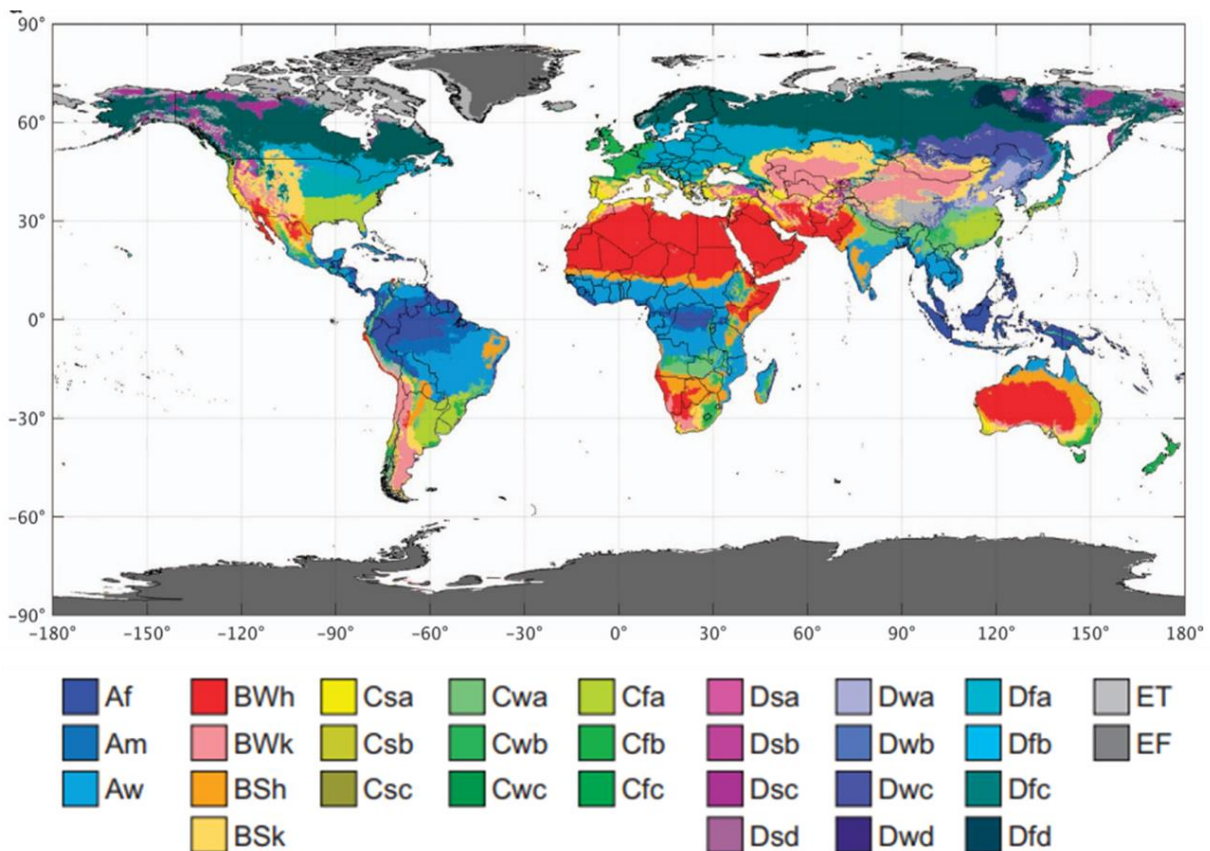


Figure 6: Classification de Köppen-Geiger sur la période 1980-2016 (Beck et al., 2018).

Cette revue bibliographique se concentre exclusivement sur les microorganismes pionniers tels que les algues, les cyanobactéries, les champignons et les bactéries. Cependant, il est essentiel de souligner que d'autres organismes vivants, comme les mousses, les lichens et les plantes, jouent également un rôle important dans l'altération des pierres.

Les microorganismes mentionnés dans cette étude ont été principalement identifiés par deux méthodes :



- L'isolement de souches pures sur milieu de culture solide ou liquide, suivi du séquençage des souches isolées.
- Le séquençage de l'ADN de l'ensemble des microorganismes présents dans un échantillon, une méthode ayant pris plusieurs appellations au fil du temps (pyroséquençage, séquençage à haut débit ou séquençage de nouvelle génération - NGS).

Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients. La méthode d'isolement permet de sélectionner uniquement les microorganismes vivants (ou les spores en dormance capables de se développer dans des conditions favorables), qui sont aptes à utiliser les nutriments du milieu de culture. Cependant, cela ne représente qu'environ 1 % des microorganismes d'une communauté microbienne donnée. Le principal avantage de cette méthode est qu'elle permet de réaliser des tests sur des souches pures, notamment des tests de biodégradation des pierres.

La méthode de séquençage de l'ADN total d'un échantillon (comme le NGS) permet une identification plus exhaustive des microorganismes présents, en prenant en compte l'ADN des microorganismes vivants ainsi que celui des microorganismes morts. Toutefois, elle ne permet pas de réaliser des tests de biodégradation, et l'identification des microorganismes est limitée par les bases de données utilisées pour l'affiliation taxonomique des séquences. Ces bases de données étant en constante évolution, des modifications futures dans l'affiliation taxonomique des séquences étudiées sont possibles.

De nouvelles méthodes d'analyse de l'ADN ont émergé récemment, notamment l'étude du génome complet des différents microorganismes présents dans un échantillon. Cette approche diffère du NGS, qui se base sur des fragments d'ADN pour l'identification des microorganismes. L'analyse du génome entier ouvre la voie à de nouvelles avancées, notamment dans la compréhension des gènes impliqués dans des processus tels que l'altération des pierres.

### • **Le climat tropical à subtropical**

Sous climats subtropicaux à tropical (classification de Köppen-Geiger : Af, Am et Aw, Figure 6), tels qu'en Asie du sud-est et en Amérique du Sud et centrale, l'année est scindée en deux saisons : la saison sèche et la saison humide. Les températures mensuelles sont généralement supérieures à 18°C, et sont soumises à de grandes quantités de précipitations notamment durant la mousson (ou saison des pluies). Dans ces régions, la présence d'eau en grande quantité, la forte humidité relative ainsi que l'ensoleillement permettent la croissance active des microorganismes sur les monuments historiques en pierre (Liu et al., 2018; Zhang et al., 2019).

La méta-analyse réalisée par Ortega-Morales et al., 2019 a mis en évidence que les phototrophes, et notamment les cyanobactéries, sont très différentes dans les climats tropicaux à subtropicaux par rapport aux climats plus tempérés. Dans ces régions, notamment en Inde, les cyanobactéries identifiées appartiennent principalement aux genres *Scytonema* et *Tolypothrix*, qui sont riches en pigments protecteurs vis-à-vis du stress environnemental tels que la scytonémine, le caroténoïde ou encore en acides aminés analogues à la mycosporine (Keshari and Adhikary, 2013). Au Cambodge, sur le monument d'Angkor Wat, les cyanobactéries composent la majorité de la population retrouvée, avec les genres *Chroococcidiopsis*, *Microcoleus*, *Leptolyngbya*, *Scytonema* (Gaylarde et al., 2012). Les microorganismes phototrophes retrouvés sur les sites Maya de

Hormiguero, Chicanná et Becánde appartiennent aux genres *Gloeocapsa* (Cyanobactérie) et *Trentepohlia* (algue verte)(Ortega-Morales et al., 2013).

Dans les régions tropicales à subtropicales, la diversité des microorganismes phototrophes est dominée par les cyanobactéries qui sont plus résistantes aux effets de dessiccation, à la température ou encore au rayonnement UV que les algues. La présence de pigments au sein de ces microorganismes leur accorde une capacité de protection durant les périodes sèches où ils sont soumis aux fortes conditions de rayonnement UV et de température. Ces pigments, contenus dans les biofilms, induisent donc une forte altération chromatique des monuments historiques. Les biofilms absorbant plus d'UV dans ces régions peuvent aussi causer un stress physique à la roche liée au changement de température qui entraîne des dilatations et contractions du biofilm (Gaylarde, 2020). La diversité ainsi que la croissance des microorganismes phototrophes sont principalement favorisées durant la saison des pluies (Adhikary et al., 2015; Ortega-Morales et al., 2019).

Les champignons les plus fréquemment retrouvés sous ces climats (Mexique, Inde et Thaïlande) correspondent aux genres *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Aspergillus* (De La Rosa-García et al., 2011; Biswas et al., 2013; Ortega-Morales et al., 2016; Zhang et al., 2019; Agrawal et al., 2023; Nonthijun et al., 2023). Les genres *Aspergillus* et *Cladosporium* ont par ailleurs montré une grande capacité à dissoudre le calcium en boîte de Petri et à relarguer de grandes quantités d'acide fumarique (Agrawal et al., 2023).

L'étude de Nonthijun et al., 2023, dans la région de Chiang Mai en Thaïlande, a montré que les communautés fongiques sont très différentes entre les saisons sèches et humides. Par ailleurs, la diversité fongique durant la saison sèche est plus importante qu'en saison humide. Ainsi, les Capnodiales, les Cladophialora et les Hypocreales sont plus présents en saison sèche, alors que le *Fusarium*, *Trichoderma* et Nectriceae sont identifiés en saison humide.

Du point de vue des bactéries, la majorité des études concernent principalement leurs impacts en termes de bio-détérioration en milieu pollué. Cependant, quelques études montrent une prédominance des Actinobacteria, sous climat tropical à subtropical. Les genres représentés sont *Kocuria*, *Modestobacter*, *Georgenia*, *Cellulomonas*, *Micrococcus* et *Staphylococcus* (Biswas et al., 2013; Gaylarde et al., 2017). Les Actinobacteria sont des bactéries résistantes au stress environnemental, qui sont capables de survivre et de croître à des températures élevées.

### • **Le climat sec : désertique et de steppe**

Le climat sec (classement de Koppen-Geiger BWh, BWk, BSh et BSk, Figure 6) regroupe deux types de climats : désertique et climat de steppe avec la présence de grandes prairies se localisant principalement aux bordures des déserts. Ces climats peuvent atteindre des températures extrêmement chaudes en journée et très froides la nuit ; la pluviométrie y est également très faible.

Sous climat désertique chaud ou froid (désert de Taklimakan en Chine, désert d'Atacama au Chili, désert du Namib en Namibie, Pamir au Tadjikistan), les microorganismes photosynthétiques sont très majoritairement des cyanobactéries appartenant au genre *Chroococcidiopsis* (Friedmann, 1980; Warren-Rhodes et al., 2006; Makhalyane et al., 2013; Khomutovska et al., 2017; Lacap-Bugler et al., 2017; Nir et al., 2019). D'autres genres ont aussi été identifiés dans de plus faibles proportions tels que les genres *Microcoleus*, *Nostoc*, *Leptolyngbya* et *Phormidium* (Warren-Rhodes et al., 2006; Lacap-Bugler et al., 2017; Nir et al., 2019). La croissance des cyanobactéries

dans ces lieux ayant de faibles précipitations (inférieures à 5 mm.an<sup>-1</sup>) à l'absence totale de précipitations durant plusieurs années, est principalement reliée à des localisations où le brouillard et la rosée sont importants (Warren-Rhodes et al., 2006).

Les champignons, et principalement les black fungi ou merismatic fungi (MCF) sont particulièrement bien représentés notamment grâce à leur capacité de survie et d'adaptation importante. Ils sont connus pour leur résistance aux stress environnementaux, tels que le fort rayonnement solaire, la radioactivité, la dessiccation (Sterflinger et al., 2012). Taxonomiquement, les MCF sont des Ascomycètes, appartenant aux ordres des Chaetothyriales, Dothideales, et Capnodiales. Les champignons issus de ces climats ne produisent pas usuellement d'acides organiques, mais montrent une pigmentation brune à noire due à la mélanine (Salvadori and Municchia, 2016). Les genres suivants ont été identifiés à de nombreuses reprises sous climats arides (désert du Negev en Israël, désert en Arizona aux USA, ou encore en Arabie Saoudite ou en Libye) : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Coniosporium*, *Hormonema*, *Hortaea*, *Lichenothelia*, *Phaeotheca*, *Phoma*, *Sarcinomyces*, *Trimmatostroma*, *Ulocladium*, *Cladophialophora*, *Leptosphaerulina*, *Eupenicillium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Ascobolus*, *Monodictys*, *Periconia* et *Gilberella* (Gorbushina et al., 1993; Sterflinger, 1995; Wollenzien et al., 1995; Diakumaku, 1996; De Leo et al., 1999; Sterflinger, 2000; Conley et al., 2006; Sterflinger et al., 2012; Alotaibi et al., 2020).

La diversité bactérienne, sous climat désertique, est principalement constituée des phyla suivants : Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Bacillus et Chloroflexi (Essoussi et al., 2012; An et al., 2013; Nir et al., 2019; Wu et al., 2021; Bahadur et al., 2021, 2022).

Dans les déserts froids (classification de Köppen-Geiger BWk et BSk, Figure 6), tels que les déserts de Gobi, Taklamakan ou encore le plateau Qinghai-Tibet, les genres retrouvés majoritairement sont : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rubrobacter*, *Effluviibacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Flavisolibacter*, *Salinimicrobium*, *Lactococcus*, *Pontibacter*, *Streptomonospora* (An et al., 2013; Bahadur et al., 2022, 2021)

Dans les déserts chauds (classification de Köppen-Geiger BWh et BSh, Figure 6), tels que les déserts de Negev, Sahara, en Arabie Saoudite, en Égypte ou du Namib, les genres retrouvés majoritairement sont : *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Massilia*, *Microverga*, *Streptomyces*, *Protaetiibacter*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Lechevalieria*, *Actinoplana*, *Micromonospora*, *Kineococcus*, *Nocardia* (Essoussi et al., 2012; ElBaghdady et al., 2019; Nir et al., 2019; Alotaibi et al., 2020; Genderjahn et al., 2021).

Dans le désert du Negev en Israël (désert chaud), aucun effet saisonnier sur les communautés bactériennes n'a été identifié (Nir et al., 2019), tandis que sur le plateau tibétain (désert froid), un effet saisonnier a été identifié avec une prédominance des Proteobacteria et des Firmicutes en été ainsi qu'une prédominance des cyanobactéries en hiver (Wu et al., 2021).

### • Le climat tempéré

Le climat tempéré (classification de Köppen-Geiger Csa, Csb, Csc (saison sèche en été), Cwa, Cwb, Cwc (Saison sèche en hiver), Cfa, Cfb et Cfc (climat humide), Figure 6) est le type de climat majoritaire dans l'ouest de l'Europe, la partie nord-méditerranéenne, au sud-est des États-Unis, au sud-est de l'Amérique latine ainsi qu'au sud et à l'est du plateau tibétain.

Très peu d'études ont été réalisées sur la diversité microbienne des climats tempérés de type Cw (saison sèche en hiver), que l'on peut retrouver au Népal ainsi qu'à l'est de la Chine. C'est pour cela que la suite de l'état des connaissances se portera sur les climats tempérés avec saison sèche en été (Cs) et les climats tempérés humides (Cf).

Le **climat tempéré avec été sec (Cs)** est principalement localisé sur le pourtour méditerranéen. De nombreuses études portant sur les diversités microbiennes présentes sur les monuments historiques en pierres ont été réalisées en Espagne, au Portugal ainsi que dans le sud de l'Italie.

Contrairement aux climats décrits précédemment, la diversité des microorganismes phototrophes est très importante sous climat tempéré. Elle est notamment due à une présence importante d'algues vertes, qui nécessite un apport important en eau, ainsi qu'à de nombreuses cyanobactéries.

Les algues identifiées sur les monuments en pierre autour de la Méditerranée, appartiennent notamment aux genres : *Chlorococcum*, *Chlorella*, *Stichococcus*, *Klebsormidium*, *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Myrmecia*, *Cosmarium* et *Symploca*. Les genres *Klebsormidium*, *Trebouxia* et *Trentepohlia* ont été décrits comme participant au processus de lichenisation, et les genres *Cosmarium* et *Symploca* sont considérés comme des destructeurs majeurs du calcaire utilisé dans l'ornement de la fontaine de Bibatauin à Grenade en Espagne (Macedo et al., 2009; Dakal and Cameotra, 2012; Pinheiro et al., 2019).

Dans les climats désertiques et tropicaux à subtropicaux, la diversité des Cyanobactéries était largement prédominée par le genre *Chroococcidiopsis*. Sous le climat tempéré méditerranéen, de nombreux genres de cyanobactéries sont identifiés tels que *Gloeocapsa*, *Nostoc*, *Pleurocapsa*, *Chroococcus*, *Phormidium*, *Plectonema*, *Chroococcopsis*, *Synechocystis*, *Gloeotheca*, *Scytonema*, *Lyngbya*, *Microcoleus* et *Synechococcus* (Ortega-Calvo et al., 1991; Macedo et al., 2009; Pinheiro et al., 2019; Checucci et al., 2022).

Certains genres tels que *Gloeocapsa* ou *Scytonema* présentent des couleurs très intenses qui sont reliées à leurs adaptations environnementales. Par exemple, elles peuvent prendre une couleur allant du jaune au marron dans des environnements faibles en azote, induite par une réduction de la chlorophylle et de la phycocyanine au profit du caroténoïde (Ortega-Calvo et al., 1991; Pinheiro et al., 2019).

Les champignons retrouvés sur les monuments historiques en pierre appartiennent majoritairement à deux phyla : les Ascomycota et les Basidiomycota. De nombreux genres identifiés sur ces monuments sont des Hyphomycètes, connus comme étant des champignons aéroportés et ayant la faculté de se développer rapidement dans des climats humides, tels que : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Aureobasidium*, *Phoma*, *Acremonium* and *Ulocladium*. D'autres genres fongiques sont identifiés tels que : *Candida*, *Botrytis*, *Toxicocladosporium*, *Penicillium*, *Neodevriesia*, *Cyphellophora*, *Lecanicillium*, *Talaromyces*, *Coprinellus*, *Parengyodontium*, *Mortierella*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Malassezia*, *Rhodotula* (Pinheiro et al., 2019; Rosado et al., 2020; Trovão et al., 2020; Paiva et al., 2022; Silva et al., 2022).

Malgré la présence de champignons fréquemment retrouvés sous climats tempérés, Paiva et al., (2022) ont montré que la diversité fongique était principalement régie par les niches écologiques distinctes tels que certains faciès d'altération de la pierre.

Sous climats tempérés, les diversités bactériennes sont très riches, avec de nombreux phyla bactériens retrouvés sur les monuments en pierres tels que : les Proteobacteria, les Actinobacteria, les Bacteroidetes, les Chloroflexi, les Firmicutes, les Deinococcus-Thermus, les Abditibacteriota, les Armatimonadetes, les Planctomycetes, les Verrucomicrobia et les Acidobacteria. Les proportions de chaque phylum peuvent tout de même varier en fonction du substrat, ou encore d'un potentiel microclimat associé (Chimienti et al., 2016; Pinheiro et al., 2019; Coelho et al., 2021; Checucci et al., 2022; Silva et al., 2022).

Les genres identifiés sont d'autant plus importants et variés. La majorité des études montrent la présence des genres : *Rubrobacter*, *Crossiella*, *Sphingomonas*, *Altererythrobacter*, *Novosphingobium*, *Rubellimicrobium*, *Rubrivirga*, *Flavisolibacter*, *Blastocatella*, *Methylobacterium*, *Aliterella*, *Truepera*, *Abditibacterium*, *Massilia*, *Anthrobacter*, *Bacillus*, *Roseomonas*, *Aureobasidium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Spirosoma*, *Acinetobacter*. Les genres *Rubrobacter*, *Arthrobacter* et *Roseomonas* ont notamment été cités comme étant responsables de formation de biofilm coloré (Pinheiro et al., 2019; Rosado et al., 2020; Coelho et al., 2021; Checucci et al., 2022; Silva et al., 2022)

Le **climat tempéré humide (Cf)** est principalement localisé en Europe de l'ouest (France et Royaume-Uni), au sud-est des États-Unis, en Argentine ainsi que dans l'est de la Chine.

Comme précédemment décrit pour les climats tempérés secs en été, sous climat tempéré humide, la diversité en algues et en cyanobactéries est beaucoup plus importante qu'en climat tropical et désertique. Les microorganismes photosynthétiques et notamment les algues vertes constituent une des plus importantes détériorations chromatiques (Gaylarde and Gaylarde, 2005; Cutler et al., 2013b).

Les algues identifiées appartiennent majoritairement à trois phyla : Chlorophyta, Charophyta et Ochrophyta, comprenant les genres : *Parietochloris*, *Viridiella*, *Elliptochloris*, *Klepsordium*, *Phyllisiphon*, *Desmococcus* et *Haemaotococcus* (Grbić Ljaljević et al., 2009; Cutler et al., 2013a).

De nombreux genres de cyanobactérie ont été identifiés tels que: *Nostoc*, *Stigonema*, *Gloeocapsa*, *Gloeotheca*, *Gloelcapsopsis*, *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Hassallia*, *Aphanocapsa*, *Leptolyngbya*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Phormidium* et *Chroococcidiopsis* (Grbić Ljaljević et al., 2009; Balland-Bolou-Bi et al., 2016; Zanardini et al., 2016; Grbić et al., 2017; Popović et al., 2018).

La richesse en algues vertes et en cyanobactéries sous climats tempérés humides est favorisée par un fort apport en eau (pluie et humidité relative) dans ces localisations, ainsi que par un temps de rétention de l'eau plus long dans les différents substrats. L'étude de Reboah et al. (2023) a notamment montré qu'en banlieue parisienne, la croissance des microorganismes photosynthétiques est plus importante en saison hivernale qu'en saison estivale, ce qui est corrélé avec les apports d'eau par la pluie (plus importante en hiver qu'en été).

La majorité des champignons identifiés appartiennent aux phyla des Ascomycota et des Basidiomycota (Cutler et al., 2013a; Reboah et al., 2023)

De nombreux genres fongiques ont pu être identifiés, tels que *Vermiconia*, *Candelariella*, *Catillaria*, *Solenospora*, *Cladosporium*, *Stibella*, *Beauveria*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Neocucurbitaria*, *Aureobasidium*, *Mucor*, *Devriesea*, *Rhinocladiella*, *Cryptococcus*, *Alternaria*, *Drechshela*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Mycelia*, *Paecylomyces*, *Phoma*, *Chaetomium*, *Acremoniella*, *Trichothecium*, *Periconiella*, *Rhizopus*, *Acremonium*, *Bipolaris*, *Phialophora* et *Torrubiella* (Suihko et al., 2007; Berdoulay and Salvado, 2009; Grbić Ljaljević et

al., 2009; Cutler et al., 2013a; Grbić et al., 2017; Balland-Bolou-Bi et al., 2023; Reboah et al., 2023). De nombreux genres identifiés sont des hyphomycètes, décrits comme étant majoritaires sous climat tempéré et/ou humide (Pinheiro et al., 2019).

De la même manière que les climats de types Cs, la diversité bactérienne est très importante sous les climats tempérés humides. Les bactéries identifiées sur les monuments appartiennent majoritairement aux phyla suivants : Bacteroidetes, Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria, Deinococcus, Chloroflexi et Firmicutes (Balland-Bolou-Bi et al., 2016; Mihajlovski et al., 2019; Schröer et al., 2020; Gambino et al., 2021; Balland-Bolou-Bi et al., 2023; Reboah et al., 2023).

Différentes études ont montré que la composition de la diversité bactérienne varie en fonction des saisons et que les saisons hivernales et printanières montrent une plus grande diversité bactérienne (Tayler and May, 1991; May et al., 2000). L'étude de Gambino et al. (2021) a notamment montré que les Proteobacteria ainsi que les cyanobactéries étaient prédominantes en été et que les phyla Bacteroidetes, Acidobacteria ainsi qu'Actinobacteria étaient quant à eux plus importants en hiver.

De plus, l'étude réalisée par Balland-Bolou-Bi et al. (2016) a mis en évidence une spécificité des bactéries en fonction de l'orientation des monuments. Les Bacteroidetes, les Acidobacteria ainsi que les Proteobacteria se localisent préférentiellement en position horizontale et les communautés présentes en position verticale sont principalement composées d'Actinobacteria et de Proteobacteria.

L'ensemble des genres suivant ont été identifiés sur différents monuments : *Abdibacterium*, *Acidiphilium*, *Acidisphaera*, *Acidothermus*, *Acinetobacter*, *Actinoplana*, *Altererythrobacter*, *Rubrobacter*, *Anthrobacter*, *Arthrobacter*, *Asticcacaulis*, *Aureimonas*, *Bacillus*, *Balneola*, *Blastococcus*, *Bosea*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Carnobacterium*, *Cellulomonas*, *Chryseobacterium*, *Clavibacter*, *Conexibacter*, *Curtobacterium*, *Deinococcus*, *Dyadobacter*, *Ellin6055*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Erythrobacter*, *Flavobacterium*, *Friedmaniella*, *Gordonia*, *Halomonas*, *Jannaschia*, *Janthinobacterium*, *Kineococcus*, *Kocuria*, *Maribius*, *Marmoricola*, *Massilia*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Microlunatus*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Novosphingobium*, *Paenibacillus*, *Panteoa*, *Pedobacter*, *Pontibacter*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Pseudonocardia*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Rhodopila*, *Rubellimicrobium*, *Rubrobacter*, *Solirubrobacter*, *Spherobacter*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, et *Truepera* (Suihko et al., 2007; Berdoulay and Salvado, 2009; Zanardini et al., 2016; Grbić et al., 2017; Mihajlovski et al., 2019; Schröer et al., 2020; Balland-Bolou-Bi et al., 2023; Reboah et al., 2023).

### • Le climat continental D

Contrairement aux autres types de climat, très peu d'études portent sur la bio-détérioration sous climat de type continental. Ce climat est prédominant en Europe du Nord et de l'Est, en Russie, ainsi qu'au Canada et au nord-est des États-Unis. Il est caractérisé comme ayant des saisons hivernales et estivales bien définies, avec des températures pour le mois le plus froid inférieur à -3°C et pour le mois le plus chaud supérieur à 10°C.

Les microorganismes phototrophes retrouvés sur les monuments en pierre sous ces climats sont principalement des Cyanobacteria ainsi que quelques Chlorophyta. Trois genres de Chlorophyta ont été identifiés : *Trentepohlia*, *Trebouxia*, et *Desmococcus*. Les genres appartenant au phylum

des Cyanobacteria sont : *Stigonema*, *Gloeocapsopsis*, *Lyngbya*, *Leptolyngbya*, *Synechocystis*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Scytonema*, *Aphanocapsa* et *Chroococcus* (Sazanova et al., 2020; Vlasov et al., 2021).

L'étude de Nuhoglu et al. (2006), a notamment montré que sous ce type de climat, en hiver les premiers colonisateurs des pierres ne sont pas les microorganismes photosynthétiques, mais plutôt les champignons.

Les principaux genres fongiques identifiés appartiennent majoritairement aux phyla Ascomycota et Basidiomycota, et correspondent aux genres : *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Candida*, *Cladosporium*, *Coniosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Papulaspora*, *Parengyodontium*, *Penicillium*, *Phaeosclera*, *Purpureocillium*, *Pythium*, *Sclerotinia*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Trichocladium*, *Trichoderma* et *Ulocladium*. (Frank-Kamenetskaya et al., 2009; Ponizovskaya et al., 2019; Vlasov et al., 2019, 2021; Sazanova et al., 2022; Piłskowska et al., 2023).

Certaines espèces de lichens ont pu être identifiées par Vlasov et al. (2019) : *Phaeophyscia nigricans*, *Phaeophyscia orbicularis*, *Xanthoria parietina*, *Lecanora spp.*, *Candelariella sp.*, *Caloplaca sp.*, *Verrucaria spp.*, *Bacidina sp.*.

Les principaux phyla bactériens identifiés sous ce type de climat appartiennent aux phyla : Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria (Vlasov et al., 2021; Sazanova et al., 2022).

Les genres bactériens identifiés correspondent à : *Friedmanniella*, *Cytophaga*, *Hymenobacter*, *Spirosoma*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Rubellimicrobium*, *Sphingomonas* et *Deinococcus*.

### • Le climat polaire

La majorité des communautés microbiennes sous climats polaires proviennent de l'analyse de communautés présentes sur les roches en Arctique et en Antarctique. En ces lieux, le climat est dit polaire subpolaire océanique (classification de Köppen-Geiger EM, Figure 6), caractérisé par des précipitations abondantes et des hivers doux avec une température moyenne du mois le plus froid supérieure à -10°C. Sous ces climats, une grande variété de roche y a été identifiée : grès, granites, travertins, calcaires... (Yung et al., 2014; Selbmann et al., 2017; Coleine et al., 2018a, 2018b; Choe et al., 2018).

Les microorganismes phototrophes correspondent principalement aux genres cyanobactéries : *Acarychloris*, *Chroococcales*, *Chroococciidiopsis*, *Oscillatoriales*, *Stigonematales*, *Phormidium*, *Loriellopsis* et *Gloeocapsa* (Yung et al., 2014; Lacap-Bugler et al., 2017; Brady et al., 2018). Des algues vertes (Chlorophyta) ont aussi été identifiées comme appartenant aux genres : *Micractinium*, *Stichococcus*, *Trebouxia* (Yung et al., 2014; Brady et al., 2018)

Les communautés fongiques sont principalement représentées par les phyla Ascomycota et Basidiomycota (Coleine et al., 2018a). Différents types de champignons ont été identifiés tels que les saprotrophes (genres : *Cryptococcus*, *Naganisha* et *Rhodotorula*), des champignons habitant sur les roches (RIF) et des levures noires (genres : *Friedmanniomyces*, *Extremus*, *Elasticomyces*, *Cryomyces*, *Knufia*, *Exophiala*, *Capronia*, *Cladophialophora*), des Ascomycètes filamenteux (genres : *Cladosporium*, *Pseudogymnoascus*, *Fusarium*, *Leptosphaeria*, *Lachnum*, *Penicillium*) ainsi que des champignons formant des lichens appartenant à l'ordre des Lecanorales (genres : *Buellia*, *Candelariella*, *Rhizoplaca*, *Umbilicaria*, *Acarospora*, *Lecanora* et *Lecidea*). La majorité

## Chapitre 1 : Etat de l'art – Le calcaire parisien, agents et processus

des lichens identifiés forment des lichens de type crustacé (Yung et al., 2014; Selbmann et al., 2017; Coleine et al., 2018a, 2018b).

Les communautés bactériennes identifiées en Antarctique appartiennent majoritairement aux phyla : Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Deinococcus, Planctomycetes et Chloroflexi (Yung et al., 2014; Brady et al., 2018). Les principaux genres identifiés sont : *Actinobacterium*, *Nocardioideae*, *Acidobacteria*, *Blastocatella*, *Sphingomonas*, *Acetobacteraceae*, *Arthrobacter*, *Nocardioideae*, *Frankiales*, *Pseudanabaenaceae*, *Truepera*, *Deinococcus*, *Brevundimonas*, *Sporosarcina*, *Sphingosinicella* et *Leptolyngbya* (Choe et al., 2018).

Le Tableau 5 récapitule, pour chaque type de climat, l'ensemble des genres microbiens identifiés. Les méthodes d'identification des microorganismes ont été spécifiées. Lorsque deux méthodes sont attribuées à un même microorganisme, cela signifie qu'il a été identifié à la fois par isolement de souches pures et par métagénomique (NGS).

Tableau 5: Tableau récapitulatif des genres microbiens identifiés à la surface des monuments en pierre en fonction du climat

	Microorganismes identifiés		Méthode d'identification	Références bibliographiques
Climat tropical à subtropical	Algues et Cyanobactéries	<i>Trentepohlia</i> <i>Chroococcidiopsis</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Tolypothrix</i>	Isolement	Gaylarde et al., 2012 Keshari et Adhikary, 2013 Ortega-Morales et al., 2013
	Champignons	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Nectriceae</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> et <i>Ulocladium</i> .	isolement	De La Rosa-García et al., 2011 Biswas et al., 2013 Ortega-Morales et al., 2016 Agrawal et al., 2023 Nonthijun et al., 2023
			Métagénomique	Nonthijun et al., 2023
	Bactéries	<i>Cellulomonas</i> , <i>Georgenia</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Micrococcus</i> <i>Modestobacter</i> , et <i>Staphylococcus</i>	Isolement	Biswas et al., 2013
Métagénomique			Gaylarde et al., 2017	
Climat sec : désertique et de steppe	Cyanobactéries	<i>Chroococcidiopsis</i> , <i>Leptolyngbya</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Phormidium</i>	Métagénomique	Khomutovska et al., 2017 Lacap-Bugler et al., 2017; Makhalanyane et al., 2013; Nir et al., 2019
	Champignons	<i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Coniosporium</i> , <i>Hormonema</i> , <i>Hortaea</i> , <i>Lichenothelia</i> , <i>Phaeotheca</i> , <i>Phoma</i> , <i>Sarcinomyces</i> , <i>Trimmatostroma</i> , <i>Ulocladium</i> , <i>Cladophialophora</i> , <i>Leptosphaerulina</i> , <i>Eupenicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Ascobolus</i> , <i>Monodictys</i> , <i>Periconia</i> , <i>Gilberella</i>	Isolement	Wollenzien et al., 1995 Conley et al., 2006 Alotaibi et al., 2020;
	Bactéries	<i>Pseudomonas</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Effluviibacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Flavisolibacter</i> <i>Salinimicrobium</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pontibacter</i> , <i>Streptomonospora</i>	Isolement	Essoussi et al., 2012 EIBaghdady et al., 2019;
Métagénomique			An et al., 2013; Nir et al., 2019; Wu et al., 2021 Bahadur et al., 2021, 2022 Genderjahn et al., 2021	



Chapitre 1 : Etat de l'art – Le calcaire parisien, agents et processus

		<i>Bacillus, Lactobacillus, Massilia, Microverga, Streptomyces, Protactiibacter, Arthrobacter, Kocuria, Microbacterium, Lechevalieria, Actinoplane, Micromonospora, Kineococcus, Nocardia</i>		
Climat tempéré	Algues et Cyanobactéries	<i>Chlorococcum, Chlorella, Cosmariium, Desmococcus, Elliptochloris, Haemaotococcus, Klebsormidium, Myrmecia, Parietochloris, Phyllisiphon, Stichococcus, Symploca, Trebouxia, Trentepohlia, Viridiella.</i>	Isolement	Ortega-Calvo et al., 1991 Grbić Ljaljević et al., 2009
		<i>Aphanocapsa, Chroococcidiopsis, Chroococcopsis, Chroococcus, Gloeocapsa, Gloelcapsopsis, Gloeotheca, Hassalia, Lyngbya, Leptolyngbya, Microcoleus, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium, Plectonema, Pleurocapsa, Scytonema, Stigonema, Synechococcus, Synechocystis, Tolypothrix.</i>	Métagénomique	Cutler et al., 2013a Balland-Bolou-Bi et al., 2016 Zanardini et al., 2016 Popović et al., 2018 Checcucci et al., 2022 Reboah et al., 2023
	Champignons	<i>Acremonium, Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Beauveria, Bipolaris, Botrytis, Candelariella Candida, Catillaria, Chaetomium Cladosporium, Coprinellus, Cyphellophora, Cryptococcus, Devriesia, Drechshela, Epicoccum, Fusarium, Gibberella Lecanicillium, Malassezia, Mortierella, Mucor, Mycelia Neocucurbitaria, Neodevriesia, Paecylomyces, Parengyodontium, Penicillium, Periconiella, Phoma, Phialophora, Rhinocladiella, Rhizopus Rhodotula, Solenospora, Stachybotrys, Stibella Talaromyces, Torrubielda Toxicocladosporium, Trichoderma, Trichothecium, Vermiconia, Ulocladium</i>	Isolement	Suihko et al., 2007 Grbić Ljaljević et al., 2009 Trovão et al., 2020
			Métagénomique	Paiva et al., 2022a Berdoulay and Salvado, 2009 Cutler et al., 2013a Grbić et al., 2017 Rosado et al., 2020 Silva et al., 2022 Balland-Bolou-Bi et al., 2023 Reboah et al., 2023
	Bactérie	<i>Abditibacterium, Acidiphilium, Acidisphaera, Acidothermus, Acinetobacter, Actinoplane, Aliterella, Altererythrobacter, Arthrobacter, Asticcacaulis, Aureimonas, Aureobasidium, Bacillus, Balneola, Blastocatella, Blastococcus, Bosea, Brevibacterium, Brevundimonas, Burkholderia, Carnobactérium, Cellulomonas, Chryseobacterium, Clavibacter, Conexibacter, Crossiella, Curtobacterium, Deinococcus, Dyadobacter, Ellin6055, Enterobacter, Enterococcus, Erwinia, Erythrobacter, Flavobacterium, Flavisolibacter, Friedmaniella, Gordonia, Halomonas, Jannaschia, Janthinobacterium, Kineococcus, Kocuria, Maribius, Marmoricola, Massilia, Methylobacterium, Microbacterium, Micrococcus, Microlunatus, Nocardia, Nocardioides, Novosphingobium, Paenibacillus, Panteoa, Pedobacter, Pontibacter,</i>	Métagénomique	Suihko et al., 2007 Berdoulay and Salvado, 2009 Balland-Bolou-Bi et al., 2016 Chimienti et al., 2016 Zanardini et al., 2016 Grbić et al., 2017 Mihajlovski et al., 2019 Schröer et al., 2020a Coelho et al., 2021 Silva et al., 2022 Checcucci et al., 2022 Balland-Bolou-Bi et al., 2023 Reboah et al., 2023 ;

Chapitre 1 : Etat de l'art – Le calcaire parisien, agents et processus

		<i>Porphyrobacter, Pseudomonas, Pseudonocardia, Ralstonia, Rhodococcus, Rhodopila, Roseomonas, Rubellimicrobium, Rubrivirga, Rubrobacter, Solirubrobacter, Spherobacter, Sphingobium, Sphingomonas, Spirosoma, Truepera, Stenotrophomonas, Streptomyces.</i>		
climat continental	Algues et Cyanobactéries	<i>Desmococcus, Trentepohlia et Trebouxia</i> <i>Aphanocapsa, Calothrix, Chroococcus, Gloeocapsopsis, Leptolyngbya, Lyngbya, Nostoc, Scytonema, Stigonema, Synechocystis</i>	Métagénomique	Vlasov et al., 2021
	Champignons	<i>Acremonium, Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Botrytis, Candida, Cladosporium, Coniosporium, Epicoccum, Fusarium, Mortierella, Papulaspora, Parengyodontium, Penicillium, Phaeosclera, Purpureocillium, Pythium, Sclerotinia, Scytalidium, Talaromyces, Trichocladium, Trichoderma, Ulocladium</i>	Isolement	Nuhoglu et al. 2006 Frank-Kamenetskaya et al., 2009 Ponizovskaya et al., 2019 Sazanova et al., 2022
			Métagénomique	Vlasov et al., 2021 Sazanova et al., 2022
	Bactéries	<i>Cytophaga, Deinococcus, Flavobacterium, Friedmanniella, Hymenobacter, Pedobacter, Rubellimicrobium, Sphingomonas, Spirosoma, Acetobacteraceae, Acidobacteria, Actinobacterium, Arthrobacter, Blastocatella, Brevundimonas, Deinococcus Frankiales Leptolyngbya, Nocardioideae, Nocardioidea, Pseudanabaenaceae, Sphingomonas, Sphingosinicella, Sporosarcina, Truepera</i>	Métagénomique	Vlasov et al., 2021 Sazanova et al., 2022
climat polaire	Algues	<i>Micractinium, Stichococcus, Trebouxia</i> <i>Acarychloris, Chroococcales, Chroococciopsis, Gloeocapsa, Loriellopsis, Oscillatoriales, Phormidium et Stigonematales</i>	Métagénomique	Yung et al., 2014 Lacap-Bugler et al., 2017 Brady et al., 2018
	Champignons	<i>Acarospora, Buellia, Candelariella, Capronia, Cladophialophora, Cladosporium, Cryomyces, Cryptococcus, Elasticomyces, Exophiala, Extremus, Friedmanniomyces, Fusarium, Knufia, Lachnum, Lecanora, Lecidea, Leptosphaeria, Naganisha, Penicillium, Pseudogymnoascus, Rhizoplaca, Rhodotorula, Umbilicaria</i>	Métagénomique	Yung et al., 2014 Selbmann et al., 2017 Coleine et al., 2018a, 2018b
	Bactéries	<i>Acetobacteraceae, Acidobacteria, Actinobacterium, Arthrobacter, Blastocatella, Brevundimonas, Deinococcus Frankiales Leptolyngbya, Nocardioideae, Nocardioidea, Pseudanabaenaceae, Sphingomonas, Sphingosinicella, Sporosarcina, Truepera</i>	Métagénomique	Yung et al., 2014 Brady et al., 2018 Choe et al., 2018

- **Microclimats**

Précédemment, l'influence du climat régional a été montrée notamment par la présence de certains microorganismes étant localisés préférentiellement sous ces climats. Néanmoins la présence de microclimats est le facteur majeur influençant la bio-détérioration des monuments (Austigard and Mattsson, 2019; Reboah et al., 2023).

À l'échelle d'un monument, l'ensemble des façades ne reçoit pas le même taux d'irradiation solaire, le même pourcentage d'ombre, le même apport en eau ni le même degré d'exposition au vent. L'ensemble de ces facteurs va pouvoir créer un microclimat à l'échelle locale ayant un effet sur les microorganismes présents ainsi que sur les faciès de bio-détérioration associés. Les conditions microclimatiques peuvent donner naissance à des niches écologiques particulières, avec un effet sur la biomasse entraînant une plus grande diversité microbienne (Ariño et al., 2010).

Le premier facteur limitant la colonisation biologique est **l'apport en eau**. Il peut se faire de manière directe par un chemin préférentiel des pluies affectant un monument, par remontée capillaire, ou indirectement par des temps de séchage plus longs induisant des humidités relatives locales plus importantes et plus longues, intimement liés à l'irradiation solaire et donc à la température (Barberousse et al., 2006; Caneva et al., 2012). L'étude de Ortega-Morales et al. (2004) a montré la présence d'espèces fréquemment retrouvées en milieux aquatiques, *Nevskia ramosa* et *Salinibacter rubber* au niveau d'un biofilm ayant un apport en eau, tandis que dans un biofilm avec un très faible apport en eau, des bactéries tolérantes à la dessiccation (*Rubrobacter xylanophilus* et *Rubrobacter radiotolerans*) ont été recensées.

Le deuxième facteur est **la température** notamment induite par l'ensoleillement. En effet, plus un monument va recevoir une forte irradiation solaire, plus la température va être élevée sur une surface, plus le temps de séchage de ce monument va être faible (Caneva et al., 2012). Dans ce cas, les microorganismes pouvant se développer sur ce type de surface vont être préférentiellement tolérants à la dessiccation. Par exemple, l'étude de Ortega-Morales et al., (2013) a montré que le genre cyanobactérien *Gloeocapsa*, générant une patine sombre par la présence de scytonémine, a été retrouvé préférentiellement sur les surfaces les plus irradiées (temps de séchage de la surface très faible) sur les monuments Mayas, tandis que les zones les plus ombragées avec une humidité plus importante, une patine rouge due au genre algair *Trentepohlia* se développait. De la même manière, Ariño et al., 2010 a montré que la distribution des lichens était notamment dépendante du degré d'ensoleillement. Dans les lieux recevant le plus d'irradiation, les lichens de type crustacé se développent majoritairement, car leurs caractéristiques morphologiques leur permettent d'être plus tolérants à la dessiccation. Dans les milieux plus ombragés avec une plus importante humidité, les lichens à thalles lépreux se développent majoritairement.

#### **4.2. Pollution et microorganismes**

La pollution atmosphérique joue un rôle important sur la diversité des communautés microbiennes et sur la composition de celle-ci. Plusieurs études ont montré que la pollution atmosphérique exerce une pression écologique entraînant une réduction de la diversité de microorganismes tels que les champignons, les bactéries hétérotrophes et chimiolithotrophes ou encore les cyanobactéries, par rapport à des communautés microbiennes retrouvées en milieu moins pollué

ou rural. La réduction de la diversité microbienne entraîne une sélectivité des microorganismes capables d'utiliser les nutriments disponibles (Mitchell and Gu, 2000; Ortega-Morales et al., 2019)

En milieu pollué, les communautés microbiennes sont capables d'utiliser les composés soufrés, azotés ou encore les COV comme nutriments (Mitchell and Gu, 2000; Nuhoglu et al., 2006; Ortega-Morales et al., 2019; Gaylarde, 2020). L'étude de Mitchell et Gu (2000), comparant les communautés microbiennes entre les villes de Cambridge (polluée) et Lexington (moins polluée) a montré que le nombre de bactéries chimiolithotrophes capables d'utiliser les composés soufrés étaient plus importantes à Cambridge, enrichissant donc les communautés microbiennes en microorganismes sulfato-oxydants. En laboratoire, cette même étude a montré que des concentrations inférieures à 50 ppm de SO<sub>2</sub> entraînent une acidification des milieux induite par les microorganismes après seulement 10 jours.

La présence de biofilms à la surface des pierres (lichens par exemple) sont des sites accrus où est piégé la pollution particulaire et gazeuse. De plus, ils permettent une augmentation de la rétention d'eau et des dépôts humides pouvant contenir de l'azote et des phosphates provenant des fertilisants ou encore des composés sulfurés provenant des processus de combustion (Schiavon, 2002; Ding et al., 2021).

L'action des microorganismes combinée à la pollution atmosphérique accentue la détérioration de la pierre. L'étude de Pitzurra et al. (2003) réalisée en laboratoire a montré qu'après un an d'expérience, les calcaires ayant été incubés en présence de microorganismes et de pollution, présentent une dégradation plus importante qu'avec l'effet de la pollution seul. De plus cette étude met en évidence une relation importante entre la pollution et la colonisation fongique. Cette relation est expliquée par le fait que les champignons utilisent principalement les polluants sous forme d'aérosols comme nutriments. L'étude de Moroni et Pitzurra (2008) a notamment montré que les champignons qui se sont développés sur la pierre en présence de pollution atmosphérique, sont en capacité de survivre et de continuer leur développement longtemps après la suppression de cette pollution, induisant l'acidification du substrat par le processus de sulfatation. Cela est expliqué par le fait que des composés sulfatés sont toujours présents à la surface de la pierre, longtemps après la suppression de la source de pollution, notamment sous forme de particules qui pourraient être utilisées par les champignons.

Depuis quelques années, les phénomènes intermittents de verdissement des monuments ont été constatés par les conservateurs du Père-Lachaise en périodes hivernales. Ce phénomène est décrit dans plusieurs localisations à travers le monde, notamment à Belfast ou encore dans les îles britanniques, depuis les années 1990, et semble être attribué à la baisse des concentrations en SO<sub>2</sub>, induite par les différentes politiques environnementales qui ont limité l'utilisation des carburants contenant du soufre. La baisse du SO<sub>2</sub> entraîne une colonisation biologique qui est d'autant plus favorisée par la hausse des composés azotés, qui joue le rôle de fertilisant, permettant donc une colonisation importante par les microorganismes phototrophes et donc un verdissement important dans les périodes hivernales (McCabe et al., 2011; Smith et al., 2011). Cela est en accord avec l'étude de Nováková et Neustupa (2015), qui a montré que les pics en NO<sub>2</sub> atmosphérique, en milieu pollué, entraînent une prolifération des biofilms constitués principalement d'algues vertes sur des feuilles d'arbres, tandis que les pics de PM<sub>10</sub> étaient négativement corrélés avec cette prolifération.

## 5. Bilan & Objectif de la thèse

L'étude bibliographique a montré que les pierres calcaires subissent les actions de différents agents : abiotiques, biotiques et anthropiques. L'altération du calcaire dépend donc de ces facteurs extrinsèques, mais aussi intrinsèques au matériau.

Si l'effet de ces différents facteurs a déjà beaucoup été étudié, il est parfois difficile de déterminer les contributions respectives de chacun et des synergies possibles, notamment entre la pollution et les microorganismes qui sont nuisibles sur les processus d'altération de la pierre. En fait, l'élimination ou l'apparition de nouvelles communautés microbiennes à la surface des monuments en pierre en fonction des facteurs environnementaux et leur influence sur la dégradation de la pierre doivent être soigneusement évaluées.

Les principaux travaux en termes de bio-détérioration portent le plus souvent sur des souches d'algues, de bactéries ou de champignons ayant été isolées sur des monuments en pierre. Leurs effets sur l'altération de la pierre ont été évalués indépendamment les uns des autres. C'est seulement depuis 2015 que des travaux utilisant des méthodes de pyroséquençage puis de Next Generation Sequencing (NGS) ont été utilisés pour évaluer les diversités bactériennes, algaires et fongiques présentes sur les monuments en pierre.

Le but de cette étude est donc de déterminer les communautés biologiques présentes (bactériennes, algaires et fongiques), leurs proportions ainsi que leurs distributions et de préciser le rôle des facteurs environnementaux sur l'altération de la pierre, ainsi que l'effet de la synergie pollution-diversité microbienne sur l'altération du calcaire.

Dans un premier temps (Chapitre 3), une étude de terrain a été réalisée afin d'analyser les diversités microbiennes ainsi que les faciès d'altération du calcaire après un temps d'exposition court (5 ans) à long (2 siècles). Pour cela, le site d'étude du Père-Lachaise a été choisi, car il rassemble (1) de nombreux monuments funéraires constitués de calcaire, (2) des zones boisées tout en étant situé au cœur de Paris, en environnement pollué, (3) une datation fiable qui s'exprime à travers les inscriptions sur les tombes non restaurées. On y trouve donc une archive d'environ 200 ans d'altération. Sur ces tombes, une étude sur l'impact saisonnier a aussi été réalisée.

Dans un second temps (Chapitre 4), différentes expériences de vieillissement en milieu contrôlé ont été réalisées afin d'isoler certains paramètres d'altération. La première expérience met en présence de calcaire St Maximin, une eau de pluie synthétique de composition similaire à une pluie actuelle à Paris ainsi que de microorganismes. Dans un second temps, une pollution particulaire et gazeuse a été ajoutée au système afin de voir si les communautés microbiennes présentes évoluent différemment du premier système. Enfin la dernière simulation a été réalisée en modifiant la composition de l'eau de pluie, afin qu'elle soit représentative d'une pollution passée (avec ajout de sulfate) et future (avec ajout de nitrate et d'ammonium). Le but étant de comprendre si une modification de l'eau de pluie induite par différentes pollutions atmosphériques modifie les communautés microbiennes et les faciès d'altérations du calcaire.

## **CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1. Démarche expérimentale

Afin de bien comprendre les dégradations des monuments en pierre calcaire en milieu urbain pollué, plusieurs axes d'étude ont été définis.

Le premier axe s'articule autour du vieillissement naturel de la pierre calcaire à long et court temps d'exposition. Pour cela, nous avons sélectionné un site d'étude afin (1) d'effectuer des prélèvements sur des monuments anciens. (2) d'y effectuer des expositions de matériaux sains sur du moyen terme. Le site sélectionné est le cimetière du Père Lachaise, où certaines tombes sont considérées comme des témoins de 200 ans d'exposition à une atmosphère urbaine et polluée. Nous y avons également collecté des coupons de pierres calcaires qui y avaient été exposés pendant 5 ans. Différentes analyses chimiques et biologiques seront réalisées afin de caractériser les faciès d'altération du calcaire, ainsi que d'identifier et quantifier les microorganismes présents à leur surface.

Le second axe se focalise sur le vieillissement artificiel de la pierre calcaire, sous forme de tests d'altérations en milieu contrôlé. Trois tests vont être réalisés afin de comprendre :

- L'impact de la pluie et des microorganismes sur l'altération de calcaire sain
- L'impact de la pluie et des microorganismes sur l'altération du calcaire pré vieilli par une pollution particulaire et gazeuse
- L'impact de la composition de la pluie et des microorganismes sur l'altération du calcaire sain

Ces différents tests permettent la compréhension des mécanismes d'altérations.

### 1.1. Description du site d'étude

Le cimetière du Père Lachaise est localisé en plein cœur de Paris, dans le 20<sup>ème</sup> arrondissement. Il est actuellement considéré comme un des cimetières les plus connus au monde de par le nombre important de personnes célèbres ayant trouvé dans ce lieu leur dernière demeure.

Il a ouvert en 1804 suite à une pénurie de lieux de sépulture dans Paris, induite par la fermeture du cimetière des Innocents en 1780 résultant d'une loi interdisant les cimetières en ville. Appelé initialement cimetière de l'Est, il fait partie d'une vague de création de cimetières en périphérie de Paris tels que : le cimetière de Montmartre au nord, le cimetière de Montparnasse au sud et le cimetière de Passy à l'ouest.

Initialement, le cimetière du Père Lachaise était localisé en périphérie de Paris, dans un quartier décrit comme pauvre et populaire. Il était destiné aux parisiens habitant dans le 5, 6, 7 et 8<sup>ème</sup> arrondissement de Paris. Durant les premières années après son ouverture, très peu d'enterrements y ont eu lieu.

C'est en 1817, après que le préfet de Paris ait déplacé les dépouilles d'Héloïse et Abélard ainsi que Molière et La Fontaine que le cimetière connut un engouement important : le nombre de stèles augmenta rapidement jusqu'à 33 000 tombes en 1830. Des agrandissements du cimetière sont alors décrétés, passant ainsi, au fur et à mesure des décennies, de 17 à 44 hectares aujourd'hui (Figure 7).

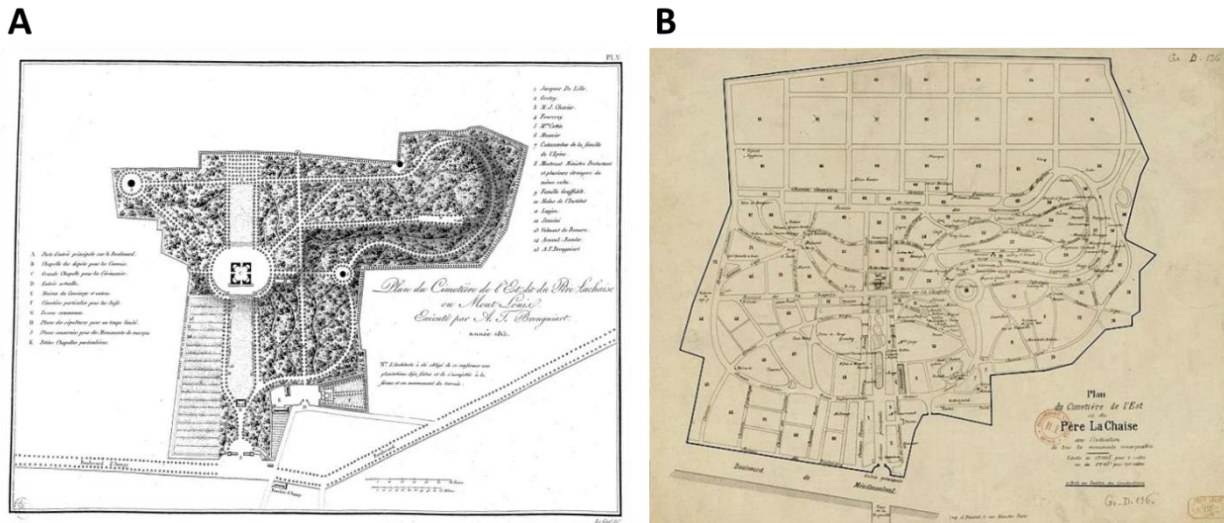


Figure 7: Plan du cimetière du Père Lachaise. (A) F Brongniard, 1813 (<https://perelachaisehistoire.fr/plan-de-brongniard-1813-tombes-remarquables/>); (B) Anonyme en 1883 (<https://www.applachaise.net/bibliographie/plans/plans-du-cimetiere-19eme-siecle/>)

Actuellement, le cimetière abrite plus de 75000 stèles réparties en 97 divisions, construites en matériaux très différents, allant des calcaires aux granites. Au cours du temps, une évolution du type de matériaux utilisés pour les sépultures est observable au sein du cimetière. En effet beaucoup de stèles datées entre 1830 et 1880 sont construites en pierres calcaires. La diversité des calcaires est elle-même importante avec différents types observés du plus fin au plus grossier. Ces calcaires sont typiques des différents calcaires du bassin parisien, comme le Lutétien, le Comblanchien ou encore le calcaire d'Euville.

Le cimetière du Père Lachaise possède de nombreuses stèles en pierre calcaire qui n'ont pas été restaurées. Ces stèles peuvent donc être considérées comme des témoins de plus de 200 ans d'altération en milieu urbain pollué. Enfin le cimetière est aussi considéré comme un jardin parisien, il est composé de plus de 40 000 arbres répartis dans l'ensemble du cimetière. Certaines parties du cimetière notamment la partie la plus ancienne est plus végétalisée que les parties les plus récente.

## 2. Échantillonnage

### 2.1. Altération avancée du calcaire : les stèles du cimetière Père Lachaise

Dans un premier temps, différents types de faciès d'altération du calcaire ont été recherchés au sein de trois divisions du cimetière (Figure 8) : les divisions 25, 92 et 62.

Ces trois divisions ont été choisies de par leurs différences de microclimat. La division 25, appelée romantique correspond à une division très végétalisée notamment par de nombreux arbres. Beaucoup de stèles présentent des patines colorées vertes à oranges. La division 62 est localisée près du boulevard Ménilmontant. Les stèles de cette division, pour la plupart, montrent la présence de patine foncée grise à noire. Enfin, la division 92 est une division peu végétalisée, localisée au centre du cimetière du Père Lachaise. Les stèles la composant, présentent des patines d'altérations moins sombre que celle présente dans la division 62.





Figure 8 : Position des stèles échantillonnées au sein du cimetière de Père Lachaise.

Les différents échantillons utilisés dans cette étude ont été prélevés sur la stèle (partie verticale), sur la dalle ou la tombale (partie horizontale) et sur le soubassement (partie verticale localisée sous la tombale, Figure 9). Au total 32 échantillons ont été prélevés en grattant les premiers millimètres du calcaire à l'aide d'un scalpel stérile, lors de deux campagnes d'échantillonnage, une en saison hivernale (2020 et 2021), et l'autre au début de l'automne 2021. La nomenclature des échantillons se réalise de la manière suivante : ST X H/V Y avec X de 1 à 12 correspond à une tombe, H ou V correspond à l'orientation de l'échantillon et Y de 1 à 3 correspondant à un échantillon. Ainsi sur une même tombe plusieurs échantillons ont pu être récoltés. Le détail des échantillons est présenté en Annexe 1.

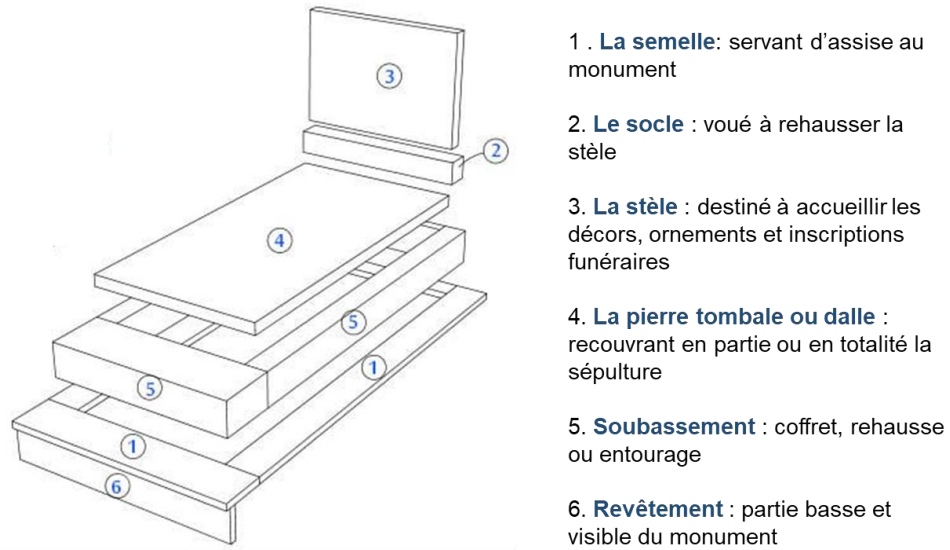


Figure 9 : Schéma représentant les différents éléments d'une tombe (lassurance-obseques.fr)

## 2.2. Premiers stades d'altération du calcaire : les coupons

Afin d'observer les premiers stades de colonisation biologique et d'altération, des morceaux de calcaires St Maximin Roche fine (6 x 6 x 1 cm) ont été exposés depuis 2016 au cimetière du Père Lachaise au niveau du local technique du cimetière (Figure 10).



Figure 10 : Localisation des coupons au niveau du local technique Père Lachaise (en rouge)

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

La pierre calcaire de St Maximin (St Maximin, Oise) est fréquemment utilisée dans les monuments historiques dans Paris et ces alentours. Elle a été utilisée dans la construction du Panthéon, de l'église St Sulpice ainsi que pour le palais Bourbon. Aujourd'hui, elle est particulièrement utilisée en restauration, de par le fait que la carrière soit actuellement toujours en activité, afin de remplacer certain calcaire dont les carrières d'origine sont actuellement fermées. Elle a été utilisée notamment pour la restauration du Pont neuf ou encore du Louvre.

Différents calcaires de St Maximin existent et sont préconisés pour différents emplois (Tableau 6).

Tableau 6 : Différentes pierres de St Maximin et leurs préconisations d'emploi (<https://www.ouachee-corpechot.com/pierre-saint-maximin>)

Pierres	Caractéristiques	Emploi
Saint-Maximin Liais	Densité apparente : 2,22 Résistance à l'écrasement : 572 à 950 kg.cm <sup>-2</sup> Porosité : 18 % Vitesse du son : 4 051 m.s <sup>-1</sup>	revêtements, dallages, escaliers, parapets, socles, appuis, restauration des monuments historiques
Saint-Maximin Construction Franche	Densité apparente : 2,12 Résistance à l'écrasement : 369 kg.cm <sup>-2</sup> Porosité : 20 % Vitesse du son : 3 634 m.s <sup>-1</sup>	pour les assises de rejaillissement, appuis, bandeaux, corniches, restauration de monuments historiques
Saint-Maximin Franche Fine	Masse volumique apparente : 1700 à 2000 kg.m <sup>-3</sup> Porosité : 25 à 35%	revêtement mince, élévation extérieure, bandeau et appuis extérieurs, soubassement extérieur, couronnement extérieur, mur massif, corniche extérieure
Saint-Maximin Roche Fine	Densité apparente : 1,76 Résistance à l'écrasement : 152 kg.cm <sup>-2</sup> Porosité : 34,9 % Vitesse du son : 2 693 m.s <sup>-1</sup>	constructions d'élévation et corniches
Saint-Maximin Construction	Densité apparente : 1,66 Résistance à l'écrasement : 70 kg.cm <sup>-2</sup> Porosité : 38,4 % Vitesse du son : 2 385 m.s <sup>-1</sup>	construction d'élévation et les corniches

Les propriétés pétrographique du calcaire St Maximin Roche fine utilisée dans ces expériences sont décrites par (Saheb et al., 2016) Cette pierre est principalement composée de calcite (97%) et de quartz (3%). Elle possède un coefficient de capillarité de  $3,7 \pm 0,1 \text{ g.cm}^{-2}.\text{h}^{-0,5}$ . La porosité totale de cette pierre est estimée à  $38,1 \pm 0,1 \%$ , avec une porosité ouverte (mercure) de 36,2%. La taille des macropore est de 20  $\mu\text{m}$  et celle des micropores est de 0.15  $\mu\text{m}$ . Le coefficient de saturation des roches St Maximin est estimé à  $79,7 \pm 3,0 \%$  par Moreau, 2008.

Dix-huit coupons au total avaient été placés en mars 2016 (précédent projet MIAM, financé par l'OSU Efluve), dans différentes positions à l'aide d'un rack en métal : 6 en position 'exposée à la pluie horizontalement' (EH), 6 en position 'exposée à la pluie verticalement' (EV), 3 en position 'abritée horizontalement' (AH) et 3 en position 'abritée verticalement' (AV) (Figure 11).

Le 2 février 2021, après 5 ans d'exposition au cimetière du Père Lachaise, 10 coupons de calcaires ont été prélevés : 3 exposés horizontalement et verticalement, ainsi que 2 abrités

horizontalement et verticalement. Les coupons ont été stockés au laboratoire à 4°C jusqu'à caractérisation. Avant analyse, les coupons ont été scindés en 2 morceaux à l'aide d'un burin. La première partie a été grattée à l'aide d'un scalpel stérile sous hotte à flux laminaire, et la poudre récoltée a été utilisée pour les analyses biologiques et chimiques. La deuxième partie a été dédiée aux observations microscopiques.

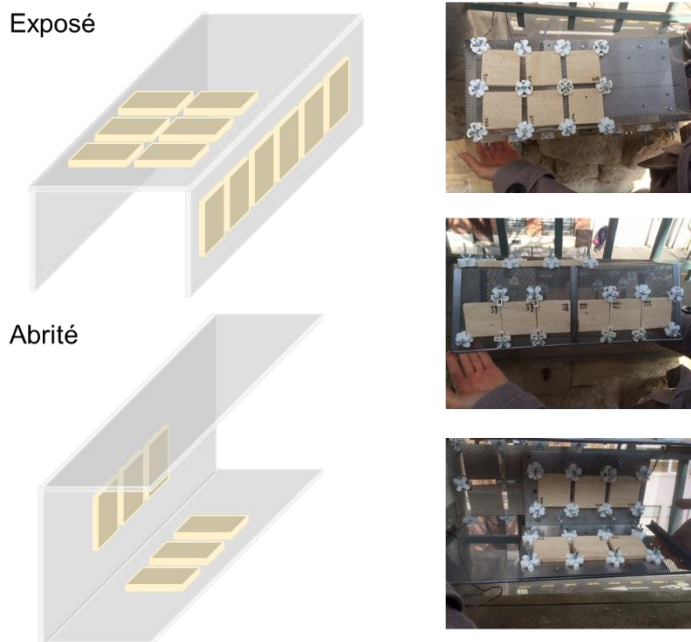


Figure 11 : Schéma du dispositif expérimental d'exposition des coupons au cimetière du Père Lachaise.

- ⇒ **L'étude du vieillissement naturel des calcaires a donc été effectuée sur un temps d'exposition court, après 5 ans d'exposition au cimetière du Père Lachaise et sur un temps d'exposition long, par l'étude des faciès d'altération des tombes anciennes du cimetière.**

### 3. Caractérisation du vieillissement naturel des calcaires

#### 3.1. Analyses biologiques

Différentes analyses ont été réalisées afin de caractériser les communautés microbiennes présentes à la surface des calcaires.

##### 3.1.1. Dénombrement bactérien et fongique en milieu liquide

Le dénombrement bactérien et fongique a été réalisées en utilisant la méthode du nombre le plus probable (MPN) (Sutton, 2010). Une partie de l'élution non filtrée (100  $\mu$ L) a été diluée par  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  et  $10^5$ . Pour les bactéries, le milieu de culture LB (VWR®) a été utilisé, avec un ajout de fongizone à une concentration de  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Pour les champignons, correspond à de l'extrait de malt (VWR®) additionné d'ampicilline à une concentration de  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Le milieu et les solutions diluées ont été introduits en 8 répétitions dans une microplaque. L'absorbance a été lue à 490 nm après 24 heures pour les bactéries et 6 jours pour les champignons. Le programme de calcul des NPP utilisé provient de Jarvis et al., (2010).

### 3.1.2. Détermination de l'activité enzymatique totale

L'activité enzymatique des microorganismes est estimée par spectrophotométrie développée par Green et al. (2006). Cette méthode utilise la fluorescéine di-acétate qui, en présence d'enzymes (estérase, lactase, ...), se dégrade en fluorescéine, une molécule colorée (de couleur jaune) (Figure 12).

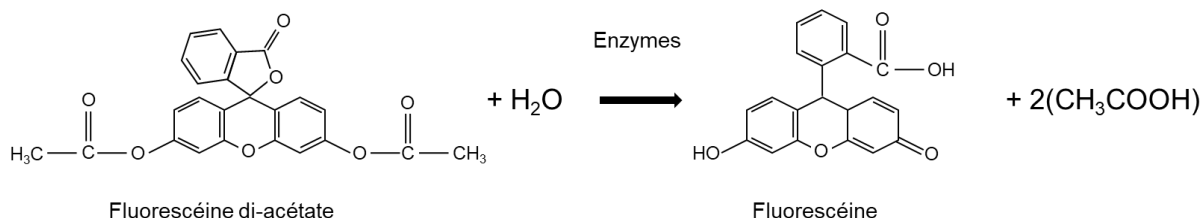


Figure 12 : Schéma de dégradation de la fluorescéine di-acétate en fluorescéine en présence d'enzymes.

Un tampon phosphate a été réalisé en dissolvant 20.7 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> avec 30.4 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dans un litre d'eau Milli-Q® (pH = 7,2). La solution est stérilisée par autoclavage pendant 21 min à 121°C.

Une solution de fluorescéine di-acétate (FDA) a été préparée à une concentration de 0.24 mmol.L<sup>-1</sup> en dissolvant 100 mg de fluorescéine di-acétate dans 100 mL d'acétone 100 %.

Dans un tube de 50 mL, 0,5 g de calcaire ont été ajoutés à 49,5 mL de tampon phosphate ainsi que 500 µL de solution de FDA. Cette solution a ensuite été mise en agitation à 40 rpm pendant 2 h dans le noir à une température de 20°C.

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Genesys™ 150 Thermo Fisher Scientific à 490 nm.

### 3.1.3. Identification des communautés bactériennes et fongiques par biologie moléculaire

Afin de déterminer la diversité des microorganismes présents dans les différents échantillons, l'ADN a été extrait. Pour cela, le kit FastDNA Spin Kit for Soil MP bio® a été utilisé, dans lequel 500 mg de calcaire ont été insérés, selon les instructions du fabricant. L'ADN extrait a été envoyé à l'entreprise Eurofin Genomics, sur leur plateforme de séquençage utilisant la technologie Illumina MiSeq. Deux régions de séquençage ont été choisies, la région V3-V5 du gene codant pour ARN ribosomal 16S (amorces : 5' CCTACGGGNGGCWGCAG - 3' AACTYAAAKRAATTGRCGG) pour le séquençage des génomes bactériens et la région ITS1 du gene codant pour ARN ribosomal ITS (amorces : 5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3' GCTGCGTTCTTCATCGATGC) pour les génomes fongiques.

Les séquences brutes ont été retraitées par bio-informatique (Figure 13) sur la plateforme Galaxy migale, MIGALE INRAE suivant différentes étapes :

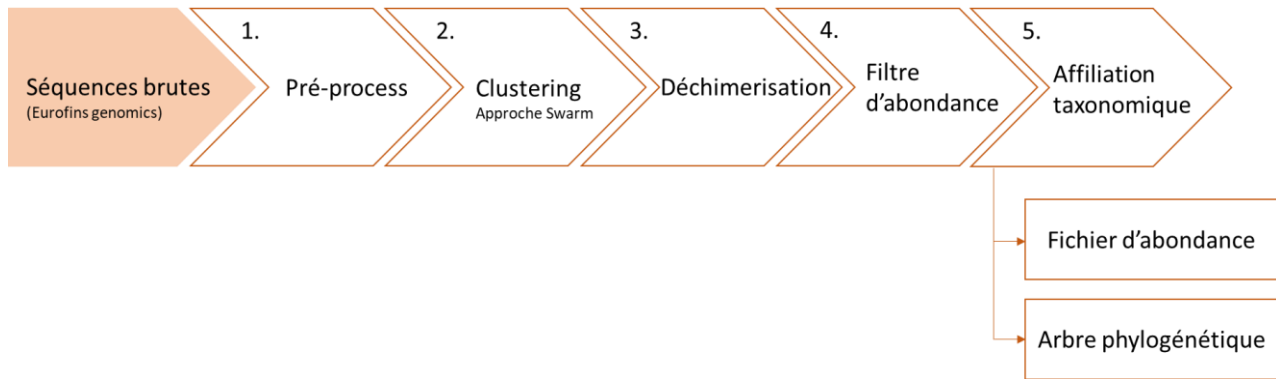


Figure 13 : Schéma des étapes du traitement bio-informatique des séquences ADN.

L'étape 1, le « Pré-process » correspond à une étape de préparation des données de séquençage où sont enlevées des séquences brutes les informations non biologiques, telles que les primers ou les barcodes pouvant être contenus sur les séquences.

À partir des séquences nettoyées, les séquences vont être regroupées sous forme d'OTU (Operational Taxonomic Unit), lors de l'étape appelée « Clustering » suivant l'approche Swarm (Figure 14). À partir d'une séquence, un réseau de séquence va être constitué lorsqu'elles sont identiques. Chaque réseau de séquence sera considéré comme un OTU Swarm dans la suite du manuscrit.

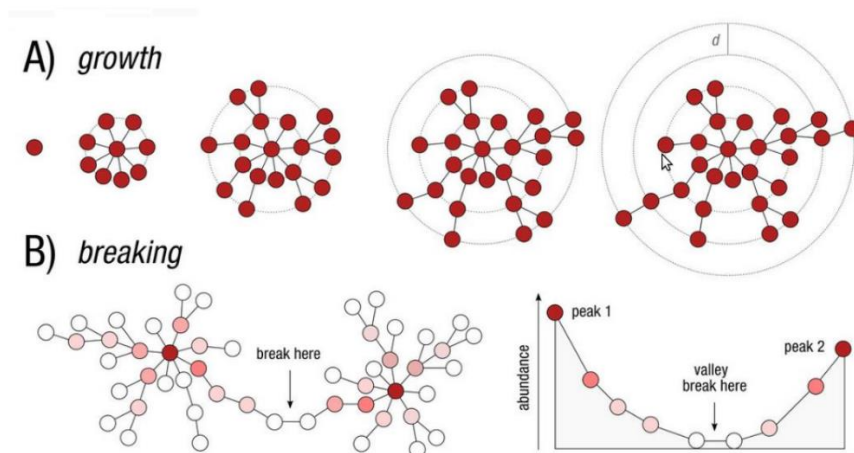


Figure 14 : Schéma de l'étape de clustering suivant l'approche Swarm

Le fichier issu de l'étape de « Clustering » comporte un nombre important d'OTU, notamment des OTU contenant une seule séquence d'origine. Ces séquences peuvent provenir d'erreurs issues de l'amplification par PCR : elles sont appelées chimères. Il est nécessaire de les supprimer. Une étape de « déchimèrisation » est donc réalisée. Dans cette étape, les OTU peu abondants sont considérés comme chimères et sont donc supprimés.

Dans l'étape 5, des filtres d'abondance sont appliqués sur le fichier d'OTU sans chimère, permettant une fois de plus de supprimer les OTU les moins abondantes. A cette étape, un filtre peut être ajouté pour enlever une éventuelle contamination.

Enfin, le fichier d'OTU « nettoyé » est affilié taxonomiquement grâce à deux bases de données de référence : 16S\_SILVA\_Pintail100\_138 pour les données bactériennes et

ITS\_UNITE\_Eukaryote\_8.0 pour les données fongiques et algaires. Deux fichiers sont obtenus : un fichier d'abondance et un arbre phylogénétique.

L'analyse biostatistique permet également la visualisation de données, ainsi que les calculs d'indice de biodiversité tels que l'alpha et bêta-diversité.

L'alpha-diversité correspond à la diversité intra-échantillon, elle peut être caractérisée par différents indices selon la méthode utilisée :

- **Richesse observée** : cet indice correspond au nombre d'OTU observées.

$$S_{rich} = \sum_s 1_{\{p_s > 0\}} = \sum_i c_i \quad (1)$$

Avec  $c_i$  le nombre d'espèce observé  $i$  fois  $i = (1, 2, \dots)$  et  $p_s$  la proportion des espèces  $s$  ( $s = 1, 2, \dots, S$ )

- **Shannon** : la largeur de la distribution de l'abondance relative de l'OTU reflète la capacité ou non à prédire l'OTU d'une bactérie choisie au hasard (Shannon, 1948).

$$S_{Shan} = - \sum_s p_s \log(p_s) \leq \log(S) \quad (2)$$

- **Simpson** : Il définit la probabilité que deux bactéries prises au hasard dans la communauté appartiennent à des OTU différentes (Simpson, 1949).
- **Inverse Simpson** : il correspond à l'inverse de la probabilité que deux bactéries prises au hasard appartiennent à la même OTU

$$S_{Inv-simp} = \frac{1}{p_1^2 + \dots + p_S^2} \leq S \quad (3)$$

Avec  $p_s$  la proportion d'espèce  $s$  ( $1, 2, \dots, S$ ).

- **Chao 1** : c'est le nombre d'OTU observées et l'estimation du nombre d'OTU non observées (Chao et al., 2006).

$$S_{Chao1} = S_{rich} + \widehat{C}_0 \quad (4)$$

La bêta-diversité correspond à la diversité inter-échantillons et peut se baser sur la composition de la communauté microbienne comme Jaccard ou Bray-Curtis ou sur une approche phylogénétique comme Unifrac et wUnifrac.

- **Jaccard** : fraction des espèces spécifiques entre deux échantillons (Jaccard, 1901)

$$d_{Jac} = \frac{\sum_s 1_{\{n_s^1 > 0, n_s^2 = 0\}} + 1_{\{n_s^2 > 0, n_s^1 = 0\}}}{\sum_s 1_{\{n_s^1 + n_s^2 > 0\}}} \quad (5)$$

Avec  $n_s^1$  le nombre d'espèces  $s$  ( $s = 1, 2, \dots, S$ ) dans la communauté 1 et  $n_s^2$  le nombre d'espèce dans la communauté 2.

- **Bray-Curtis** : fraction de la communauté spécifique entre deux échantillons (Bray and Curtis, 1957).

$$d_{BC} = \frac{\sum_s |n_s^1 - n_s^2|}{\sum_s |n_s^1 + n_s^2|} \quad (6)$$

Avec  $n_s^1$  le nombre d'espèces  $s$  ( $s = 1, 2, \dots, S$ ) dans la communauté 1 et  $n_s^2$  le nombre d'espèce dans la communauté 2.

- **Unifrac** : fraction de l'arbre phylogénétique spécifique entre deux échantillons (Lozupone and Knight, 2005)

$$d_{UF} = \frac{\sum_e l_e [1_{\{p_e > 0, q_e = 0\}} + 1_{\{q_e > 0, p_e = 0\}}]}{\sum_e l_e \times 1_{\{p_e + q_e > 0\}}} \quad (7)$$

Avec  $e$  qui correspond a chaque branche de l'arbre phylogénétique,  $l_e$  la longueur de cette branche,  $p_e$  correspondant à la fraction de la communauté 1 et  $q_e$  correspondant à la fraction de la communauté 2 sous la branche  $e$ .

- **wUnifrac** : fraction de la diversité spécifique entre deux échantillons

$$d_{wUF} = \frac{\sum_e l_e |p_e - q_e|}{\sum_e l_e (p_e + q_e)} \quad (8)$$

Avec  $e$  qui correspond a chaque branche de l'arbre phylogénétique,  $l_e$  la longueur de cette branche,  $p_e$  correspondant à la fraction de la communauté 1 et  $q_e$  correspondant à la fraction de la communauté 2 sous la branche  $e$ .

Dans la suite de l'étude, seul l'indice de Bray-Curtis à été utilisé car il permet une approche focalisée sur les structures des communautés microbiennes, se basant sur les fractions des communautés spécifiques aux deux communautés étudiés.

## 3.2. Analyses physico-chimiques

### 3.2.1. Observation par microscopie numérique et électronique

Les observations microscopiques des faciès d'altération du calcaire ont été réalisées à l'aide du microscope numérique VHX-6000, Keyence®. Cet appareil permet d'acquérir des images 2D et 3D, ainsi que de mesurer par exemple des rugosités surfaciques : Sz (maximale), Sa (moyenne) et Sq (quadratique).

Afin d'observer les faciès d'altération à l'échelle microscopique, le microscope électronique à balayage (MEB) TM3030, HITACHI® couplé à un spectromètre dispersif en énergie (EDS) Oxford, logiciel AztecOne a permis d'analyser directement des échantillons sans métallisation préalable.

### 3.2.2. Analyses des phases cristallines par Diffraction à rayon X (DRX)

À partir de la poudre provenant des différentes stèles, une analyse des phases cristallines présentes à la surface de calcaire a été effectuée en utilisant le diffractomètre PANALYTICAL X'PERT PRO équipé d'une anode de cuivre. L'identification des phases cristallines présentes a été réalisée à l'aide de deux logiciels : Qual X et HighscorePlus 2.0.

### 3.2.3. Analyse de la fraction soluble par chromatographie ionique



## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Une élution a été réalisée à partir de 0,5 g de poudre de calcaire, mis en solution avec 4 mL d'eau Milli Q. Après 2h en rotation à 40 rpm, la solution a été centrifugée à 1500 rpm pendant 2 min. Le surnageant a été prélevé puis filtré à l'aide d'un filtre seringue à 0,2 µm de porosité. Le surnageant a été dilué dans de l'eau Milli Q pour l'analyse.

La concentration en anions et cations solubles a été mesurée à l'aide de la chromatographie ionique 930 Compact IC Flex Metrohm® de la plateforme PRAMMICS OSU-EFLUVE UMS 3563. Les différents cations en solution sont séparés utilisant une colonne C4 (250 mm) constituée de gel de silice avec des groupes carboxyles ainsi qu'une phase mobile composée d'acide nitrique et d'acide dipicolinique à débit identique tout au long de l'analyse. Cette méthode permet l'identification et la quantification des différents cations : lithium, sodium, ammonium, potassium, manganèse, calcium, magnésium, strontium (références : IC multi element, Sigma Aldrich®). Les limites de quantification des cations en solution sont indiquées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Limites de quantification des cations en ppb.

Éléments	Li <sup>+</sup>	Na <sup>2+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Sr <sup>2+</sup>
LQ (ppb)	10	25	25	25	50	25	10	100

Les anions présents en solution sont séparés en utilisant une colonne A supp 7 (250mm), composée d'alcool polyvinylique avec un groupe ammonium quaternaire, ainsi qu'une phase mobile composée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et de NaHCO<sub>3</sub> avec un gradient de débit durant l'analyse : 30 min avec un débit 0.9 mL.min<sup>-1</sup> à faible conductivité puis augmentation de la conductivité par ajout d'éluant plus concentré pour séparer les espèces ioniques ayant besoin de plus de force ionique. Cette méthode permet l'identification et la quantification de différents anions organiques (glycolate, acétate, propionate, formate, MSA, oxalate) et inorganiques (fluorures, chlorures, bromures, nitrates, phosphates, sulfates). Différents échantillons de référence ont été utilisé pour la quantification des anions :

- F<sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Br<sup>-</sup>: Anion multi element, Merck®
- Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> : Anion multi element, Merck®
- Anions organiques : Glycolate (84968-180, VWR®), Acétate (84951-180, VWR®), Propionate (84991-180, VWR®), Formate (84967-180, VWR®), MSA (84977-180, VWR®), Oxalate (84986-180, VWR®)

Les limites de quantification des anions organiques et inorganiques sont mentionnées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Limite de quantification des anions organiques et inorganiques en ppb.

Éléments	Glycolate	Acétate	Propionate	Formate	MSA	Oxalate
LQ (ppb)	5	5	5	5	5	10

Éléments	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
LQ (ppb)	20	15.6	20	15.6	20	15.6

L'identification et la quantification des espèces ioniques est réalisée à l'aide du logiciel MagIC Net 3.3 Metrohm®.

## 4. Vieillesse artificielle en conditions contrôlées : protocole, suivi et analyses

### 4.1. Protocole

Différentes simulations en conditions contrôlées ont été réalisées sur 63 jours afin de comprendre les interactions pluie, microorganismes et calcaire en faisant varier les différents agents d'altération (Figure 15).

Dans un second temps, du calcaire sain a été mis en altération en flacon de culture, en présence d'eau de pluie de synthèse dont la composition est semblable à la pluie actuelle et de communautés microbiennes issues d'une stèle du Père Lachaise. Par la suite, suivant le même modèle, un premier agent d'altération a été modifié en pré-exposant les calcaires à une pollution gazeuse et particulaire. Enfin dans une troisième partie, la composition de l'eau de pluie synthétique a été modifiée afin de s'adapter à la composition des pluies dans un contexte de pollution ancienne, actuelle et future.

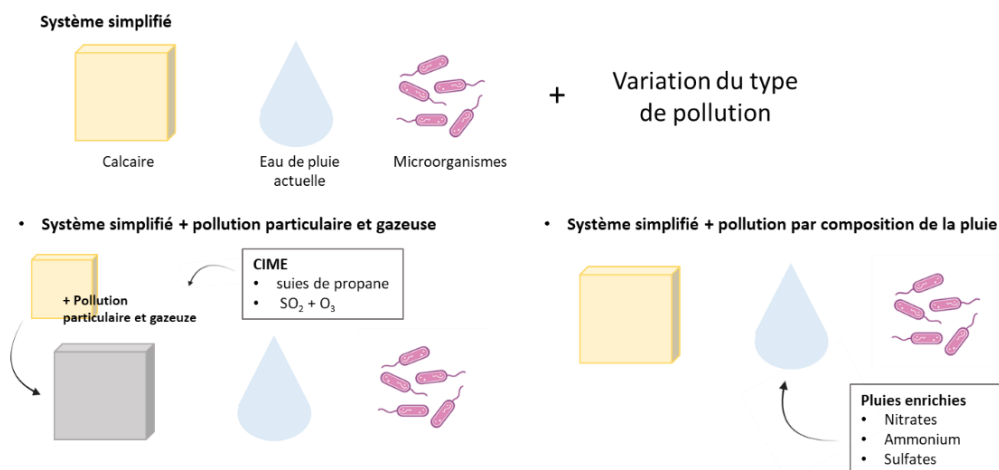


Figure 15 : Schéma de la démarche expérimentale suivie pour l'altération des calcaires en milieu contrôlé. (1) Simulation d'altération des calcaires dans CIME 2 agit pas sur la température ni la luminosité mais  $T^\circ$  ambiante dans pièce climatisé  $\sim 22^\circ\text{C}$ , lumière ambiante ; (2) Simulation d'altération du calcaire en flacon de culture en faisant varier les pollutions.

#### 4.1.1. Préparation des calcaires et stérilisation

Des morceaux de calcaire St Maximin Roche Fine ont été découpés à la scie diamantée (Escil Carela 2000) dans les dimensions suivantes : 1 cm x 1 cm x 0,5 cm. Ils ont ensuite été rincés à l'eau Milli Q afin d'enlever l'excès de poudre créée lors de la découpe. Afin de stériliser un maximum les coupons de calcaire sans changer les paramètres intrinsèques de la roche, 1 mL d'éthanol 100 % a été ajouté sur les calcaires. Sous l'effet de capillarité, l'ensemble du réseau poreux du calcaire a été en contact avec l'éthanol. Les calcaires ont été ensuite laissés sous une hotte à flux laminaire jusqu'à évaporation complète de l'éthanol. Enfin, toujours sous hotte, les coupons ont été soumis à deux cycles d'UV de 30 min sur les six faces du calcaire.

#### 4.1.2. Exposition des calcaires soumis à une pollution gazeuse et particulaire

Le calcaire St Maximin Roche Fine a été découpé en morceau de 1 x 1 x 0,5 cm. Ils ont ensuite été placés en Chambre d'Interaction Matériaux-Environnement CIME (Chabas et al., 2015). CIME est une chambre de simulation dédiée à l'étude de l'altération des matériaux du patrimoine. Elle permet l'injection contrôlée de différents gaz et particules atmosphériques. Dans un premier temps, dans l'enceinte de CIME, des coupons de calcaire ont été exposés à un cycle de dépôts de suies de combustion de propane pendant 30 min à l'aide du MiniCAST Soot generator MOD5201A, Jing® suivi de 18h de sédimentation. Puis les coupons ont subi un cycle de vieillissement d'un mois, à raison de 6 injections par jours suivant le protocole : 20 injections de 400 ppb de SO<sub>2</sub> suivi d'une injection de O<sub>3</sub> à 600 ppb pendant 12 min. L'humidité relative (HR) de l'enceinte a été maintenue entre 90 et 100 % durant le cycle. Avant utilisation, les coupons pré-vieillis ont été stockés dans une boîte contenant du gel de silice (HR = 0 %) à température ambiante.

Les coupons pré-vieillis ont ensuite été stérilisés suivant le protocole décrit (§ 4.1.1)

### 4.1.3. Préparation de l'inoculum microbien

La poudre de calcaire nécessaire à la préparation de l'inoculum microbien a été récupéré sur la stèle ST10V1 au cimetière du Père Lachaise, de par sa similarité au calcaire St Maximin Roche Fine. La poudre de calcaire a été conservée à 4°C jusqu'à son utilisation.

Dans 2 tubes, ont été répartis respectivement 15 g et 11 g de poudre de calcaire, auxquels ont été ajoutés à chacun 35 mL de sérum physiologique 0.9 % (9 g de NaCl pour 1 L d'eau Milli Q) ayant été préalablement stérilisés par autoclavage (21 min à 121°C). Ce mélange a été mis en rotation pendant 1 h à 40 rpm, puis centrifugé pendant 2 min à 1500 rpm. Après centrifugation, le surnageant des deux tubes a été récupéré et regroupé dans un seul tube, qui sera considéré comme par la suite comme l'inoculum microbien.

Sur chaque morceau de calcaire préalablement stérilisé, 1 mL d'inoculum a été déposé et laissé en pré incubation pendant 48 h à 25°C.

### 4.1.4. Préparation des pluies polluées

Afin de créer une eau de pluie synthétique proche des compositions réelles, de l'eau de pluie récoltée au Père Lachaise en mars 2016 a été préalablement analysée par chromatographie ionique afin de connaître sa composition (Balland-Bolou-Bi et al., 2016, 2023). La composition ionique est décrite dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Tableau des concentrations en ions de l'eau de pluie récoltée au cimetière du Père Lachaise en 2016.

Eléments	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Concentration (mg.L-1)	9,80	0	2,91	1,79	0,16	1,58	0,32	4,22	16,59	3,50

En se basant sur cette composition, une eau de pluie synthétique a été élaborée à partir de différents sels pour avoir une composition ionique semblable (Tableau 10). Le Tableau 10-A correspond à la masse de sels ajoutée à un litre Milli-Q® pour obtenir une eau de pluie synthétique. Les concentrations ioniques sont données dans le Tableau 10-B.

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Tableau 10 : (A) Masse de sels utilisés dans la composition de l'eau de pluie synthétique. (B) Equivalence en concentration d'ions (mg. L<sup>-1</sup>) de l'eau de pluie synthétique.

<b>A</b>		<b>B</b>	
Sels	Masse (mg)	Éléments	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )
KCl	17	K <sup>+</sup>	11,04
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,6	Ca <sup>2+</sup>	0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	Na <sup>+</sup>	2,91
KNO <sub>3</sub>	5,5	Mg <sup>2+</sup>	1,81
MgCl <sub>2</sub>	4	Al <sup>3+</sup>	0
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	8	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,69
NaCl	7	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0,32
Al (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , 9H <sub>2</sub> O	0	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3,12
NH <sub>4</sub> Cl	5	Cl <sup>-</sup>	18,62
		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3,37

À partir de cette composition, trois eaux de pluies ont été créées en ajoutant les concentrations maximales de sulfates, nitrates et ammonium, trouvées dans des eaux de pluie dans la littérature (Tableau 11).

Tableau 11: Tableau de la composition ionique des quatre pluies synthétiques utilisées dans les expériences

Eléments	Concentration (mg.L <sup>-1</sup> )			
	P	PS	PA	PN
K <sup>+</sup>	9,81	2,71	6,78	15
Ca <sup>2+</sup>	0	0	0	0
Na <sup>+</sup>	4,26	3,02	0,14	2,99
Mg <sup>2+</sup>	1,34	7,41	1,30	3,02
Al <sup>3+</sup>	0	0	0	10,61
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	3,44	18,72	14,24	2,36
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	3,20	0,35	0,29	0,32
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	7,39	23,85	4,67	4,77
Cl <sup>-</sup>	17,55	45,20	32,22	16,67
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1,29	4,30	3,93	31,92
pH	8,55	7,00	7,04	4,29

### 4.1.5. Composition des différents microcosmes

Les microcosmes ont été préparés dans des flacons de 75 cm<sup>3</sup> (VWR), dans lesquels ont été ajoutés 100 mL de pluie synthétique (ch Chap 2. §4.1.4), un morceau de calcaire et 1 mL d'inoculum microbien suivant différentes conditions :

- Eau de pluie + inoculum microbien + calcaire
- Eau de pluie + inoculum microbien + calcaire exposé à la pollution gazeuse et particulaire
- Eau de pluie polluée (P, PN, PS ou PA) + inoculum microbien + calcaire

Pour chaque condition, des témoins abiotiques (eau de pluie + calcaire) et des témoins sans calcaire (eau de pluie + inoculum microbien) ont été réalisés. Chaque microcosme est produit en triplicata.

### 4.1.6. Paramètres de la manipulation

Pour les deux suivis, chaque condition a été réalisée en triplicata. Les flacons ont été placés au Minitron incubateur agité INFORS HT à 25°C de la plateforme PRAMMICS OSU-EFLUVE UMS 3563, avec une agitation à 50 rpm et suivant un cycle d'alternance lumière/obscurité de 12 h chacune (Figure 16).

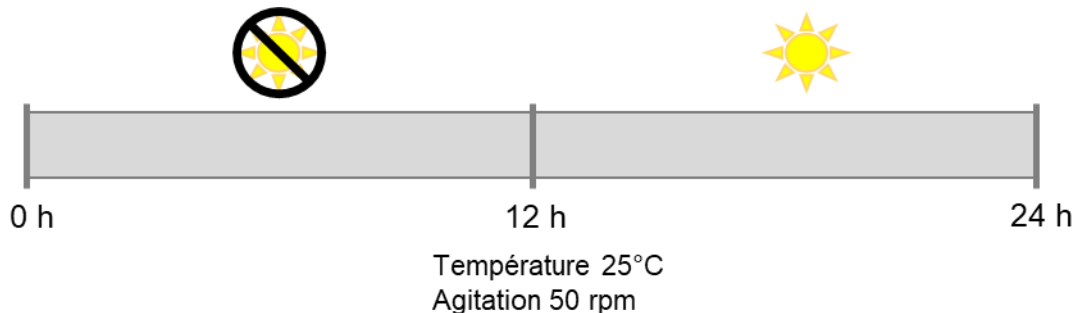


Figure 16 : Conditions d'exposition des calcaires au Minitron : 12h dans l'obscurité, 12h en présence de lumière, température 20°C et agitation 50 rpm.

Chaque semaine, un suivi des paramètres biologiques et chimiques a été conduit (cf Chap. 2 §4.2.1 et § 4.2.2).

## 4.2. Suivi expérimental hebdomadaire

### 4.2.1. Suivi du développement microbien

#### 4.2.1.1. Dénombrement bactérien et fongique cultivable en milieu solide

Pour dénombrer les bactéries et les champignons cultivable présent dans les microcosmes, deux milieux de culture ont été préparés : du milieu Plate Count Agar (PCA à 23,5 g.L<sup>-1</sup>) et de l'extrait de Malt (17 g.L<sup>-1</sup>) contenant de l'agar-agar à une concentration 15 g.L<sup>-1</sup> et dilués dans de l'eau distillée. Les milieux ont été stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 21 min. Après refroidissement et avant gélification, de l'ampicilline et de la fongizone à concentration 1 g.L<sup>-1</sup> sont ajoutés respectivement à l'extrait de Malt et au PCA.

Les échantillons sont préparés en réalisant une série de dilutions en cascade (§ 3.1.1)

Pour les champignons, le milieu de culture est d'abord coulé, puis après refroidissement total et prise en masse de la gélose, 100 µL des solutions diluées sont ensemencés en surface et étalés à l'aide d'un étaleur en L.

Pour les bactéries, l'ensemencement est réalisé en profondeur ou en masse. 100 µL des solutions diluées sont placées sous forme de gouttelette au fond de la boîte de Petri, puis le milieu de culture encore liquide est coulé.

Après prise en masse des géloses, les boîtes de Petri sont placées à l'étuve à 25°C pendant 48 h pour les bactéries et 96 h pour les champignons.

Après incubation, les colonies sont comptées et rapportées en Unités Formant Colonie par millilitre (UFC.mL<sup>-1</sup>).

### **4.2.1.2. Dénombrement microbien par cytométrie**

Le suivi du nombre de cellules vivantes a été mesuré à l'aide du Cytomètre en flux Bactosense bNovate technologie®. Cet appareil permet le dénombrement des cellules intactes par marquage au fluorochrome SYBR GREEN I. Pour l'analyse, 90 µL d'échantillons sont utilisés. Dans un premier temps, l'échantillon va être mis en contact avec le fluorochrome qui va marquer les cellules intactes. Après 10 min d'incubation à 37°C, la mesure de l'absorbance est réalisée à l'aide d'une diode laser 488 nm. Les limites de détection de l'appareil en termes de nombre sont de 100 cellules par millilitre (limite basse) et de 5 millions de cellules par millilitre (limite haute). La limite de détection en terme de taille de cellule est de 0,1 µm.

### **4.2.1.3. Suivi de la concentration de microorganismes photosynthétique par BenthosTorch**

La BenthosTorch, BBE Moldaenke® est un appareil permettant la mesure de la concentration en organismes photosynthétiques de manière non destructive. Cet appareil permet d'obtenir la concentration (en µg.cm<sup>-2</sup>) en algues vertes, cyanobactéries et diatomées dans des milieux solides ou aqueux. Il utilise le principe de la fluorescence. La lumière émise par les LED à plusieurs longueurs d'ondes (470, 525 et 610 nm) va exciter les pigments contenus par les microorganismes. L'intensité de la fluorescence de la chlorophylle permet de calculer les concentrations des différents microorganismes benthiques. Les mesures ont été réalisées en triplicata, en prélevant 500 µL de solution qui ont été placés dans les unités de mesure fournies par le fabricant.

### **4.2.1.4. Suivi de l'activité enzymatique totale**

Le protocole de mesure de l'activité enzymatique totale décrit précédemment (cf Chap. 2 §3.1.2) a été modifié et adapté à des solutions aqueuses. Le tampon phosphate et la solution de fluorescéine di-acétate ont été préparés selon le protocole décrit précédemment.

Pour l'analyse, dans un tube eppendorf® de 2 mL contenant 500 µL d'échantillon, ont été ajoutés 250 µL de tampon phosphate et 250 µL de FDA. Après deux heures d'agitation dans l'obscurité à 40 rpm, l'absorbance est mesurée à 490 nm à l'aide du spectrophotomètre Genesis™ 150 Thermo Fisher Scientific®.

## **4.2.2. Suivi des paramètres chimiques**

### **4.2.2.1. Analyses par chromatographie ionique**

Le suivi de la composition ionique des microcosmes a été réalisé par chromatographie ionique (CI). Pour cela, 500 µL de chaque échantillon ont été dilués dans 6,5 mL d'eau Milli-Q®. Les dilutions ont été ensuite filtrées à l'aide d'un filtre seringue 0,2 µm en acétate de cellulose. Les échantillons ont été analysés suivant le protocole décrit §3.2.3.

#### 4.2.2.2. Suivi du pH

A chaque pas de temps, le pH de chaque échantillon a été mesuré à l'aide du pH-mètre APERA instrument 820 précision séries muni d'une sonde pH électrode 881, Labsen, suivant la norme ISO 10390.

#### 4.2.2.3. Modélisation de spéciation chimique en solution

À partir des données de concentrations en ions et de pH mesuré, des modélisations de spéciation chimique en solution ont été réalisées en utilisant le logiciel Visual MINTEQ 3.1. Le code originel a été construit par l'USEPA sous le nom de MINTEQA2 et il est aujourd'hui maintenu par Jon Petter Gustafsson de l'Université KTH en Suède. Ce logiciel a permis de calculer les indices de saturations des phases minérales pouvant être formées. L'indice de saturation (IS) correspond au log du rapport entre le produit de l'activité ionique  $Q$  et de la constante de solubilité  $K$  de la phase correspondante.

$$IS = \log \Omega = \log \frac{Q}{K} \quad (9)$$

Si  $IS > 0$ , la solution est sursaturée par rapport à la phase minérale et si  $IS < 0$ , la solution est sous-saturée. Si  $IS = 0$ , alors la solution est à l'équilibre avec cette phase.

Le calcul de la spéciation repose sur deux lois :

- La loi de la conservation de la matière :

$$Ci(Tot) = \sum_{j=1}^{Ns} nij[Sj] \quad (10)$$

Avec  $Ci(Tot)$  la concentration totale d'un élément,  $S$  l'espèce de l'élément,  $j$  le nombre d'espèces,  $Ns$  le nombre d'espèce, et  $n$  le coefficient stœchiométrique.

- La loi d'action de masse :  
Pour une réaction :



$n_x$  correspond au coefficient stœchiométrique,  $A$  et  $B$  correspondent aux activités des réactifs et  $C$  et  $D$  correspondent aux activités des produits.

La constante d'équilibre  $K$  est égale au produit des activités des réactifs sur l'activité des produits :

$$K_{(T)} = \frac{(C)^{n_c}(D)^{n_d}}{(A)^{n_a}(B)^{n_b}} \quad (12)$$

### 4.3. Caractérisation des patines altération

#### 4.3.1. Colorimétrie

Afin de quantifier l'altération chromatique des échantillons de calcaire après exposition de 63 jours, ceux-ci ont tout d'abord été séchés. Les mesures de colorimétrie ont été réalisées à l'aide du spectrocolorimètre CM600-d Konica Minolta® en utilisant le logiciel SpectraMagic™ NX KonicaMinolta®.

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Les mesures ont été réalisées dans l'espace chromatique Lab. Les paramètres du système  $L^*a^*b$  sont :

- $L^*$  qui correspond à la clarté et est mesuré entre 0 et 100 où 0 correspond au noir et 100 au blanc de référence
- $a^*$  qui correspond à une valeur chromatique allant du vert au rouge
- $b^*$  qui correspond à une valeur chromatique allant du bleu au jaune.

Les mesures obtenues définissent donc un point situé dans un repère à trois dimensions, la sphère de l'espace couleur  $L^*a^*b^*$  appelé aussi CIELAB, caractérisant la couleur (Figure 17).

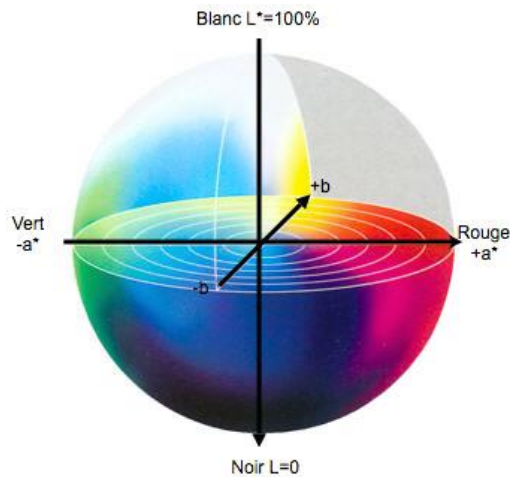


Figure 17 : Sphère de la couleur CIELAB (<https://www.normaprint.fr/blog/modeliser-la-couleur/>)

## 5. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé sur le logiciel RStudio, suivant une logique de décision décrite dans la Figure 18.

Dans un premier temps, il faut tester la normalité du jeu de donnée étudié. Si le jeu de données suit une loi normale, une ANOVA sera réalisée à la suite. Dans le cas où la p-valeur de l'ANOVA ( $\alpha$ ) est inférieure à 0,05, cela signifie qu'au moins un des échantillons est différent des autres. Pour l'identifier, un test post hoc de Tukey est réalisé.

Dans le cas où le jeu de données de départ ne suit pas une loi normale, un test de Kruskal Wallis est réalisé. De la même manière que précédemment, si la p-valeur obtenue est inférieure à 0,05, cela signifie qu'au moins un des échantillons est différent des autres et dans ce cas le test post hoc de Conover sera utilisé pour l'identifier.



## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

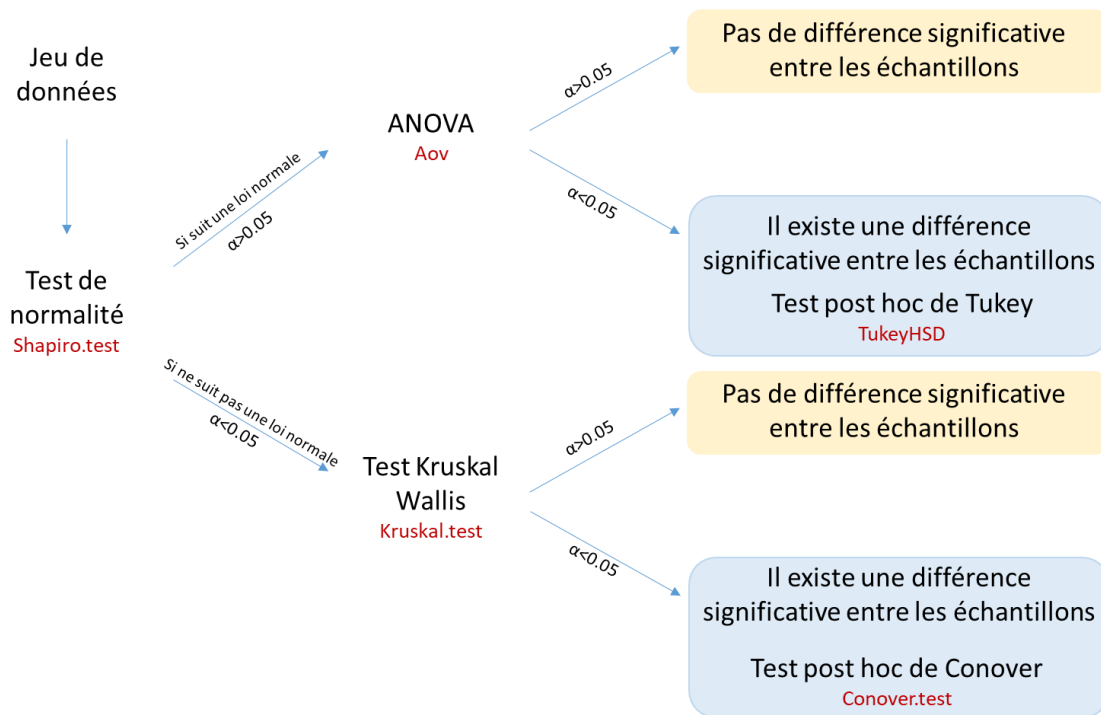


Figure 18 : Arbre de décision des tests statistiques.

Les différents packages utilisés pour les tests statistiques sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des différents packages R utilisés.

Packages	Utilisation	Références
Factoshiny	Analyse en composante principale (ACP)	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=Factoshiny">https://CRAN.R-project.org/package=Factoshiny</a>
Conover.test	Test post hoc sur rang (après Kruskal Wallis)	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=conover.test">https://CRAN.R-project.org/package=conover.test</a>
rcompanion	Permet de nommer les degrés de similitude par des lettres : a, b, c... Si deux échantillons portent la même lettre cela signifie qu'ils ne sont pas significativement différents.	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=rcompanion">https://CRAN.R-project.org/package=rcompanion</a>
pheatmap	Permet la réalisation de carte de chaleur (représentation graphique)	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap">https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap</a>
RColorBrewer	Ajoute une palette de couleur à un graphique	<a href="https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer">https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer</a>

⇒ **L'ensemble des analyses chimiques et biologiques permettent de caractériser l'altération des échantillons altérés à long (tombe du Père Lachaise), moyen (coupons) et court (simulation en laboratoire) termes.**

# **ÉTUDE DU VIEILLISSEMENT NATUREL DES PIERRES CALCAIRES**

## **CHAPITRE 3 :**

## Introduction :

Ce chapitre est un état des lieux de l'altération du calcaire en conditions réelles à court et long terme exposé à un environnement urbain et pollué.

Les altérations observées sur la pierre calcaire résultent de l'action de différents agents (microorganismes, pollution, météorologie...). De plus, ces agents peuvent avoir des interactions entre eux, par sélection de certaines communautés microbiennes en fonction de la pollution atmosphérique ou encore par la modification de la composition de l'eau de pluie induite par un changement de pollution.

Les tombes du Père-Lachaise montrent des faciès d'altération très prononcés résultant d'environ 200 ans d'altération biologique et physico-chimique en milieu urbain. Ces tombes sont donc des bons témoins de l'altération ancienne et prolongée. Cependant, depuis 200 ans, les politiques environnementales ont permis, par exemple, de diminuer le SO<sub>2</sub> atmosphérique, changeant donc le type de pollution au cours du temps. Il est donc probable que les faciès d'altération du calcaire aient varié, ainsi que les communautés microbiennes associées. Les prélèvements effectués en 2020 et 2021 correspondent alors à un instant t notamment en termes de communautés microbiennes qui sont certainement associées aux facteurs environnementaux actuels

En complément, pour comprendre les premiers stades d'altération, des coupons de calcaires ont été exposés au cimetière du Père-Lachaise, jusqu'à ce qu'une patine d'altération homogène se soit développée sur l'ensemble des coupons de même orientation. Pendant 5 ans, à une fréquence d'une fois par an, des mesures de concentrations *in situ* en algues vertes et en bactéries ont été réalisées. Puis après 5 ans, des échantillons ont été collectés afin de caractériser l'altération à court terme de calcaire au moyen d'analyses biologiques et physico-chimiques.

## Chapitre 3.1 : Étude du vieillissement naturel de la pierre calcaire à court terme

### Résumé :

Afin de mieux comprendre les premiers stades d'altération du calcaire, des morceaux de calcaire St Maximin Roche Fine (43 millions d'années, Lutétien), ont été exposés en conditions réelles, au cimetière du Père-Lachaise, durant 5 ans, dans différentes situations : à la pluie en position verticale (EV) et horizontale (EH) et abrités des pluies en position verticale (AV) et horizontale (AH).

L'état de l'art a en effet montré que certaines altérations de la pierre telles que les efflorescences de gypse (croûtes noires) se retrouvaient majoritairement dans des parties abritées alors que dans les zones exposées aux pluies, la colonisation biologique était beaucoup plus importante.

Durant ces 5 ans, un suivi des microorganismes phototrophes a été réalisé à l'aide d'une BenthosTorch (Bbe Moldaenke®) à raison d'une mesure par an. Cependant, les mesures sont très dépendantes des conditions météorologiques des jours précédents et ne sont pas cumulatives (Reboah et al., 2023). De ce fait, après 5 ans d'exposition, les coupons de calcaire ont été prélevés puis analysés en laboratoire (analyses physico-chimiques et biologiques) afin d'identifier les microorganismes présents et d'étudier les premiers faciès d'altération.

Les résultats ont montré une colonisation biologique très importante à la pluie (verticale et horizontale) avec la présence de biofilm d'algues vertes et de mousses, alors que les échantillons abrités sont légèrement salis et la colonisation biologique est peu visible. En termes de colonisation, les communautés bactériennes et fongiques présentes sur les coupons exposés aux pluies sont très différentes entre les positions horizontales et verticales. Elles sont assez semblables pour tous les coupons abrités. Du point de vue chimique, aucune néo-cristallisation n'a été identifiée en position exposée. Au contraire, du  $\text{KNO}_3$  a été retrouvé pour les échantillons abrités de manière horizontale et verticale. A ce stade, les altérations physiques ou chimiques qui découlent de la bio-colonisation ou du climat et de la pollution sont difficiles à observer. Les processus de dissolution ou de dépôt sont plus lents à produire leurs effets, alors que la colonisation biologique qui, à minima, a un impact esthétique, est très rapide.

Cet article est actuellement publié dans la revue Heritage Science.

## The biological contribution to the weathering of limestone monuments in a vegetated urban area: results of a 5-year exposure.

Paloma Reboah<sup>1,2</sup>, Aurélie Verney-Carron<sup>1</sup>, Samir Abbad Andaloussi<sup>2</sup>, Vanessa Alphonse<sup>2</sup>, Olivier Lauret<sup>1</sup>, Sophie Nowak<sup>3</sup>, Anne Chabas<sup>1</sup>, Mandana Saheb<sup>1</sup>, Clarisse Balland-Bolou-Bi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univ Paris Est Creteil and Université Paris Cité, CNRS, Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques (LISA), F-94010, Créteil, France

<sup>2</sup> Univ Paris-Est Creteil, Laboratoire Eau, Environnement et Systèmes Urbains (LEESU), Ecole des Ponts, Val de Marne, 94010 Créteil, France

<sup>3</sup> Université Paris Cité, CNRS, ITODYS (UMR 7086), F-75013 Paris, France

### Abstract:

Biological activity, climate and pollution are responsible for the degradation of building stones, especially limestone, which is widely used in the Paris region. In order to determine the respective contribution of physicochemical and biological processes to the degradation of limestone, limestone specimens from the Père-Lachaise cemetery (Paris, France) were exposed for five years under different conditions: sheltered from or exposed to rain and in horizontal or vertical position. After exposure, the collected samples were characterized by light and electron microscopy, X-Ray diffraction and ion chromatography after elution. The results showed an intense biocolonization of the samples exposed to rain, while the sheltered samples were more affected by the pollution (soiling). The characterization of the bacterial and fungal communities using Next Generation Sequencing Illumina 16S for bacteria and ITS for fungi highlighted that five main bacterial phyla were identified: Actinobacteriota, Bacteroidota, Cyanobacteria, Proteobacteria and Deinococcota (major genera *Flavobacterium*, *Methylobacterium-Methylobacter*, *Sphingomonas*, *Roseomonas* and *Nocardiodes*). Among the fungi, the phylum Ascomycota was predominant with the genera *Cladosporium*, *Ramularia*, *Aureobasidium* and *Lecania*. However, the alteration of the limestone is difficult to quantify at this stage. Potassium nitrate of rain origin has been found in the sheltered area, but no gypsum. Therefore, the biocolonization is a fast phenomenon on the stone and the physico-chemical processes derived from it, caused by climate and pollution, are slower. This is in agreement with the long-term observations made on old and unrestored graves of the cemetery described in the literature.

**Keywords:** bio-deterioration, limestone, microbial communities, preservation, biological colonization, exposure campaign.

### 1. Introduction

Lutetian limestone (43 million years) is widely used in buildings in the northern part of France due to its proximity, with a lot of quarries located in and around the Paris region (Blanc et al., 2000). Over time, the monuments made out of limestone are exposed to various physical, chemical and biological processes, which can induce their deterioration. The intensity of degradation depends on intrinsic and extrinsic factors. Intrinsic parameters are related to the characteristics of the stone: chemical and mineralogical composition, porosity, and roughness. Extrinsic parameters include climate, pollution, and biological organisms.

First, climate plays an important role on the natural limestone degradation and particularly meteorological parameters (rain, wind, insolation, relative humidity, temperature) that can induce physico-chemical deterioration, such as erosion, loss of material, salt crystallization (by alternation

of moisture – drying) (Mizutani et al., 2015), change of the porosity (by freeze-thaw cycles in presence of water on porous network) (Sand, 1997), etc.

Then, the natural alteration is generally increased by the atmospheric pollution (gaseous pollutants and particular matter). Air pollution interacts with limestone through dry (in absence of rain) or wet deposition (in presence of rain). Black crusts are an example of dry deposition. They correspond to the crystallization of gypsum ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) by reaction between Ca from the stone and atmospheric  $\text{SO}_2$ . On a monument, they are preferentially found in sheltered part from rain (Camuffo, 1986; Charola et al., 2007). Wet deposition is affected by acidification of the rain, that takes place directly in the cloud or during rainfall by washing of atmospheric pollutants suspended in the lower atmosphere (Camuffo, 2016).

Stones can also be colonized by microorganisms such as fungi, bacteria, cyanobacteria, mosses, lichens, or algae.

Over a period of 5 years to several decades, it can be expected that biocolonization will cause biodeterioration in addition to the aesthetic impact. The growth of mosses can cause serious damage to stone monuments and appears to occur later than the other organisms. They are attached to the substrate by small structures called rhizoids, which expand and contract to break down the stone matrix, secreting organic acids, inorganic acids, polysaccharides, and other substances that continuously weather the rock matrix by chemical action. For example, mosses form a layer of water on the stone surface after rainfall, increasing the interaction between water and stone (Jang and Viles, 2022). Bacteria are responsible for the formation of biofilms that cause large color changes induced by pigments. By absorbing more light, the temperature change can cause a physical stress through expansion and contraction processes (Scheerer et al., 2009; T. Warscheid and Braams, 2000). Some bacterial species, such as sulfur cycle bacteria or ammonia and nitrite cycle bacteria, may be involved in chemical damage to the stone. In sulfur-polluted environments, sulfur cycle bacteria may even convert limestone to gypsum. This gypsum may have a dark coloration caused by airborne particles trapped in extracellular polymeric substance (EPS) (Scheerer et al., 2009). Fungi are also one of the most important microorganisms involved in stone decay.

Black fungi are the most worrisome type of fungi known in stone conservation, because they are ubiquitous, very difficult to remove, and the first recolonizers of a clean stone (Sterflinger and Piñar, 2013). Some species, such as the airborne hyphomycetes, can be pioneers of biocolonization, establishing their hyphae in the porous network of the stone (Pinheiro et al., 2019). Black fungi also induce bio-pitting and can develop a thin black layer on the surface in association with a lichen. The color is caused by the melanin pigment of the black fungi (Sterflinger and Piñar, 2013; Pinheiro et al., 2019; De Leo et al., 2022). Fungi can also attack the stone chemically by producing organic acids (oxalic, acetic, citric...) that can degrade stone minerals by solubilizing and chelating (Scheerer et al., 2009; Pinheiro et al., 2019). Lichens are mainly involved in the physical attack through the penetration of rhizines composed of fungal filaments and the expansion/contraction of the thallus, which can lift the grain stone surface. As fungi, lichens mainly produce oxalic acid, which causes the formation of calcium oxalate, weddellite and whewellite (Pinheiro et al., 2019; Scheerer et al., 2009). These processes take a long time to become significantly visible, but colonization by these microorganisms has been shown to be very rapid.

The alteration of limestone monument occurs at different spatial scales (Fitzner and Heinrichs, 2001). The changes of stone properties concern the nanoscale and are not visible. The alteration is observable at the microscale (mm to cm) with color change or mass loss, at the mesoscale (cm to m) for different deterioration phenomena and at the macroscale (façade or monument) with structural effects. Microscale and mesoscale alteration can be visible after only a few months of exposure, such as material loss after freeze-thaw action in cold and wet climate (Fehér and Török,

2022), such as biocolonization by phototrophic microorganisms and bacteria inducing a greening or a yellowing of the surface (Eyssautier-Chuine et al., 2021, 2020; Miller et al., 2008).

It is thus important to understand limestone alteration mechanisms and to determine the associated kinetics as a function of intrinsic and extrinsic parameters to better preserve them. However, all environmental parameters act simultaneously. After long-term exposure (decades or centuries), it is therefore difficult to discriminate the impact of each parameter on the stone deterioration and to assess the synergetic effects. Moreover, the deterioration of limestone monument is not a linear process. One way to understand and quantify the role of a specific parameter is to perform laboratory experiments (Balland-Bolou-Bi et al., 2023; Miller et al., 2009). Another way is to monitor the first stages of alteration in real conditions.

The aim of this work is therefore to study the first stages of alteration of limestone in terms of biocolonization and weathering. To this end, samples of limestone were exposed for 5 years in different conditions - sheltered and unsheltered from rain and in horizontal and vertical positions - in the Père-Lachaise cemetery (Figure 1). This site combines the characteristics of an urban area and a heavily planted garden. Moreover, the alteration of ancient tombs has already been studied (Balland-Bolou-Bi et al., 2016).

## 2. Material and methods

### 2.1. Exposure campaign of limestone samples at the Père-Lachaise cemetery

'Saint-Maximin roche fine' limestone is a Lutetian limestone that has been selected for its widespread use in monuments (such as Meaux and Le Mans cathedrals, Saint-Cloud and Vincennes castles...), and as restoration stone for monuments (Rozenbaum et al., 2008). Moreover, its petro-physical properties are described in the literature (Saheb et al., 2016). 'Saint Maximin roche fine' limestone is composed of 97% calcite and 3% quartz, with a homogeneous grain distribution. This stone has a porosity of 38% and a water capillary coefficient of  $3.7\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-0.5}$ .

The Père Lachaise cemetery site was chosen because it is a vegetated area in the center of Paris. This site contains numerous limestone tombs, which may have been altered for up to 200 years. It was interesting to expose pristine limestone in similar conditions. 18 specimens of limestone ( $6 \times 6 \times 1 \text{ cm}^3$ ) were cut. This size was chosen to perform different analyses and to avoid side effect. The specimens have been then attached to aluminum holders fixed on a metallic structure installed at the Père-Lachaise cemetery in Paris, France ( $48^{\circ}51'52.0''\text{N}$ ,  $2^{\circ}23'44.2''\text{E}$ ) (Figure 19A, 1B) from 16 March 2016 to 1 February 2021. 6 specimens were exposed unsheltered from rain and in horizontal position (UH, Figure 19D), 6 specimens unsheltered from rain and in vertical position (UV, Figure 1E), 3 specimens in sheltered from rain and in vertical position (SV) and 3 specimens in sheltered and in horizontal position (SH) (Figure 19F).

The climate in Paris is described as hot temperate (cf. Koppen and Geiger classification) with the presence of rainfall in the driest months. During this period, the annual average temperature was  $13.4^{\circ}\text{C}$  and the annual average precipitation was  $698 \text{ mm}\cdot\text{a}^{-1}$  (MeteoFrance data, Paris Montsouris station).

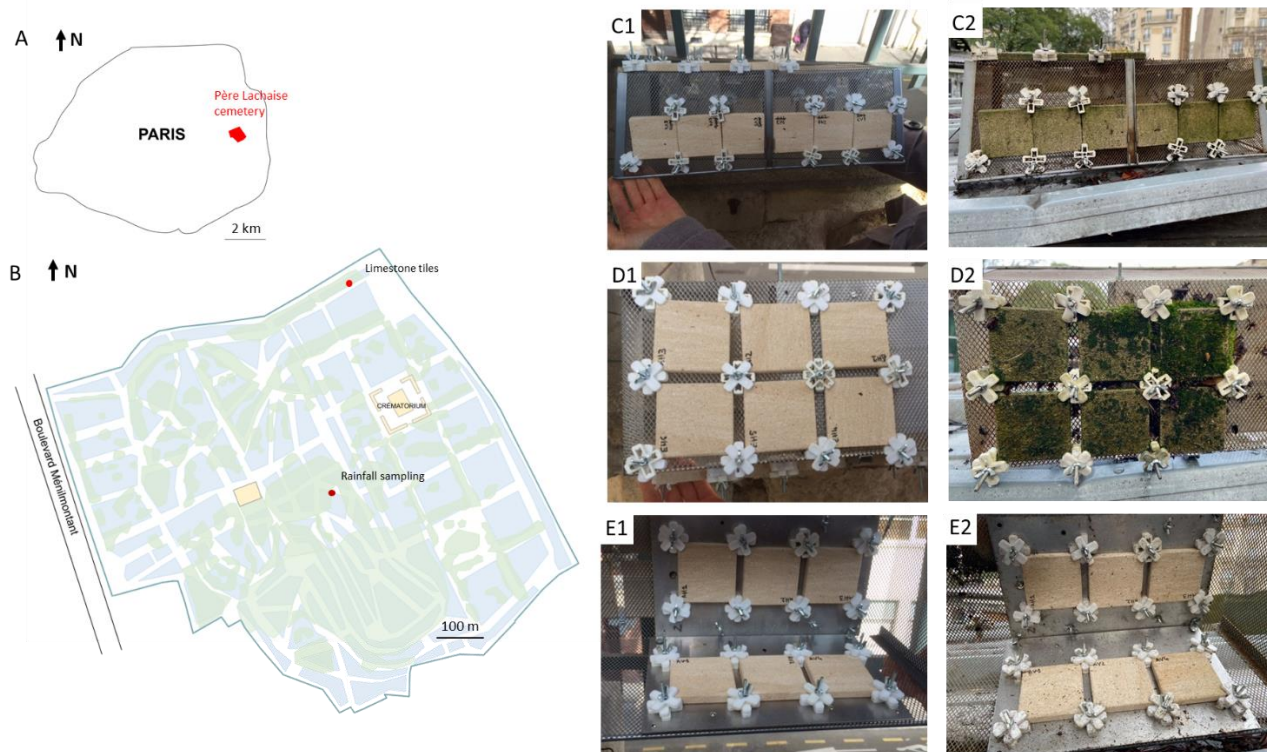


Figure 19: Site of the study. (A) Location of cemetery in Paris, (B) Map of the cemetery, (C1 to E1) Pictures of the different exposure of the limestone on the rack on the first day of exposure (C1 : Exposed Horizontal, D1: Exposed Vertical, E1: Sheltered Horizontal and Vertical); (C2 to E2) Pictures of the different exposure of limestone on the rack after 5 years of exposure (C2 : Exposed Horizontal, D2: Exposed Vertical, E2: Sheltered Horizontal and Vertical).

Before and during the exposure campaign, 2 series of three rainfalls were collected at the Père-Lachaise cemetery. The first one (P1, P2, P3) was sampled between 16 and 27 November 2015 and the second one (P4, P5, P6) from 14 April to 3 May 2016. The sampling site is located in the middle of the Division 25 (see Figure 19) and is surrounded by tombs and an abundant vegetation with trees (mainly chestnut, maple, cedar and ash trees) and shrubs. The objective was to collect rainfall samples representative of the site to obtain a range of rain composition to be compared to the composition of the soluble fraction of limestone samples and have a rough assessment of element sources.

Precipitation was sampled using a 24 cm diameter Teflon funnel screwed to a Teflon filter holder fitted with a cellulose acetate filter (0.45  $\mu\text{m}$  porosity and 47 mm diameter) to isolate particulate matter. The system is screwed to a 500 mL polyethylene bottle which collects the filtered rain. Biological development is limited by the prior addition of 100 mg of thymol into the bottle. Two blank samples – one with milliQ® (mQ) water (BL1) and one with mQ and thymol (BL2) – were obtained by using this set-up. After sampling, the pH and the conductivity were measured using a multiparameter analyzer Consort C861 and electrodes. Solutions were stored in a freezer until their analyses by Ion chromatography.

The volume-weighted mean concentration for each period ( $VWM$  in  $\mu\text{eq}\cdot\text{L}^{-1}$ ) is calculated using:

$$VWM = \frac{\sum_{i=1}^n C_i P_i}{\sum_{i=1}^n P_i} \quad (1)$$



where  $C_i$  is the ionic concentration for each element (in  $\mu\text{eq}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $P_i$  the precipitation amount for each rainy event (in mm) and  $n$  the total number of rain events. Concentrations of  $\text{H}^+$  were calculated from measured pH values. The same equation is used for average pH and conductivity (instead of  $C_i$ ).

Marine (SW) and crustal (crust) enrichment factors (EFs) correspond to the elemental ratio between ions in rainwater compared to a similar ratio for a reference material.  $\text{Na}^+$  can be used as a reference element for seawater and  $\text{Ca}^{2+}$  for the continental crust. They were calculated to assess the potential sources of major ions in rainwater:

$$EF_{SW} = [X/\text{Na}^+]_{rain}/[X/\text{Na}^+]_{SW} \quad (2)$$

$$EF_{crust} = [X/\text{Ca}^{2+}]_{rain}/[X/\text{Ca}^{2+}]_{crust} \quad (3)$$

With X the concentration of the element of interest in rainwater (in  $\mu\text{eq}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Reference ratio are given in (Keene et al., 1986) for seawater (in  $\mu\text{eq}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+ = 0.044$ ;  $\text{SO}_4^{2-}/\text{Na}^+ = 0.121$ ;  $\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+ = 0.227$ ;  $\text{K}^+/\text{Na}^+ = 0.412$ ;  $\text{Cl}^-/\text{Na}^+ = 1.161$ ) and in Rudnick and Gao ((Rudnick and Gao, 2014) for continental crust (in ppm;  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+} = 0.613$ ;  $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+} = 0.328$ ;  $\text{SO}_4^{2-}/\text{Ca}^{2+} = 0.026$ ).

## 2.2. Samples collection and preparation

After 5 years of exposure, 10 specimens were collected: 3 UH, 3 UV, 2 SV and 2 SH. The remaining 8 specimens will be collected over a longer period (probably 10 years). During the past period, regular observations and measurements of benthic microorganism concentrations (green algae, cyanobacteria and diatoms) by fluorescence using a BenthosTorch (bbe moldaenke®) were carried out. However, the biological development depends on the meteorological conditions during the days preceding the measurement (see S1 in the supplementary material), as confirmed by (Reboah et al., 2023). Therefore, a 5-year exposure period was chosen to ensure substantial biological colonization and significant changes.

After sampling, for each of the 10 specimens, a sterile swab was used to collect microbial DNA on the limestone surfaces. Then, the limestone surface (first 5 mm) was scratched to collect powder with a sterile scalpel under sterile conditions. The powders from each type of sample (UH, UV, SH and SV) were pooled to perform multiple analyses. In the following, SV\_P, SH\_P, UV\_P, UH\_P correspond to the powder scratched from the limestone surface for the three samples and SV<sub>i</sub>\_S (with i from 1 to 3) corresponds to the swab sample for each of the three replicates of limestone in different positions. All the samples were stored in sterile tubes at 4°C until analyses.

## 2.3. Solid characterization

The surface of the samples was first observed using a digital microscope (Keyence VHX-6000). The samples were also characterized using a tabletop scanning electron microscope (SEM Hitachi TM3030) coupled with energy dispersive X-ray spectrometry (EDS Bruker Quantax 70) to observe the surface change at the microscopic scale and to determine the elemental composition. The technique requires no sample preparation prior to analysis.

In order to identify the crystalline phases present on the limestone surface, XRD analysis was performed on the limestone powder, using a Panalytical Empyrean powder diffractometer equipped with a PIXcel detector fitted with a Cu anode tube ( $K\alpha_1 = 1.5406 \text{ \AA}$ ) operating at 45 kV

and 40 Ma. Crystalline phase identification was performed with QualX and HighScorePlus 2.0 software, using COD and ISDC databases.

#### **2.4. Extraction of soluble ions adsorbed on specimens**

To extract soluble ions, an elution was performed using 1 g of limestone powder and 9 mL of MilliQ® water (mQ). The solution was placed on a rotator at 40 rpm for 1 hour, followed by centrifugation at 14000 g for 5 minutes. The supernatant was collected, filtered at 0.2 µm, and analyzed in triplicate by ion chromatography (IC) to determine the concentrations of cations, anions, and organic acids. Rainfall samples were also analyzed by IC. The instrument is METROHM 930 Compact Flex on the PRAMMICS platform OSU-EFLUVE UMS 3563. For cations, the eluent is a mix of nitric acid and picolinic acid and a column Metrostep C4 (250 mm, with a mesh of 2.5 µm, Metrohm ®) was used. For anions, the mobile phase is a mix of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and NaHCO<sub>3</sub> and a column Metrostep A supp 7 (250mm, mesh of 2.5 µm, Metrohm ®) was used. The data processing of chromatograms was carried out using MagIC Net 3.3 software. The limits of quantification are: 1 x 10<sup>-5</sup> mg·g<sup>-1</sup> for magnesium and oxalate; 1.56 x 10<sup>-5</sup> mg·g<sup>-1</sup> for chloride, sulfates and nitrates; 2 x 10<sup>-5</sup> mg·g<sup>-1</sup> for phosphate and fluoride; 2.5 x 10<sup>-5</sup> mg·g<sup>-1</sup> for sodium, potassium, ammonium and calcium; 5 x 10<sup>-6</sup> mg·g<sup>-1</sup> for acetate, propionate and formate.

#### **2.5. Biological analyses**

Bacterial and fungal estimations have been performed using the Most Probable Number (MPN) method (Sutton, 2010). A part of non-filtered elution (100 µL) was diluted by 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> and 10<sup>5</sup>. For bacteria, LB broth medium (VWR®) was used, with an addition of fongizone with a concentration of 1g·L<sup>-1</sup>. For fungi, the medium is Malt extract broth (VWR ®) with addition of ampicillin with a concentration of 1g·L<sup>-1</sup>. Medium and diluted solutions were introduced in 8 replicates in a microplate. The absorbance was read at 490 nm after 24 hours for bacteria and 6 days for fungi. The MPN calculation program used come from (Jarvis et al., 2010).

To determine the composition of the limestone microbiome, two types of samples were used for DNA extraction: pooled limestone powder and sterile swabs. DNA was extracted using a DNA extraction Spin Kit for Soil (MPBio ®) according to the manufacturer's instructions. For powder samples (designated \_P), 0.5 g of limestone powder was used, and for swab samples (designated \_S), the head of the sterile swab was used. Next generation sequencing (library preparation, amplification and sequencing) was performed on the Eurofins Genomics platform using the Illumina MiSeq method on two target regions, ITS1 for fungi and V3-V5 for bacteria.

The bioinformatics treatment was carried out on Galaxy, Migale platform. Databases 16S\_SILVA\_Pintail100\_138 for bacteria and ITS\_UNITE\_Fungi\_8.0 for fungi were used for taxonomic assignment of sequences. Biostatistics including the index of biodiversity (Bray-Curtis beta diversity) were calculated using the Easy16S application, Migale bioinformatics facilities platform.

#### **2.6. Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using RStudio®: non-parametric Kruskal-Wallis test for comparison of samples and post-hoc Conover test (package conover.test), with corrected Bonferroni for the different groups of significance.

### 3. Results

#### 3.1. Rainfall composition

Six rainfall samples were collected at the Père-Lachaise cemetery: P1, P2, P3 in November 2015 (1<sup>st</sup> series) and P4, P5, P6 in April 2016 (2<sup>nd</sup> series) (Table 1). The amount of rain calculated from the collected volume is in agreement with the MeteoFrance data, except for the P2 sample for which the bottle capacity was too low. The pH varies between 4.5 and 6.2 (average 5.4) and the conductivity between 42.9 and 258.0  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (average 119.1  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). A pH of 5.6 corresponds to equilibrium with atmospheric  $\text{CO}_2$ . Therefore, the rain is acidic for P1, P2, and P4 due to dissolution of  $\text{NO}_x$  or  $\text{SO}_2$  in the cloud and raindrops (Steinfeld and Pandis, 1998; Whelpdale et al., 1997). This is in agreement with the measured pH of precipitation in Europe (Keresztesi et al., 2019).

Inorganic ions and organic acids were measured for the six samples and the VWM was calculated for the two periods (Table 1). The ion balance can be used to determine the data quality of rainwater samples. For P1-P3 samples, the difference in concentrations between total cations and total anions is less than 11%, which is fully acceptable (Niu et al., 2017). For P4-P5-P6, the sum of cations is higher than the sum of anions. However, P6 seems to be contaminated by  $\text{K}^+$ .

Despite the variability, the range of concentrations for the different elements is comparable to published data (e.g. for northern Europe, (Beysens et al., 2017; Caroll, 1962)). Nevertheless, the sum of cations and anions is higher than published data ( $\sim 50\text{-}200 \mu\text{eq}\cdot\text{L}^{-1}$  for each in (Keresztesi et al., 2019; Salve et al., 2008) vs.  $1000 \mu\text{eq}\cdot\text{L}^{-1}$  here).

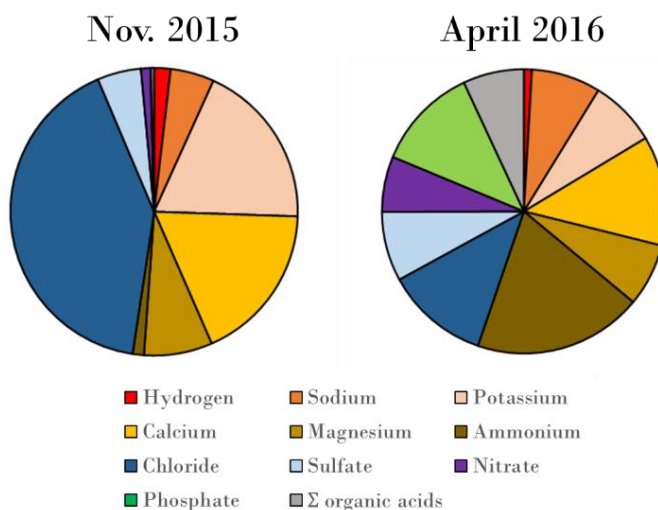


Figure 20: Respective contribution (in %) of the volume-weighted mean concentrations of the main elements of the rain for the 2 series (Nov. 2015 and April 2016).

The main anions are chlorides and sulfates for the 1<sup>st</sup> series (Nov. 2015) and chlorides, phosphates, sulfates and nitrates for the 2<sup>nd</sup> series (April 2016). The high phosphate content can be explained by the rainwater sampling conditions. The collector was placed at ground level, close to vegetation and under the tree canopy, since the aim was to sample rainwater that is in contact with the graves. (Decina et al., 2018) highlighted a high increase in P concentration (by a factor of 6) of the rainwater passing through the tree canopy compared to rainwater falling directly from the atmosphere to the ground. The source of P may be deposited dust or organic matter. This is also consistent with the season, as P6 was collected in the spring. Conversely, the chloride content is

lower in the second series. Chloride can be of marine origin, but the enrichment factor for series 1 (between 1.9 and 9.2) is higher than 1 (Table 1). Therefore, chloride can also originate from anthropogenic sources (e.g. biomass burning or road deicing agents (Thornton et al., 2010)), which is also consistent with the season. On the contrary, the EFs for  $\text{Cl}^-$  in the 2<sup>nd</sup> series are close to 1, suggesting a marine origin. Sulfates are of anthropogenic origin, as the EFs compared to seawater and continental crust are mostly higher than 1. They can come from the combustion of sulfur-containing fuels. Nitrates also come from industrial activities and transportation.

The main cations detected are calcium, potassium, magnesium, sodium and ammonium (Figure 20). Calcium and sodium are assumed to originate mainly from the continental crust and seawater, respectively, and are used as reference for the calculation of the EFs (Eqs. 2 and 3). For  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{EF}_{\text{SW}}$  is close to or greater than 1, indicating additional sources to the marine salts, while  $\text{EF}_{\text{crust}}$  is slightly less than 1. Thus,  $\text{Mg}^{2+}$  is certainly of natural origin. For  $\text{K}^+$ ,  $\text{EF}_{\text{SW}}$  is much higher than 1 (30 to 500), highlighting additional sources to the marine salts, while  $\text{EF}_{\text{crust}}$  is slightly higher (2 to 4).  $\text{K}^+$  could originate from biomass burning, but, except for P6,  $\text{K}^+$  is very well correlated with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , and not with  $\text{NH}_4^+$  or phosphates (not shown).

The acidity is mainly due to sulfuric acid and nitric acid and neutralization by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (Kumar et al., 2002; Salve et al., 2008). Thus, the ratio  $(\text{SO}_4^{2-} + \text{NO}_3^{-})/(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$  was calculated. Since the main anion is  $\text{Cl}^-$ , the ratio is less than 1 (0.23 and 0.72, Table 1). This shows the alkaline nature of the rainwater.

The concentrations of organic acids are relatively low. The main ions analyzed are formate, acetate and oxalate, which is in agreement with other studies (Sun et al., 2016). Their sources can be direct (biogenic emissions, biomass burning) or secondary (photochemical oxidation of precursors from natural and anthropogenic sources) (Chebbi and Carlier, 1996).

The comparison of the three samples of each series shows a variability. For the first series, the concentrations tend to decrease with time (Table 1), especially for  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Br}^-$ . Except for oxalate, the organic acids are high in P1 and close to the detection limits for P2 and P3. There is an increase between P1 and P2 and then a decrease in P3 for  $\text{K}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . An opposite trend is observed for  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$ . In terms of enrichment factors, P3 is closer to P4 and P5. For the 2<sup>nd</sup> series, there is a general increase in concentrations, except for nitrates, which are low for P6. These changes in the ionic concentration indicate that the soluble components in the air are scavenged by the leaching process.

Even if the variability of the rainfall is high according to the season or to the scavenging rate, the results give a range of typical concentrations of rainwater (compared to other studies) that could be used for controlled alteration experiments in laboratory and as a reference to compare with the soluble fraction of limestone samples. It is also shown that the local effect of the vegetation can influence the phosphate concentration.

Table 1: Sampling conditions (dates, volume, amount), pH, conductivity, concentrations in cations, anions and main organic acids (in  $\mu\text{eq}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and calculations of ionic ratio or enrichment factors (EF) (Eq. 2 and 3). The amount of rain is calculated from the volume and compared to MeteoFrance data (Montsouris and Saint-Antoine stations). The conductivity was directly measured and calculated from concentrations and molar ionic conductivity values for comparison. The volume-weighted mean (VWM) are calculated using Eq. (1).

		BL1	BL2	P1	P2	P3	VWM	P4	P5	P6	VWM
date from		mQ water	mQ water	2015-11-16 17:00	2015-11-18 09:45	2015-11-23 10:00		2016-04-09 12:00	2016-04-14 16:20	2016-04-24 15:20	
to			+ thymol	2015-11-18 09:45	2015-11-23 10:00	2015-11-27 12:00		2016-04-14 16:20	2016-04-24 15:20	2016-05-03 09:40	
Volume (mL)				75.3	495.4*	465.4		515.58	375.96	241.86	
Amount (mm)				1.7	10.9*	10.3		11.4	8.3	5.3	
Amount (MeteoFrance) (mm)				2.3	35.9	9.9		11.6	8.4	6.1	
pH				5.3	4.5	6.0	4.9	4.9	5.8	6.2	5.4
Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )				148.8	138.6	42.9	118.4	44.7	81.5	258.0	102.4
Calc. conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )				93.0	118.1	28.5		24.6	44.0	330.8	
Hydrogen	H <sup>+</sup>	0.10	0.10	5.0	31.6	1.0	24.1	13.5	1.7	0.6	6.8
Sodium	Na <sup>+</sup>	1.23	0.59	112.1	59.6	72.9	64.3	31.4	59.1	120.6	59.6
Potassium	K <sup>+</sup>	1.04	1.71	240.2	301.1	48.5	244.6	27.8	98.1	1337.1***	57.5***
Calcium	Ca <sup>2+</sup>	<LD	<LD	367.2	282.4	42.1	233.8	23.0	76.0	275.3	94.4
Magnesium	Mg <sup>2+</sup>	<LD	<LD	98.7	123.9	18.8	100.4	10.0	23.9	194.7	54.0
Ammonium	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<LD	0.99	74.8	11.8	23.6	16.5	65.3	98.8	389.1	145.5
Chloride	Cl <sup>-</sup>	0.86	0.76	785.0	634.9	158.3	537.7	40.6	76.0	213.0	89.1
Sulfate	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	5.47	0.34	90.0	73.0	28.9	64.1	23.5	51.0	150.2	59.7
Nitrate	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<LD	0.89	52.7	11.9	15.6	14.1	40.3	85.5	5.7	47.9
Phosphate	PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	44.18	0.43	6.2	0.0	0.0	0.2	1.9	25.8	373.6	89.2
Fluoride	F <sup>-</sup>	<LD	<LD	2.1	1.4	0.3	1.2	<LD	1.1	9.3	2.3
Bromide	Br <sup>-</sup>	<LD	0.37	0.51	0.49	0.23	0.4	<LD	<LD	0.8	0.2
Acetate	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	0.47	0.71	10.1	0.4	0.0	0.7	1.5	1.6	139.5	31.0
Propionate	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> COO <sup>-</sup>	<LD	<LD	1.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	1.5	0.4
Formate	HCOO <sup>-</sup>	0.13	0.27	13.2	0.1	0.1	0.6	0.7	0.8	73.5	16.3
MSA	CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<LD	<LD	0.5	0.0	0.0	0.0	0.1	0.4	<LD	0.2

Oxalate	$C_2O_4^{2-}$	<LD	0.09	3.2	4.6	0.1	3.6	0.9	0.6	19.2	4.7
$\Sigma$ cations		2.38	3.39	898.1	810.5	206.8	683.8	170.9	357.7	2317.5	417.9
$\Sigma$ anions		51.1	3.9	964.5	726.8	203.6	622.8	109.6	242.9	986.3	340.9
Ion difference		-182%	-13%	-7%	11%	2%	9%	44%	38%	81%	20%
$\Sigma$ organic acids		0.6	1.1	28.0	5.1	0.3	4.9	3.3	3.6	233.7	52.5
$\Sigma$ total		53.5	7.2	1862.6	1537.3	410.3	1306.5	280.6	600.6	3303.9	758.8
$SO_4^{2-}+NO_3^-/$ $Ca^{2+}+Mg^{2+}$				0.31	0.21	0.73	0.23	1.93	1.37	0.33	0.72
EF SW K				97.4	229.5	30.3	172.8	40.4	75.4	503.9	43.8
EF SW Ca				74.5	107.6	13.1	82.6	16.7	29.2	51.9	36.0
EF SW Mg				3.9	9.2	1.1	6.9	1.4	1.8	7.1	4.0
EF SW SO <sub>4</sub>				6.6	10.1	3.3	8.2	6.2	7.1	10.3	8.3
EF SW Cl				6.0	9.2	1.9	7.2	1.1	1.1	1.5	1.3
EF Crust K				2.0	3.3	3.5	3.2	3.7	3.9		1.9
EF Crust Mg				0.5	0.9	0.9	0.9	0.9	0.6	1.4	1.2
EF Crust SO <sub>4</sub>				9.3	9.8	36.2	14.4	53.7	35.3	28.7	33.3

\* The volume and the amount of rain during this period are underestimated because the bottle had a capacity of 500 mL while the amount of rain was higher.

\*\* Calculations are based on Météofrance rainfall for P2 sample.

\*\*\* There is a probable contamination for this K concentration and it was not taken into account in the calculation of the VN.

### 3.2. Weathering observations

After 5 years of exposure, a greenish patina is visible on exposed limestone specimens (UV and UH) (Figure 21A and 3 B). Significant moss development is also observed on UH specimens (Figure 21B). Sheltered specimens (SH and SV) do not show the presence of patina, but rather a gray coloration. The presence of green spherical structures on UV (Figure 21B) and UH (Figure 21C) can be assimilated to green algae. On UH, the moss development with small leaves is clearly visible (Figure 21C). In sheltered positions (SH and SV) some fungal hyphae are visible (Figure 21E).

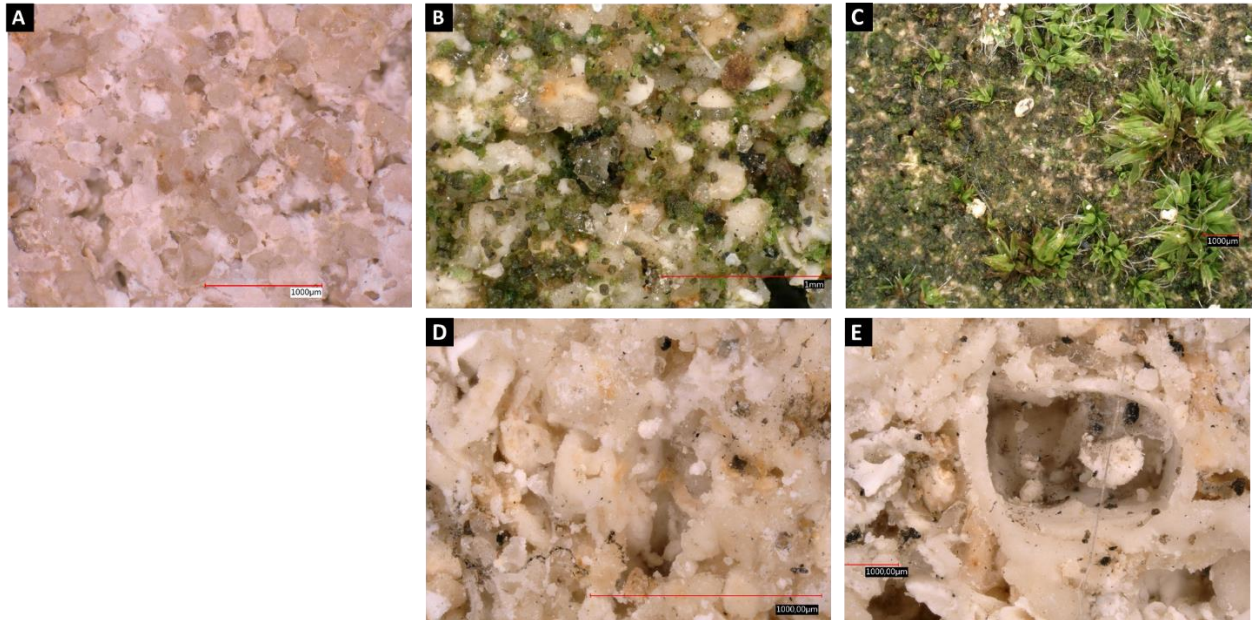


Figure 21: Microscopic observation of limestone specimens after 5 years exposure in Père-Lachaise cemetery A: Pristine limestone, B: Unsheltered Vertical (UV), C: Unsheltered Horizontal (UH), D: Sheltered Horizontal (SH), E: Sheltered Vertical (SV).

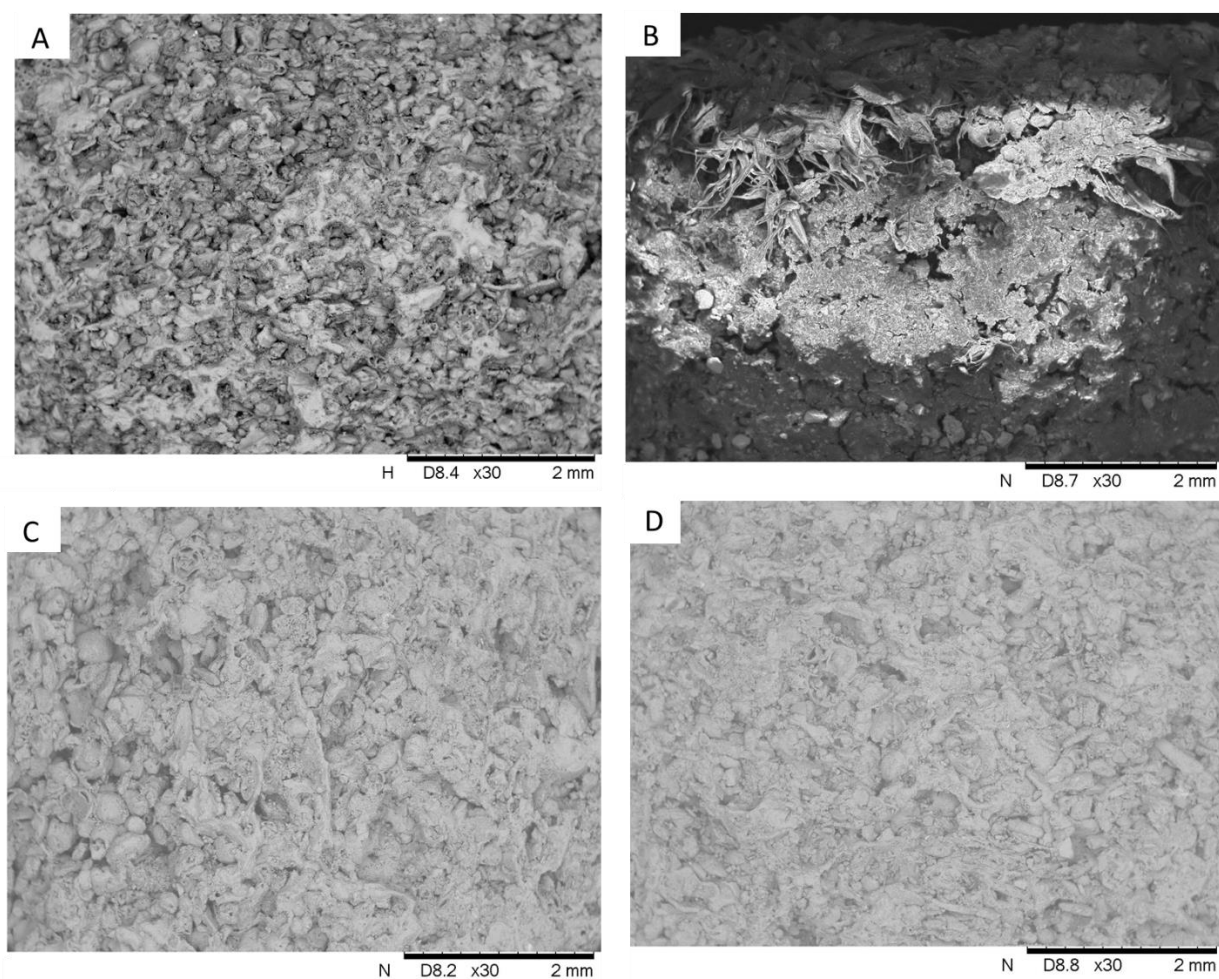


Figure 22: SEM observation of limestone specimens after 5 years of exposure at Père Lachaise. A: Pristine limestone (no exposure), B: Unsheltered Horizontal (UH), C: Sheltered Vertical, D: Sheltered Horizontal (SH).

SEM analysis was performed on each specimen (Figure 4). Qualitative observations were made, but no significant neocrystallization was observed. Also, specimens with a lot of organic matter, such as UV, were not observed.

### 3.3. Crystalline phases analysis

XRD analyses (Figure 23) show two major phases: calcite and quartz for all positions and unweathered limestone (CS). For the sheltered positions SH and SV,  $\text{KNO}_3$  was also detected with peaks around  $26^\circ$  (2-theta). Potassium nitrate is also known as saltpeter or niter. The main source is usually natural fertilizers.



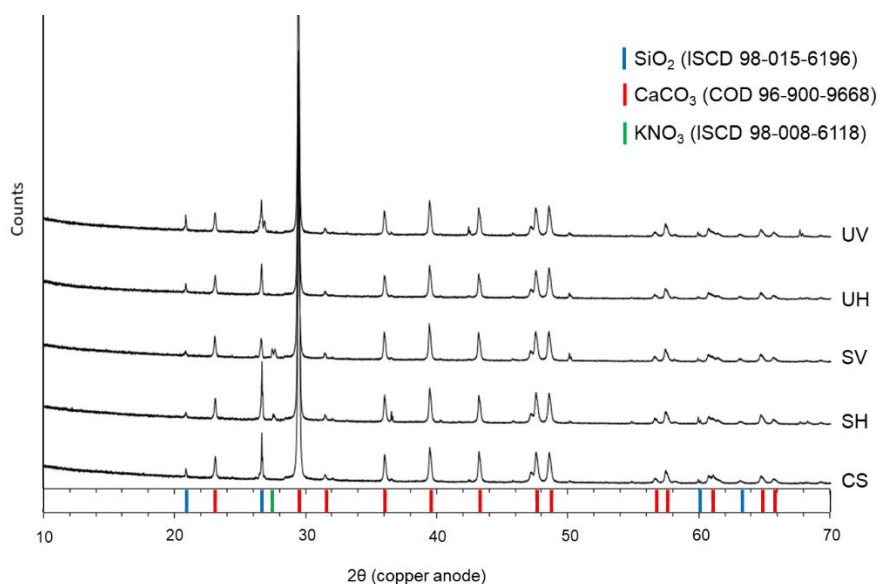


Figure 23: XRD analysis of pristine (CS) and weathered conditions (SH, SV, UH, UV); the red reference corresponds to calcite ( $\text{CaCO}_3$ , COD 96-900-9668), the blue one to quartz ( $\text{SiO}_2$ , ISCD 98-015-6196) and the green one to  $\text{KNO}_3$  (ISCD 98-008-6118)

### 3.4. Results of the elution analyzed by ion chromatography

The results of limestone elution are shown in Table 2 and Figure 6. The elements can come from the substrate weathering (dissolution, secondary phases within the porous network or at the surface) or from wet or dry deposition. The obtained concentrations of  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{F}^-$  are very low. These elements are either poorly soluble such as Mg in carbonates, or poorly concentrated as exogenous elements in limestone (Cl and F), while they can be present in rainwater (Table 1). For the other elements, there is an increase in the concentrations of all components compared to the original limestone. However, there are differences depending on the situation and position. The concentrations of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  and organic acids (except for formate) are higher in unsheltered samples. Since they are exposed to rain, they can be soaked by these elements. On the contrary, the concentrations in the sheltered samples are higher for  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{NO}_3^-$  (with a factor of 2 for  $\text{Ca}^{2+}$  between sheltered and unsheltered position; factor of 3 to 5 for  $\text{NO}_3^-$ ) and relatively similar for  $\text{SO}_4^{2-}$ . Ca is one of the major constituents of limestone. Elution of pristine limestone leads to a significant release of this element. Under sheltered conditions, an additional source may be provided by exogenous particles or slight dissolution of calcite or neoformed gypsum. Nitrates and sulfates are of atmospheric origin and can accumulate on the surface without regular leaching.

The comparison between the orientations shows that in the sheltered condition, the highest concentrations are measured in the vertical position for all mineral elements ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) and for oxalate, whereas the concentrations of other organic acids are very low in the vertical position. Dry deposition is probably easier in the vertical position than in the inverted horizontal position. The concentrations of organic acids are surprisingly low for SV samples. In unsheltered conditions, the concentrations are higher in the vertical position only for  $\text{Na}^+$  and oxalate. They are significantly higher in horizontal position for  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{PO}_4^{2-}$  and other organic acids and relatively close for  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ . For phosphates and organic acids, this may be related to the growth of moss on the surface of horizontal samples.

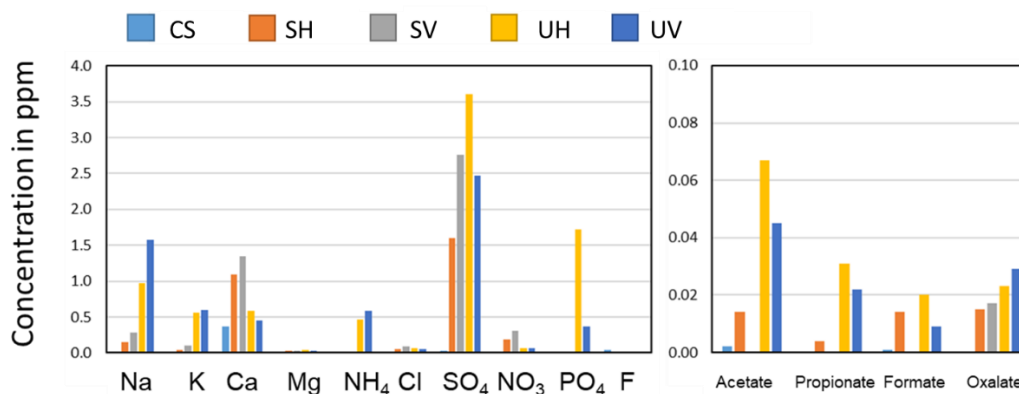


Figure 24: Concentrations (in ppm) in elution solution after immersion in mQ water for 24 hours of pristine (CS) and weathered (SH, SV, UH, UV) samples.

Table 2: Soluble ions concentration (in  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) in elution solution after immersion in mQ water for 24 hours of pristine (CS) and weathered (SH, SV, UH, UV) samples. The letters a,b,c,d, and e represent the significant difference on ion concentration as a function of the position after Kruskal-Wallis to compare samples and Conover tests corrected Bonferroni for the difference groups of significances. < LQ means inferior of limit of quantification.

Sample	CS	SH	SV	UH	UV
Sodium	0.017±0.000 <sup>c</sup>	0.152±0.001 <sup>a</sup>	0.279±0.001 <sup>b</sup>	0.967±0.005 <sup>d</sup>	1.577±0.015 <sup>e</sup>
Potassium	0.012±0.000 <sup>c</sup>	0.044±0.001 <sup>a</sup>	0.107±0.002 <sup>b</sup>	0.557±0.003 <sup>d</sup>	0.595±0.000 <sup>e</sup>
Calcium	0.364±0.003 <sup>c</sup>	1.091±0.006 <sup>a</sup>	1.342±0.004 <sup>b</sup>	0.579±0.011 <sup>d</sup>	0.457±0.006 <sup>e</sup>
Magnesium	0.022±0.001 <sup>b</sup>	0.029±0.002 <sup>a</sup>	0.027±0.002 <sup>a</sup>	0.038±0.002 <sup>c</sup>	0.034±0.000 <sup>c</sup>
Ammonium	<LQ <sup>b</sup>	0.005±0.001 <sup>a</sup>	<LQ <sup>b</sup>	0.469±0.008 <sup>c</sup>	0.582±0.005 <sup>d</sup>
Chloride	0.004±0.000 <sup>c</sup>	0.053±0.000 <sup>a</sup>	0.092±0.000 <sup>b</sup>	0.061±0.004 <sup>d</sup>	0.055±0.000 <sup>e</sup>
Sulfate	0.023±0.001 <sup>c</sup>	1.600±0.001 <sup>a</sup>	2.761±0.012 <sup>b</sup>	3.599±0.022 <sup>d</sup>	2.468±0.025 <sup>e</sup>
Nitrate	0.004±0.000 <sup>b</sup>	0.188±0.002 <sup>a</sup>	0.302±0.001 <sup>a</sup>	0.063±0.010 <sup>c</sup>	0.064±0.001 <sup>c</sup>
Phosphate	<LQ <sup>c</sup>	0.017±0.006 <sup>a</sup>	0.003±0.001 <sup>b</sup>	1.726±0.016 <sup>d</sup>	0.367±0.003 <sup>e</sup>
Fluoride	0.038±0.000 <sup>c</sup>	0.006±0.000 <sup>a</sup>	0.006±0.000 <sup>b</sup>	0.005±0.000 <sup>d</sup>	0.005±0.000 <sup>e</sup>
Acetate	0.002±0.000 <sup>c</sup>	0.014±0.002 <sup>a</sup>	<LQ <sup>b</sup>	0.067±0.000 <sup>d</sup>	0.045±0.004 <sup>e</sup>
Propionate	0.000±0.000 <sup>b</sup>	0.004±0.000 <sup>a</sup>	<LQ <sup>b</sup>	0.031±0.000 <sup>c</sup>	0.022±0.001 <sup>ac</sup>
Formate	0.001±0.000 <sup>c</sup>	0.014±0.001 <sup>a</sup>	<LQ <sup>b</sup>	0.020±0.001 <sup>d</sup>	0.009±0.001 <sup>e</sup>
Oxalate	<LQ <sup>c</sup>	0.015±0.000 <sup>a</sup>	0.017±0.000 <sup>b</sup>	0.023±0.002 <sup>d</sup>	0.029±0.001 <sup>e</sup>

### 3.5. Microbial enumeration

Enumeration using the Most Probable Number (MPN) technique gives a good estimate of the number of heterotrophic cultivable bacteria and fungi. The values for the exposed positions UH and UV (Figure 25) are 2 or 3 orders of magnitude higher than those for the sheltered positions. The difference is more important for bacteria (Figure 25A) than for fungi (Figure 25B), since the number of bacteria after 24 hours in the sheltered position is very low (< 10 cells/0.5 g of

limestone). For the exposed positions, the number of bacteria is higher in the horizontal position than in the vertical position, while the number of fungi is lower.

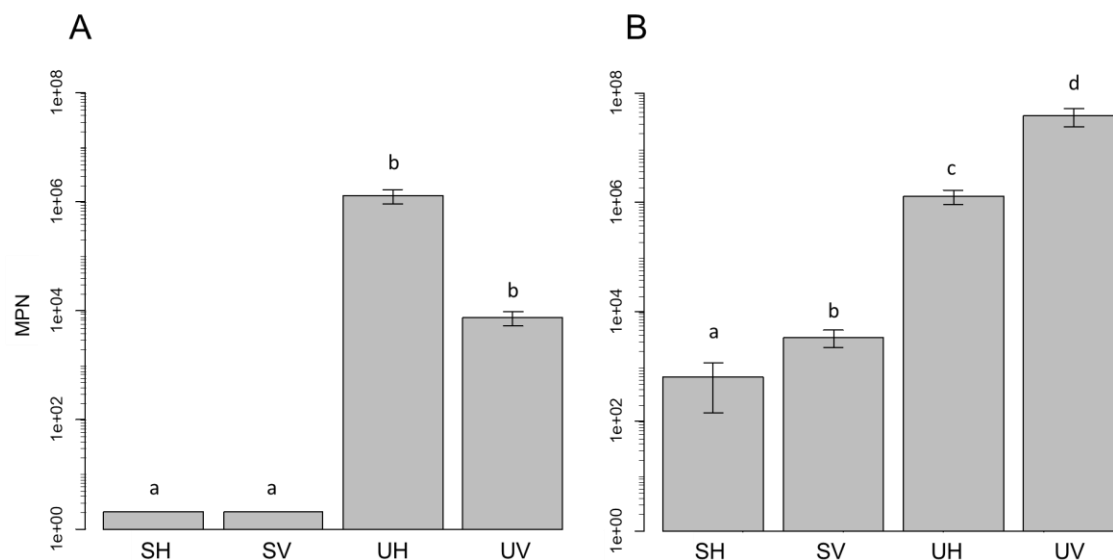


Figure 25: Enumeration of bacteria (A) and fungi (B) in cells.mL<sup>-1</sup>. Letters a, b, c and d represent the similarity degree after statistical Kruskal Wallis test to compare samples and the post hoc Conover test corrected Bonferroni to the difference groups of significance.

### 3.6. Identification of phyla

The sequencing results allowed to calculate the relative abundance of the different phyla for bacteria and fungi (Figure 26). The bacterial communities on the samples belong to eight main phyla (Figure 26A). The most abundant are Proteobacteria (25-65%), Deinococcota (2-15%), Cyanobacteria (5-30%), Bacteroidota (2-55%) and Actinobacteriota (7-55%). These five phyla are present in all the samples but not in the same proportions.

The percentage of Actinobacteria is higher in the sheltered position (31% for SH and 53% for SV) than in the exposed position (values ranging between 7 and 18% for UH and 18 and 26% for UV). Bacteroidota are more abundant in the horizontal position (28% for SH and 8-58% for UH) than in the vertical position (8.7% for SV and 2-6% for UV), regardless of exposure. The abundance of Deinococcota is higher in the UH position, with a relative abundance of 6.4-14%, while the values for the other positions are less than 3%. The relative abundance of Proteobacteria is higher on the UV sample, with values ranging between 44 and 63%, than on the other positions, where the relative abundance is less than 30%.

The fungal communities are composed of 2 main phyla, Ascomycota and Basidiomycota (Figure 26B). A significant fraction is unidentified for exposed positions (between 5 and 20%), which may be due to the sequencing of some algae that are not recognized with the fungal database used in this study. Ascomycota is the most abundant phylum (> 90% for SH, SV and UH, ~ 75% for UV). Thus, less than 10% of the communities are composed of Basidiomycota, this phylum being more abundant on UH and UV (5-20%).

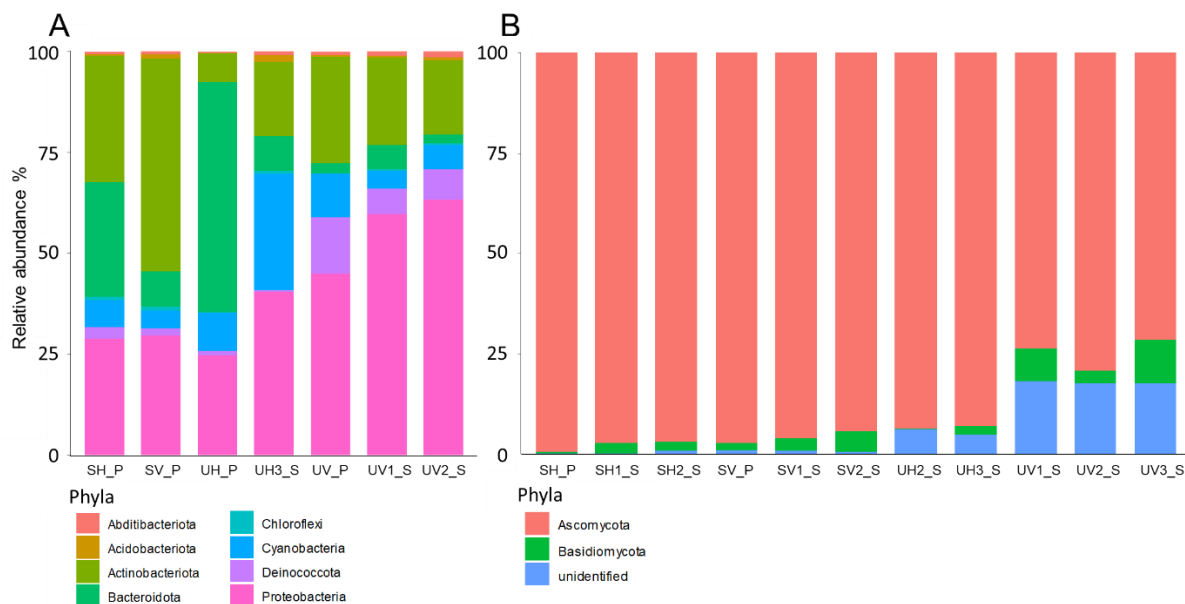


Figure 26: Relative abundance (in %) of phyla of bacterial (A) and fungal communities (B) for the different weathered samples (SH, SV, UH, UV) by using the powder (\_P) or the swab (\_S) methods. Different samplings were performed for the swab method.

### 3.7. Bacterial diversity at the genus level

Bacterial diversity can be detailed at different taxonomic levels, sometimes down to genus level (Figure 27). Irrespective of the sampling positions (UH, UV, SH, SV), the same 5 phyla were found to represent more than 60% of the bacterial diversity: Actinobacteria, Bacteroidota, Cyanobacteria, Deinococcota and Proteobacteria.

The phylum Actinobacteria is mainly represented by the genera *Friedmanniella*, *Nocardioidea* and *Marmoricola*. These genera are found in all the positions, but not in the same proportions. For the genus *Friedmanniella*, the relative abundances are higher in sheltered positions (with 10% for SH and 11% for SV) than in exposed positions, where the relative abundance ranges between 0.3 and 1% for UH and between 1.7 and 3.4% for UV. *Nocardioidea* is mainly present on SV (with an abundance of 11%), followed by SH (5.3%). On exposed samples, *Nocardioidea* is more abundant on UV (between 3 and 8%) than on UH samples (2-4%). This genus seems to be more abundant on vertical orientation than on horizontal one. Then, the genus *Marmoricola* is present in greater abundance on the SV sample (7.3%). On the other samples (SH, UH and UV), this genus represents less than 3% of the genus present. Actinobacteriota are more present on the sheltered than on the exposed positions and seem to be sensitive to this parameter. The horizontal or vertical orientation does not seem to influence their development.

Bacteroidota are mainly represented by the genus *Flavobacterium*. This genus is abundant on SH and UH (21.4% and between 5 and 50%, respectively). On the vertical positions SV and UV, the relative abundance of this genus represents less than 3% of the samples.

Cyanobacteria represent 5-30% of the bacterial abundance at the phyla level. Cyanobacterial sequences are difficult to relate to the genus level for the sequencing study region, therefore only two genera of cyanobacteria are identified: *Nostoc* and *Scytonema*. The abundances of these two genera are less than 1%.

The phylum Deinococcota is mainly represented by the genus *Truepera*. Its relative abundance is higher in the UV position (between 6.5 and 14%) than in the other samples (< 2.5%).

Finally, the Proteobacteria phylum is mainly represented by the genera *Roseomonas*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Rubellimicrobium*, *Sphingorhabus* and *Sphingomonas*. *Methylobacterium-Methylorubrum* and *Sphingomonas* genera have the same behavior with their highest abundance on UV, ranging (between 7-22% and 22-38%, respectively). For *Methylobacterium-Methylorubrum*, the relative abundances are 7.7% for SV, 4.9 for SH and range between 1.5 and 3.6% for UH. For *Sphingomonas*, the relative abundance is 5% for SH and UH, and 6.5% for SV. The values for *Roseomonas* are higher in the vertical positions SV and UV (5.8% and 1.7-5%, respectively). For SH and UH, the relative abundances are less than 3%. The highest abundance of the genus *Sphingorhabus* is on the UH position (3-12%), followed by the SH position (1.2%). This genus is absent on SV and UV positions.

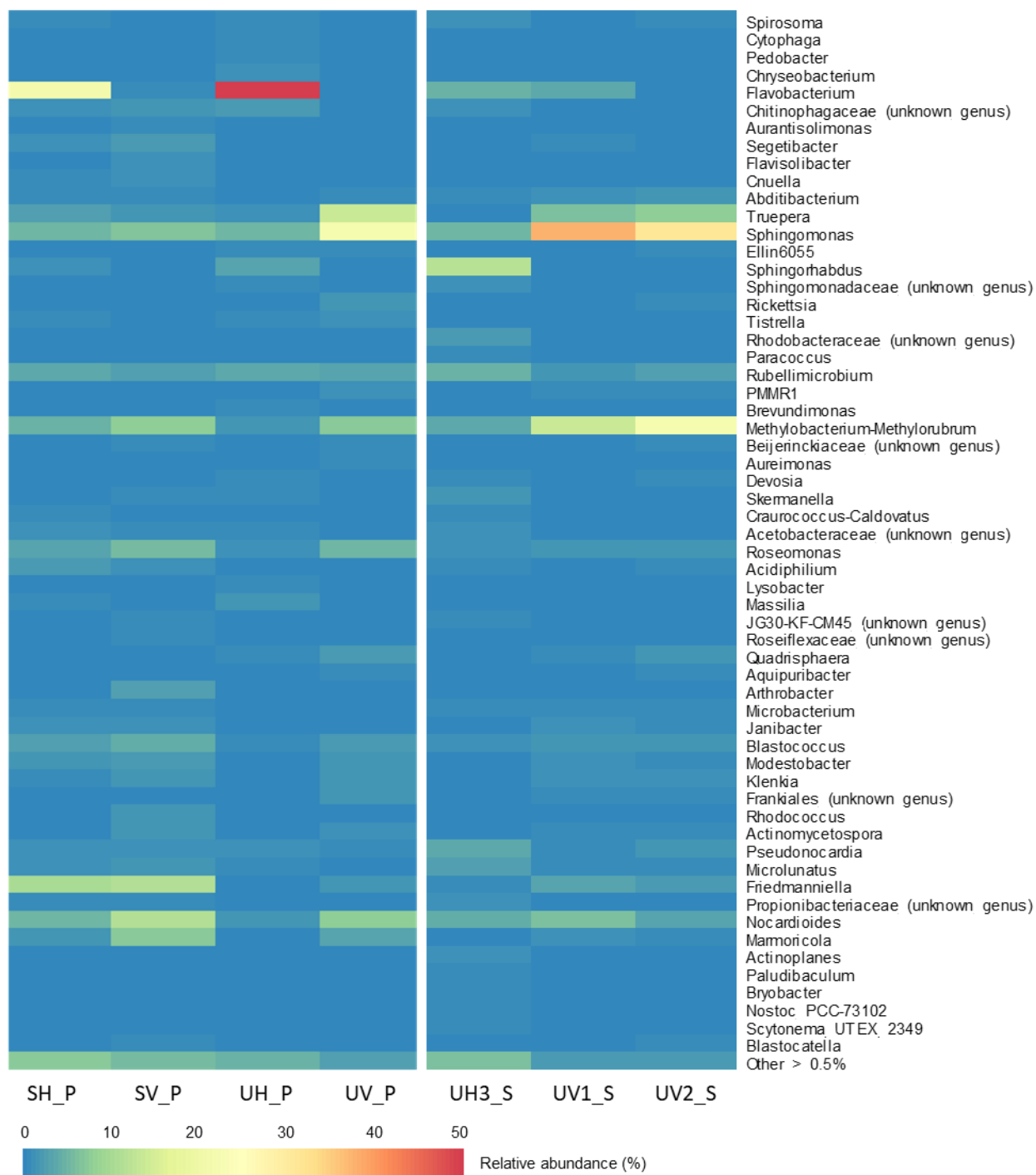


Figure 27: Heat map representing the relative abundance (in %) of bacteria at genus level for each sample (SH, SV, UH, UV) collected either as powder (\_P) or with a swab (\_S). Only genera represented have relative abundance superior to 0.5%.

### 3.8. Fungal communities on genus level

The phylum Ascomycota represents between 75 and 98% of the fungi present on the samples. Regardless of the position, three dominant classes were found: Dothiedomycetes, Eurotiomycetes and Lecanoromycetes (Figure 28).

The proportion of Dothiedomycetes is higher on the sheltered positions (91-93% for SH and 84-86% for SV) than on the exposed positions (32-59% for UH and 15-20% for UV). On the contrary, the proportion of Eurotiomycetes is higher on the exposed (6-22% for UH and 24-38% for UV) than on the sheltered positions (0.6-1.2% for SH and 1.2-4.8% for SV). Lecanoromycetes show a similar trend with higher relative abundances for UH and UV (18-25% and 1.4-27%, respectively) than for SH and SV (< 0.4%).

The class Dothiedomycetes is mainly represented by 4 genera: *Cladosporium*, *Ramularia*, *Aureobasidium* and *Macroventura*. Regardless of the sampling method, the relative abundances of *Cladosporium*, *Ramularia* and *Aureobasidium* are higher in the sheltered position SH and SV than in the exposed position UH and UV. For *Cladosporium*, the relative abundance ranges between 54 and 65% for SH and between 22 and 35% for SV, while it is below 1% for UH and UV. For *Ramularia*, the relative abundance ranges between 18 and 23% for SH and between 13 and 43% for SV, while this genus is absent on the exposed position. Finally, for *Aureobasidium*, the relative abundance is 4-9% for SH and 4-18% for SV, where it is less than 1% on the exposed position. In contrast to the previous genera, the relative abundance of *Macroventura* is higher for UH (4-19%) and UV (0.6-3%) than for SH and SV (<1.5%).

The taxonomical assignment up to genus level is not very accurate for the class Eurotiomycetes. The orders Chaetothyriales and Verrucariales have the highest relative abundance of this class and are higher on the exposed (UH and UV) than on the sheltered positions (< 1% for SH and SV). Chaetothyriales are more abundant on UV (18-24%) than on UH (0.5-3%). In contrast, Verrucariales are more important on UH (1-9%) than on UV (1-3%). The genus *Verrucaria* follows the same trend with the highest relative abundance on UH, (3-6% depending on the sampling method).

The genus *Lecania*, representing Lecanoromycetes on samples, is mainly present on exposed positions (17-25% for UH and 0.5-15% for UV) and sparse on sheltered positions (<1%).

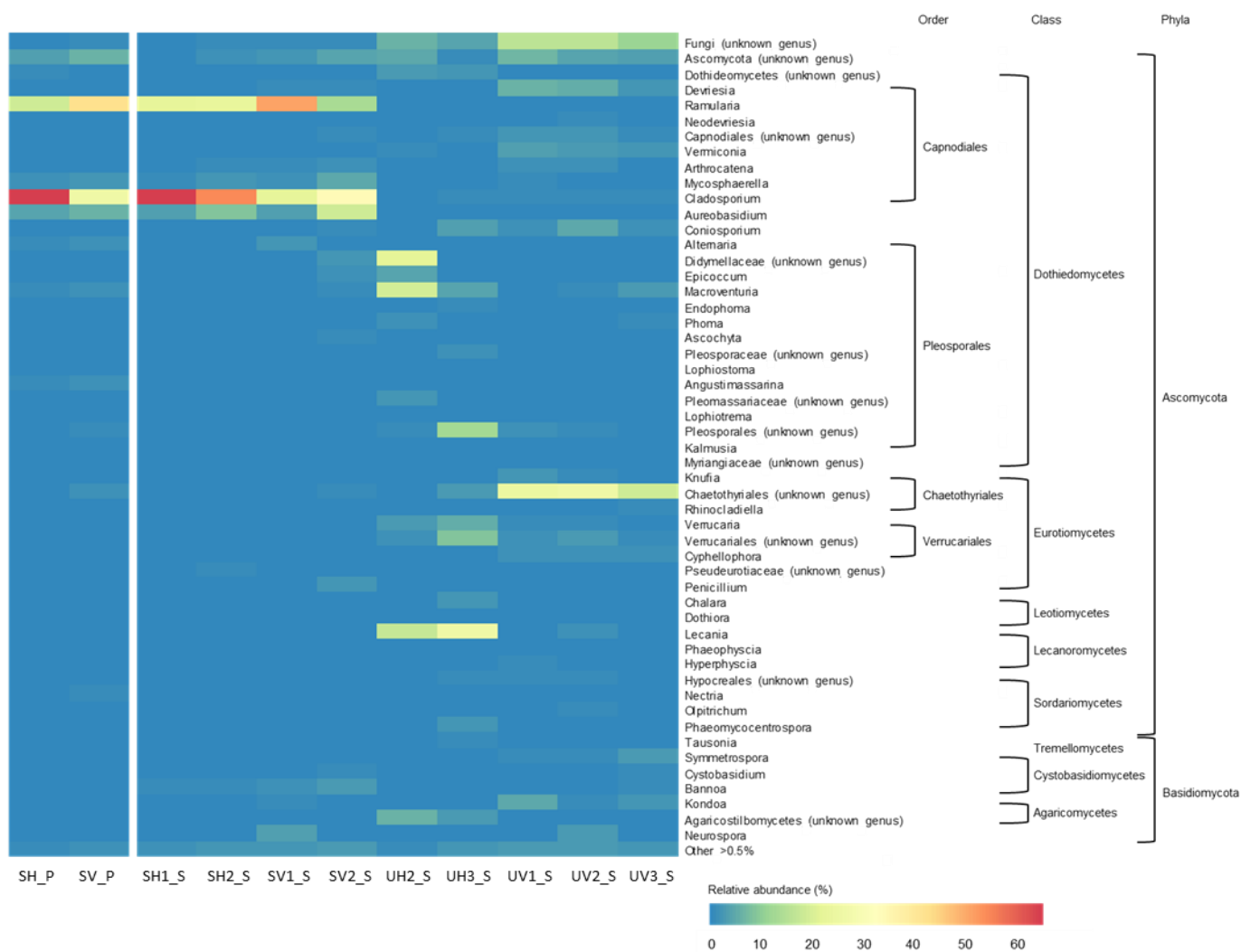


Figure 28: Heatmap showing the relative abundance of the most represented fungi in each position at genus level. Genera represented have relative abundance superior to 0.5%.

### 3.9. Dissimilarity of microbial community: Bray-Curtis beta diversity index

#### *Comparison of sampling methods*

Two sampling methods were used for DNA extraction. In order to compare the 2 sampling methods, the Bray Curtis beta diversity was calculated (Table 3). This index allows the comparison of the composition of two samples at the species level. For bacteria, the sequencing was possible for both UH and UV sampling methods. For fungi, the comparison was possible for samples SH and SV. The result of the Bray Curtis beta diversity is shown in Table 3. The dissimilarity of the microbial communities as a function of the sampling method shows low values, between 0.1 and 0.5, for bacteria and fungi. Therefore, it is possible to have different positions without taking into account the sampling method.



Table 3: Bray-Curtis beta diversity indices of bacteria and fungi as a function of the position and exposure condition.

Bacteria	UH_P		UH3_S	UV_P			UV1_S	UV2_S
	UH_P	0	0.6		UV_P	0	0.39	0.4
UH3_S		0		UV1_S		0	0.3	
				UV2_S			0	

Fungi	SH_P			SH1_S	SH2_S	SV_P			SV1_S	SV2_S
	SH_P	0	0.16	0.24			SV_P	0	0.25	0.43
SH1_S		0	0.27			SV1_S		0	0.51	
SH2_S			0			SV2_S			0	

### Comparison of the positions

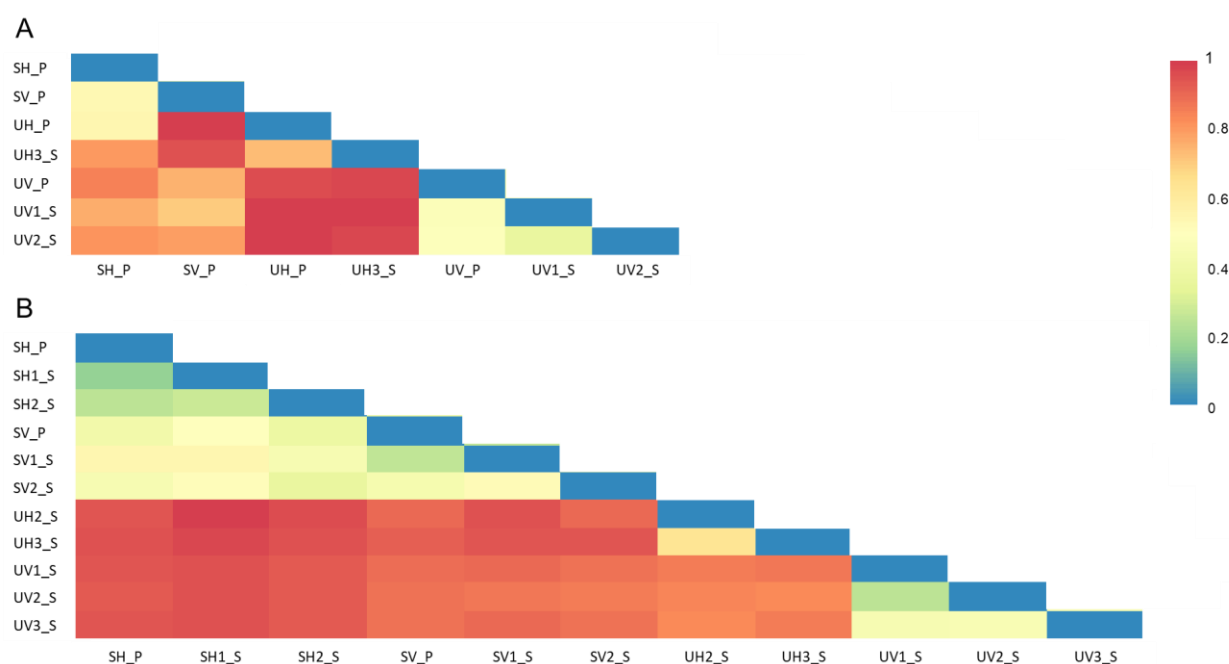


Figure 29: Heat map showing the Bray Curtis beta diversity index for bacterial communities (A) and fungi communities (B). Beta diversity index of 1 correspond to a high dissimilarity and 0 correspond to a high similarity.

For bacteria (Figure 29A), the comparison of the sheltered positions SH-SV with the exposed positions UH – UV shows a high dissimilarity (beta diversity  $\sim 0.7-0.8$ ), except for SH-UH ( $\sim 0.5$ ). This low value can be explained by the important abundance of *Flavobacterium* in the horizontal position (Figure 27). The beta diversity between horizontal and vertical position is low for sheltered position, indicating a relative similarity, whereas it is high for exposed positions ( $0.9-1$ ), corresponding to high differences. For fungi (Figure 29B), the differences between sheltered and unsheltered positions are high (beta diversity between  $0.9-1$ ). Fungal diversity is relatively similar between sheltered horizontal and vertical positions (SH-SV) with values between  $0.4$  and  $0.5$ , but very different between exposed horizontal and vertical positions (UH and UV) with very high with values around  $0.8$ .

## 4. Discussion

The aim of this study was to understand the first steps of colonization of limestone in an urban area, in different positions (sheltered or unsheltered) and orientations (vertical or horizontal).

### 4.1. Biocolonization

After 5 years of exposure, the difference in biocolonization is clearly observed on limestone. The biological colonization is higher on the surfaces exposed to rain than on the sheltered surfaces and appears as a green patina induced by photolithotrophic microorganisms and moss development. This greenish patina is often found on limestone monuments after a long period of exposure (Th. Warscheid and Braams, 2000; Barberousse et al., 2006; Macedo et al., 2009). This orientation allows a higher water availability due to the contact with rain and a more important solar radiation, in contrast to sheltered samples (SH and SV).

The sequencing results highlight the presence of five major bacterial phyla: Actinobacteria, Bacteroidota, Chloroflexi, Deinococcota and Proteobacteria. These phyla are commonly found on limestone monuments (Balland-Bolou-Bi et al., 2016; Coelho et al., 2021; Gambino et al., 2021; Mihajlovski et al., 2017). Proteobacteria and Actinobacteria are often dominant in epilithic communities (Ding et al., 2021; McNamara et al., 2006; Silva et al., 2022). The most important bacterial genera found are *Flavobacterium*, *Truepera*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Roseomonas*, *Friedmaniella*, *Nocardioides* and *Marmoricola*. Their proportion varies according to their position of exposure. The genus *Sphingomonas* is often present on stone monuments, regardless of the type of stone. They are known to be able to produce a yellow pigment that they use as a sunscreen, allowing them to survive under high UV irradiation. This may explain their higher proportion on exposed vertical positions (Li et al., 2016; Mihajlovski et al., 2017; Silva et al., 2022; Wang and Liu, 2021). The genus *Methylobacterium-Methylorubrum* is known to produce carotenoid pigments and has previously been found in bacterial communities associated with stone monuments (Green, 2015; Mihajlovski et al., 2017; Silva et al., 2022). The genus *Flavobacterium* from the phylum Bacteroidetes is present in large proportions in horizontal positions. This genus has been found in very advanced bioalteration facies in both vertical and horizontal positions (Balland-Bolou-Bi et al., 2019; Rosado et al., 2020). This may be due to the greater amount of water retained in some areas, as this genus is commonly found in aquatic systems (Bernardet and Bowman, 2006).

The fungal communities are mainly composed of two phyla, Ascomycota and Basidiomycota. The main genera found on limestone surfaces are *Ramularia*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Lecania* and their abundance depends on their position. The genera *Aureobasidium* and *Cladosporium* are found in high abundance on the sheltered positions, in agreement with other short-term exposure studies (Pitzurra et al., 2003). These genera are common airborne fungi, corresponding to black fungi and act as first fungal colonizers in humid to temperate climates (De Leo et al., 2022; Paiva et al., 2022; Pinheiro et al., 2019; Sterflinger and Piñar, 2013).

The effect of the orientation (vertical or horizontal) on the microbial communities is clearly observed only for samples exposed to rain, with high values of beta diversity for bacteria and fungi, in contrast to sheltered samples. This can also be explained by the difference availability of water. In the exposed position, where the presence of photolithotrophic microorganisms is higher, the most abundant fungi are considered to be lichenized fungi, such as the genus *Lecania*, the families Verrucariales and Chaetothyriales (Thüs et al., 2011).

Therefore, the microbial communities are relatively similar for short- and long-term exposed stones, suggesting that they are dependent on environmental conditions rather than the state of alteration of the substrate. This suggestion is strengthened by the strong influence of the

orientation of the samples, which can be explained by water availability, but possibly also by light exposure and temperature.

#### 4.2. Effect of air pollution on biological colonization

Air pollution (gases, particulate matter) can affect the surface of monuments by increasing acidity and depositing new chemical compounds (various salts such as gypsum) due to the interaction of stone components with these pollutants, inducing a change in the structure of microbial communities that adapt to their new environment (Balland-Bolou-Bi et al., 2016; Scheerer et al., 2009; Schröer et al., 2020; Villa et al., 2015). The microorganisms on the surface of the stones play an important role in their degradation, and the pollutants can intensify/accelerate these effects (Balland-Bolou-Bi et al., 2016; Gaylarde et al., 2017; Ortega-Morales et al., 2019; Schröer et al., 2020).

Rainfall analysis conducted in November 2015 and April 2016 show a high proportion of chloride in November 2015, which can be attributed to the cleaning of the tombs with bleach water. In April 2016, the proportions of ammonium, nitrate, and sulfate accounted for more than the half of the ions studied (Figure 20). These compounds may be related to air pollution such as sulfur and NO<sub>x</sub> emissions. These pollutants can be used as nutrients by certain microorganisms, affecting their metabolism (Sazanova et al., 2022; Villa et al., 2015). NO<sub>x</sub> has been shown to favor the development to nitrogen-metabolizing bacteria. In this study, the genera *Nocardiodes*, *Friedmanniella*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Sphingomonas* and *Rubellimicrobium* were found in high proportions in the sheltered position, where high nitrate concentrations were observed. Some species of the aforementioned genus have been identified as denitrifying bacteria capable of reducing nitrate compounds to nitrite (Alessa et al., 2021; Cua and Stein, 2014; Cui et al., 2013; Iwai et al., 2010; Xing et al., 2018; Yun et al., 2019). Furthermore, the study of (Moroni and Pitzurra, 2008), shows the ability of a fungal community composed of the species *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhodotorula sp.* and *Cryptococcus sp.* to utilize sulfate compound as a nutrient. In our study, the genus *Cladosporium* is present on all samples in high proportion, this genus can promote the consumption of sulfate on limestone surface, which can explain the absence of gypsum after 5 years of exposure. Therefore, pollution influences the composition of rainwater. The actual composition tends to favor denitrifying bacteria and could provide nutrients for some fungal genera.

#### 4.3. Alteration facies

Visually, after 5 years of exposure to the Parisian atmosphere in a green area, limestone samples exposed to rain are covered by mosses and microorganisms in horizontal position and by a green patina in vertical position. Samples sheltered from the rain are slightly gray and the biocolonization appears to be low. They are more susceptible to contamination from pollutant deposition (Beloïn and Haynie, 1975; Creighton et al., 1990; Grossi et al., 2003; Pio and Lopes, 1998; Watt and Hamilton, 2003). Therefore, samples exposed to rain seem to be more affected by bioalteration processes, whereas sheltered samples are affected by physico-chemical processes.

However, the alteration of stone (dissolution, secondary phase formation, porosity change...) is difficult to quantify at this stage and no obvious sign of physical or chemical attack is evidenced. On sheltered positions (SH and SV), XRD analyses show the presence of neocrystallization of potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>). The potassium and nitrate involved in the formation of KNO<sub>3</sub> seems to come from rainfall (Table 1), which is consistent with the salt growth requiring an alternation of wet and dry periods. On the positions exposed to rain (UH and UV), no secondary crystalline phases are visible due to the rain leaching. Microscopic analyses do not show the formation of secondary phases as secondary carbonates are difficult to observe and gypsum is not detectable

at this stage. The loss of material and the evolution of the roughness cannot be precisely quantified due to the biocolonization.

The results obtained after 5 years can be linked to the main observations made on ancient tombs in the Père-Lachaise cemetery (Balland-Bolou-Bi et al., 2016). The horizontal parts (specimens) are mostly colonized by mosses, microalgae and bacteria and a kind of soil is formed at the surface. The vertical parts (steles) are covered by biofilms, lichens, algae... They erode when exposed to rain, and gypsum and soot can be found in more sheltered areas. Black crusts can be thick in the most sheltered parts. Therefore, bioalteration is predominant and relatively fast, while physico-chemical processes (erosion, pollution and black crusts) are slower.

In vegetated areas such as the Père Lachaise cemetery, field observations show that the most frequent alterations are erosion in areas exposed to rain, soiling or encrustation in sheltered areas, and biocolonization. With the reduction in SO<sub>2</sub> in Paris, rainfall is less acidic and black crusts are harder to form. Biocolonization will therefore be a major phenomenon in the future as temperatures and rainfall increase (Reboah et al. 2023). This will have to be taken into account in the conservation of monuments.

## 5. Conclusion

This work presents the results of 5 years of exposure of limestone samples in a vegetated area in different conditions (sheltered vs. unsheltered from rain, horizontally vs. vertically exposed). The characterization of the samples shows that the microbial communities are strongly present on limestone surfaces and especially on those exposed to rainfall. Sequencing of these communities revealed different phyla: Actinobacteriota, Bacteroidota, Cyanobacteria, Proteobacteria and Deinococcota for bacteria and Ascomycota for fungi. Moreover, some significant differences in the respective contributions were detected as a function of the condition (exposed to rain or not) and of the orientation (horizontal or vertical), revealing the role of water availability, light and temperature. At this stage, the only sign of physico-chemical processes (dissolution, secondary phase precipitation) is the formation of KNO<sub>3</sub> on sheltered samples. This phase can originate from the rainwater. Therefore, in the short-term the main cause of alteration is the biological colonization. Physical, chemical, and biogenic alteration facies are slower to be evidenced. However, it is expected that these processes will lead to a significant state of alteration, as this is observed on the ancient tombs of the cemetery.

## Acknowledgement

The authors would like to thank the director B. GALLOT and the conservator G. GROUD of the Père-Lachaise cemetery to give use the authorization to expose limestone specimens during five years. They also acknowledge the Agence Nationale de la Recherche (Project-ANR-19-CE22-000 MIAM) and OSU-Efluve for the financial supports. The authors thank the Prammics platform for ion chromatography analyses. The authors acknowledge the INRA MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRA, 2018. Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing help and support. They also acknowledge the reviewers for their helpful comments.

## References

Adhikary, S.P., Keshari, N., Urzi, C., De Philippis, R., 2015. Cyanobacteria in biofilms on stone temples of Bhubaneswar, Eastern India. *algol\_stud* 147, 67–93. [https://doi.org/10.1127/algol\\_stud/2015/0190](https://doi.org/10.1127/algol_stud/2015/0190)

- Agrawal, S., Khumlianlal, J., Devi, S.I., 2023. Uncovering the Fungal Diversity and Biodeterioration Phenomenon on Archaeological Carvings of the Badami Cave Temples: A Microcosm Study. *Life* 14, 28. <https://doi.org/10.3390/life14010028>
- AIRPARIF, 2020. Bilan de la qualité de l'air Année 2019, surveillance et information en Ile de France. AIRPARIF.
- Alessa, O., Ogura, Y., Fujitani, Y., Takami, H., Hayashi, T., Sahin, N., Tani, A., 2021. Comprehensive Comparative Genomics and Phenotyping of *Methylobacterium* Species. *Front. Microbiol.* 12, 740610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.740610>
- Alotaibi, M.O., Sonbol, H.S., Alwakeel, S.S., Suliman, R.S., Fodah, R.A., Abu Jaffal, A.S., AlOthman, N.I., Mohammed, A.E., 2020. Microbial Diversity of Some Sabkha and Desert Sites in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27, 2778–2789. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.038>
- Aly, N., Gomez-Heras, M., Hamed, A., Álvarez De Buergo, M., Soliman, F., 2015. The influence of temperature in a capillary imbibition salt weathering simulation test on Mokattam limestone. *Mater. construcc.* 65, e044. <https://doi.org/10.3989/mc.2015.00514>
- An, S., Couteau, C., Luo, F., Neveu, J., DuBow, M.S., 2013. Bacterial Diversity of Surface Sand Samples from the Gobi and Taklamaken Deserts. *Microb Ecol* 66, 850–860. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0276-2>
- Anatolaki, Ch., Tsitouridou, R., 2009. Relationship between acidity and ionic composition of wet precipitation. *Atmospheric Research* 92, 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2008.09.008>
- Angeli, M., Hébert, R., Menéndez, B., David, C., Bigas, J.-P., 2010. Influence of temperature and salt concentration on the salt weathering of a sedimentary stone with sodium sulphate. *SP* 333, 35–42. <https://doi.org/10.1144/SP333.4>
- Ariño, X., Llop, E., Gomez-Bolea, A., Saiz-Jimenez, C., 2010. Effects of climatic change on microorganisms colonizing cultural heritage stone materials, in: *Climate Change and Cultural Heritage*. pp. 193–198.
- Ausset, P., Del Monte, M., Lefèvre, R.A., 1999. Embryonic sulphated black crusts on carbonate rocks in atmospheric simulation chamber and in the field: role of carbonaceous fly-ash. *Atmospheric Environment* 33, 1525–1534. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(98\)00399-9](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(98)00399-9)
- Austigard, M.S., Mattsson, J., 2019. Monitoring climate change related biodeterioration of protected historic buildings. *IJBPA* 38, 529–538. <https://doi.org/10.1108/IJBPA-11-2018-0094>
- Bahadur, A., Zhang, W., Sajjad, W., Nasir, F., Zhang, G., Liu, G., Chen, T., 2021. Bacterial diversity patterns of desert dunes in the northeastern Qinghai-Tibet Plateau, China. *Arch Microbiol* 203, 2809–2823. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02272-z>
- Bahadur, A., Zhang, Z., Sajjad, W., Nasir, F., Zia, M.A., Liu, G., Chen, T., Zhang, W., 2022. Bacterial community structure and functions in microhabitats associated with black stones in Black Gobi desert, China. *Ecological Indicators* 142, 109168. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109168>
- Balland-Bolou-Bi, C., Bolou-Bi, E.B., Alphonse, V., Giusti-Miller, S., Jusselme, M.D., Livet, A., Grimaldi, M., Bousserhine, N., 2019. Impact of microbial activity on the mobility of metallic elements (Fe, Al and Hg) in tropical soils. *Geoderma* 334, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.07.044>
- Balland-Bolou-Bi, C., Saheb, M., Alphonse, V., Livet, A., Reboah, P., Abbad-Andaloussi, S., Verney-Carron, A., 2023. Effect of Cultivable Bacteria and Fungi on the Limestone Weathering Used in Historical Buildings. *Diversity* 15, 587. <https://doi.org/10.3390/d15050587>
- Balland-Bolou-Bi, C., Saheb, M., Bousserhine, N., Abbad-Andaloussi, S., Alphonse, V., Nowak, S., Chabas, A., Desboeufs, K., Verney-Carron, A., 2016. Effect of microorganism activities

- in a polluted area on the alteration of limestone used in historical buildings. *Science and Art: A Future For Stone* 25.
- Bar, E., Rise, M., Vishkautsan, M., Arad, S. (Malis), 1995. Pigment and Structural Changes in *Chlorella zofingiensis* upon Light and Nitrogen Stress. *Journal of Plant Physiology* 146, 527–534. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82019-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82019-5)
- Barberousse, H., Lombardo, R.J., Tell, G., Couté, A., 2006. Factors involved in the colonisation of building façades by algae and cyanobacteria in France. *Biofouling* 22, 69–77. <https://doi.org/10.1080/08927010600564712>
- Beck, H.E., Zimmermann, N.E., McVicar, T.R., Vergopolan, N., Berg, A., Wood, E.F., 2018. Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Sci Data* 5, 180214. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214>
- Beloin, N.J., Haynie, F.H., 1975. Soiling of building materials. *Journal of the Air Pollution Control Association* 25, 399–403. <https://doi.org/10.1080/00022470.1975.10470099>
- Benoit, P., Blanc, A., Gély, J.-P., Guini-Skliar, A., Obert, D., Viré, M., 2000. La pierre de Paris. Méthode d'étude de la pierre à bâtir depuis son extraction jusqu'à sa mise en œuvre, in: *La Pierre Dans La Ville Antique et Médiévale. Actes Du Colloque d'Argentomagus, Supplément à La Revue Archéologique Du Centre de La France. Fédération pour l'édition de la Revue archéologique du Centre de la France.*
- Berdoulay, M., Salvado, J.C., 2009. Genetic characterization of microbial communities living at the surface of building stones. *Letters in Applied Microbiology* 49, 311–316. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02660.x>
- Bernardet, J.-F., Bowman, J.P., 2006. The Genus *Flavobacterium*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp. 481–531. [https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8\\_17](https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_17)
- Beysens, D., Mongruel, A., Acker, K., 2017. Urban dew and rain in Paris, France: Occurrence and physico-chemical characteristics. *Atmospheric Research* 189, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2017.01.013>
- Biswas, J., Sharma, K., Harris, K.K., Rajput, Y., 2013. Biodeterioration agents: Bacterial and fungal diversity dwelling in or on the pre-historic rock-paints of Kabra-pahad, India. *Iran J Microbiol* 5, 309–314.
- Blanc, A., Gely, J.-P., Vire, M., 2001. Le calcaire lutétien, ses carrières, son utilisation dans les monuments. *Muséum d'histoire naturelle, Paris* 38–46.
- Blanc, A., Gely, J.-P., Vire, M., 2000. Le calcaire lutetien, ses carrières, son utilisation dans les monuments, in: *Le Lutétien, La Pierre de Paris*. pp. 38–46.
- Blanc, A., Lorenz, C., 1994. Les matériaux de construction des thermes de Paris. *Lapidicina* 5, 1–10.
- Bonazza, A., Brimblecombe, P., Grossi, C.M., Sabbioni, C., 2007. Carbon in Black Crusts from the Tower of London. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4199–4204. <https://doi.org/10.1021/es062417w>
- Bonazza, A., Natali, C., Ghedini, N., Vaccaro, C., Sabbioni, C., 2015. Oxalate Patinas on Stone Monuments in the Venetian Lagoon: Characterization and Origin. *International Journal of Architectural Heritage* 9, 542–552. <https://doi.org/10.1080/15583058.2013.837546>
- Boniek, D., Damaceno, Q.S., De Abreu, C.S., De Castro Mendes, I., Dos Santos, A.F.B., De Resende Stoianoff, M.A., 2019. Filamentous fungi associated with Brazilian stone samples: structure of the fungal community, diversity indexes, and ecological analysis. *Mycol Progress* 18, 565–576. <https://doi.org/10.1007/s11557-019-01470-w>
- Brady, A.L., Goordial, J., Sun, H.J., Whyte, L.G., Slater, G.F., 2018. Variability in carbon uptake and (re)cycling in Antarctic cryptoendolithic microbial ecosystems demonstrated through radiocarbon analysis of organic biomarkers. *Geobiology* 16, 62–79. <https://doi.org/10.1111/gbi.12263>

- Brake, W.H.T., 1975. Air Pollution and Fuel Crises in Preindustrial London, 1250-1650. *Technology and Culture* 16, 337. <https://doi.org/10.2307/3103030>
- Bray, J.R., Curtis, J.T., 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27, 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Breitenbach, R., Silbernagl, D., Toepel, J., Sturm, H., Broughton, W.J., Sasaki, G.L., Gorbushina, A.A., 2018. Corrosive extracellular polysaccharides of the rock-inhabiting model fungus *Knufia petricola*. *Extremophiles* 22, 165–175. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0984-5>
- Brimblecombe, P., 2012. *The Big Smoke* (Routledge Revivals), 0 ed. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780203813898>
- Brimblecombe, P., Grossi, C.M., 2009. Millennium-long damage to building materials in London. *Science of The Total Environment* 407, 1354–1361. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.09.037>
- Brimblecombe, P., Lefèvre, R.-A., 2021. Weathering of materials at Notre-Dame from changes in air pollution and climate in Paris, 1325–2090. *Journal of Cultural Heritage* 50, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.06.007>
- Camuffo, D., 2016. Weathering of Building Materials, in: Brimblecombe, P. (Ed.), *Urban Pollution and Change to Material and Building Surfaces*. pp. 19–59.
- Camuffo, D., 1991. Physical weathering of monuments. Presented at the Weathering and Air Pollution. First Course, Community of Mediterranean Universities, Mario Adda Editore, Bari, University School of Monument Conservation, pp. 51–66.
- Camuffo, D., 1986. Deterioration Processes of Historical Monuments, in: *Studies in Environmental Science*. Elsevier, pp. 189–221. [https://doi.org/10.1016/S0166-1116\(08\)70884-7](https://doi.org/10.1016/S0166-1116(08)70884-7)
- Camuffo, D., Bernardi, A., Zanetti, M., 1988. Analysis of the real-time measurement of the pH of rainfall at Padova, Italy: Seasonal variation and meteorological aspects. *Science of The Total Environment* 71, 187–200. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(88\)90166-0](https://doi.org/10.1016/0048-9697(88)90166-0)
- Camuffo, D., Del Monte, M., Ongaro, A., 1984. The pH of the atmospheric precipitation in Venice, related to both the dynamics of precipitation events and the weathering of monuments. *Science of The Total Environment* 40, 125–139. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(84\)90347-4](https://doi.org/10.1016/0048-9697(84)90347-4)
- Camuffo, D., Del Monte, M., Sabbioni, C., 1983. Origin and growth mechanisms of the sulfated crusts on urban limestone. *Water Air Soil Pollut* 19, 351–359. <https://doi.org/10.1007/BF00159596>
- Caneva, G., Ceschin, S., Salvadori, O., Kashiwadani, H., Moon, K.H., Futagami, Y., 2012. Biodeterioration of stone in relation to microclimate in the Ta Nei Temple - Angkor (Cambodia). Presented at the 12th International Congress on the Deterioration and Conservation of Stone Columbia University, New York.
- Cardell, C., Delalieux, F., Roumpopoulos, K., Moropoulou, A., Auger, F., Van Grieken, R., 2003. Salt-induced decay in calcareous stone monuments and buildings in a marine environment in SW France. *Construction and Building Materials* 17, 165–179. [https://doi.org/10.1016/S0950-0618\(02\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0950-0618(02)00104-6)
- Caroll, D., 1962. Rainwater as a Chemical Agent of Geologic Processes - A Review | Resolution Copper Project and Land Exchange Environmental Impact Statement.
- Carr, N.G., Whitton, B.A., 1982. *The biology of cyanobacteria*, Univ of California Press. ed.
- Chabas, A., Fouqueau, A., Attoui, M., Alfaro, S.C., Petitmangin, A., Bouilloux, A., Saheb, M., Coman, A., Lombardo, T., Grand, N., Zapf, P., Berardo, R., Duranton, M., Durand-Jolibois, R., Jerome, M., Pangui, E., Correia, J.J., Guillot, I., Nowak, S., 2015. Characterisation of CIME, an experimental chamber for simulating interactions between materials of the cultural heritage and the environment. *Environ Sci Pollut Res* 22, 19170–19183. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5083-5>

- Chabas, A., Jeannette, D., 2001. Weathering of marbles and granites in marine environment: petrophysical properties and special role of atmospheric salts. *Environmental Geology* 40, 359–368. <https://doi.org/10.1007/s002540000157>
- Chabas, A., Kloppmann, W., Sizun, J.-P., Wille, G., Coman, A., Petitmangin, A., Nowak, S., Martin, E., Jurgens, M.-A., 2022. Sources and chronology of soluble salt formation in a medieval dovecote caught up in urbanisation: a resilience story? *Environ Earth Sci* 81, 550. <https://doi.org/10.1007/s12665-022-10665-6>
- Chao, A., Chazdon, R.L., Colwell, R.K., Shen, T.-J., 2006. Abundance-Based Similarity Indices and Their Estimation When There Are Unseen Species in Samples. *Biometrics* 62, 361–371. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2005.00489.x>
- Charola, A.E., Pühringer, J., Steiger, M., 2007. Gypsum: A review of its role in the deterioration of building materials. *Environmental Geology* 52, 207–220. <https://doi.org/10.1007/s00254-006-0566-9>
- Charola, A.E., Ware, R., 2002. Acid deposition and the deterioration of stone: a brief review of a broad topic. *SP 205*, 393–406. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2002.205.01.28>
- Chebbi, A., Carlier, P., 1996. Carboxylic acids in the troposphere, occurrence, sources, and sinks: A review. *Atmospheric Environment* 30, 4233–4249. [https://doi.org/10.1016/1352-2310\(96\)00102-1](https://doi.org/10.1016/1352-2310(96)00102-1)
- Checucci, A., Borruso, L., Petrocchi, D., Perito, B., 2022. Diversity and metabolic profile of the microbial communities inhabiting the darkened white marble of Florence Cathedral. *International Biodeterioration & Biodegradation* 171, 105420. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2022.105420>
- Chimienti, G., Piredda, R., Pepe, G., Van Der Werf, I.D., Sabbatini, L., Crecchio, C., Ricciuti, P., D'Erchia, A.M., Manzari, C., Pesole, G., 2016. Profile of microbial communities on carbonate stones of the medieval church of San Leonardo di Siponto (Italy) by Illumina-based deep sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 8537–8548. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7656-8>
- Choe, Y.-H., Kim, M., Woo, J., Lee, M.J., Lee, J.I., Lee, E.J., Lee, Y.K., 2018. Comparing Rock-inhabiting Microbial Communities in Different Rock Types from a High Arctic Polar Desert. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy070>
- Coelho, C., Mesquita, N., Costa, I., Soares, F., Trovão, J., Freitas, H., Portugal, A., Tiago, I., 2021. Bacterial and archaeal structural diversity in several biodeterioration patterns on the limestone walls of the old cathedral of Coimbra. *Microorganisms* 9, 709.
- Coleine, C., Selbmann, L., 2021. 2.1 Black fungi inhabiting rock surfaces, in: Büdel, B., Friedl, T. (Eds.), *Life at Rock Surfaces*. De Gruyter, pp. 57–86. <https://doi.org/10.1515/9783110646467-003>
- Coleine, C., Stajich, J.E., Zucconi, L., Onofri, S., Pombubpa, N., Egidi, E., Franks, A., Buzzini, P., Selbmann, L., 2018a. Antarctic Cryptoendolithic Fungal Communities Are Highly Adapted and Dominated by Lecanoromycetes and Dothideomycetes. *Front. Microbiol.* 9, 1392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01392>
- Coleine, C., Zucconi, L., Onofri, S., Pombubpa, N., Stajich, J., Selbmann, L., 2018b. Sun Exposure Shapes Functional Grouping of Fungi in Cryptoendolithic Antarctic Communities. *Life* 8, 19. <https://doi.org/10.3390/life8020019>
- Conley, C.A., Ishkhanova, G., McKay, C.P., Cullings, K., 2006. A Preliminary Survey of Non-Lichenized Fungi Cultured from the Hyperarid Atacama Desert of Chile. *Astrobiology* 6, 521–526. <https://doi.org/10.1089/ast.2006.6.521>
- Creighton, P.J., Liou, P.J., Haynie, F.H., Lemmons, T.J., Miller, J.L., Gerhart, J., 1990. Soiling by atmospheric aerosols in an urban industrial area. *Journal of the Air and Waste Management Association* 40, 1285–1289. <https://doi.org/10.1080/10473289.1990.10466783>



- Cua, L.S., Stein, L.Y., 2014. Characterization of denitrifying activity by the alphaproteobacterium, *Sphingomonas wittichii* RW1. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00404>
- Cui, Y., Woo, S.-G., Lee, J., Sinha, S., Kang, M.-S., Jin, L., Kim, K.K., Park, J., Lee, M., Lee, S.-T., 2013. *Nocardioides daeguensis* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from activated sludge of an industrial wastewater treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 3727–3732. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.047043-0>
- Cutler, N.A., Oliver, A.E., Viles, H.A., Ahmad, S., Whiteley, A.S., 2013a. The characterisation of eukaryotic microbial communities on sandstone buildings in Belfast, UK, using TRFLP and 454 pyrosequencing. *International Biodeterioration & Biodegradation* 82, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.010>
- Cutler, N.A., Viles, H.A., Ahmad, S., McCabe, S., Smith, B.J., 2013b. Algal ‘greening’ and the conservation of stone heritage structures. *Science of The Total Environment* 442, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.050>
- Dakal, T.C., Cameotra, S.S., 2012. Microbially induced deterioration of architectural heritages: routes and mechanisms involved. *Environ Sci Eur* 24, 36. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-24-36>
- De La Rosa-García, S. del C., Ortega-Morales, B.O., Gaylarde, C., Beltran-Garcia, M., Quintana-Owen, P., Reyes-Estebanez, M., 2011. Influence of fungi in the weathering of limestone of Mayan monuments, in: *Revista Mexicana de Micología*. pp. 43–51.
- De Leo, F., Antonelli, F., Pietrini, A.M., Ricci, S., Urzì, C., 2019. Study of the euendolithic activity of blackmeristematic fungi isolated from a marble statue in the Quirinale Palace’s Gardens in Rome, Italy. *Facies* 65, 18. <https://doi.org/10.1007/s10347-019-0564-5>
- De Leo, F., Marchetta, A., Urzì, C., 2022. Black Fungi on Stone-Built Heritage: Current Knowledge and Future Outlook. *Applied Sciences* 12, 3969. <https://doi.org/10.3390/app12083969>
- De Leo, F., Urzì, C., De Hoog, G.S., 1999. Two *Coniosporium* species from rock surfaces. *Studies in Mycology* 70–79.
- Decina, S.M., Templer, P.H., Hutyra, L.R., 2018. Atmospheric Inputs of Nitrogen, Carbon, and Phosphorus across an Urban Area: Unaccounted Fluxes and Canopy Influences. *Earth’s Future* 6, 134–148. <https://doi.org/10.1002/2017EF000653>
- Del Monte, M., Sabbioni, C., Zappia, G., 1987. The origin of calcium oxalates on historical buildings, monuments and natural outcrops. *Science of The Total Environment* 67, 17–39. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(87\)90063-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(87)90063-5)
- Di Bonaventura, M.P., Del Gallo, M., Cacchio, P., Ercole, C., Lepidi, A., 1999. Microbial Formation of Oxalate Films on Monument Surfaces: Bioprotection or Biodeterioration? *Geomicrobiology Journal* 16, 55–64. <https://doi.org/10.1080/014904599270749>
- Diakumaku, E., 1996. Investigations on the role of black fungi and their pigments in the deterioration of monuments. Oldenburg, Germany.
- Dias, L., Pires, V., Sitzia, F., Lisci, C., Candeias, A., Caldeira, A.T., Mirão, J., 2023. Evaluating the biosusceptibility of natural stone as an supporting tool to prevent Cultural Heritage biodeterioration. *Eur. Phys. J. Plus* 138, 570. <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-023-04185-w>
- Ding, Y., Salvador, C.S.C., Caldeira, A.T., Angelini, E., Schiavon, N., 2021. Biodegradation and microbial contamination of limestone surfaces: an experimental study from Batalha Monastery, Portugal. *Corrosion and Materials Degradation* 2, 31–45.
- Dyda, M., Laudy, A., Decewicz, P., Romaniuk, K., Ciekowska, M., Szajewska, A., Solecka, D., Dziewit, L., Drewniak, L., Skłodowska, A., 2021. Diversity of Biodeteriorative Bacterial and Fungal Consortia in Winter and Summer on Historical Sandstone of the Northern Pergola, Museum of King John III’s Palace at Wilanow, Poland. *Applied Sciences* 11, 620. <https://doi.org/10.3390/app11020620>

- EI Baghdadly, K.Z., Tolba, S.T., Houssien, S.S., 2019. Biogenic deterioration of Egyptian limestone monuments: treatment and conservation. *Journal of Cultural Heritage* 38, 118–125.
- Essilmi, M., Loudiki, M., El Gharmali, A., 2019. STUDY OF THE LICHENS OF THE MOROCCAN ATLANTIC COAST SAFI-ESSAOUIRA: BIOINDICATION OF AIR QUALITY AND LIMITING FACTORS. *Appl. Ecol. Env. Res.* 17, 4305–4323. [https://doi.org/10.15666/aeer/1702\\_43054323](https://doi.org/10.15666/aeer/1702_43054323)
- Essoussi, I., Boujmil, R., Nouioui, I., Abbassi-Ghozzi, I., Hamza, A., Boudabous, A., Gtari, M., 2012. Genetic Diversity and Esterase-Profilng of Actinobacteria Isolated from Sahara Desert Stones and Monuments. *Geomicrobiology Journal* 29, 23–28. <https://doi.org/10.1080/01490451.2010.521367>
- Eyssautier-Chuine, S., Mouhoubi, K., Reffuveille, F., Bodnar, J.L., 2020. Thermographic imaging for early detection of biocolonization on buildings. *Building Research and Information* 48, 856–865. <https://doi.org/10.1080/09613218.2020.1730740>
- Eyssautier-Chuine, S., Vaillant-Gaveau, N., Charpentier, E., Reffuveille, F., 2021. Comparison of biofilm development on three building and restoration stones used in French monuments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 165, 105322. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105322>
- Fan, G., Zhang, J., Wang, Y., Huang, K., Wang, S., Yao, Y., Luo, J., 2022. Microbial community and nitrogen transformation pathway in bioretention system for stormwater treatment in response to formulated soil medium. *Process Safety and Environmental Protection* 161, 594–602. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.03.077>
- Favero-Longo, S.E., Viles, H.A., 2020. A review of the nature, role and control of lithobionts on stone cultural heritage: weighing-up and managing biodeterioration and bioprotection. *World J Microbiol Biotechnol* 36, 100. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02878-3>
- Fehér, K., Török, Á., 2022. Detecting short-term weathering of stone monuments by 3D laser scanning: lithology, wall orientation, material loss. *Journal of Cultural Heritage* 58, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2022.10.012>
- Fitzner, B., Heinrichs, K., 2001. Damage diagnosis on stone monuments – weathering forms, damage categories and damage indices.
- Fitzner, B., Heinrichs, K., La Bouchardiere, D., 2002. Limestone weathering of historical monuments in Cairo, Egypt. *SP* 205, 217–239. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2002.205.01.17>
- Frank-Kamenetskaya, O., Vlasov, D., Zelenskaya, M., Knauf, I., Timasheva, M., 2009. Decaying of the marble and limestone monuments in the urban environment. Case studies from Saint Petersburg, Russia. *Studia UBB, Geologia* 54, 17–22. <https://doi.org/10.5038/1937-8602.54.2.4>
- Friedmann, E.I., 1980. Endolithic microbial life in hot and cold deserts. *Origins Life Evol Biosphere* 10, 223–235. <https://doi.org/10.1007/BF00928400>
- Fries, N., Gunnerbeck, E., 1981. Nutritional characters in *Ramularia* species. *Mycopathologia* 74, 73–78. <https://doi.org/10.1007/BF01259461>
- Fronteau, G., Pascal, A., Barbin, V., 1999. CARACTERISATION SEDIMENTOLOGIQUE ET PETROPHYSIQUE DE PIERRES DE TAILLE CALCAIRES, DURABILITE EN ŒUVRE ET MODES D'ALTERATIONS, in: *Livre Des Résumés*. Presented at the 7 ème Congrès Français de Sédimentologie, Publi. ASF, Paris, pp. 157–158.
- Fu, W., Song, G., Wang, Y., Wang, Q., Duan, P., Liu, C., Zhang, X., Rao, Z., 2022. Advances in Research Into and Applications of Heterotrophic Nitrifying and Aerobic Denitrifying Microorganisms. *Front. Environ. Sci.* 10, 887093. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.887093>
- Fucikova, K., 2011. Monograph of the Genus *Bracteacoccus* (Sphaeropleales, Chlorophyceae), with Systematic Clarification of Taxonomically Related Genera. University of Connecticut.

- Fuentes, E., Carballeira, R., Prieto, B., 2021. Role of Exposure on the Microbial Consortiums on Historical Rural Granite Buildings. *Applied Sciences* 11, 3786. <https://doi.org/10.3390/app11093786>
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Vöosmarty, C.J., 2004. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>
- Gambino, M., Lepri, G., Štovíček, A., Ghazayarn, L., Villa, F., Gillor, O., Cappitelli, F., 2021. The tombstones at the Monumental Cemetery of Milano select for a specialized microbial community. *International Biodeterioration & Biodegradation* 164, 105298. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105298>
- Gardner, C.M., Gerhard, W.A., Redfern, L.K., Gunsch, C.K., 2022. Evaluation of developing maize microbiomes and associations among nitrogen cyclers and key fungal taxa. *Microbiology* 168. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001155>
- Garnaud, S., Mouchel, J.-M., Chebbo, G., Thévenot, D.R., 1999. Heavy metal concentrations in dry and wet atmospheric deposits in Paris district: comparison with urban runoff. *Science of The Total Environment* 235, 235–245. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00199-0)
- Gaylarde, C., 2020. Influence of Environment on Microbial Colonization of Historic Stone Buildings with Emphasis on Cyanobacteria. *Heritage* 3, 1469–1482. <https://doi.org/10.3390/heritage3040081>
- Gaylarde, C., Baptista-Neto, J.A., Ogawa, A., Kowalski, M., Celikkol-Aydin, S., Beech, I., 2017. Epilithic and endolithic microorganisms and deterioration on stone church facades subject to urban pollution in a sub-tropical climate. *Biofouling* 33, 113–127. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1269893>
- 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 & Biodegradation* 55, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.10.001>
- Gaylarde, C.C., Rodríguez, C.H., Navarro-Noya, Y.E., Ortega-Morales, B.O., 2012. Microbial Biofilms on the Sandstone Monuments of the Angkor Wat Complex, Cambodia. *Curr Microbiol* 64, 85–92. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0034-y>
- Genderjahn, S., Lewin, S., Horn, F., Schleicher, A.M., Mangelsdorf, K., Wagner, D., 2021. Living Lithic and Sublithic Bacterial Communities in Namibian Drylands. *Microorganisms* 9, 235. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020235>
- Gibeaux, S., Thomachot-Schneider, C., Eyssautier-Chuine, S., Marin, B., Vazquez, P., 2018. Simulation of acid weathering on natural and artificial building stones according to the current atmospheric SO<sub>2</sub>/NO<sub>x</sub> rate. *Environ Earth Sci* 77, 327. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7467-6>
- Gomez-Heras, M., Fort, R., 2007. Patterns of halite (NaCl) crystallisation in building stone conditioned by laboratory heating regimes. *Environ Geol* 52, 259–267. <https://doi.org/10.1007/s00254-006-0538-0>
- Gorbushina, A.A., Krumbein, W.E., Hamman, C.H., Panina, L., Soukharjevski, S., Wollenzien, U., 1993. Role of black fungi in color change and biodeterioration of antique marbles. *Geomicrobiology Journal* 11, 205–221. <https://doi.org/10.1080/01490459309377952>
- Gottschalk, G., 1986. Regulation of Bacterial Metabolism, in: *Bacterial Metabolism*, Springer Series in Microbiology. Springer New York, New York, NY, pp. 178–207. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1072-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1072-6_7)
- Grbić Ljaljević, M., Subakov-Simić, G., Krizmanić, J., Ladić, V., 2009. Cyanobacterial, algal and fungal biofilm on sandstone substrata of Eiffel's Lock in Becej (Serbia). *Botanica Serbica*, vol 3, Issue 1 101–105.

- Grbić, M.L., Simić, G.S., Stupar, M., Jelikić, A., Sabovljević, M., Đorđević, M., Vukojević, J., 2017. Biodiversity's hidden treasure: biodeteriorated archaeological tombstones of Serbia. *Current Science* 112, 304–310.
- Green, P.N., 2015. *Methylobacterium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 1–8. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00830>
- Green, V.S., Stott, D.E., Diack, M., 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.020>
- Grossi, C.M., Esbert, R.M., Díaz-Pache, F., Alonso, F.J., 2003. Soiling of building stones in urban environments. *Building and Environment* 38, 147–159. [https://doi.org/10.1016/S0360-1323\(02\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0360-1323(02)00017-3)
- Guillitte, O., 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Science of The Total Environment* 167, 215–220. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04582-L](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04582-L)
- Hawkes, C.V., Kivlin, S.N., Rocca, J.D., Huguet, V., Thomsen, M.A., Suttle, K.B., 2011. Fungal community responses to precipitation: FUNGAL CLIMATE RESPONSE. *Global Change Biology* 17, 1637–1645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02327.x>
- Hodgetts, N., Lockhart, N., 2020. Checklist and country status of European bryophytes – update 2020. . National Parks and Wildlife Service, Department of Culture, Heritage and the Gaeltacht, Ireland, Irish Wildlife Manuals.
- Hoog, G.S. de, Figueras, M.J. (Eds.), 1996. *Atlas of clinical fungi*, 2. print. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures [u.a.], Baarn.
- Huang, Z., Wei, Z., Xiao, X., Tang, M., Li, B., Zhang, X., 2019. Nitrification/denitrification shaped the mercury-oxidizing microbial community for simultaneous Hg<sup>0</sup> and NO removal. *Bioresource Technology* 274, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.069>
- Hutchinson, A.J., Johnson, J.B., Thompson, G.E., Wood, G.C., Sage, P.W., Cooke, M.J., 1993. Stone degradation due to wet deposition of pollutants. *Corrosion Science* 34, 1881–1898. [https://doi.org/10.1016/0010-938X\(93\)90025-C](https://doi.org/10.1016/0010-938X(93)90025-C)
- Inkpen, R.J., Viles, H.A., Moses, C., Baily, B., Collier, P., Trudgill, S.T., Cooke, R.U., 2012. Thirty years of erosion and declining atmospheric pollution at St Paul's Cathedral, London. *Atmospheric Environment* 62, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.08.055>
- Isola, D., Bartoli, F., Meloni, P., Caneva, G., Zucconi, L., 2022. Black Fungi and Stone Heritage Conservation: Ecological and Metabolic Assays for Evaluating Colonization Potential and Responses to Traditional Biocides. *Applied Sciences* 12, 2038. <https://doi.org/10.3390/app12042038>
- Isola, D., Zucconi, L., Onofri, S., Caneva, G., De Hoog, G.S., Selbmann, L., 2016. Extremotolerant rock inhabiting black fungi from Italian monumental sites. *Fungal Diversity* 76, 75–96. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0342-9>
- Iwai, K., Aisaka, K., Suzuki, M., 2010. *Friedmanniella luteola* sp. nov., *Friedmanniella lucida* sp. nov., *Friedmanniella okinawensis* sp. nov. and *Friedmanniella sagamiharensis* sp. nov., isolated from spiders. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 113–120. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007815-0>
- Jaccard, P., 1901. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura., in: *Bull Soc Vaudoise Sci Nat*. pp. 547–579.
- Jang, J., Anderson, E.L., Venterea, R.T., Sadowsky, M.J., Rosen, C.J., Feyereisen, G.W., Ishii, S., 2019. Denitrifying Bacteria Active in Woodchip Bioreactors at Low-Temperature Conditions. *Front. Microbiol.* 10, 635. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00635>
- Jang, K., Viles, H., 2022. Moisture Interactions Between Mosses and Their Underlying Stone Substrates. *Studies in Conservation* 67, 532–544. <https://doi.org/10.1080/00393630.2021.1892430>

- Jarvis, B., Wilrich, C., Wilrich, P.T., 2010. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1660–1667. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x>
- Jeannette, D., 1992a. Morphologie et nomenclature des altérations, in: *La Conservation de La Pierre Monumentale En France*, Les Presses Du CNRS. pp. 51–72.
- Jeannette, D., 1992b. L'altération des monuments, in: *Territoire et Monuments de France*. Editions du BRGM, pp. 355–364.
- Kauffman, J., 1952. Corrosion et protection des pierres calcaires des monuments. *Corrosion-Anti-corrosion* 87–88.
- Keene, W.C., Pszenny, A.A.P., Galloway, J.N., Hawley, M.E., 1986. Sea-salt corrections and interpretation of constituent ratios in marine precipitation. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 91, 6647–6658. <https://doi.org/10.1029/JD091ID06P06647>
- Keresztesi, Á., Birsan, M.V., Nita, I.A., Bodor, Z., Szép, R., 2019. Assessing the neutralisation, wet deposition and source contributions of the precipitation chemistry over Europe during 2000–2017. *Environmental Sciences Europe* 31, 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12302-019-0234-9/TABLES/2>
- Keshari, N., Adhikary, S.P., 2013. Characterization of cyanobacteria isolated from biofilms on stone monuments at Santiniketan, India. *Biofouling* 29, 525–536. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.794224>
- Khomutovska, N., Jerzak, M., Kostrzewska-Szlakowska, I., Kwiatowski, J., Suska-Malawska, M., Syczewski, M., Jasser, I., 2017. Life in Extreme Habitats: Diversity of Endolithic Microorganisms from Cold Desert Ecosystems of Eastern Pamir. *Polish Journal of Ecology* 65, 303–319. <https://doi.org/10.3161/15052249PJE2017.65.4.001>
- Kloppmann, W., Rolland, O., Proust, E., Montech, A.T., 2014. Soluble salt sources in medieval porous limestone sculptures: A multi-isotope (N, O, S) approach. *Science of The Total Environment* 470–471, 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.087>
- Kotowski, T., Motyka, J., Knap, W., Bielewski, J., 2020. 17-Year study on the chemical composition of rain, snow and sleet in very dusty air (Krakow, Poland). *Journal of Hydrology* 582, 124543. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.124543>
- Kramar, S., Urosevic, M., Pristacz, H., Mirtič, B., 2010. Assessment of limestone deterioration due to salt formation by micro-Raman spectroscopy: application to architectural heritage. *J Raman Spectroscopy* 41, 1441–1448. <https://doi.org/10.1002/jrs.2700>
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A., Nash, T.H., 2008. Desiccation-Tolerance in Lichens: A Review. *The Bryologist* 111, 576–593. <https://doi.org/10.1639/0007-2745-111.4.576>
- Kucera, V., Tidblad, J., Kreislova, K., Knotkova, D., Faller, M., Reiss, D., Sneathlge, R., Yates, T., Henriksen, J., Schreiner, M., Melcher, M., Ferm, M., Lefèvre, R.-A., Kobus, J., 2007. UN/ECE ICP Materials Dose-response Functions for the Multi-pollutant Situation. *Water Air Soil Pollut: Focus* 7, 249–258. <https://doi.org/10.1007/s11267-006-9080-z>
- Kumar, R., Rani, A., Singh, S.P., Maharaj, K., Srivastava, S.S., 2002. A long term study on chemical composition of rainwater at Dayalbagh, a suburban site of semiarid region. *Journal of Atmospheric Chemistry* 41, 265–279. <https://doi.org/10.1023/A:1014955715633/METRICS>
- Lacap-Bugler, D.C., Lee, K.K., Archer, S., Gillman, L.N., Lau, M.C.Y., Leuzinger, S., Lee, C.K., Maki, T., McKay, C.P., Perrott, J.K., De Los Rios-Murillo, A., Warren-Rhodes, K.A., Hopkins, D.W., Pointing, S.B., 2017. Global Diversity of Desert Hypolithic Cyanobacteria. *Front. Microbiol.* 8, 867. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00867>
- Les monuments historiques et la pierre, 2012. , Duo. Direction régionale des affaires culturelles, DRAC, du Languedoc-Roussillon, Conservation régionale des monuments historiques, CRMH, Montpellier.

- Li, Q., Zhang, B., He, Z., Yang, X., 2016. Distribution and Diversity of Bacteria and Fungi Colonization in Stone Monuments Analyzed by High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 11, e0163287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163287>
- Li, Q., Zhang, B., Yang, X., Ge, Q., 2018. Deterioration-Associated Microbiome of Stone Monuments: Structure, Variation, and Assembly. *Appl Environ Microbiol* 84, e02680-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02680-17>
- Lipfert, F.W., 1989. Atmospheric damage to calcareous stones: Comparison and reconciliation of recent experimental findings. *Atmospheric Environment* (1967) 23, 415–429. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(89\)90587-8](https://doi.org/10.1016/0004-6981(89)90587-8)
- Liu, X., Meng, H., Wang, Y., Katayama, Y., Gu, J.-D., 2018. Water is a critical factor in evaluating and assessing microbial colonization and destruction of Angkor sandstone monuments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 133, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.05.011>
- Liu, X., Zarfel, G., Van Der Weijden, R., Loiskandl, W., Bitschnau, B., Dinkla, I.J.T., Fuchs, E.C., Paulitsch-Fuchs, A.H., 2021. Density-dependent microbial calcium carbonate precipitation by drinking water bacteria via amino acid metabolism and biosorption. *Water Research* 202, 117444. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117444>
- Lopez-Arce, P., Doehne, E., Martin, W., Pinchin, S., 2008. Sales de sulfato magnésico y materiales de edificios históricos: simulación experimental de laminaciones en calizas mediante ciclos de humedad relativa y cristalización de sales. *Mater. construcc.* 58, 125–142. <https://doi.org/10.3989/mc.2008.v58.i289-290.77>
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 71, 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Macedo, M.F., Miller, A.Z., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C., 2009. Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology* 155, 3476–3490. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032508-0>
- Magdy Abdullah, A., Adam, M., Marey Mahmoud, H., 2023. A Comparative Analytical Study of Some Deterioration Products Formed on the Sandstone Reliefs of Edfu and Kom Ombo Temples. *Advanced Research in Conservation Science* 4, 1–17. <https://doi.org/10.21608/arcs.2023.162922.1029>
- Makhalanyane, T.P., Valverde, A., Lacap, D.C., Pointing, S.B., Tuffin, M.I., Cowan, D.A., 2013. Evidence of species recruitment and development of hot desert hypolithic communities. *Environ Microbiol Rep* 5, 219–224. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12003>
- Mansch, R., Bock, E., 1998. Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation* 9, 47–64. <https://doi.org/10.1023/A:1008381525192>
- Mansch, R., Bock, E., 1996. Simulation of microbial attack on natural and artificial stone. *Microbiologically influenced corrosion of materials* 167–186.
- Marszałek, M., Dudek, K., Gaweł, A., Czerny, J., 2019. Mineralogical and geochemical studies of secondary mineral assemblages related to deterioration of building materials. *GQ* 63. <https://doi.org/10.7306/gq.1494>
- Martinet, G., Quénée, B., 2008. Pierres de construction - Natures et mécanismes d'altération. *Corrosion Vieillessement*. <https://doi.org/10.51257/a-v1-cor402>
- Massey, S.W., 1999. The effects of ozone and NO<sub>x</sub> on the deterioration of calcareous stone. *Science of The Total Environment* 227, 109–121. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00409-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00409-4)
- May, E., Papida, S., Abdulla, H., Tayler, S., Dewedar, A., 2000. Comparative Studies of Microbial Communities on Stone Monuments in Temperate and Semi-Arid Climates, in: Ciferri, O., Tiano, P., Mastromei, G. (Eds.), *Of Microbes and Art*. Springer US, Boston, MA, pp. 49–62. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4239-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4239-1_4)

- McCabe, S., Smith, B., Adamson, C., Mullan, D., McAllister, D., 2011. The 'Greening' of Natural Stone Buildings: Quartz Sandstone Performance as a Secondary Indicator of Climate Change in the British Isles? *ACS* 01, 165–171. <https://doi.org/10.4236/acs.2011.14018>
- McIlroy De La Rosa, J.P., Warke, P.A., Smith, B.J., 2012. Microscale biopitting by the endolithic lichen *Verrucaria baldensis* and its proposed role in mesoscale solution basin development on limestone. *Earth Surf Processes Landf* 37, 374–384. <https://doi.org/10.1002/esp.2244>
- McNamara, C.J., Perry IV, T.D., Bearce, K.A., Hernandez-Duque, G., Mitchell, R., 2006. Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Microbial Ecology* 51, 51–64. <https://doi.org/10.1007/s00248-005-0200-5>
- Mihajlovski, A., Gabarre, A., Seyer, D., Bousta, F., Di Martino, P., 2017. Bacterial diversity on rock surface of the ruined part of a French historic monument: The Chaalis abbey. *International Biodeterioration & Biodegradation* 120, 161–169.
- Mihajlovski, A., Lepinay, C., Mirval, A.-L., Touron, S., Bousta, F., Di Martino, P., 2019. Characterization of the archaeal and fungal diversity associated with gypsum efflorescences on the walls of the decorated Sorcerer's prehistoric cave. *Ann Microbiol* 69, 1071–1078. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01506-2>
- Miller, A.Z., Dionísio, A., Laiz, L., MacEdo, M.F., Saiz-Jimenez, C., 2009. The influence of inherent properties of building limestones on their bioreceptivity to phototrophic microorganisms. *Annals of Microbiology* 59, 705–713. <https://doi.org/10.1007/BF03179212>
- Miller, A.Z., Dionísio, A., Macedo, M.F., Sáiz-Jiménez, C., 2017. Primary bioreceptivity of limestones to phototrophic microorganisms: A laboratory-based stone colonization experiment. *Technoheritage* 2017 97.
- Miller, A.Z., Laiz, L., Gonzalez, J.M., Dionísio, A., Macedo, M.F., Saiz-Jimenez, C., 2008. Reproducing stone monument photosynthetic-based colonization under laboratory conditions. *Science of The Total Environment* 405, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.066>
- Miller, A.Z., Sanmartín, P., Pereira-Pardo, L., Dionísio, A., Sáiz-Jiménez, C., Macedo, M.F., Prieto, B., 2012. Bioreceptivity of building stones: A review. *Science of the total environment* 426, 1–12.
- Mitchell, R., Gu, J.-D., 2000. Changes in the biofilm microflora of limestone caused by atmospheric pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 299–303. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00105-0)
- Mizutani, E., Ogura, D., Ishizaki, T., Abuku, M., Sasaki, J., 2015. Influence of the infiltrated rainwater on the degradation of the inner wall in Hagia Sophia, Istanbul. *Energy Procedia* 78, 1353–1358. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.11.153>
- Moreau, C., 2008. Vieillissement naturel en milieu urbain de pierres calcaires hydrofugées: évaluation de la durabilité des traitements et de leur impact sur le nettoyage. Université de Reims, Champagne Ardenne.
- Moroni, B., Pitzurra, L., 2008. Biodegradation of atmospheric pollutants by fungi: a crucial point in the corrosion of carbonate building stone. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 391–396.
- Moroni, B., Pitzurra, L., Poli, G., 2004. Microbial growth and air pollutants in the corrosion of carbonate building stone: results of laboratory and outdoor experimental tests. *Env Geol* 46. <https://doi.org/10.1007/s00254-004-1045-9>
- Nagachandrabose, S., 2020. Management of Potato Cyst Nematodes Using Liquid Bioformulations of *Pseudomonas fluorescens*, *Purpureocillium lilacinum* and *Trichoderma viride*. *Potato Res.* 63, 479–496. <https://doi.org/10.1007/s11540-020-09452-2>
- Negi, A., Sarethy, I.P., 2019. Microbial Biodeterioration of Cultural Heritage: Events, Colonization, and Analyses. *Microb Ecol* 78, 1014–1029. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01366-y>

- Nir, I., Barak, H., Kramarsky-Winter, E., Kushmaro, A., 2019. Seasonal diversity of the bacterial communities associated with petroglyphs sites from the Negev Desert, Israel. *Ann Microbiol* 69, 1079–1086. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01509-z>
- Niu, Y., Li, X., Huang, Z., Zhu, C., 2017. Chemical characteristics and possible causes of acid rain at a regional atmospheric background site in eastern China. *Air Quality, Atmosphere and Health* 10, 971–980. <https://doi.org/10.1007/s11869-017-0486-8>
- Nonthijun, P., Mills, Natasha, Mills, Nantana, Yongsawas, R., Sansupa, C., Suwannarach, N., Jaikang, C., Motanated, K., Chayapakdee, P., Jongjitngam, S., Noirungsee, N., Disayathanoowat, T., 2023. Seasonal Variations in Fungal Communities on the Surfaces of Lan Na Sandstone Sculptures and Their Biodeterioration Capacities. *JoF* 9, 833. <https://doi.org/10.3390/jof9080833>
- Nováková, R., Neustupa, J., 2015. Microalgal biofilms on common yew needles in relation to anthropogenic air pollution in urban Prague, Czech Republic. *Science of The Total Environment* 508, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.031>
- Nuhoglu, Y., Oguz, E., Uslu, H., Ozbek, A., Ipekoglu, B., Ocak, I., Hasenekoglu, İ., 2006. The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey. *Science of The Total Environment* 364, 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.06.034>
- Ortega-Calvo, J.J., Hernandez-Marine, M., Sáiz-Jiménez, C., 1991. Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *International biodeterioration* 28, 165–185.
- Ortega-Morales, B.O., Gaylarde, C., Anaya-Hernandez, A., Chan-Bacab, M.J., De La Rosa-García, S.C., Arano-Recio, D., Montero-M, J., 2013. Orientation affects Trentepohlia-dominated biofilms on Mayan monuments of the Rio Bec style. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.014>
- Ortega-Morales, B.O., Narváez-Zapata, J., Reyes-Estebanez, M., Quintana, P., De La Rosa-García, S.D.C., Bullen, H., Gómez-Cornelio, S., Chan-Bacab, M.J., 2016. Bioweathering Potential of Cultivable Fungi Associated with Semi-Arid Surface Microhabitats of Mayan Buildings. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00201>
- Ortega-Morales, B.O., Narváez-Zapata, J.A., Schmalenberger, A., Sosa-López, A., Tebbe, C.C., 2004. Biofilms fouling ancient limestone Mayan monuments in Uxmal, Mexico: a cultivation-independent analysis. *Biofilms* 1, 79–90. <https://doi.org/10.1017/S1479050504001188>
- Ortega-Morales, O., Montero-Muñoz, J.L., Baptista Neto, J.A., Beech, I.B., Sunner, J., Gaylarde, C., 2019. Deterioration and microbial colonization of cultural heritage stone buildings in polluted and unpolluted tropical and subtropical climates: A meta-analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation* 143, 104734. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104734>
- Outram, Q., Fishman, N., 2006. Le roi Charbon et ses sujets turbulents : les industries et sociétés charbonnières en Grande-Bretagne aux XVIIIe et XIXe siècles, in: Daumalin, X., Daviet, S., Mioche, P. (Eds.), *Territoires européens du charbon*. Presses universitaires de Provence, pp. 15–35. <https://doi.org/10.4000/books.pup.6255>
- Owczarek-Kościelniak, M., 2020. *Extremus adstrictus* from a dolomite wall in Poland: the first report outside Mallorca. *Plant and Fungal Systematics* 65, 624–630. <https://doi.org/10.35535/pfsyst-2020-0034>
- Owczarek-Kościelniak, M., Krzewicka, B., Piątek, J., Kołodziejczyk, Ł.M., Kapusta, P., 2020. Is there a link between the biological colonization of the gravestone and its deterioration? *International Biodeterioration & Biodegradation* 148, 104879. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104879>



- Owczarek-Kościelniak, M., Sterflinger, K., 2018. First records of *Knufia marmoricola* from limestone outcrops in the Wyżyna Krakowsko-Częstochowska Upland, Poland. *Phytotaxa* 357, 94. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.357.2.2>
- Paiva, D.S., Fernandes, L., Trovão, J., Mesquita, N., Tiago, I., Portugal, A., 2022. Uncovering the Fungal Diversity Colonizing Limestone Walls of a Forgotten Monument in the Central Region of Portugal by High-Throughput Sequencing and Culture-Based Methods. *Applied Sciences* 12, 10650. <https://doi.org/10.3390/app122010650>
- Pinheiro, A.C., Mesquita, N., Trovão, J., Soares, F., Tiago, I., Coelho, C., de Carvalho, H.P., Gil, F., Catarino, L., Piñar, G., 2019. Limestone biodeterioration: A review on the Portuguese cultural heritage scenario. *Journal of cultural heritage* 36, 275–285.
- Pio, C.A., Lopes, D.A., 1998. Chlorine loss from marine aerosol in a coastal atmosphere. *Journal of Geophysical Research Atmospheres* 103, 25263–25272. <https://doi.org/10.1029/98JD02088>
- Pitzurra, L., Moroni, B., Nocentini, A., Sbaraglia, G., Poli, G., Bistoni, F., 2003. Microbial growth and air pollution in carbonate rock weathering. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52, 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00175-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00175-0)
- Pląskowska, E., Patejuk, K., Lorenc, M.W., Grzeszczuk, J., 2023. Lichens and Fungi on Sandstone Tombs at the Historical Jewish Cemetery in Wrocław (Poland). *Studies in Conservation* 1–9. <https://doi.org/10.1080/00393630.2023.2174396>
- Ponizovskaya, V.B., Rebrikova, N.L., Kachalkin, A.V., Antropova, A.B., Bilanenko, E.N., Mokeeva, V.L., 2019. Micromycetes as colonizers of mineral building materials in historic monuments and museums. *Fungal Biology* 123, 290–306. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.01.002>
- Popović, S., Stupar, M., Unković, N., Subakov Simić, G., Ljaljević Grbić, M., 2018. Diversity of Terrestrial Cyanobacteria Colonizing Selected Stone Monuments in Serbia. *Studies in Conservation* 63, 292–302. <https://doi.org/10.1080/00393630.2018.1438127>
- Proctor, M.C.F., 1990. The physiological basis of bryophyte production. *Botanical Journal of the Linnean Society* 104, 61–77. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1990.tb02211.x>
- Reboah, P., Bolou-Bi, C.B., Nowak, S., Verney-Carron, A., 2023. Influence of climatic factors on cyanobacteria and green algae development on building surface. *PLoS ONE* 18, e0282140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140>
- Reese Næsborg, R., Ekman, S., Tibell, L., 2007. Molecular phylogeny of the genus *Lecania* (Ramalinaceae, lichenized Ascomycota). *Mycological Research* 111, 581–591. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.001>
- Rodriguez-Sanchez, A., Muñoz-Palazon, B., Hurtado-Martinez, M., Mikola, A., Gonzalez-Lopez, J., Vahala, R., Gonzalez-Martinez, A., 2020. Analysis of microbial communities involved in organic matter and nitrogen removal in a full-scale moving bed biofilm reactor located near the Polar Arctic Circle. *International Biodeterioration & Biodegradation* 146, 104830. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104830>
- Rohwerder, T., Sand, W., 2003. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology* 149, 1699–1710. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26212-0>
- Rosado, T., Dias, L., Lança, M., Nogueira, C., Santos, R., Martins, M.R., Candeias, A., Mirão, J., Caldeira, A.T., 2020. Assessment of microbiota present on a Portuguese historical stone convent using high-throughput sequencing approaches. *MicrobiologyOpen* 9, 1067–1084. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1030>
- Rozenbaum, O., Barbanson, L., Muller, F., Bruand, A., 2008. Significance of a combined approach for replacement stones in the heritage buildings' conservation frame. *Comptes Rendus - Geoscience* 340, 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2008.04.005>
- Rudnick, R.L., Gao, S., 2014. Composition of the Continental Crust, in: Holland, H.D., Turekian, K.K. (Eds.), *Treatise on Geochemistry*. pp. 1–64.

- Saheb, M., Chabas, A., Mertz, J.-D., Colas, E., Rozenbaum, O., Sizun, J.-P., Nowak, S., Gentaz, L., Verney-Carron, A., 2016. Weathering of limestone after several decades in an urban environment. *Corrosion Science* 111, 742–752. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2016.06.015>
- Saiz-Jimenez, C., 1999. Biogeochemistry of Weathering Processes in Monuments. *Geomicrobiology Journal* 16, 27–37. <https://doi.org/10.1080/014904599270721>
- Saiz-Jimenez, C., 1984. Weathering and colonization of limestones in an urban environment. *Soil Biology and Conservation of the Biosphere 2*, *Soil Biology and Conservation of the Biosphere 2* 757–767.
- Salvadori, O., Municchia, A.C., 2016. The Role of Fungi and Lichens in the Biodeterioration of Stone Monuments. *Open Conf. Proceed. J.* 7, 39–54. <https://doi.org/10.2174/2210289201607020039>
- Salve, P.R., Maurya, A., Wate, S.R., Devotta, S., 2008. Chemical composition of major ions in rainwater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80, 242–246. <https://doi.org/10.1007/S00128-007-9353-X/TABLES/5>
- Sand, W., 1997. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates—A general mechanistic overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* 40, 183–190. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(97\)00048-6](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00048-6)
- Sand, W., Bock, E., 1991. Biodeterioration of mineral materials by microorganisms—biogenic sulfuric and nitric acid corrosion of concrete and natural stone. *Geomicrobiology Journal* 9, 129–138. <https://doi.org/10.1080/01490459109385994>
- Sazanova, K.V., Zelenskaya, M.S., Manurtdinova, V.V., Izatulina, A.R., Rusakov, A.V., Vlasov, D.Yu., Frank-Kamenetskaya, O.V., 2020. Accumulation of Elements in Biodeposits on the Stone Surface in Urban Environment. Case Studies from Saint Petersburg, Russia. *Microorganisms* 9, 36. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010036>
- Sazanova, K.V., Zelenskaya, M.S., Vlasov, A.D., Bobir, S.Yu., Yakkonen, K.L., Vlasov, D.Yu., 2022. Microorganisms in Superficial Deposits on the Stone Monuments in Saint Petersburg. *Microorganisms* 10, 316. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020316>
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O., Gaylarde, C., 2009. Chapter 5 Microbial Deterioration of Stone Monuments—An Updated Overview, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 97–139. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00805-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00805-8)
- Schiavon, N., 2002. Biodeterioration of calcareous and granitic building stones in urban environments. *SP 205*, 195–205. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2002.205.01.15>
- Schröer, L., De Kock, T., Cnudde, V., Boon, N., 2020. Differential colonization of microbial communities inhabiting Lede stone in the urban and rural environment. *Science of The Total Environment* 733, 139339. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139339>
- Seifert, K.A., Nickerson, N.L., Corlett, M., Jackson, E.D., Louis-Seize, G., Davies, R.J., 2004. *Devriesia*, a new hyphomycete genus to accommodate heat-resistant, cladosporium-like fungi. *Can. J. Bot.* 82, 914–926. <https://doi.org/10.1139/b04-070>
- Seinfeld, J.H., Pandis, S.N., 2016. *Atmospheric Chemistry and physics: From Air Pollution to climate Change*, 3rd Edition.
- Selbmann, L., Onofri, S., Coleine, C., Buzzini, P., Canini, F., Zucconi, L., 2017. Effect of environmental parameters on biodiversity of the fungal component in lithic Antarctic communities. *Extremophiles* 21, 1069–1080. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0967-6>
- Shannon, C.E., 1948. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal* 27, 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Sheir, D., Amer, O., Elkhateeb, W., Daba, G., 2020. Elucidation of myco-deterioration affecting calcareous construction materials of the Egyptian architectural heritage. *Boreal Environnement Reseach* 25, 27–56.
- Shi, S., Lin, Z., Zhou, Jiong, Fan, X., Huang, Y., Zhou, Jian, 2022. Enhanced thermophilic denitrification performance and potential microbial mechanism in denitrifying granular

- sludge system. *Bioresource Technology* 344, 126190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126190>
- Silva, N.C., Madureira, A.R., Pintado, M., Moreira, P.R., 2022. Biocontamination and diversity of epilithic bacteria and fungi colonising outdoor stone and mortar sculptures. *Appl Microbiol Biotechnol* 106, 3811–3828. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11957-4>
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of Diversity. *Nature* 163, 688–688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Smith, B.J., McCabe, S., McAllister, D., Adamson, C., Viles, H.A., Curran, J.M., 2011. A commentary on climate change, stone decay dynamics and the 'greening' of natural stone buildings: new perspectives on 'deep wetting.' *Environ Earth Sci* 63, 1691–1700. <https://doi.org/10.1007/s12665-010-0766-1>
- Steinfeld, J.I., Pandis, S.N., 1998. Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development* 40, 26–26. <https://doi.org/10.1080/00139157.1999.10544295>
- Sterflinger, K., 2010. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews* 24, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.03.003>
- Sterflinger, K., 2000. Fungi as Geologic Agents. *Geomicrobiology Journal* 17, 97–124. <https://doi.org/10.1080/01490450050023791>
- Sterflinger, K., 1995. Geomicrobiological investigations on the alteration of marble monuments by dematiaceous fungi. Oldenburg, Germany.
- Sterflinger, K., Krumbein, W.E., 1997. Dematiaceous fungi as a major agent for biopitting on Mediterranean marbles and limestones. *Geomicrobiology Journal* 14, 219–230. <https://doi.org/10.1080/01490459709378045>
- Sterflinger, K., Piñar, G., 2013. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills? *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 9637–9646. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5283-1>
- Sterflinger, K., Tesei, D., Zakharova, K., 2012. Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. *Fungal Ecology* 5, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.12.007>
- Suihko, M.-L., Alakomi, H.-L., Gorbushina, A., Fortune, I., Marquardt, J., Saarela, M., 2007. Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 494–508. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.05.001>
- Sun, X., Wang, Y., Li, H., Yang, X., Sun, L., Wang, X., Wang, T., Wang, W., 2016. Organic acids in cloud water and rainwater at a mountain site in acid rain areas of South China. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6038-1>
- Sutton, S., 2010. The most probable number method and its uses in enumeration, qualification, and validation. *Journal of validation technology* 8–41.
- Taylor, S., May, E., 1991. The seasonality of heterotrophic bacteria on sandstones of ancient monuments. *International Biodeterioration* 28, 49–64. [https://doi.org/10.1016/0265-3036\(91\)90033-N](https://doi.org/10.1016/0265-3036(91)90033-N)
- Thornton, J.A., Kercher, J.P., Riedel, T.P., Wagner, N.L., Cozic, J., Holloway, J.S., Duó, W.P., Wolfe, G.M., Quinn, P.K., Middlebrook, A.M., Alexander, B., Brown, S.S., 2010. A large atomic chlorine source inferred from mid-continental reactive nitrogen chemistry. *Nature* 2010 464:7286 464, 271–274. <https://doi.org/10.1038/nature08905>
- Thüs, H., Muggia, L., Pérez-Ortega, S., Favero-Longo, S.E., Joneson, S., O'Brien, H., Nelsen, M.P., Duque-Thüs, R., Grube, M., Friedl, T., Brodie, J., Andrew, C.J., Lücking, R., Lutzoni, F., Gueidan, C., 2011. Revisiting photobiont diversity in the lichen family verrucariaceae (ascomycota). *European Journal of Phycology* 46, 399–415. <https://doi.org/10.1080/09670262.2011.629788>

- Tian, L., Wang, L., 2021. Multi-omics analysis reveals structure and function of biofilm microbial communities in a pre-denitrification biofilter. *Science of The Total Environment* 757, 143908. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143908>
- Toreno, G., Zucconi, L., Caneva, G., Meloni, P., Isola, D., 2024. Recolonization dynamics of marble monuments after cleaning treatments: A nine-year follow-up study. *Science of The Total Environment* 912, 169350. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169350>
- Trovão, J., Gil, F., Catarino, L., Soares, F., Tiago, I., Portugal, A., 2020. Analysis of fungal deterioration phenomena in the first Portuguese King tomb using a multi-analytical approach. *International Biodeterioration & Biodegradation* 149, 104933. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104933>
- Tsubouchi, T., Koyama, S., Mori, K., Shimane, Y., Usui, K., Tokuda, M., Tame, A., Uematsu, K., Maruyama, T., Hatada, Y., 2014. *Brevundimonas denitrificans* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from deep seafloor sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 3709–3716. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.067199-0>
- Vergès-Belmin, V., 2008. ICOMOS-ISCS: illustrated glossary on stone deterioration patterns, English-French version. ed, Monuments and sites. ICOMOS, Paris.
- Villa, F., Vasanthakumar, A., Mitchell, R., Cappitelli, F., 2015. RNA-based molecular survey of biodiversity of limestone tombstone microbiota in response to atmospheric sulphur pollution. *Lett Appl Microbiol* 60, 92–102. <https://doi.org/10.1111/lam.12345>
- Vlasov, D.Yu., Frank-Kamenetskaya, O.V., Manurtdinova, V.V., Zelenskaya, M.S., 2019. Decay of the Monuments, in: Frank-Kamenetskaya, O.V., Vlasov, D.Yu., Rytikova, V.V. (Eds.), *The Effect of the Environment on Saint Petersburg's Cultural Heritage, Geoheritage, Geoparks and Geotourism*. Springer International Publishing, Cham, pp. 75–95. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-79072-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-79072-5_4)
- Vlasov, D.Yu., G. Panova, E., S. Zelenskaya, M., A. Rodina, O., D. Vlasov, A., V. Sazanova, K., 2021. Changes of Granite Rapakivi under the Biofouling Influence, in: René, M., Aiello, G., El Bahariya, G. (Eds.), *Geochemistry*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92324>
- Wakefield, R.D., Jones, M.S., 1998. An introduction to stone colonizing micro-organisms and biodeterioration of building stone. *QJEGH* 31, 301–313. <https://doi.org/10.1144/GSL.QJEG.1998.031.P4.03>
- Wang, Y., Liu, X., 2021. Sulfur-oxidizing bacteria involved in the blackening of basalt sculptures of the Leizhou Stone Dog. *International Biodeterioration and Biodegradation* 159. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105207>
- Warren-Rhodes, K.A., Rhodes, K.L., Pointing, S.B., Ewing, S.A., Lacap, D.C., Gómez-Silva, B., Amundson, R., Friedmann, E.I., McKay, C.P., 2006. Hypolithic Cyanobacteria, Dry Limit of Photosynthesis, and Microbial Ecology in the Hyperarid Atacama Desert. *Microb Ecol* 52, 389–398. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9055-7>
- Warscheid, T., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46, 343–368. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8)
- Warscheid, Th., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 343–368. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8)
- Watt, J., Hamilton, R., 2003. The soiling of buildings by air pollution., in: *The Effects of Air Pollution on the Built Environment*. pp. 289–334.
- Whelpdale, D.M., Summers, P.W., Sanhueza, E., 1997. A global overview of atmospheric acid deposition fluxes. *Environmental Monitoring and Assessment* 48, 217–247. <https://doi.org/10.1023/A:1005708821454/METRICS>
- Wollenzien, U., De Hoog, G.S., Krumbein, W.E., Urzı, C., 1995. On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *Science of The Total Environment* 167, 287–294. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04589-S](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04589-S)

- Wood, E.E., Ross, M.E., Jubeau, S., Montalescot, V., MacKechnie, K., Marchington, R.E., Davey, M.P., McNeill, S., Hamilton, C., Stanley, M.S., 2023. From green to orange: The change in biochemical composition of phototrophic-mixotrophic *Chromochloris zofingiensis* in pilot-scale photobioreactors. *Algal Research* 75, 103238. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103238>
- Wu, F., Zhang, Y., He, D., Gu, J.-D., Guo, Q., Liu, X., Duan, Y., Zhao, J., Wang, W., Feng, H., 2021. Community structures of bacteria and archaea associated with the biodeterioration of sandstone sculptures at the Beishiku Temple. *International Biodeterioration & Biodegradation* 164, 105290. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105290>
- Xing, W., Li, J., Li, D., Hu, J., Deng, S., Cui, Y., Yao, H., 2018. Stable-Isotope Probing Reveals the Activity and Function of Autotrophic and Heterotrophic Denitrifiers in Nitrate Removal from Organic-Limited Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 52, 7867–7875. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01993>
- Yun, L., Yu, Z., Li, Y., Luo, P., Jiang, X., Tian, Y., Ding, X., 2019. Ammonia nitrogen and nitrite removal by a heterotrophic *Sphingomonas* sp. strain LPN080 and its potential application in aquaculture. *Aquaculture* 500, 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.054>
- Yung, C.C.M., Chan, Y., Lacap, D.C., Pérez-Ortega, S., De Los Rios-Murillo, A., Lee, C.K., Cary, S.C., Pointing, S.B., 2014. Characterization of Chasmoendolithic Community in Miers Valley, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Microb Ecol* 68, 351–359. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0412-7>
- Zanardini, E., May, E., Inkpen, R., Cappitelli, F., Murrell, J.C., Purdy, K.J., 2016. Diversity of archaeal and bacterial communities on exfoliated sandstone from Portchester Castle (UK). *International Biodeterioration & Biodegradation* 109, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.021>
- Zhang, G., Gong, C., Gu, J., Katayama, Y., Someya, T., Gu, J.-D., 2019. Biochemical reactions and mechanisms involved in the biodeterioration of stone world cultural heritage under the tropical climate conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 143, 104723. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104723>
- Zhang, H., Shu, D., Zhang, J., Liu, X., Wang, K., Jiang, R., 2024. Biodegradable Film Mulching Increases Soil Microbial Network Complexity and Decreases Nitrogen-Cycling Genes Abundances (preprint). SSRN. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4688923>
- Zhang, Y., Su, M., Wu, F., Gu, J.-D., Li, J., He, D., Guo, Q., Cui, H., Zhang, Q., Feng, H., 2023. Diversity and Composition of Culturable Microorganisms and Their Biodeterioration Potentials in the Sandstone of Beishiku Temple, China. *Microorganisms* 11, 429. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020429>
- Zhang, Y.-Q., Yu, L.-Y., Wang, D., Liu, H.-Y., Sun, C.-H., Jiang, W., Zhang, Y.-Q., Li, W.-J., 2008. *Roseomonas vinacea* sp. nov., a Gram-negative coccobacillus isolated from a soil sample. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 58, 2070–2074. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65789-0>
- Zhang, Z., Wang, J., Zhang, X., Chen, A., 2023. Aspartate as Sole Carbon and Nitrogen Source for Simultaneous Nitrification, Denitrification and Phosphorus Removal in a Sequencing Batch Reactor. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4615232>
- Zhao, H., Zhao, J., Li, F., Li, X., 2016. Performance of Denitrifying Microbial Fuel Cell with Biocathode over Nitrite. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00344>
- Zhao, L., Fu, G., Zeng, A., Cheng, B., Song, Z., Hu, Z., 2023. Effects of different aeration strategies and ammonia-nitrogen loads on nitrification performance and microbial community succession of mangrove constructed wetlands for saline wastewater treatment. *Chemosphere* 339, 139685. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139685>

## **Chapitre 3.2 : Étude du vieillissement naturel de la pierre calcaire à long terme : site du Père-Lachaise**

### **Introduction :**

Le cimetière du Père-Lachaise, qui a ouvert en 1804, possède de nombreuses tombes construites en pierre calcaire de par sa proximité d'exploitation. Grand nombre de ces tombes n'ont pas été restaurées et reflètent ainsi 200 ans d'altération en milieu urbain. Les tombes échantillonnées proviennent de trois divisions du cimetière ayant des caractéristiques assez différentes. La division 25 est très végétalisée, la division 62 se trouve à proximité du boulevard Ménilmontant, enfin la division 95 est localisée dans le centre du cimetière, non loin du crématorium.

L'ensemble des tombes choisies sont construites en pierre calcaire. Trois grands types de calcaire ont pu être identifiés : le premier est un calcaire à entroques, très riche en crinoïdes, et assimilé au calcaire d'Euville, le second est un calcaire très fin qui semble être très peu poreux pouvant être assimilé à un calcaire lithographique ou un marbre très détérioré. Enfin le troisième type de calcaire identifié est souvent de couleur blanc-gris à beige, avec une porosité plus importante que le deuxième. Il est assimilé à du calcaire du Lutétien, sans spécification, car l'identification des foraminifères est délicate de par son état de dégradation avancé.

L'objectif est donc d'étudier non seulement l'effet de la proximité du trafic routier, ainsi que de la densité de végétation, mais aussi le rôle du substrat sur la bio-colonisation et sur l'altération des pierres calcaires. De plus, les prélèvements ont été faits en été et en hiver afin de mettre en lumière ou non une activité saisonnière.

Comme expliqué précédemment (cf Chap. 2 §2.1), les échantillons récoltés se trouvent sous forme de poudre grattée en surface du calcaire. Différentes analyses minéralogiques, chimiques et biologiques ont été réalisées afin d'identifier les modifications chimiques et les microorganismes impliqués dans ces altérations.

## 1. Analyse des phases cristallines par diffraction à rayon X (DRX).

Le Tableau 13 illustre les différentes phases cristallines et leurs proportions au sein de chaque échantillon collecté à la surface des tombes.

Tableau 13 : Proportions (en %) des différentes phases cristallines analysées (de manière semi-quantitative) par DRX pour les échantillons collectés en hiver.

Échantillon	Division	Calcaire	Calcite	Quartz	Gypse	Aragonite
ST1V1	25	Lutétien	15	3	82	
ST1V2	25	Lutétien	92	8		
ST1H1	25	Lutétien	62	38		
ST2V1	25	Lutétien	61	27	12	
ST2V2	25	Lutétien	79	10		11
ST2H1	25	Lutétien	86	14		
ST7V1	25	Fin		5	95	
ST7H1	25	Lutétien	70	30		
ST12V1	25	Fin	98	2		
ST3V1	62	Lutétien	98	2		
ST3V2	62	Lutétien	99	1		
ST3H1	62	Lutétien	98	2		
ST4V1	62	Calcaire à entroque	49	2	49	
ST4V2	62	Calcaire à entroque	99	1		
ST4H1	62	Calcaire à entroque	98	2		
ST5V1	62	Lutétien		47	53	
ST5V2	62	Lutétien	34	43	23	
ST5V3	62	Lutétien	27	36	38	
ST6V1	62	Lutétien	54	17	29	
ST6V2	62	Lutétien	75	25		
ST6V3	62	Lutétien	52	17	31	
ST8V1	92	Calcaire à entroque	99	1		
ST8V2	92	Calcaire à entroque	99	1		
ST9V1	92	Calcaire à entroque	15	11	74	
ST9V2	92	Calcaire à entroque	99	1		
ST9V3	92	Calcaire à entroque	75	2	23	
ST9H1	92	Calcaire à entroque	92	8		
ST10V1	92	Lutétien	82	8		10
ST10H1	92	Lutétien	68	21		11
ST11H1	92	Fin	97	3		

Quatre phases sont analysées : la calcite, le quartz, le gypse et l'aragonite. La calcite est le composant majoritaire du calcaire. La proportion de calcite varie entre 0 et 99 % en fonction de l'échantillon. Le quartz est lui aussi un composant principal du calcaire et sa proportion varie en

fonction du type de calcaire. La proportion de quartz est faible pour le calcaire à entroques (entre 1 et 9 %) sauf pour un échantillon pauvre en calcite et riche en gypse et pour le calcaire fin (2-3 %). Sa proportion est plus importante dans le calcaire Lutétien (entre 1 et 9 % pour les échantillons contenant plus de 90 % de calcite, entre 13 et 61 % pour ceux avec une teneur en calcite entre 50 et 90 %). Les échantillons pauvres en calcite restent riches en quartz (entre 20 et 33 %). Le quartz peut alors avoir été préservé pendant le processus de sulfatation de la calcite ou peut avoir une origine exogène. L'aragonite est aussi un composant du calcaire et est présente dans 3 échantillons.

Le gypse a été identifié dans un tiers des échantillons. Il est issu de la sulfatation de la calcite par le  $\text{SO}_2$  atmosphérique dans l'air (Camuffo et al., 1983) et forme généralement des croûtes noires, faciès d'altération connu des calcaires. Quand sa proportion est grande, la teneur en quartz est faible, ce qui pourrait indiquer que le quartz est plutôt issu du substrat. Mais dans les calcaires du Lutétien, on peut trouver des échantillons avec des teneurs élevées en quartz et gypse (Fronteau et al., 1999; Saheb et al., 2016).

⇒ **Les proportions des phases nous permettent donc de connaître la minéralogie du substrat et à identifier les échantillons qui sont davantage impactés par la pollution atmosphérique.**

## 2. Analyse de la fraction soluble

La composition ionique de la fraction soluble des échantillons récoltés au cimetière du Père-Lachaise en été et en hiver a été analysée (Figure 30+ Annexe 2). En revanche les carbonates n'ont pas été dosés. Pour les échantillons riches en sulfates, les solutions sont équilibrées du point de vue de la neutralité électrique (Annexe 2). Pour les autres, la somme des cations est plus élevée très certainement parce que la concentration en carbonates n'est pas prise en compte. Seul l'échantillon ST1V1 en hiver contient presque uniquement des sulfates probablement compensés par  $\text{H}^+$ .

L'examen des concentrations ioniques totales (CIT) (Figure 30) est rendu difficile également du fait de l'absence des carbonates mais globalement les échantillons riches en sulfates ont une concentration totale élevée alors que ceux qui sont pauvres ont une concentration totale faible. En effet, les phases sulfatées (gypse : constante de solubilité  $15\text{-}20 \text{ mg.L}^{-1}$ ) sont plus faciles à dissoudre lors de l'éluion que les carbonates (calcite : constante de solubilité  $2,23 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Nous avons également calculé les p-valeurs par les tests statistiques de Kruskal Wallis pour comparer les CIT en hiver et en été en considérant ou non l'orientation et la division (Tableau 14). Si celles-ci sont inférieures à 0,05, alors les valeurs comparées sont significativement différentes. Les concentrations sont donc significativement plus faibles en hiver qu'en été. Cela pourrait être expliqué par une quantité moins grande de pluie en été qu'en hiver qui limiterait le lessivage mais les différences de pluviométrie en fonction des saisons ne sont pas très marquées pour le climat parisien. Il y a en revanche des températures plus élevées et donc plus d'évaporation, ce qui peut favoriser la formation de sels au sein de la porosité. De plus, en hiver comme en été, l'orientation horizontale induit des plus faibles concentrations ioniques totales. Les surfaces verticales retiennent certainement plus les dépôts secs que les surfaces horizontales. L'effet de la division n'est quant à lui pas visible.



L'analyse de la composition des solutions montre la prédominance de trois ions :  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  (Figure 30). À l'inverse,  $\text{Na}^+$  et  $\text{NH}_4^+$  ont des teneurs plus faibles et  $\text{Mg}^{2+}$  très faibles pour les cations. Les concentrations en nitrates, chlorures et phosphates sont variables et ponctuellement élevées pour les anions. Il en est de même pour l'acétate parmi les anions organiques, alors que les concentrations en propionate, formate, oxalate et glycolate restent basses.

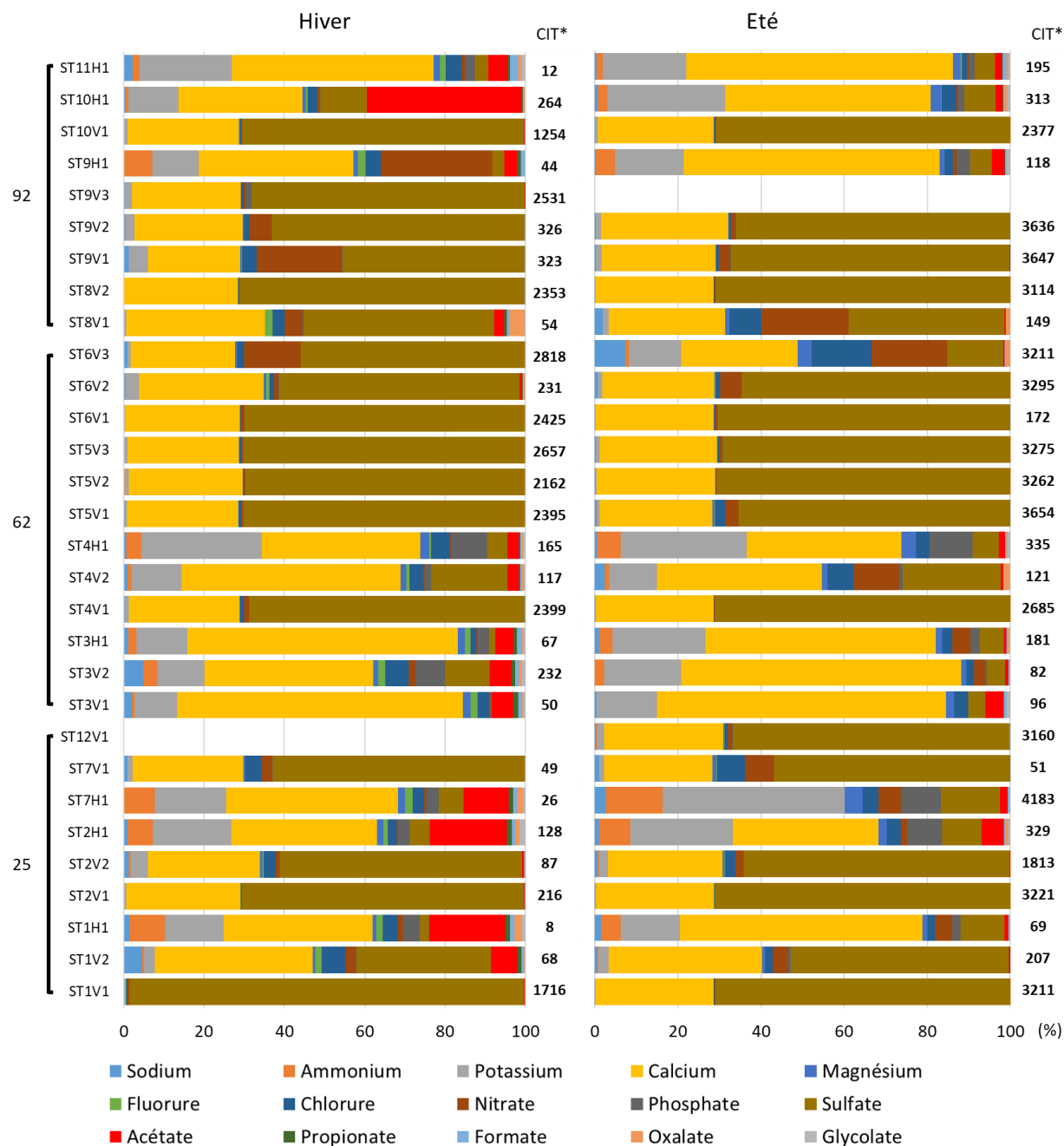


Figure 30 : Proportion massique (en %) des ions présents dans la fraction soluble des calcaires en fonction des saisons hivernale et estivale par échantillon ; CIT\* correspond à la concentration ionique totale (en mg.L<sup>-1</sup>).

Pour déterminer s'il existe un effet de la saison, de l'orientation ou de la localisation au sein du cimetière sur la composition ionique des fractions solubles issues des tombes du Père Lachaise,

les p-valeurs ont été calculées par les tests statistiques de Kruskal Wallis pour chaque espèce ionique (Tableau 14).

Tableau 14 : p-valeur obtenues par test statistique de Kruskal-Wallis pour évaluer l'effet de l'orientation (Horizontal ou Vertical) et de la division (25, 62 ou 92) pour chaque saison, ainsi que l'effet saisonnier. L'indice\* et la couleur rouge indique des résultats significativement différents (car  $p < 0,05$ ).

	Orientation Hiver	Division Hiver	Orientation Été	Division Été	Hiver/été
Sodium	0,59	0,61	0,02*	0,77	0,64
Ammonium	7,4.10 <sup>-5*</sup>	0,17	6,17.10 <sup>-5*</sup>	0,74	0,64
Potassium	6,3.10 <sup>-5*</sup>	0,88	7,74.10 <sup>-5*</sup>	0,91	0,77
Calcium	0,004*	0,49	0,02*	0,66	0,75
Magnésium	0,0005*	0,36	5.10 <sup>-4*</sup>	0,96	0,48
Fluorure	0,006*	0,7	0,68	0,43	1,69.10 <sup>-8*</sup>
Chlorure	0,045*	0,67	0,07	0,93	0,48
Nitrate	0,59	0,61	0,98	0,76	0,37
Phosphate	0,007*	0,61	3,44.10 <sup>-5*</sup>	0,31	0,45
Sulfate	0,0002*	0,97	0,001*	0,8	0,54
Acétate	0,0004*	0,23	0,0002*	0,66	0,008*
Propionate	0,002*	0,34	0,001*	0,38	5,9.10 <sup>-7*</sup>
Formate	0,0004*	0,53	0,0002*	0,58	0,02*
Oxalate	0,02*	0,27	0,65	0,27	0,13
Glycolate	0,0005*	0,46	0,0001*	0,83	0,06
CIT	0,002*	0,621	0,008*	0,995	0,05*

Les concentrations en solution des différentes espèces ioniques sont significativement différentes pour les échantillons collectés en hiver en fonction de l'orientation horizontale ou verticale, sauf pour le sodium (en faible teneur) et les nitrates qui sont ponctuellement élevés dans 1 échantillon vertical et 1 horizontal. Les valeurs sont également significativement différentes en été entre les 2 orientations, sauf pour les anions fluorures, chlorures, nitrates et oxalates.

La division semble en revanche n'avoir aucun effet. Ce n'est pas très surprenant car la proximité du trafic ou du crématorium si elle a un effet local se traduirait plutôt en termes de métaux traces ou de spéciation du carbone.

Il y a également peu de différences entre l'hiver et l'été, ce qui peut s'expliquer par un effet cumulatif des ions au sein des pierres. Le décalage de 6 mois dans la collecte n'aurait donc pas une grande influence. La forte différence induite par l'orientation semble confirmer cette hypothèse. On peut noter tout de même des différences sur les fluorures et certains acides organiques (acétate, propionate, formate). Les anions organiques ont globalement des proportions plus importantes en hiver qu'en été. Par exemple, pour l'acétate, les proportions varient entre 0 % et 40 % en hiver et entre 0 % et 5 % en été.

La concentration des ions analysés est significativement influencée par l'orientation (excepté pour les nitrates). Tous les ions, sauf les sulfates, montrent des proportions plus importantes en position horizontale qu'en position verticale.

Dans le détail, les **sulfates** composent plus de 50 % de la fraction dans les échantillons en position verticale (Figure 30). Seuls 2 échantillons verticaux sont pauvres en sulfates (ST3V1 et ST3V2) mais ceux-ci sont composés de plus de 98 % de calcite (Tableau 13) et leur concentration ionique totale est faible (Figure 30). ST1V1 contient quasiment uniquement des sulfates et c'est un échantillon riche en gypse mais de manière surprenante pauvre en calcium. La localisation et l'effet saisonnier n'influent pas sur sa proportion. Les sulfates proviennent très certainement de la dissolution du gypse formé sur les surfaces verticales plus ou moins abritées. Pour les échantillons collectés en hiver, il n'y a pas de corrélation nette entre la proportion de gypse (Tableau 13) et les concentrations en sulfates (Annexe 2). Les teneurs en sulfates sont élevées et relativement similaires pour des échantillons qui contiennent de 10 à 95 % de gypse.

Le **calcium** est présent dans l'ensemble des fractions solubles analysées et sa proportion varie entre 20 et 70 % en fonction des échantillons. Sa source peut être soit la dissolution de la calcite, du gypse ou être exogène. Cependant, il n'existe pas de corrélation nette entre la teneur en  $\text{Ca}^{2+}$  (Annexe 2) et les proportions de calcite ou de gypse (Tableau 13). Les tests statistiques montrent que la proportion de calcium est plus importante dans les échantillons en position horizontale, sans effet de leur localisation (division) ou de la saison. Nous avons vu que la concentration ionique totale des échantillons était également plus élevée en position horizontale. Il en est de même pour la concentration en calcium. Cet élément peut donc être apporté de manière plus importante par des sources exogènes et être plus fortement retenu au sein de la porosité. Mais si la proportion est plus élevée, c'est aussi parce que la proportion de sulfates est plus grande dans les échantillons verticaux et qu'ici les carbonates ne sont pas considérés, ce qui diminuerait la proportion du calcium s'ils l'étaient.

Le **potassium** est présent dans 12 échantillons avec des proportions comprises entre 10 et 40 %. Sa proportion est plus importante dans les échantillons horizontaux. Il corrèle plutôt bien avec les ions ammonium, magnésium et phosphates en été et avec les ions sodium, magnésium, chlorures et nitrates en hiver. Il peut donc avoir une origine exogène (sels marins, engrais, salpêtre).

- ⇒ **L'orientation des échantillons a un effet significatif sur la composition des fractions solubles. Dans les échantillons verticaux, les dépôts secs peuvent s'accumuler et en particulier ceux qui composent le gypse, alors qu'ils sont dissous au fur et à mesure dans les échantillons horizontaux. Cela explique une forte proportion de sulfates dans ces échantillons. A l'inverse, les autres ions sont globalement plus présents et retenus au sein des échantillons horizontaux parce qu'ils peuvent pénétrer plus profondément.**

### 3. Dénombrement microbien

La Figure 31 illustre le nombre de bactéries et de champignons dénombrés sur l'ensemble des tombes échantillonnées par la méthode du Nombre le Plus probable.

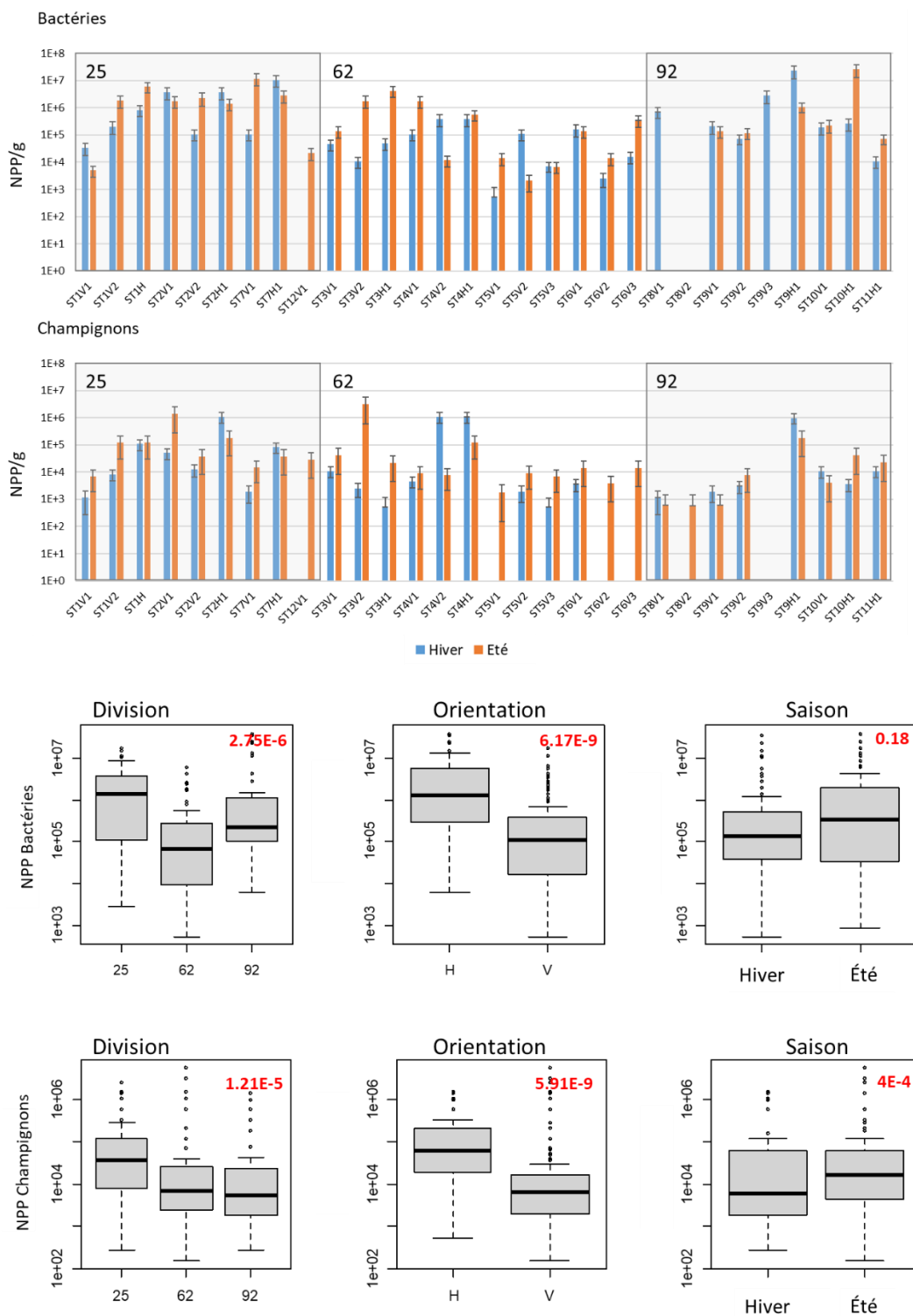


Figure 31 : Dénombrement bactérien et fongique. (A) Dénombrement par la méthode du Nombre le Plus probable (NPP) de bactéries et de champignons présents sur les tombes du cimetière du Père-Lachaise. (B) Boîtes à moustaches (boxplot) représentant la distribution des bactéries et des champignons en fonction des paramètres division, orientation et saison. Les valeurs en rouge correspondent aux p-valeurs obtenues après test statistique de Kruskal Wallis (si p-valeur < 0,05, il existe une différence significative entre les facteurs étudiés).

Le nombre le plus probable de bactéries est compris entre  $10^3$  et  $10^8$  individus par gramme de calcaire. Au sein de la division 25, le nombre de bactéries est compris entre  $10^4$  et  $10^7$  par gramme de calcaire, pour la division 62 entre  $10^3$  et  $10^6$  par gramme de calcaire et pour la division 92 entre  $10^4$  et  $10^7$  par gramme de calcaire. Les tests statistiques réalisés, afin de comparer les trois divisions entre elles, ont montré une p-valeur de  $2,75 \cdot 10^{-6}$ , indiquant que les tombes localisées dans la division 25 possèdent un plus grand nombre de bactéries que les tombes localisées dans les autres divisions du cimetière. Ce résultat est cohérent avec le fait que la division 25 est la plus végétalisée. D'autres tests statistiques ont été menés afin de comparer les effets de l'orientation (horizontale et verticale) et l'impact de la saison. Les p-valeurs obtenues correspondent à  $6,17 \cdot 10^{-9}$  pour l'orientation et 0,18 pour les saisons, ce qui indique des différences significatives du nombre de bactéries en fonction de l'orientation. Elles sont ainsi plus nombreuses pour les tombes échantillonnées en position horizontale, qui présentent une colonisation importante par les mousses. Aucun effet saisonnier n'a été identifié en termes de nombre de bactéries.

Le nombre de champignons dénombrés sur les tombes du Père-Lachaise est compris entre  $10^2$  et  $10^5$  par gramme de calcaire. Au sein de la division 25, le nombre de champignons est compris entre  $10^3$  et  $10^6$  et pour les divisions 62 et 92, il est compris entre  $10^2$  et  $10^6$  par gramme de calcaire. Des tests statistiques ont été réalisés afin de déterminer si l'orientation, la division et la saison ont un impact sur le nombre de champignons sur les tombes. Les tests sur la division ont montré une p-valeur de  $1,21 \cdot 10^{-5}$  indiquant une différence significative du nombre de champignons sur au moins une division. En effet, la division 25 montre à nouveau un nombre plus important de microorganismes. Pour l'orientation, la p-valeur obtenue correspond à  $5,91 \cdot 10^{-9}$ , indiquant un effet significatif de l'orientation de la tombe avec un nombre de champignons plus important en position horizontale. Enfin, une p-valeur de  $4 \cdot 10^{-4}$  a été obtenue en comparant les deux saisons échantillonnées, indiquant un effet significatif de ces dernières, notamment par un nombre plus important de champignons en saison estivale.

Des tests permettant de comparer l'effet du type de calcaire (lutétien ou à entroque) ont été réalisés, mais n'ont pas montrés d'effets sur le nombre de microorganismes présents (bactéries et champignons).

- ⇒ **Il existe un effet de la division et de l'orientation sur le nombre de bactéries et de champignons avec un plus grand nombre dans la division 25 végétalisée et en position horizontale en apparence fortement bio-colonisée.**
- ⇒ **Un effet saisonnier est visible seulement sur le nombre de champignons.**

#### **4. Analyse de l'activité enzymatique totale**

La Figure 32 illustre l'activité enzymatique totale sur les tombes étudiées. Les activités enzymatiques totales sont très hétérogènes. Elles sont comprises entre 0,1 et  $2,1 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Des tests statistiques ont été réalisés afin de voir s'il existe un effet de la division, de l'orientation ou de la saison. Les p-valeurs obtenues pour les effets de la division et de la saison sont respectivement de 0,23 et 0,11, ce qui indique que les activités enzymatiques ne sont pas significativement différentes suivant ces paramètres. Pour le facteur orientation, la p-valeur obtenue est de  $7,85 \cdot 10^{-5}$ . Les activités enzymatiques sont donc significativement différentes entre les positions horizontales et verticales. Elles sont plus importantes en position horizontale.

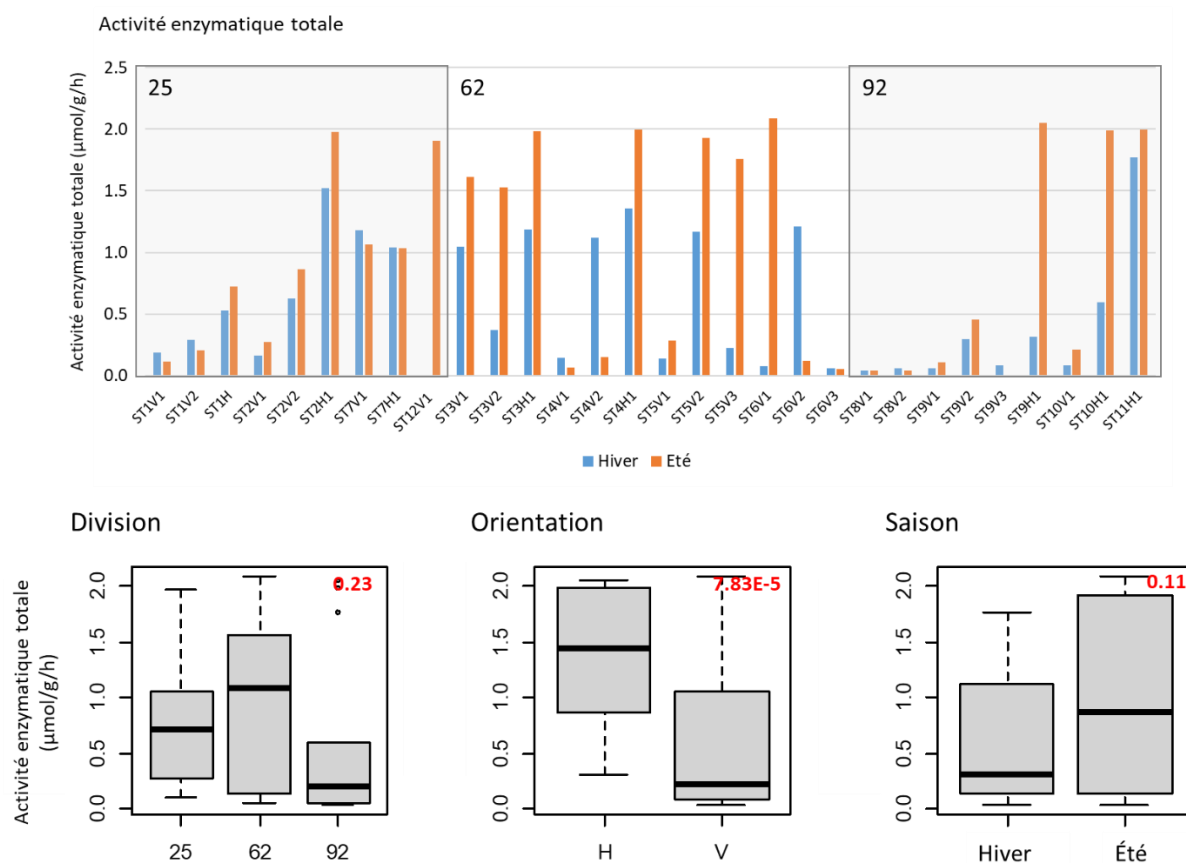


Figure 32 : Activité enzymatique totale. (A) Activité enzymatique totale en ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) en fonction des échantillons. (B) Boxplot correspondant à la distribution des activités enzymatiques totales en fonction de différents facteurs : division, orientation et saison. Les valeurs en rouge correspondent aux p-valeurs obtenue après test statistique de Kruskal Wallis (si p-valeur < 0,05, il existe une différence significative entre les facteurs étudiés).

⇒ **L'activité enzymatique totale est influencée par l'orientation et non par la saison, ces résultats sont en accord avec le nombre plus important de microorganismes en position horizontale (NPP).**

## 5. Communautés microbiennes

Les microorganismes présents sur les tombes du Père-Lachaise ont été identifiés par extraction ADN suivi d'un séquençage.

### 5.1. Communautés bactériennes

Sur l'ensemble des échantillons étudiés précédemment, 16 échantillons par campagne hivernale et estivale, soit environ 50 %, ont pu être séquencés puis étudiés en termes de communautés. Les autres échantillons n'ont pas pu être séquencés car la qualité des séquences obtenues à l'issue de la phase d'amplification était trop faible (Qscore < 70%).

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser à la diversité bactérienne, puis à la composition à l'échelle des phyla et des genres de ces communautés bactériennes.

### 5.1.1. Analyse de la diversité bactérienne

#### *Alpha-diversité*

À partir des résultats de séquençage des communautés (présentés dans le détail par la suite), les différents indices d'alpha-diversité (Richesse observée, Chao1, Shannon et Inverse Simpson) des communautés bactériennes identifiées sur les tombes du Père-Lachaise ont été calculés, au cours de deux saisons (Tableau 15).

Les différents indices d'alpha-diversité correspondent à la diversité des communautés microbiennes au sein d'un même échantillon (intra-échantillon). La richesse observée – ou unité taxonomique opérationnelle (OTU) – correspond au nombre d'espèces observées au sein d'un échantillon. L'indice de Chao 1 correspond à une estimation du nombre réel d'espèces contenues dans l'échantillon, qui prend en compte le nombre d'OTU précédemment décrit. L'indice de Shannon quant à lui traduit la richesse spécifique ainsi que l'abondance relative des espèces. Enfin l'indice Inverse Simpson, compris entre 0 et 1, est désigné comme étant la probabilité que deux individus pris au hasard au sein d'une population appartiennent à la même espèce. Il se base essentiellement sur l'abondance des espèces, et ainsi une espèce abondante a plus de poids qu'une espèce peu abondante.

Au sein des échantillons étudiés, les indices d'alpha-diversité varient entre 4 et 503 pour la richesse observée et entre 4 et 523,50 pour Chao 1. Les indices de Shannon sont compris entre 0,37 et 4,89 et les indices Inverse Simpson sont supérieurs à 5, excepté pour les échantillons ST5V2 hiver et été, ST6V1 été et ST6V2 hiver. Ces fortes valeurs indiquent que la majorité des communautés bactériennes identifiées sont très diversifiées avec un grand nombre d'OTU identifiées et sont marquées par une prédominance de certaines espèces. Les quatre échantillons ayant de faibles indices possèdent une diversité plus faible induite par un nombre plus petit d'OTU et sont dominés par quelques espèces seulement.

Tableau 15 : Tableau des indices d'alpha-diversité des communautés bactériennes présentes sur les tombes du Père-Lachaise.

Saison	Division	Échantillon	Richesse observée	Chao1	Shannon	Inverse Simpson
été	25	ST12V1	195	254,40	3,74	24,75
		ST2H1	160	188,28	4,22	37,24
		ST2V2	216	288,73	3,94	29,35
	62	ST3H1	71	90,13	3,39	21,64
		ST3V2	13	13,00	2,14	6,13
		ST4H1	503	513,50	4,63	32,73
		ST4V2	89	163,55	2,62	5,00
		ST5V2	4	4,00	0,58	1,39
		ST6V2	64	107,88	0,73	1,30
		ST6V3	184	268,91	3,70	13,28
		92	ST10V1	79	100,67	3,53
	ST11H1		102	120,07	3,27	10,10

		ST8V1	235	290,04	3,72	15,85
		ST8V2	354	371,40	4,89	79,34
		ST9V2	122	200,83	2,89	7,46
		ST9V3	290	349,09	4,15	26,65
	25	ST12V1	108	156,00	3,16	11,56
		ST1V2	142	165,10	3,72	20,49
		ST2V2	120	123,00	4,07	36,20
	62	ST3H1	75	82,20	3,25	17,51
		ST3V2	114	140,25	3,35	13,35
		ST3V3	31	34,00	2,38	8,49
		ST4H1	75	94,00	3,15	14,08
		ST4V2	114	119,06	3,36	13,95
		ST5V2	65	82,77	2,61	5,70
		ST6V1	26	44,33	0,37	1,13
		ST6V2	76	85,17	3,09	9,59
hiver	92	ST10H1	73	96,33	2,51	5,31
		ST10V1	97	110,60	3,81	30,24
		ST11H1	96	115,13	3,03	9,11
		ST8V1	98	111,13	3,63	25,25
		ST9V2	125	165,60	3,35	12,23

La comparaison des différents indices en fonction de la saison (Tableau 15) montre que les indices de richesse observée et Chao 1 sont plus grands en hiver qu'en été, alors que les indices de Shannon et Inverse Simpson sont similaires.

Du point de vue de la localisation, la division 25 présente les valeurs les plus importantes pour l'ensemble des indices étudiés et la division 62 les plus faibles. Ces résultats indiquent que les communautés microbiennes identifiées dans la division 25 présentent un grand nombre et une grande diversité d'espèces qui sont elles-mêmes réparties de manière équitable avec la codominance de plusieurs espèces. Au contraire, les différentes communautés bactériennes identifiées au sein de la division 62 montrent une plus grande disparité avec certains échantillons présentant des diversités très faibles et d'autres très élevées.

Enfin, aucune grande tendance n'a été identifiée entre les échantillons à l'horizontal et en vertical quel que soit l'indice étudié.

- ⇒ **Le nombre d'OTU identifiées semble être influencé par la saison. Il est plus important en hiver qu'en été.**
- ⇒ **Dans la division la plus végétalisée (division 25), le nombre d'OTU est plus important que dans les autres divisions.**
- ⇒ **Il n'y a pas d'impact de la position horizontale ou verticale sur la diversité bactérienne.**



### Bêta-diversité

Les indices de bêta-diversité correspondent à une comparaison des communautés microbiennes entre deux échantillons (inter-échantillon). Un indice égal à 0 signifie que l'ensemble des espèces sont identiques dans les deux échantillons. Au contraire, un indice de 1 traduit que toutes les espèces microbiennes présentes sont totalement différentes. Différents indices de bêta-diversité existent. Dans cette étude, nous avons choisi l'indice de Bray-Curtis car il prend en compte la composition et l'abondance des OTU au sein d'une communauté microbienne.

### Évolution des communautés présentes entre deux saisons

La Figure 33 représente les indices de bêta-diversité entre les mêmes échantillons en saison hivernale et estivale.

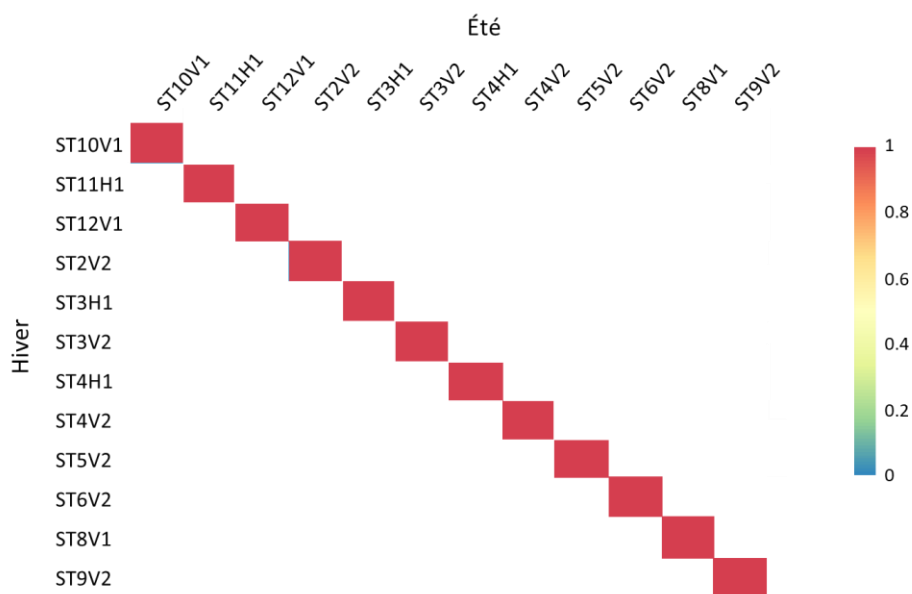


Figure 33: Carte de chaleur des indices de bêta-diversité représentant les communautés bactériennes des mêmes échantillons en saison hivernale et en saison estivale.

Pour l'ensemble des échantillons, les indices de bêta-diversité sont proches de 1, ce qui indique que les communautés bactériennes présentes sur les tombes en hiver sont totalement différentes de celles retrouvées aux mêmes endroits en été.

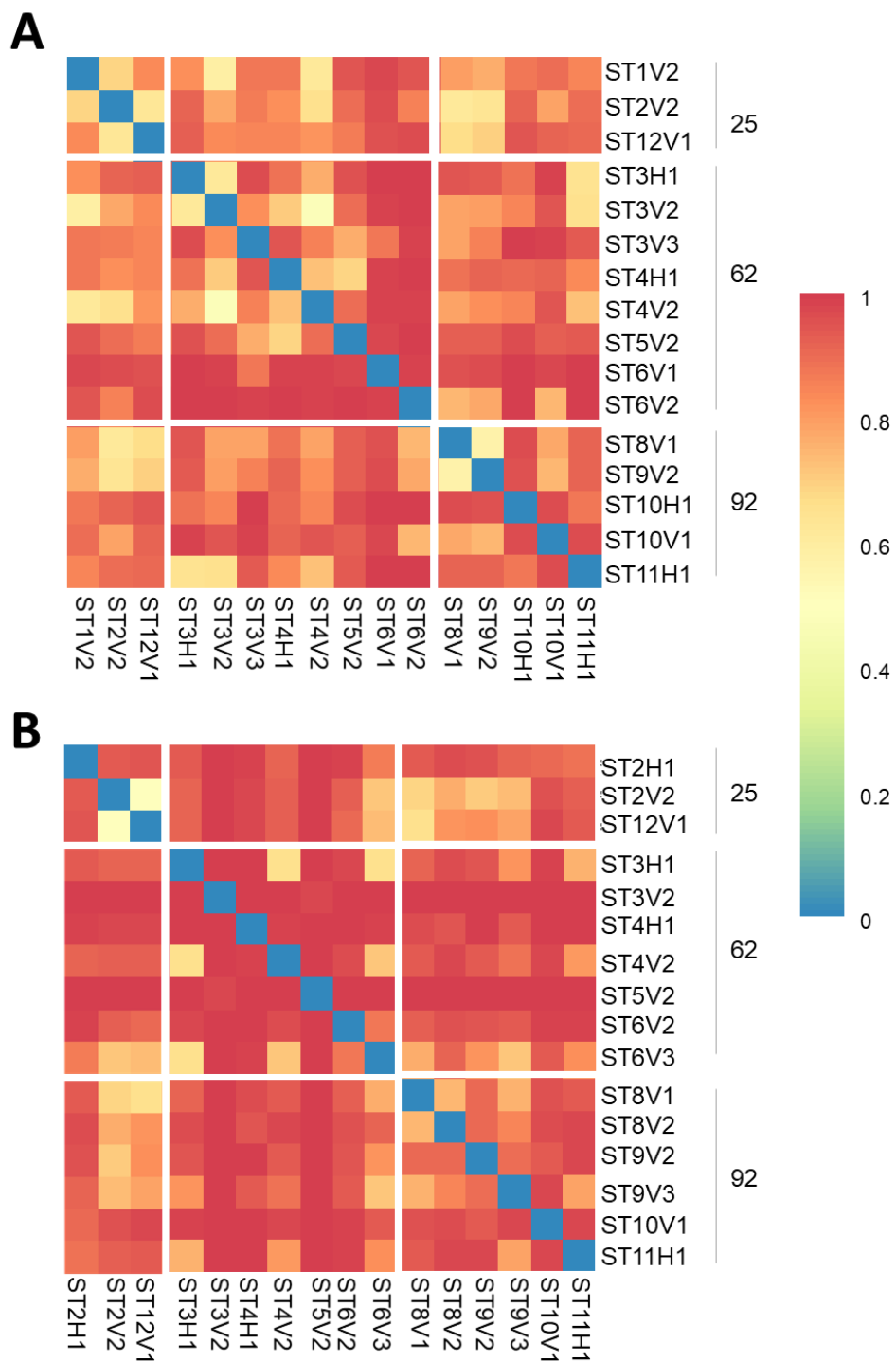


Figure 34: Cartes de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis des communautés bactériennes pour les différentes stèles en (A) saison hivernale, (B) saison estivale.

### Saison hivernale

La Figure 34 - A illustre les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis (BC) calculés entre les échantillons issus de la campagne hivernale. Les indices pour des échantillons provenant d'une même tombe (ST6V – ST8V – ST9V) sont faibles à moyenne (jaune à orange) indiquant des

similitudes. En particulier, les échantillons ST6V2 et ST6V3 (Annexe 1) ont des communautés bactériennes assez similaires malgré leurs faciès d'altération différents. Mais de manière plus générale, il existe de fortes disparités pour les échantillons verticaux. Par exemple ST3V2 et ST5V2 sont très dissemblables des autres échantillons. Il en est de même pour les échantillons horizontaux même si les valeurs sont moins extrêmes. La diversité entre les divisions est également variable. Il existe des similitudes entre certains échantillons (par exemple ST2V2 et les STV de la division 92 ou encore ST9V3 avec les STV de la division 62 mais aussi ST3H1) mais également de grandes différences pour les autres échantillons. La diversité entre les échantillons verticaux et horizontaux couvre elle aussi une grande gamme de valeurs au sein des divisions (jaune à rouge). Sur une même tombe, entre les échantillons ST4H1 et ST4V2, l'indice de BC est de 0,7 indiquant que les communautés bactériennes sont assez différentes entre les deux orientations. La différence des communautés bactériennes est encore plus marquée pour ST3H1 et ST3V2 (indice de BC de 0,9). A l'inverse, la comparaison des échantillons ST9V3 et ST11H1 donne un indice de BC de 0,4.

### Saison estivale

La *Figure 34 - B* illustre aussi les indices de bêta diversité de Bray-Curtis (BC) calculés à partir des échantillons prélevés cette fois durant la saison estivale. De manière globale, la carte présente des teintes plus claires qu'en hiver. Concernant la variabilité au sein des échantillons prélevés sur une même tombe avec la même orientation mais dans des zones avec des faciès d'altération différents (ST5V2 et ST5V3 ; ST6V2 et ST6V3), les indices de BC sont de 0,9, ce qui indique que les communautés bactériennes sont très différentes sur une même tombe en fonction du faciès d'altération.

Au sein de la division 25, les 3 échantillons verticaux ont des indices de BC compris entre 0,6 et 0,7 indiquant des communautés bactériennes assez différentes. Les échantillons verticaux des autres divisions présentent des différences du même ordre, hormis ST5V2 et ST5V3 au sein de la division 62 qui sont très dissemblables des autres échantillons. Les échantillons horizontaux moins nombreux sont plutôt similaires (jaune – orange).

La comparaison des orientations au sein d'une même tombe (Annexe 1) montre que pour ST3H1 et ST3V2 (division 62) l'indice de BC est de 0,6 ce qui correspond à des communautés assez différentes. Pour les échantillons ST4H1 et ST4V2, les mêmes constats peuvent être faits. Les différences sont plus marquées pour ST10V1 et ST10H1 (division 92).

Enfin, du fait des différences marquées pour ST5V2 et ST5V3, les communautés bactériennes présentes dans les divisions 25 et 92 présentent plus d'espèces communes que chacune de ces divisions avec la division 62. Ce résultat est identique à la campagne hivernale.

- ⇒ **Pour un même échantillon, les communautés bactériennes sont très différentes en fonction des saisons (été/hiver).**
- ⇒ **En été les communautés bactériennes sont plus similaires qu'en hiver.**

## 5.1.2. Abondance relative des phyla et genres bactériens

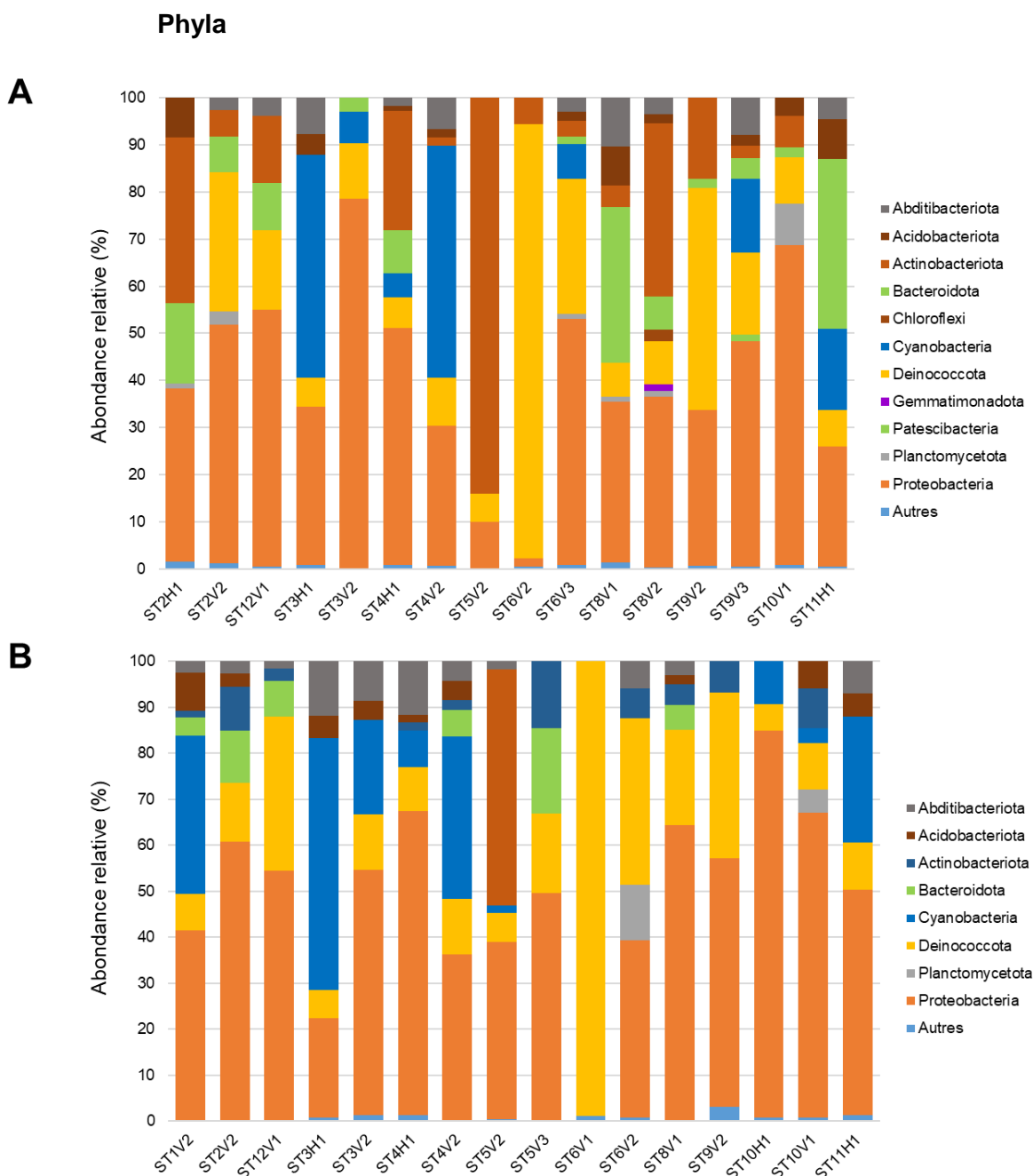


Figure 35: Abondance relative des phyla bactériens (en %). (A) en saison hivernale, (B) en saison estivale.

Les communautés bactériennes identifiées sur les tombes du Père-Lachaise en saison hivernale (Figure 35 - A) sont représentées par 11 phyla avec des proportions respectives supérieures à 1 %. Parmi eux, six phyla sont majoritaires, même si leurs proportions varient en fonction des échantillons : les Abditibacteriota (0 – 10 %), les Actinobacteriota (0 – 37 %), les Bacteroidota (0 – 36 %), les Cyanobacteria (0 – 49 %), les Deinococcota (0 – 92 %) et les Proteobacteria (2 – 79 %).

Les communautés bactériennes identifiées en saison estivale (*Figure 35 - B*) sont quant à elles représentées par 8 phyla, avec les mêmes 7 phyla majoritaires, mais en proportions différentes : les Abditibacteriota (0 – 12 %), les Actinobacteriota (0 – 51 %), les Bacteroidota (0 – 19 %), les Cyanobacteria (0 – 55 %), les Deinococcota (6 – 99 %) et les Proteobacteria (0 – 66 %).

Lorsque l'on compare la composition des communautés bactériennes à l'échelle des phyla entre les deux saisons, on observe que la proportion de Bacteroidota est beaucoup plus importante en hiver qu'en été, et que cette différence est d'autant plus visible au sein des échantillons localisés dans la division 92. De la même manière, la proportion du phylum Abditibacteriota est plus importante en été qu'en hiver.

## Genre

### Saison hivernale

La composition des communautés bactériennes identifiées lors de la campagne hivernale sont illustrées dans la *Figure 36*.

Le phylum Abditibacteriota a pour seul représentant le genre *Abditibacterium* au sein des communautés bactériennes avec des proportions comprises entre 0 et 10 %. Les Acidobacteriota sont représentés par les genres *Blastocatella* et *Bryobacter*. Les *Blastocatella* sont majoritaires avec des abondances relatives pouvant aller jusqu'à 10 %.

Les genres identifiés au sein du phylum des Actinobacteriota possèdent une grande diversité. Au sein de la division 92, ils appartiennent principalement à l'ordre de Frankiales. Au sein de l'échantillon ST8V2, possédant la plus importante proportion d'Actinobacteriota au sein de cette division, trois genres ont été identifiés : *Blastococcus* (5 %), *Klenkia* (2 %) et *Modestobacter* (6 %). Au sein des divisions 25 et 62, les genres appartiennent principalement à l'ordre des Proponibacteriales et sont : *Nocardiodes* (5 % ST2H1), *Friedmaniella* (6 % ST12V1 ; 12 % ST4H1 ; 3 % ST5V2), *Microlunatus* (10 % ST2H1).

Au sein du phylum des Bacteroidota, deux genres ont été identifiés avec des proportions supérieures à 4 %, le genre *Segetibacter* (5 % ST12V1 ; 22 % ST8V2) et le genre *Flavobacterium* (31 % ST11H1).

Le phylum des Cyanobacteria est principalement représenté par la famille des Chroococciopsaceae, dont seulement une partie a pu être identifiée et appartient au genre des *Aliterella*.

Les Deinococcota sont principalement représentés par le genre *Truepera* présent dans tous les échantillons sauf ST2H1, ST4H1 et ST5V2. Le genre *Deinococcus* a été trouvé seulement au sein de l'échantillon ST4H1 avec une abondance d'environ 10 %.

La classe des Alphaproteobacteria est la seule classe représentative de Proteobacteria. Deux genres majoritaires ont été identifiés sur la quasi-totalité des stèles : *Rubellimicrobium* et *Sphingomonas*. Les *Sphingomonas* représentent entre 0 et 40 % des genres identifiés et sont présents partout excepté sur les échantillons ST5V2 et ST6V2. Les *Rubellimicrobium* représentent entre 0 et 20 % des communautés présentes sur les stèles, sauf également sur les échantillons ST5V2 et ST6V2.

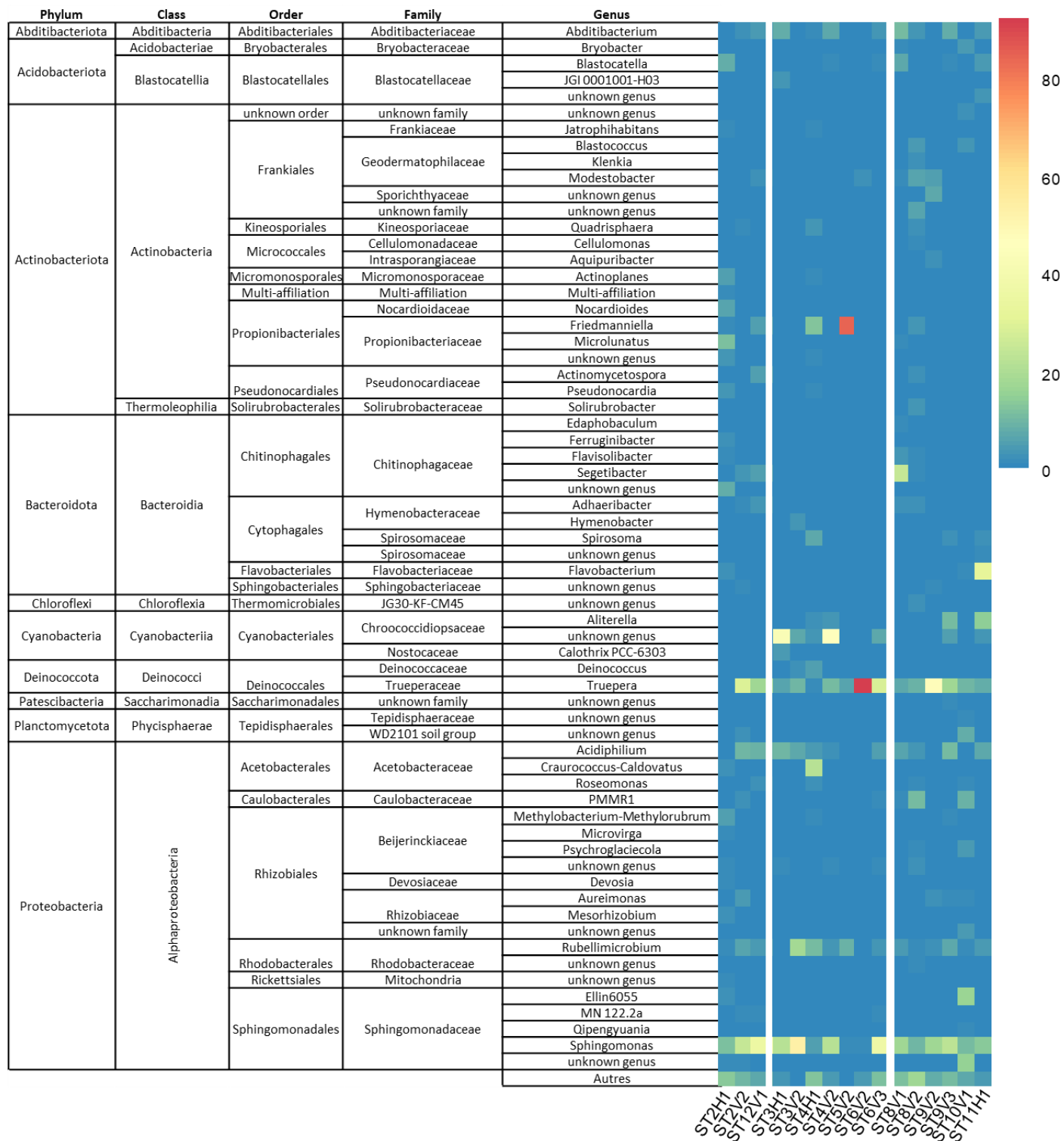


Figure 36: Abondance relative des genre bactériens identifiés en saison hivernale.

## Saison estivale

La Figure 37 représente les abondances relatives des genres bactériens identifiés sur les tombes du Père-Lachaise en saison estivale. Le nombre de genres est beaucoup plus faible en été qu'en hiver.

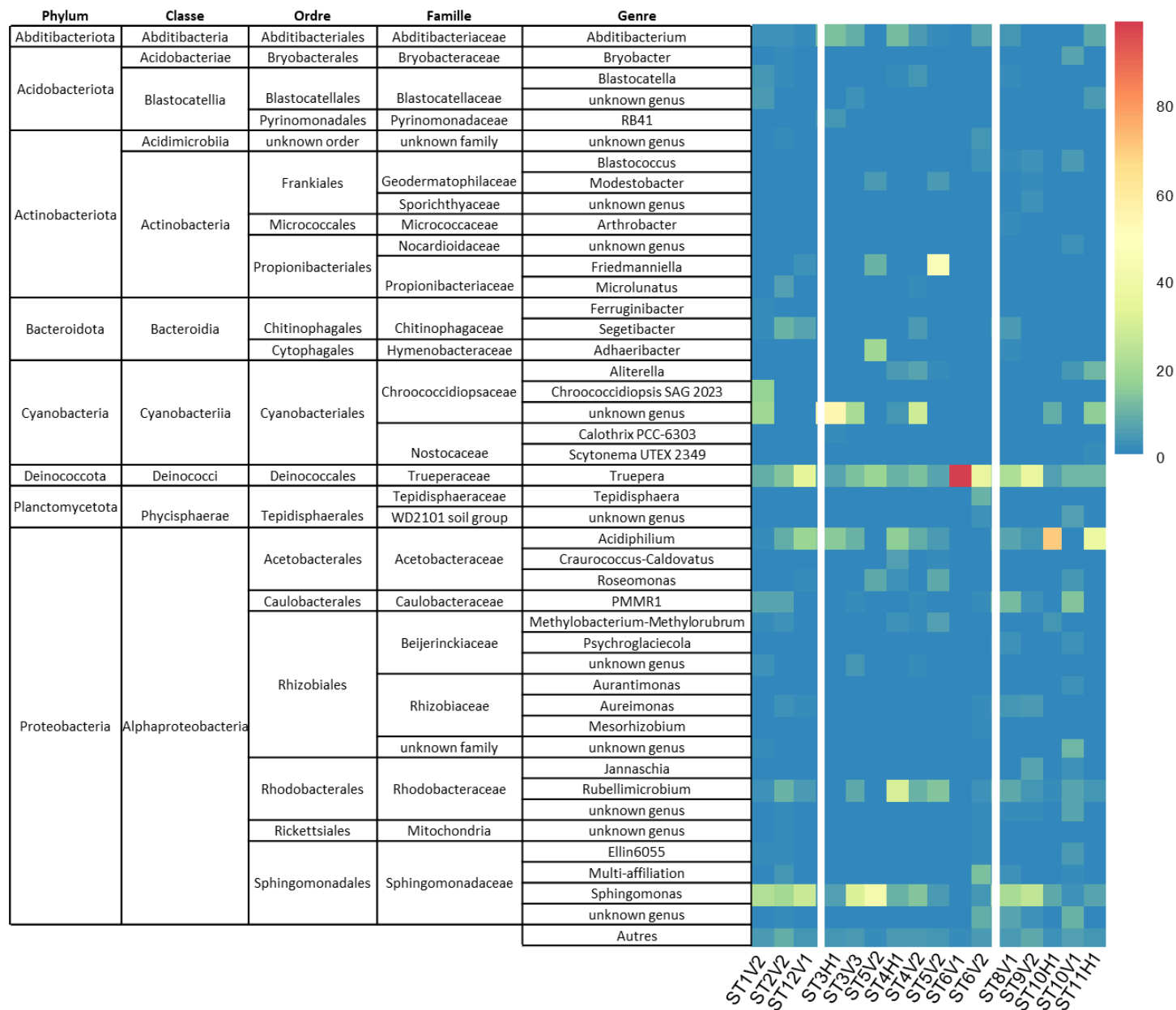


Figure 37: Abondance relative des genres bactériens identifiés sur les tombes du Père-Lachaise en saison estivale (en %).

Le genre *Abditibacterium* est le seul représentant du phylum des Abditibacteriota avec des proportions variantes entre 0 et 11 % en fonction des échantillons. Ce genre semble être plus abondant en position horizontale avec des proportions comprises entre 7 et 12 % qu'en position verticale avec des proportions comprises entre 1 et 6 %.

La majorité des Cyanobacteria identifiées appartiennent à la famille des Chroococciopsaceae. Seule une faible proportion a pu être identifiée comme appartenant au genre *Aliterella* dans les échantillons ST4H1, ST4V2, ST9V3 et ST11H1.

Le phylum Deinococota est représenté par un seul genre, *Truepera*, qui est présent sur la totalité des échantillons, excepté ST5V2. Leurs proportions varient entre 3 et 31 % en fonction des échantillons.

Trois genres appartenant au phylum de Proteobacteria sont majoritaires au sein des communautés étudiées : *Acidiphilum*, *Rubellimicrobium* et *Sphingomonas*. Le genre *Acidiphilum* est présent au sein de la majorité des échantillons et a des proportions relatives plus importantes dans les communautés provenant d'échantillons horizontaux (comprises entre 14 et 38 %) que dans celles provenant d'échantillons verticaux (comprises entre 2 et 16 %). Le genre *Rubellimicrobium* est lui aussi présent dans la majorité des communautés étudiées, mais en proportions plus faibles, comprises entre 1 et 27 %. Enfin le genre *Sphingomonas* a été identifié sur la quasi-totalité des stèles avec des abondances comprises entre 0 et 40 %.

- ⇒ **En hiver, beaucoup de genres différents, appartenant au phylum des Actinobacteriota ont été identifiés en très faible proportion**
- ⇒ **Les genres majoritaires sont identiques en été et en hiver et représentés par *Rubellimicrobium*, *Sphingomonas*, *Alitella* et *Acidiphilium*.**

## 5.2. Communautés fongiques

Sur l'ensemble des échantillons étudiés précédemment, 22 échantillons (sur 30) pour la campagne hivernale et 22 pour la campagne estivale ont pu être séquencés puis étudiés en termes de communautés.

### 5.2.1. Analyse de la diversité fongique

#### *Alpha-diversité*

Le Tableau 16 présente différents indices d'alpha-diversité (Richesse observée, Chao1, Shannon et Inverse Simpson) des communautés fongiques identifiées sur les tombes du Père-Lachaise, au cours de deux saisons.

Tableau 16 : Indices d'alpha-diversité des communautés fongiques identifiées sur les stèles du Père-Lachaise durant deux saisons.

Campagne	Division	Échantillon	Richesse observée	Chao1	Shannon	Inverse Simpson
C1	25	ST1V1	25	26.00	2.78	12.84
		ST2V1	137	144.86	3.21	10.40
		ST2V2	293	346.32	3.39	14.05
		ST7V1	196	238.00	2.43	5.31
		ST12V1	264	312.62	2.76	6.61
	ST3H1	224	315.00	1.67	2.40	
	ST3V2	105	152.25	1.95	3.20	



62	ST4H1	344	366.56	3.92	27.02
	ST4V1	302	312.69	3.55	13.98
	ST4V2	280	296.43	3.20	10.61
	ST5V1	262	283.38	3.21	9.70
	ST5V2	269	301.50	3.14	12.16
	ST5V3	250	256.50	3.00	7.47
	ST6V1	375	427.50	2.74	6.80
	ST6V2	252	287.65	2.87	8.28
	ST6V3	373	389.43	3.59	16.30
92	ST10V1	331	384.93	3.17	10.81
	ST11H1	232	291.37	3.10	11.25
	ST8V1	214	257.94	3.14	12.78
	ST8V2	221	234.20	2.76	5.56
	ST9V1	30	30.00	2.21	6.32
	ST9V2	272	294.29	3.01	10.69
	ST9V3	471	503.76	4.18	29.49
25	ST12V1	134	171.71	2.13	3.99
	ST1V1	151	170.00	3.34	15.06
	ST1V2	127	158.91	2.27	4.60
	ST7V1	62	62.00	2.51	5.49
62	ST3H1	125	160.43	1.95	4.30
	ST3V2	132	153.00	2.22	5.35
	ST4H1	166	181.55	3.64	20.72
	ST4V1	38	39.00	2.67	9.89
	ST4V2	137	163.25	2.90	8.76
	ST5V1	50	51.50	3.33	20.10
	ST5V2	130	216.67	2.43	6.99
	ST5V3	116	129.91	1.81	3.08
	ST6V1	126	140.62	2.08	3.96
	ST6V2	112	158.75	1.70	2.42
	ST6V3	140	140.75	2.90	6.21
	92	ST10H1	109	143.20	3.35
ST10V1		173	206.06	3.58	20.07
ST11H1		156	167.88	3.30	14.24
ST8V1		88	108.00	2.43	7.41
ST8V2		19	19.00	2.02	4.84
ST9V1		71	71.00	3.29	16.19
ST9V2		139	164.09	2.55	7.46

Au sein des échantillons étudiés, les indices d'alpha-diversité varient entre 19 et 471 pour la richesse observée et entre 19 et 503,76 pour Chao 1.

Les indices de Shannon sont compris entre 1,67 et 4,18 et la majorité d'entre eux entre 2,5 et 3,5, indiquant une diversité fongique assez élevée. Trois échantillons possèdent des indices de

Shannon plus faibles que les autres (entre 1 et 2) : ST3H2 (hiver et été) et ST3V2 (hiver). Ces faibles valeurs sont induites par la prédominance de quelques espèces au sein de ces échantillons, étant donné les valeurs élevées de richesse observée.

Les indices Inverse Simpson sont, pour la majorité des échantillons, supérieurs à 5 (sauf ST3H1 hiver, ST3V2 hiver et ST5V3 été qui ont des valeurs entre 2,40 et 3,20) indiquant une faible diversité des communautés fongiques ainsi qu'une assez bonne homogénéité des espèces présentes. Les communautés fongiques présentes dans les échantillons ST3H1 hiver, ST3V2 hiver et ST5V3 sont dominées par quelques espèces seulement.

Lorsque l'on compare les différents indices en fonction de la saison, les indices de richesse observée et Chao 1 montrent des différences significatives avec des indices plus grands en hiver qu'en été. Cette différence n'est pas observée pour les indices de Shannon et Inverse Simpson.

- ⇒ **La diversité des communautés microbiennes est plus importante en hiver qu'en été. Pour les indices de Shannon et Inverse Simpson, les différences de communautés entre les deux saisons étudiées ne montrent pas de différences.**
- ⇒ **Aucun effet de la division et de l'orientation horizontale et verticale n'est visible pour les différents indices d'alpha-diversité étudiés.**

### **Bêta-diversité**

#### **Évolution des communautés entre les deux saisons**

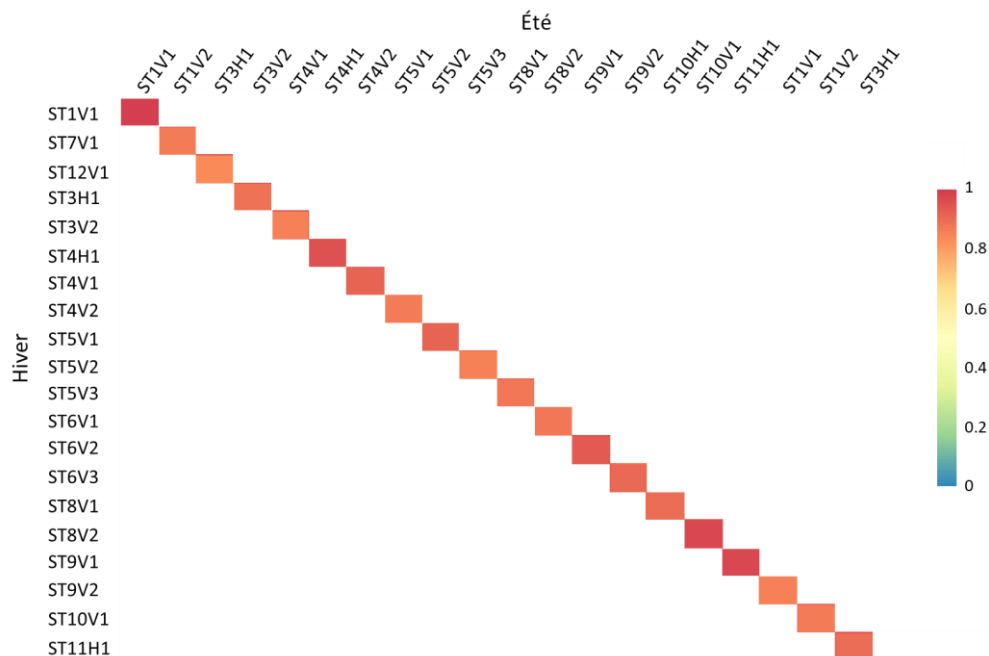


Figure 38 : Carte de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis des communautés fongiques correspondant aux différences des communautés pour un même échantillon entre les saisons hivernale et estivale.

La Figure 38 illustre les indices de bêta-diversité calculés en fonction des communautés fongiques présentes lors des deux saisons étudiées sur un même échantillon. Pour tous les échantillons,

les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis sont compris entre 0,8 et 1, indiquant une dissimilarité très importante et donc des communautés fongiques très différentes en hiver et en été.

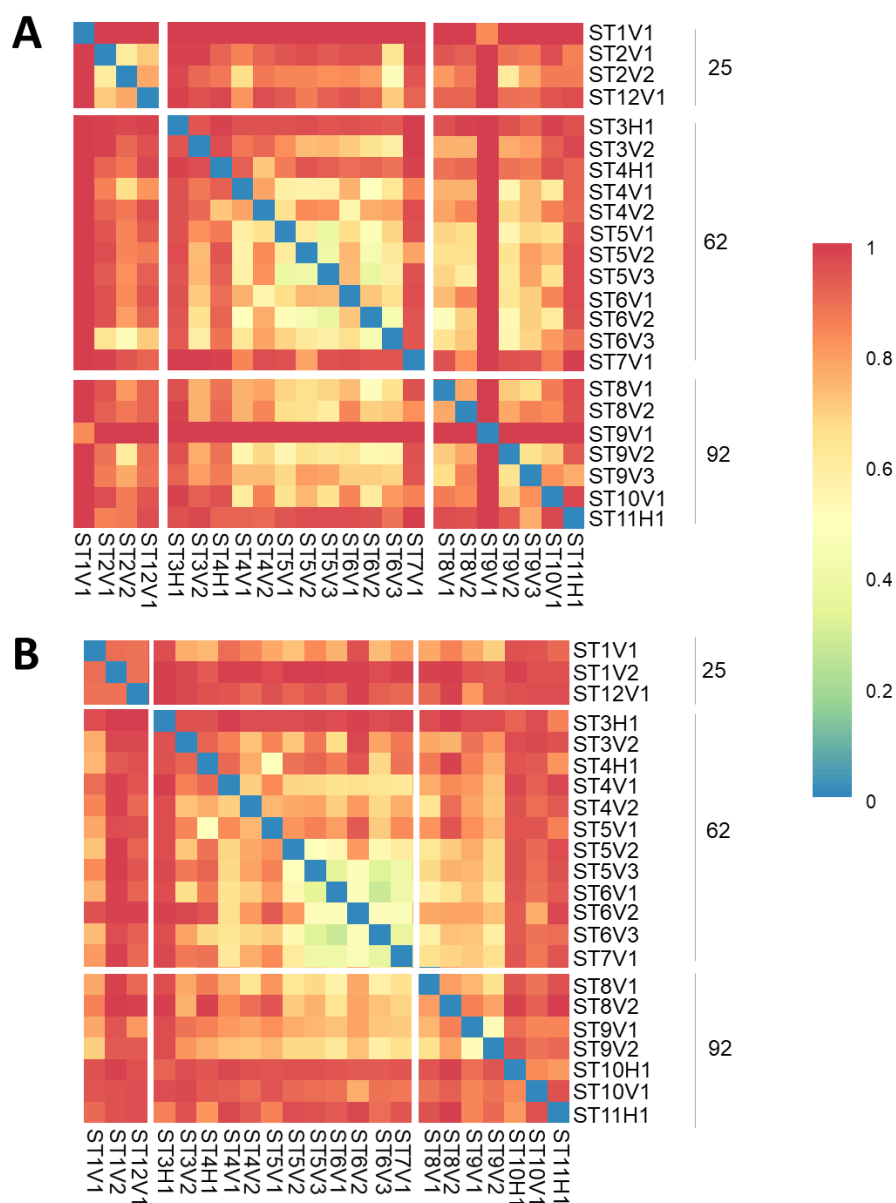


Figure 39 : Cartes de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis des communautés fongiques pour les différentes stèles en fonction des saisons étudiées : (A) Saison hivernale ; (B) Saison estivale.

### Saison hivernale

La Figure 39- A illustre les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis (BC) entre les communautés fongiques identifiées sur les tombes du Père-Lachaise. De manière générale, les teintes sont

plutôt rouges pour la comparaison des divisions 25 et 62, ainsi que 25 et 92, alors qu'elles sont plus jaunes pour la comparaison 62 – 92 et au sein d'une même division.

La comparaison des échantillons sur un même monument avec la même orientation montre que généralement les différences sont plutôt faibles pour ST2V (division 25), ST4V, ST5V, ST6V (division 62) et ST8V (division 92) mais élevées pour ST9V avec ST9V1 qui est très dissemblable de ST9V2 et ST9V3.

Pour les échantillons verticaux, ST1V1, ST7V1 et ST9V1 sont très dissemblables de tous les autres échantillons. Les autres sont plutôt similaires particulièrement au sein de la division 62. Pour les échantillons horizontaux, moins nombreux, ST3H1 est très dissemblable alors que les 2 autres présentent des similitudes.

La division 62 possède le plus grand nombre d'échantillons et les indices de BC sont compris entre 0,3 et 1. Elle permet de comparer le rôle de l'orientation. Deux communautés fongiques ont été identifiées sur la tombe ST3 (Annexe 1) en position horizontale (ST3H1) et verticale (ST3V2). L'indice de BC est de 0,96 indiquant des communautés fongiques très différentes. Il en est de même entre ST4H1 en horizontal et ST4V1 et ST4V2 en vertical où l'indice de BC est de 0,8.

### Saison estivale

La Figure 39 - B illustre les indices de bêta diversité de Bray-Curtis entre les différentes communautés fongiques identifiées en saison estivale. Globalement, les échantillons ST1V2, ST12V1, ST3H1, ST10H1, ST10V1 et ST11H1 apparaissent comme très dissemblables de tous les autres échantillons, alors que les autres ont des similitudes avec d'autres échantillons.

Au sein de la même tombe, il y a des disparités, notamment pour ST1V (indice de 0,9), ST4V (indice de 0,68), ST5V (indices entre 0,51 et 0,85), ST8V (indice de 0,73) alors que les échantillons sont moins différents pour ST6V (indice entre 0,33 et 0,57) et ST9V (indice de 0,5) témoignant de communautés fongiques plus semblables au sein de cette même tombe.

Au sein de la division 62, les indices de BC permettent de comparer les orientations verticales et horizontales. Pour la tombe ST3, l'indice de BC est de 0,95. Pour ST4, les indices de BC de ST4H1 sont de 0,88 avec ST4V1 et 0,75 avec ST4V2. Pour ST10, l'indice de BC est de 0,84. Toutes ces valeurs mettent en évidence des communautés fongiques très différentes entre les positions verticales et horizontales.

- ⇒ **Pour un même échantillon, les communautés fongiques sont très différentes en fonction des saisons.**
- ⇒ **En été et en hiver, les communautés fongiques des différents échantillons sont, dans l'ensemble assez similaires. Cependant, certains échantillons (ex : ST9V1 en hiver ou ST1V2 et ST12V1 en été) présentent des communautés fongiques propre à eux.**

## 5.2.2. Composition des communautés fongiques

### Phyla

Le phylum des Ascomycota constitue la grande majorité des phyla identifiés sur les tombes du Père-Lachaise en saison hivernale (Figure 40 - A) ou en saison estivale (Figure 40-B). Il représente entre 70 et 100 % des champignons en hiver et entre 60 et 100 % en été. Les Basidiomycota ont été détectées dans seulement quelques échantillons avec des proportions comprises entre 2 et 20 % en hiver et entre 2 et 10 % en été.

Les Mortierellomycota ont essentiellement été identifiées sur la stèle ST1 (ST1V1 et ST1V2) en saison hivernale avec des proportions représentant environ 5 % des communautés fongiques identifiées.

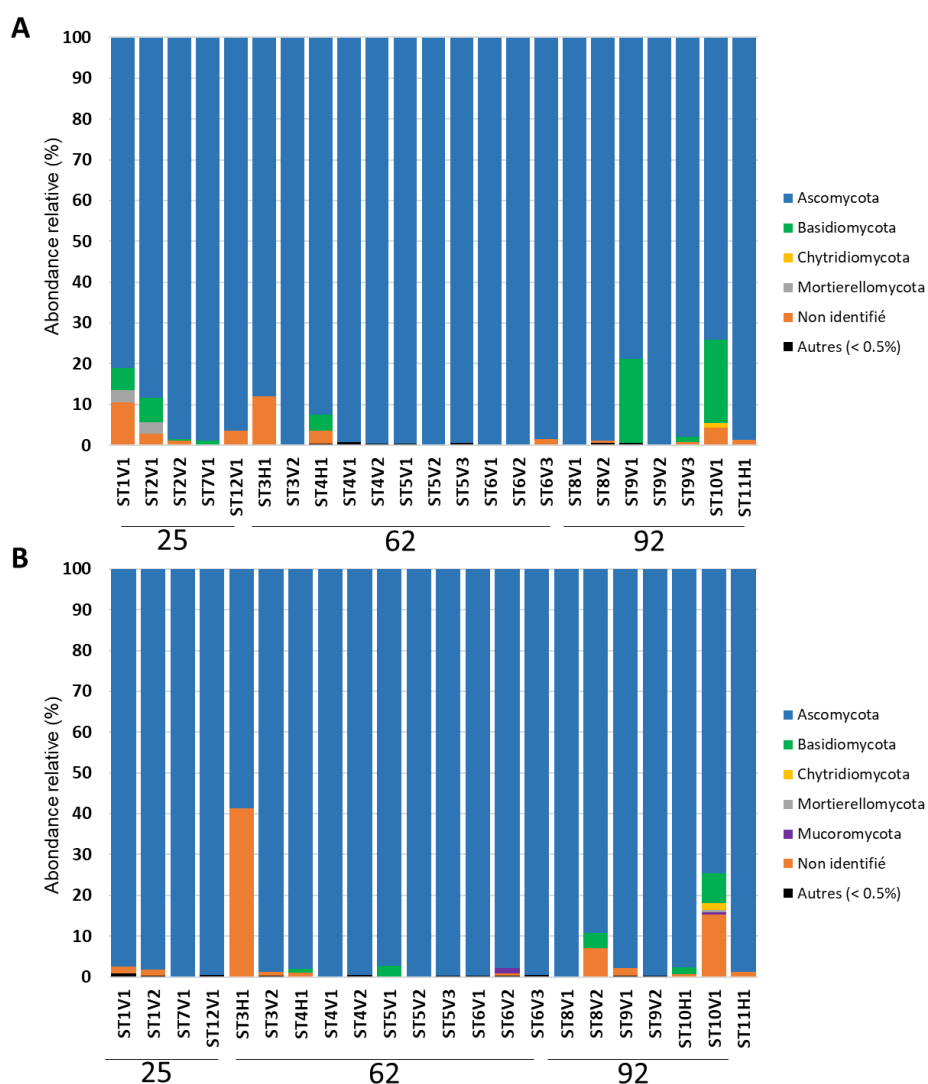


Figure 40: Abondance relative des phyla fongiques identifiés sur les stèles du Père-Lachaise (en %). (A) Saison hivernale (B) Saison estivale.

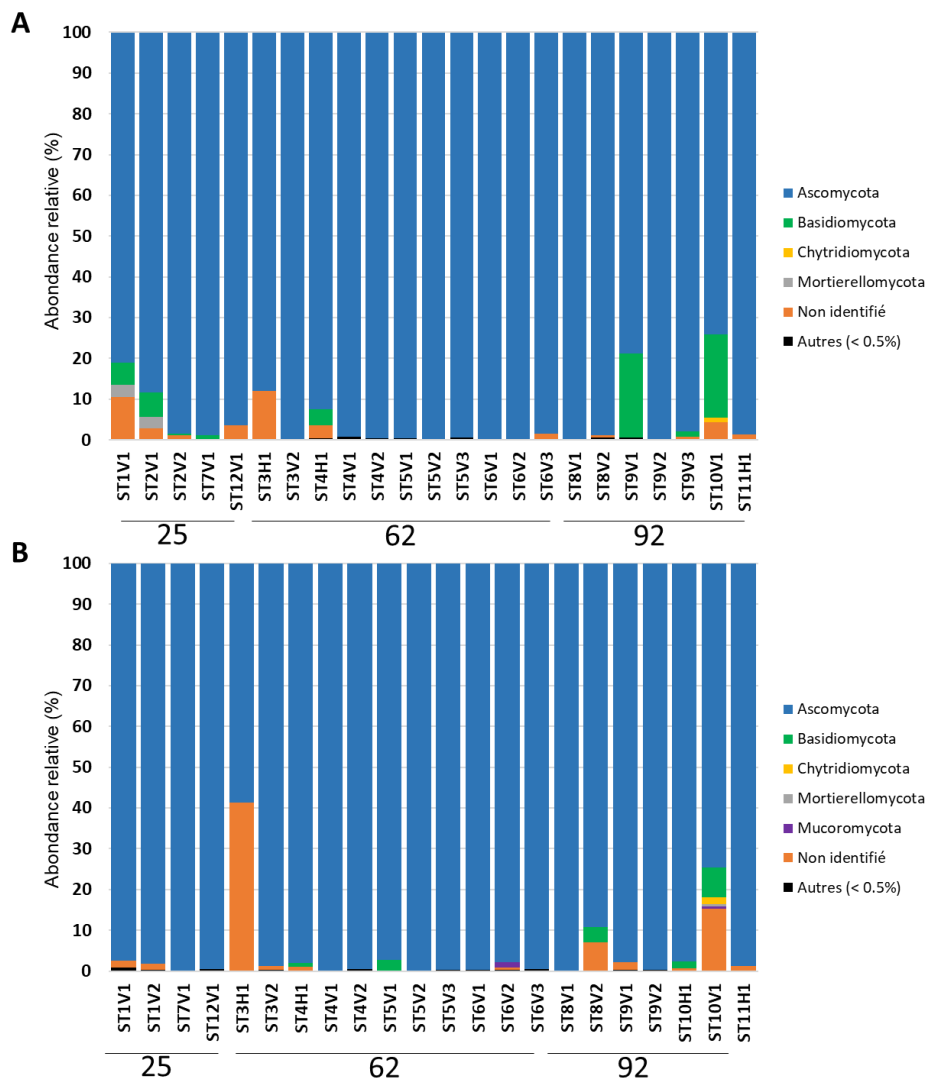


Figure 40: Abondance relative des phyla fongiques identifiés sur les stèles du Père-Lachaise (en %). (A) Saison hivernale (B) Saison estivale.

## Genre

### Saison hivernale

Les communautés fongiques identifiées en saison hivernale montrent une prédominance des Ascomycota. La majorité des genres identifiés sur les tombes du Père-Lachaise appartiennent aux classes Dothiedomycetes, Eurotiomycetes et Lecanoromycetes (Figure 41).

Les Dothiedomycetes sont principalement présents sur les échantillons en position verticale. Deux genres sont majoritaires et ont été identifiés dans la quasi-totalité des échantillons : *Extremus* (0 % — 88 %) et *Vermiconia* (0 % — 17 %). Le genre *Extremus* est particulièrement abondant sur les tombes ST5 et ST6 (Annexe 1) avec des proportions comprises entre 15 et 50 %, ainsi que sur l'échantillon ST3V2 avec une abondance relative de 88 %. Le genre *Knufia*, appartenant à la classe des Eurotiomycetes, est principalement présent dans les échantillons en position verticale avec des abondances relatives comprises entre 0 et 45 %.

Les genres fongiques identifiés sur les stèles en position horizontale appartiennent majoritairement aux classes Eurotiomycetes. Au sein des Eurotiomycetes, le genre *Penicillium* représente 75 % des genres identifiés sur l'échantillon ST3H1 et le genre *Coniosporium* a une abondance de 28 % pour l'échantillon ST4H1. Enfin l'échantillon ST11H1 est principalement composé de deux genres majoritaires : *Agonimia* (15 %) et *Verrucaria* (33 %).

Les Lecanoromycetes sont présents, autant en position horizontale que verticale, en proportion importante (jusqu'à 48 %), mais n'ont pas été identifiés jusqu'à l'échelle du genre.

### **Saison estivale**

Les genres fongiques identifiés sur les tombes du Père-Lachaise en saison estivale appartiennent majoritairement au phylum Ascomycota et sont répartis en trois classes : les Dothiedomycetes, les Eurotiomycetes et les Lecanoromycetes (*Figure 42*).

En position verticale, les genres identifiés majoritairement en été sont les mêmes que ceux identifiés en hiver – *Extremus* et *Knufia* – mais sont retrouvés en proportions différentes par rapport à l'hiver (entre 0 et 54 % pour *Extremus* et entre 0 et 70 % pour *Knufia*).

En position horizontale, de même qu'en saison hivernale, les genres identifiés appartiennent majoritairement aux classes Eurotiomycetes. Le genre *Verrucaria* est présent en grande proportion avec des abondances relatives comprises entre 2 et 43 %. L'ordre Chaetothyriales est aussi bien représenté avec une proportion de 20 % au sein de l'échantillon ST11H1, ainsi que le genre *Coniosporium* identifié au sein de l'échantillon ST4H1 avec une abondance relative de 28 %.

De la même manière qu'en saison hivernale, les Lecanoromycetes sont abondants, sans différences significatives en termes d'orientations.

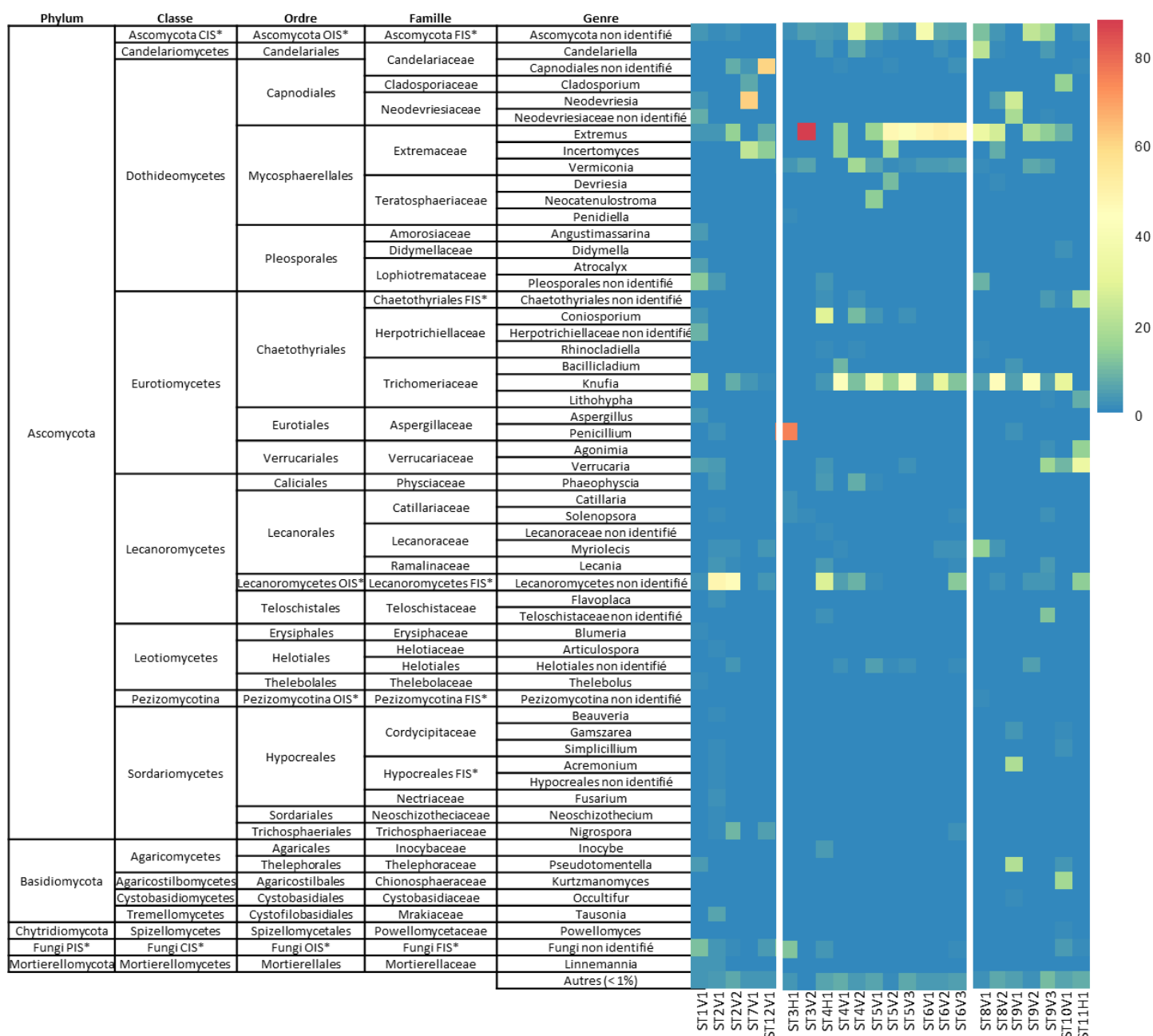


Figure 41: Abondance relative des genres fongiques identifiés sur les tombes du Père-Lachaise en saison hivernale (en %).





### 5.3. Communautés algaires

#### 5.3.1. Analyse de la diversité algaire

##### Alphadiversité

Le Tableau 17 présente différents indices d'alpha-diversité (Richesse observée, Chao1, Shannon et Inverse Simpson) des communautés fongiques identifiées sur les tombes du Père-Lachaise, au cours de deux saisons.

Tableau 17: Indices d'alpha-diversité des communautés algaires identifiées sur les stèles du Père-Lachaise durant deux saisons.

Saisons	Division	Echantillons	Richesse observée	Chao1	Shannon	Inverse Simpson	
Hiver	25	ST1V1	6	6	1,74	5,44	
		ST2V1	16	16	2,32	7,97	
		ST2V2	6	6,33	1,67	4,83	
		ST7V1	13	16	0,64	1,60	
		ST12V1	11	12	1,22	2,18	
	62	ST3H1	2	2	0,48	1,44	
		ST3V2	0	0	0,00		
		ST4H1	23	25	2,13	6,82	
		ST4V1	15	29	1,37	2,56	
		ST4V2	5	5	0,94	1,90	
		ST5V1	13	13	1,52	2,74	
		ST5V2	12	18	0,26	1,13	
		ST5V3	18	19	2,24	7,32	
		ST6V1	15	27	1,84	3,70	
		ST6V2	14	15,2	1,40	2,83	
		ST6V3	32	33	2,80	10,21	
		92	ST8V1	19	47	0,68	1,46
			ST8V2	15	15	1,71	3,88
	ST9V1		0	0	0,00		
	ST9V2		14	14,33	1,98	5,49	
	ST9V3		35	37	2,29	4,95	
	ST10V1		19	19	1,28	2,34	
	ST11H1		7	13	0,77	1,54	
	Eté	25	ST1V1	2	2	0,69	1,98
			ST1V2	8	8	0,65	1,37
ST7V1			7	7	1,35	3,04	
ST12V1			14	14	1,53	3,70	
62		ST3H1	1	1	0,00	1,00	
		ST3V2	12	14,5	1,24	2,46	
		ST3V3	6	7	0,15	1,06	
		ST4H1	5	6	0,50	1,28	

### Chapitre 3 : Etude du vieillissement naturel de la pierre calcaire

	ST4V1	1	1	0,00	1,00
	ST4V2	10	13	0,53	1,35
	ST5V1	2	2	0,37	1,28
	ST5V2	5	5	0,16	1,07
	ST6V1	4	4	1,27	3,25
	ST6V2	14	14,5	0,98	1,83
	ST6V3	15	15	1,94	5,16
	ST8V1	6	6	0,79	1,58
	ST8V2	5	5	1,51	4,13
92	ST9V1	9	9	1,38	2,94
	ST9V2	7	7	1,08	1,94
	ST10H1	8	8,2	0,87	1,54
	ST10V1	17	17	2,21	7,77
	ST11H1	6	6	0,48	1,26

Au sein des échantillons étudiés, les indices d'alpha-diversité varient entre 0 et 35 pour la richesse observée et entre 0 et 37 pour Chao 1. La diversité en algues sur les différents échantillons est donc beaucoup plus faible que la diversité bactérienne et fongique. Par ailleurs, aucun ADN attribué aux algues n'a pu être identifié sur les échantillons ST3V2 et ST9V1.

Les indices de Shannon sont compris entre 0 et 2,29, et la majorité d'entre eux se situe entre 1 et 1,5, indiquant une diversité fongique assez faible. Ces faibles indices suggèrent que les communautés algaires sont dominées par quelques espèces prédominantes.

Les indices d'Inverse Simpson, pour la majorité des échantillons, sont compris entre 1 et 4, indiquant une faible diversité des communautés algaires ainsi que la présence de certaines espèces dominantes. Cependant, certains échantillons tels que ST2V1, ST4H1, ST6V3 (hiver et été) et ST10V1 (été) montrent des indices d'Inverse Simpson supérieurs à 5, ce qui indique que, bien que la diversité algale soit faible, la distribution des différentes espèces identifiées est assez homogène.

Lorsque l'on compare les différents indices en fonction de la saison, les indices de richesse observée et Chao 1 montrent des valeurs plus élevées en hiver qu'en été. Cette différence est également observée pour les indices de Shannon et d'Inverse Simpson.

- ⇒ **La diversité des communautés algaires est plus importante en hiver qu'en été. En revanche, pour les indices de Shannon et d'Inverse Simpson, les différences entre les communautés des deux saisons étudiées ne montrent pas de variations significatives.**

**Betadiversité**

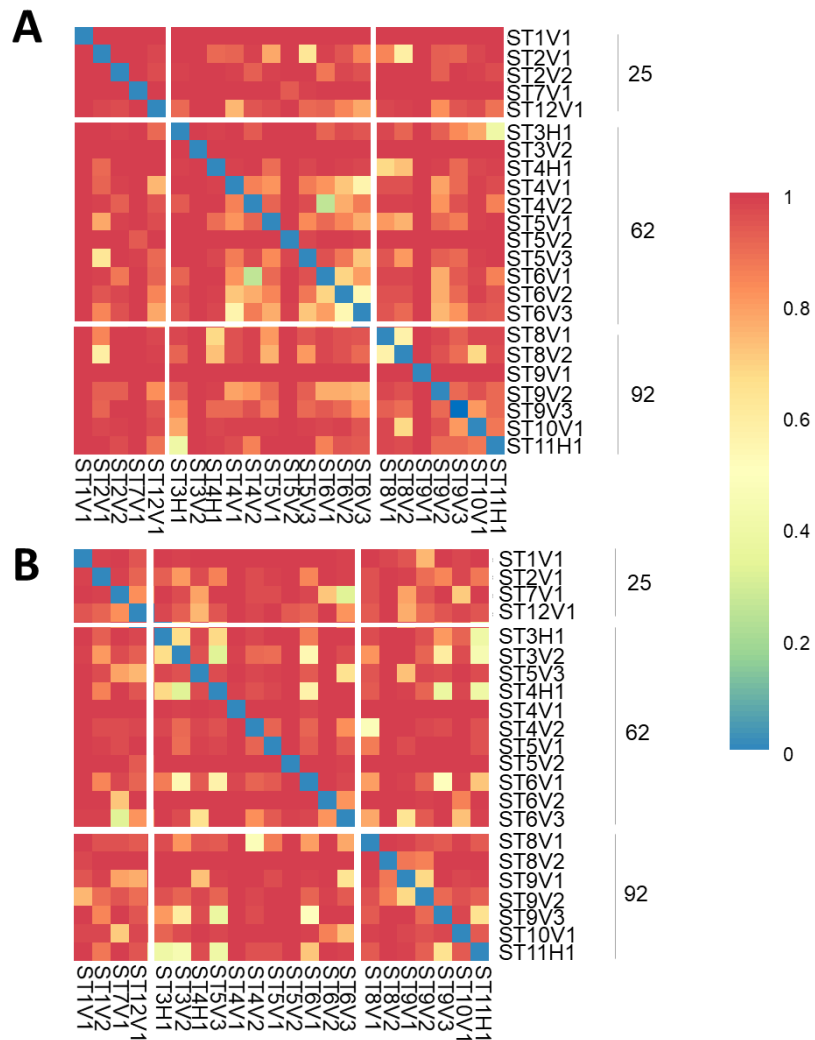


Figure 43: Cartes de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis des communautés algaires pour les différentes stèles en fonction des saisons étudiées : (A) Saison hivernale ; (B) Saison estivale.

**Saison hivernale**

La *Figure 43- A* illustre les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis (BC) entre les communautés algaires identifiées sur les tombes du Père-Lachaise. De manière générale, les teintes sont plutôt rouges pour la comparaison intra et inter-division.

La comparaison des échantillons sur un même monument avec la même orientation montre que généralement les différences moins importantes avec des couleurs orangées notamment pour les stèles ST8 et ST6. Pour les échantillons verticaux, ST1V1 et ST7V1 sont très dissemblables de tous les autres échantillons.

### Saison estivale

La *Figure 43 - B* illustre les indices de bêta diversité de Bray-Curtis entre les différentes communautés algaires identifiées en saison estivale. Globalement, l'ensemble des échantillons sont dissemblable les uns par rapport aux autres. Cependant des similitudes peuvent être remarquées notamment pour les échantillons au sein d'une même tombe comme pour ST3, ST6 et ST9 ou les couleurs sont comprises entre le jaune et l'orangé et donc des distances de Bray Curtis comprise entre 0,6 et 0,8.

- ⇒ **En été et en hiver, les communautés algaires des différents échantillons sont, dans l'ensemble assez différentes, ce qui peut être accentué par le fait que les diversités algaires sont assez faibles dans les échantillons (alphadiversité).**

### 5.3.2. Composition des communautés algaires

#### Phyla

La *Figure 44* illustre les différents phyla algaires identifiés par le séquençages de la région ITS1 du gene codant pour ARN ribosomal ITS. Trois phyla ont pu être identifiés : Chlorophyta, Bryophyta et Ochrophyta. Pour l'ensemble des échantillons le phylum des Chlorophyta est majoritairement retrouvé avec des proportions comprises entre 9 et 100 %. Le phylum des Bryophyta est lui aussi assez abondant dans certains échantillons comme ST1V1, ST2V1, ST2V2, ST5V3 en hiver et ST7V1 et ST6V1 en été avec des proportions comprises entre 5 et 65%.

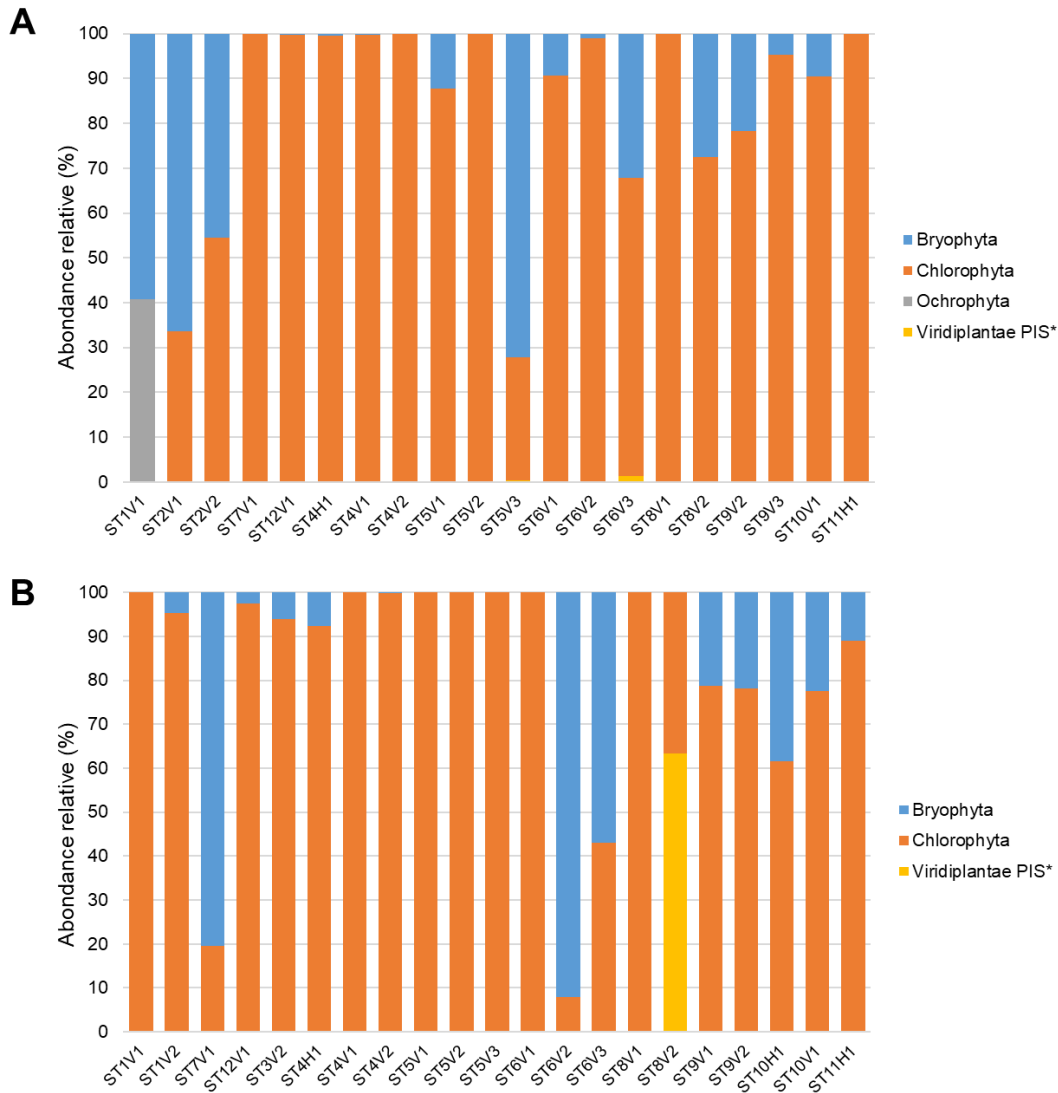


Figure 44: Abondance relative des phyla algaires (en %). (A) en saison hivernale ; (B) en saison estivale.

## Genres

### Saison hivernale

Figure 45 illustre les abondances relatives des genres algaires identifiées sur les tombes du Père Lachaise en saison hivernale. Le genre *Trebouxia* est très abondant sur la majorité des tombes avec des abondances relatives comprises entre 0 et 100 %. Le genre *Tortula* appartenant au phylum des Bryophyta est retrouvé sur la moitié des échantillons avec des abondances relatives comprises entre 0 et 50%. D'autres genres sont retrouvés de manière plus locale tels que *Apatococcus* sur l'échantillons ST5V2, *Grimmia* sur les échantillons ST2V2 et ST5V3, *Trentepohlia* sur l'échantillons ST9V3 ou encore *Chloroidium* sur l'échantillons ST11H1.

### Chapitre 3 : Etude du vieillissement naturel de la pierre calcaire

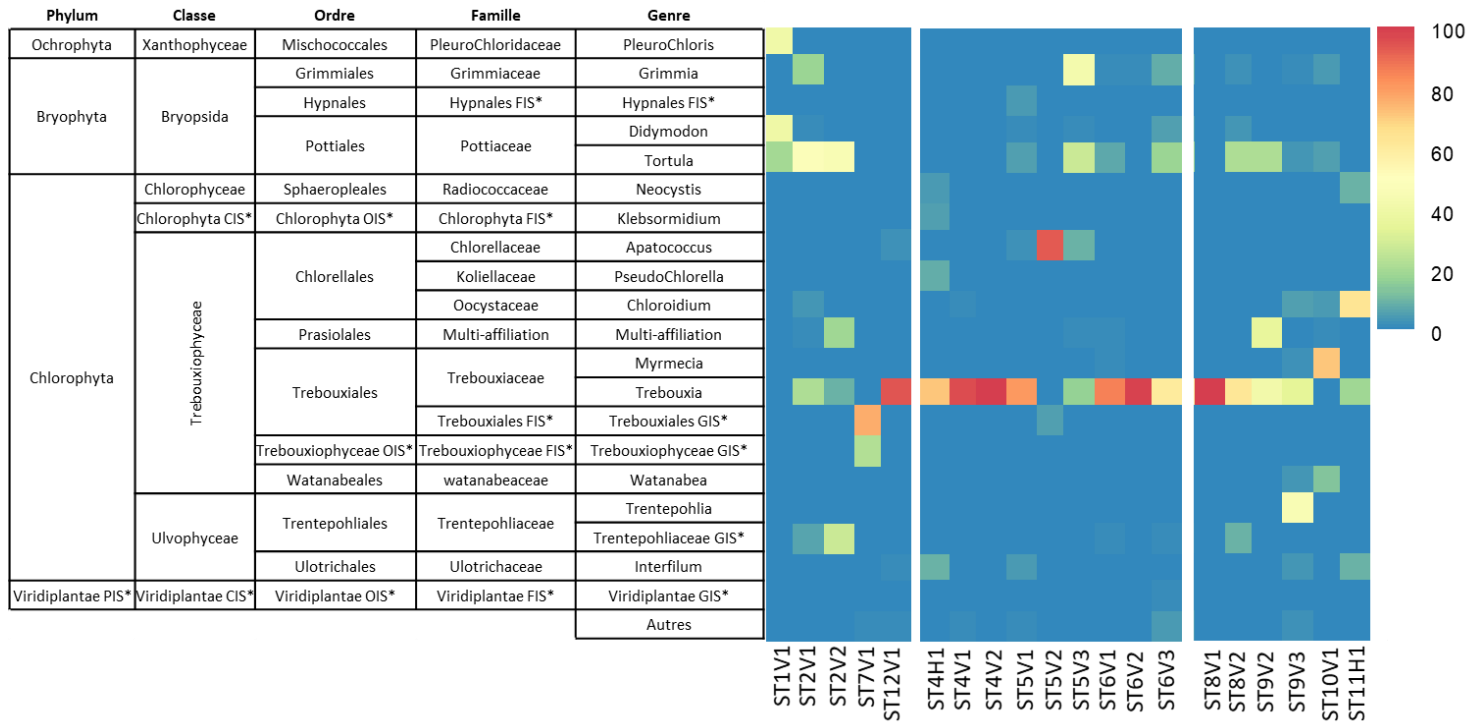


Figure 45: Abondance relative des genres identifiés sur les tombes en saison hivernale (en %).

### Saison estivale

La *Figure 46* représente l'abondance relative des genres algaires identifiés sur les stèles du Père Lachaise durant la saison estivale. Le genre *Trebouxia* appartenant au phylum des Chlorophyta est le plus abondant avec des abondances relatives comprises entre 0 et 98%. Il est retrouvé dans la majorité des échantillons prélevés. D'autres genres tels que *Tortula*, *Klebsormidium* et *Apatococcus* présentes des abondances relatives élevées sur certains échantillons tels que ST1V1, ST1V2, ST7V1 et ST6V1.

Il est aussi intéressant de noter l'absence d'algues sur les échantillons ST3V2 et ST9V1.

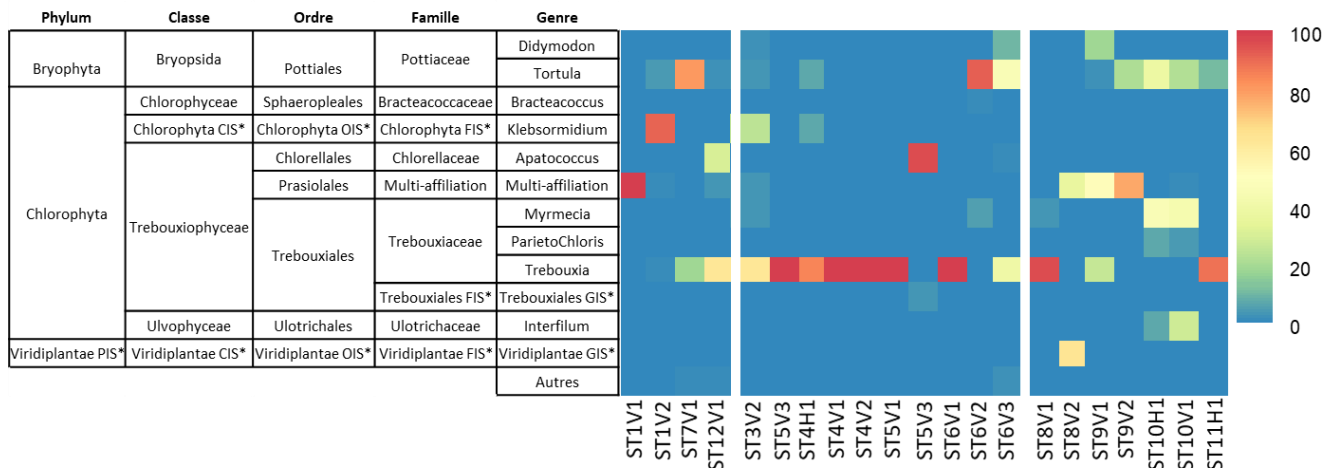


Figure 46: Abondance relative des genres algaires identifiés en saison estivale (en %).

- ⇒ La diversité des genres algaires est plus faible en été qu'en hiver avec la disparition des genres *Trentepohlia*, *Watanabea* et *Chloroidium*
- ⇒ Le genre *Trebouxia* est le genre prédominant sur les tombes du Père Lachaise quel que soit la saison étudiée.

## 6. Corrélations entre les espèces ioniques et les phyla microbiens

L'objectif de cette partie est de voir s'il y a une corrélation entre le substrat, son état de dégradation (présence de gypse) et son contenu ionique, et les communautés microbiennes. Ainsi, différentes analyses statistiques ont été réalisées afin de voir si la bio-réceptivité de la pierre influence les communautés microbiennes présentes en surface. A cause de l'état très dégradé des pierres, ainsi que de la méthode de prélèvement utilisée, les données pétrographiques de la pierre n'ont pas pu être obtenues *in situ*. En se basant seulement sur les types de calcaires identifiés (calcaire à entroques, Lutétien ou fin), aucune influence de la pierre sur la colonisation biologique n'a pu être établie. En revanche, en se basant sur la composition ionique de la fraction soluble ainsi que les phyla microbiens identifiés en surface, différentes analyses en composante principale ont été effectuées.

### 6.1. Bactéries

L'analyse des données a mis en évidence un effet saisonnier sur les diversités bactériennes avec notamment une importante diversité en saison hivernale (indices d'alpha-diversité : Richesse observée et Chao 1). Deux analyses en composantes principales (ACP) reliant les compositions ioniques et les phyla bactériens ont donc été réalisées en fonction des saisons (Figure 47 et Figure 48).

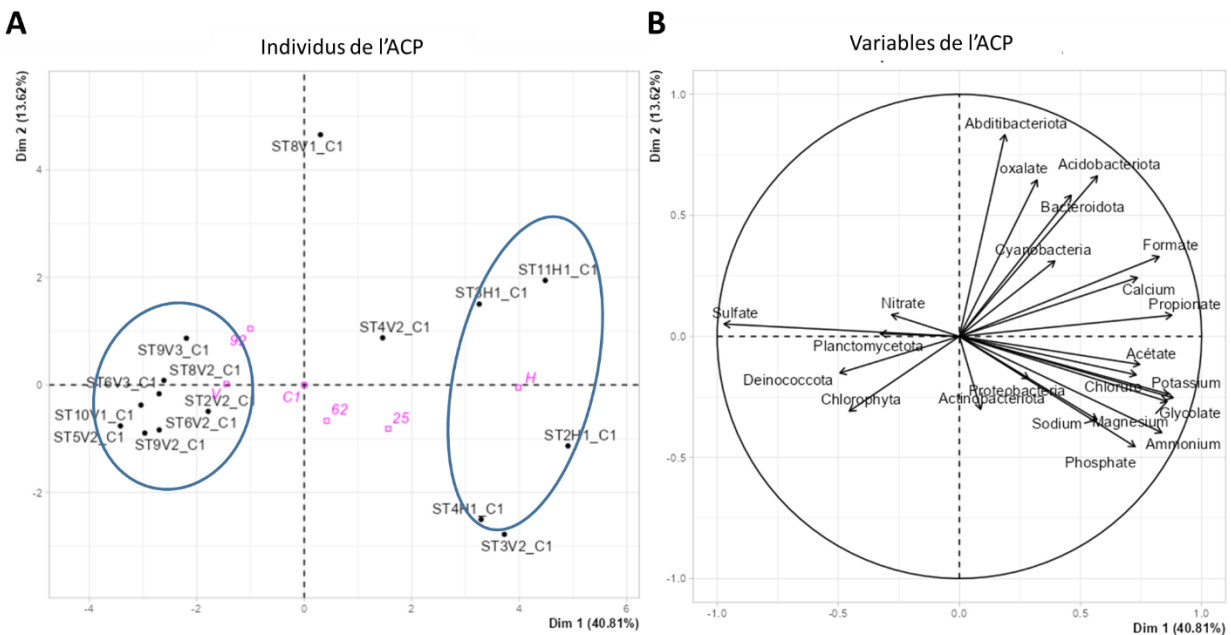


Figure 47 : Analyse en composantes principales des phyla bactériens et des ions solubles en saison hivernale.



### Chapitre 3 : Etude du vieillissement naturel de la pierre calcaire

La Figure 47 représente les phyla bactériens ainsi que les concentrations des ions présents sur les tombes identifiées durant la campagne de prélèvement hivernale. La Figure 47 - A montre deux groupes distincts composés principalement des échantillons prélevés en position horizontale et en position verticale. L'examen des variables (Figure 47 - B) montre que les échantillons verticaux présentent des concentrations en ions sulfates et nitrates assez importantes. Ces concentrations sont corrélées avec un nombre important d'OTU provenant des phyla Deinococcota, Chlorophyta et Planctomycetota.

Les échantillons horizontaux présentent quant à eux des concentrations plus importantes en anions organiques, en calcium, ammonium et potassium. Les phyla corrélés avec ses ions sont les Actinobacteriota, les Proteobacteria, les Cyanobacteria, les Bacteroidota et les Acidobacteriota.

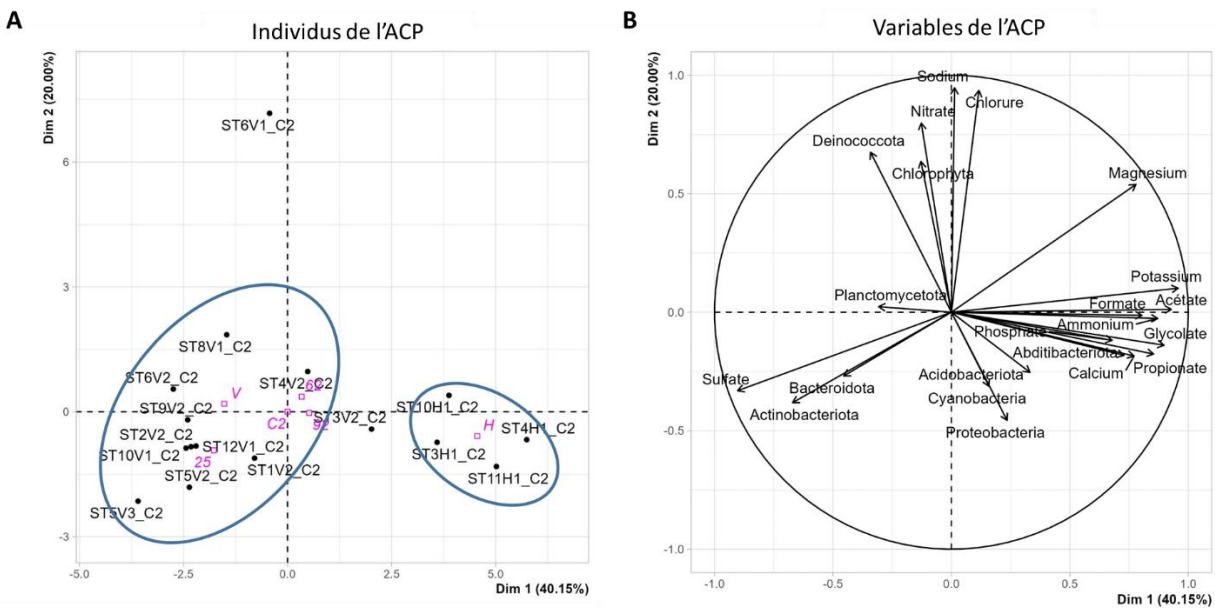


Figure 48 : Analyse en composantes principales des phyla bactériens et des ions solubles en saison estivale.

La Figure 48 a été établie de la même manière en pour la campagne de prélèvement estivale. La Figure 48 - A met à nouveau en évidence deux groupes distincts, composés respectivement d'échantillons prélevés en position horizontale et verticale. Le groupe constitué des échantillons prélevés en verticale montre des concentrations importantes en sulfates et est majoritairement composé de Bacteroidota et d'Actinobacteroidota. Le groupe composé des échantillons en position horizontale montre des concentrations plus importantes en calcium et en ammonium, ainsi qu'en anions organiques. Le phylum des Chlorophyta est particulièrement bien corrélé avec les concentrations élevées en nitrate en saison estivale.

⇒ **Les ACP montrent des résultats assez similaires en fonction des deux saisons étudiées, avec une séparation des groupes en fonction de leurs orientations.**

## 6.2. Champignons

Nous avons vu précédemment que les communautés fongiques sont principalement composées d'Ascomycota. Un effet saisonnier a été remarqué, avec des indices d'alpha-diversité plus importants en hiver qu'en été (Richesse observée et Chao 1).

L'analyse en composante principale réalisée pour les données de la saison hivernale (Figure 49) évalue les corrélations entre les contributions des différentes classes d'Ascomycetes et la composition des fractions solubles. Le facteur position semble encore une fois être déterminant dans cette analyse (Figure 49 - A). Comme montré auparavant, le développement des Dothideomycetes est favorisé en position verticale tandis que les Eurotiomycetes sont en position horizontale.

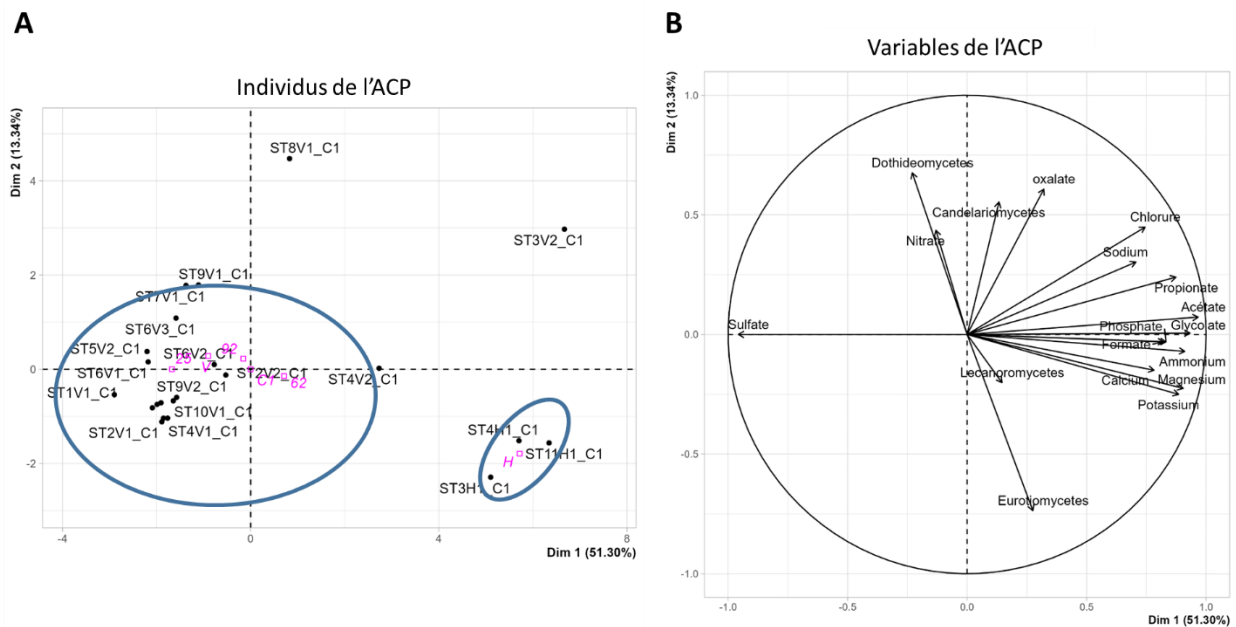


Figure 49 : Analyse en composantes principales représentant les classes des Ascomycota et les ions solubles des échantillons en saison hivernale.

## 7. Discussion

Les études menées sur des échantillons altérés sur le court terme permettent non seulement de comparer les temps d'altération et d'évaluer pour chacun la contribution de la colonisation biologique et de la pollution sur l'altération physico-chimique, mais aussi de comparer nos données à la littérature afin d'évaluer l'influence du milieu sur la sélection des communautés bactériennes (biosélectivité).

### 7.1. Bilan comparatif de la colonisation biologique et de l'altération sur le court et long terme

#### 7.1.1. Faciès d'altération généraux

### Chapitre 3 : Etude du vieillissement naturel de la pierre calcaire

Pour étudier le vieillissement de la pierre à court terme, des coupons de calcaire ont été exposés pendant 5 ans au cimetière du Père-Lachaise dans différentes conditions (horizontale et verticale ; abritée de l'impact direct des pluies et non abritée). Le Tableau 18 résume les résultats principaux d'altération ainsi que de colonisation biologique après cinq ans d'exposition.

Tableau 18: Tableau récapitulatif des résultats principaux d'exposition de coupons de calcaire pendant cinq ans au cimetière du Père-Lachaise.

<b>Abrité</b>	<b>Non abrité</b>	
<b>Horizontal &amp; vertical</b>	<b>Horizontal (H)</b>	<b>Vertical (V)</b>
Pas de changement chromatique Peu microorganismes Néof ormation de $\text{KNO}_3$ $[\text{Ca}^{2+}]$ et $[\text{NO}_3^-]$ élevées en solution après élution	Patine verte Microorganismes +++	
	Mousses ++ Bactéries ++ Champignons +	Mousses - Bactéries + Champignons ++

Les faciès d'altération identifiés sont principalement chromatiques pour les coupons exposés à l'impact direct des pluies (EH et EV). Sur ces échantillons, se développe une patine verte, induite par la croissance de microorganismes photosynthétiques. De plus, sur les coupons horizontaux s'ajoute un développement de mousse. Pour les coupons abrités, la couleur du calcaire reste relativement identique, mais du point de vue chimique,  $\text{KNO}_3$  a été identifié. Les analyses en microscopie, ainsi qu'en DRX n'ont pas permis de mettre en évidence une altération physico-chimique notable, hormis la pénétration des rhizoïdes des mousses dans le calcaire.

L'étude réalisée sur les tombes du Père-Lachaise avait pour but d'identifier les faciès d'altérations ainsi que les communautés microbiennes présentes sur ces témoins de 200 ans d'altération en environnement végétalisé et pollué. Elle a été réalisée suivant trois angles de recherches afin de comprendre s'il existe un effet de la localisation et de l'environnement proche (effet de la division), de l'orientation (horizontal ou vertical) ainsi que de la saison (hiver et été), notamment sur la composition des communautés microbiennes. Le

*Tableau 19* récapitule de principaux résultats obtenus en fonction de ces trois paramètres.

Tableau 19: Tableau récapitulatif des principaux résultats en fonction des trois paramètres étudiés : la division, l'orientation et la saison.

<b>Division 25 / 62 / 95</b>	<b>Orientation H / V</b>	<b>Saison E (été) / Hi (hiver)</b>
	Gypse en position verticale $[\text{Sulfate}] : \text{V} > \text{H}$ $[\text{ammonium}]$ , $[\text{calcium}]$ , $[\text{phosphate}]$ , $[\text{anions organiques}] : \text{H} > \text{V}$	$[\text{anions organiques}] : \text{Hi} > \text{E}$
Nb. microorganismes : 25 > 62 - 95 $\alpha$ -div : 25 > 62-95	Nb. microorganismes : $\text{H} > \text{V}$ Activité enzymatique : $\text{H} > \text{V}$	Nb. champignons : $\text{Hi} > \text{E}$ $\beta$ -div bactérienne + fongique très différente $\text{Hi} - \text{E}$ $\alpha$ -div : $\text{Hi} > \text{E}$

Les échantillons anciens ont été principalement prélevés en conditions non abritées. Ils présentent des patines plutôt verdâtres dans la division 25 et grise à noire dans les divisions 62 et 95. De plus, la présence de mousses est observée principalement sur les échantillons horizontaux. Du point de vu physico-chimique, la présence de croûtes salines a été identifiée sur plus d'un tiers des échantillons.

### 7.1.2. Colonisation biologique

Les coupons abrités ne présentent pas de changement chromatique, ce qui est en accord avec les données de dénombrement microbien, montrant un nombre de bactéries et de champignons systématiquement supérieur sur les coupons non abrités (

Tableau 19). En position non abritée, le nombre de bactéries est plus important en horizontal qu'en vertical, contrairement au nombre de champignons plus élevé en horizontal. Cela est cohérent avec le fait que les bactéries sont particulièrement présentes dans les zones où l'eau est disponible (Wakefield and Jones, 1998) et donc sur les surfaces horizontales qui augmentent le temps de rétention (Th. Warscheid and Braams, 2000).

Eyssautier-Chuine et al., (2021) a étudié la colonisation biologique sur trois types de calcaires Ditrupa, Savonnière et Courville. Après 2,5 ans d'exposition, cinq genres bactériens ont été isolés et identifiés sur les trois types de calcaires : *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas* et *Microbacterium*. Dans cette étude, les genres *Rhodococcus*, *Arthrobacter* et *Microbacterium* ont pu être identifiés, sur les coupons exposés aux pluies orientés horizontalement en proportion très faibles.

Sur les coupons, deux espèces de mousses (bryophytes) ont été identifiées par NGS sur les échantillons non abrités horizontaux. Il s'agit des espèces *Bryum argenteum* et *Nyholmiella obtusifolia* (données non montrées) qui sont fréquemment observées en France (Hodgetts and Lockhart, 2020). Leur présence seulement en position horizontale s'explique par les conditions de développement de mousses qui nécessitent un fort apport en eau (et en humidité) pour leur croissance. La position horizontale favorise donc la stagnation de l'eau contrairement à la position verticale (Proctor, 1990).

Sur les tombes anciennes non abritées des pluies, la colonisation biologique semble être principalement régie par l'orientation. En effet le dénombrement bactérien et fongique (cultivable hétérotrophe) montre un nombre de microorganismes, ainsi qu'une activité enzymatique, beaucoup plus importante sur les échantillons en position horizontale. Cela est cohérent avec une présence d'eau plus importante et plus longue, qui peut tout de même varier en fonction des propriétés pétrophysique de la pierre, et sa capacité à capter et restituer l'eau au cours du temps. Un effet de la division est seulement visible sur le nombre de bactéries qui est plus important dans la division végétalisée. Quant à l'effet saisonnier, celui-ci est principalement visible sur le nombre de champignons qui semble être plus important en été qu'en hiver. Cela pourrait être induit par la capacité des champignons à se développer dans des conditions d'humidité relative plus faible que les bactéries.

La diversité bactérienne peut également être comparée. Afin de la caractériser, deux indices (alpha-diversité et bêta-diversité) ont été utilisés. L'indice d'alpha-diversité correspond au nombre d'OTU identifiées (la richesse) dans les échantillons. Les résultats montrent que cet indice n'est pas affecté par la position même si le nombre de bactéries cultivables hétérotrophes est plus élevé en position horizontale. La richesse bactérienne semble être favorisée dans la division végétalisée, ce qui pourrait être expliqué par l'effet d'un microclimat qui pourrait prévenir de l'effet de l'évaporation d'eau et ainsi faciliter le développement microbien. Enfin, la richesse bactérienne semble être sensible à l'effet saisonnier, avec une plus grande richesse (richesse observée et Chao1) en hiver qu'en été pour la majorité des échantillons. Encore une fois, l'apport en eau notamment en hiver pourrait être le facteur majeur conduisant à une prolifération bactérienne plus

importante. L'indice de bêta-diversité permet d'évaluer la similarité ou non de deux échantillons en termes d'abondance d'OTU. La comparaison des communautés bactériennes en hiver et en été a montré des indices de bêta-diversité très important pour un même échantillon, indiquant ainsi de fortes variations des communautés bactériennes en fonction de la saison.

### 7.1.3. Comparaison des communautés microbiennes sur le court et long terme

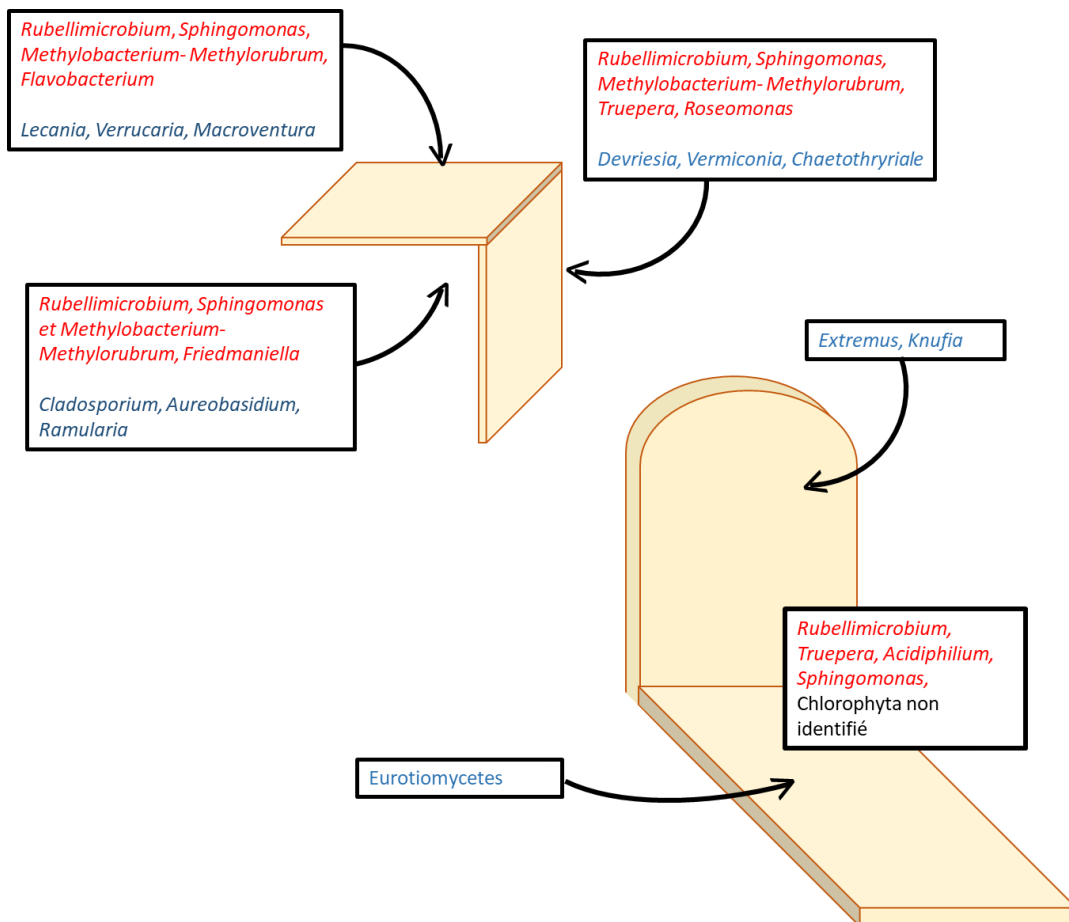


Figure 50: Schéma récapitulatif des genres bactériens (en rouge) et fongiques (en bleu) retrouvés sur les coupons et les tombes du Père Lachaise.

Les communautés bactériennes et fongiques ont été représentées à l'échelle taxonomique des phyla et des genres afin de faciliter la lecture étant donné que de nombreuses multi-affiliations à l'échelle des espèces sont présentes.

- Les bactéries

Sur les coupons, 5 phyla bactériens ont été identifiés comme étant majoritaires dans l'ensemble des échantillons : Actinobacteria, Bacteroidota, Deinococcota, Cyanobacteria et Proteobacteria. Pour les tombes, 6 phyla bactériens ont été identifiés majoritairement : Abditibacteriota, Actinobacteriota, Bacteroidota, Cyanobacteria, Deinococcota et Proteobacteria. Ces phyla sont

majoritaires pour les deux saisons étudiées, mais leurs proportions varient. Les phyla Bacteroidota et Abditibacteriota représentent une plus grande proportion des communautés identifiées en hiver et les microorganismes phototrophes (Cyanobacteria et Chlorophyta) en été, ce qui est en accord avec les observations de Nir et al. (2019) qui montrent que dans le désert du Negev les Bacteroidota sont plus abondantes en hiver et les Cyanobacteria en été.

A court et long termes, les mêmes genres principaux sont retrouvés : *Rubellimicrobium*, *Sphingomonas*, *Truepera* (Figure 50). Ces genres sont fréquemment retrouvés sur les monuments en pierre (Li et al., 2016; Mihajlovski et al., 2017; Coelho et al., 2021).

- ⇒ Ainsi, de manière générale, les mêmes phyla sont identifiés sur les échantillons exposés à court et long terme. L'apparition de 2 phyla supplémentaires sur les tombes peut s'expliquer par des variations. Pour les échantillons exposés à court terme différentes espèces de Chlorophyta ont été identifiées tels que *Planctonema lauterbornii*, *Myrmecia israeliensis*, *Ettlia pseudoalveolaris* ou encore *Xylochloris irregularis* (données non montrées), mais en proportions très faibles (< 1 %) ce qui explique leur absence sur les graphiques. Malgré leurs faibles abondances en termes d'OTU, les Chlorophyta présents induisent une forte patine verte sur les échantillons exposés (H et V).
- ⇒ Le fait que les communautés soient affectées par la saison met en évidence que les bactéries identifiées sont représentatives des conditions environnementales actuelles et ont pu de fait évoluer au cours du temps. Certes, on ne peut donc pas connaître les conditions passées mais on peut établir de manière plus précise des corrélations avec l'environnement actuel.
- ⇒ **Les échantillons altérés 5 ans en atmosphère réelle ne présentent pas de trace notable d'altération hormis la colonisation biologique qui induit un changement chromatique et une possible altération physique des mousses sur les échantillons non abrités de la pluie. L'altération est en revanche visible sur les échantillons anciens avec notamment la présence sur plus d'un tiers des échantillons de croûte saline composée de gypse. De plus de nombreuses patines colorées (verte, violette, grise, noire) sont visibles sur la quasi-totalité des échantillons. La colonisation biologique est relativement similaire sur les échantillons altérés sur le court et long terme. On retrouve une patine verte sur les surfaces verticales et des mousses en position horizontale. Ces différences sont induites par la présence d'eau qui va également varier en fonction des saisons. La colonisation biologique est donc rapide à se mettre en place alors que l'altération chimique est plus lente et donc plus difficile à observer sur le court et long terme.**

### 7.2. Sélection des communautés par l'environnement

À l'échelle des échantillons étudiés au cimetière du Père Lachaise, aucun effet du type de calcaires (bio-réceptivité) n'a pu être mis en évidence sur la composition des communautés microbiennes.

#### 7.2.1. Les bactéries : le rôle de l'eau

L'étude des genres permet de mettre en évidence le rôle de l'environnement et en particulier de l'eau.

Ainsi, le genre *Flavobacterium* est présent majoritairement sur les coupons horizontaux, et plus particulièrement non abrités. Ce genre est fréquemment associé aux systèmes aquatiques (Li et al., 2016). Il est donc cohérent de le retrouver en proportion importante en position horizontale, position favorisant la rétention d'eau (Bernardet and Bowman, 2006). Ce genre *Flavobacterium* est fréquemment observé sur des faciès de bio-altération (Tayler and May, 1991; Pinheiro et al., 2019; Coelho et al., 2021; Y. Zhang et al., 2023).

Certains genres sont présents en hiver et en été : *Truepera*, *Acidiphilium*, *Rubellimicrobium*, *Sphingomonas*, ainsi que des genres non identifiés appartenant à la famille des Chroococciopsidaceae. Ces genres sont également souvent identifiés sur les monuments en pierre indépendamment du facteur saisonnier (Li et al., 2016; Dyda et al., 2021). Ces genres semblent donc être relativement ubiquistes.

Les genres algaires montrent des variations saisonnières importantes. La diversité algaire est plus importante en hiver qu'en été sur les tombes, cela est montré par les indices d'alpha-diversité, mais aussi par le nombre de genres algaires plus important. En parallèle, en été, l'abondance relative des Cyanobacteria sur les tombes est plus importante.

En hiver, une patine verte est visible sur les monuments en pierre, notamment induite par un apport en eau plus important et une irradiation solaire plus faible. En été, les algues vertes pourraient être remplacées, notamment par des cyanobactéries, beaucoup plus résistantes au phénomène de dessiccation ainsi qu'à une irradiation solaire plus importante. Ce changement de communautés peut induire un changement de couleur de la patine pouvant aller vers des teintes orangées voire violettes.

- ⇒ **Les communautés bactériennes sont donc fortement influencées par l'apport en eau, favorisant ainsi en hiver les genres nécessitant des apports en eau plus importants et en été les microorganismes plus tolérants à la dessiccation comme les cyanobactéries.**

### 7.2.2. Les champignons : le rôle de l'eau et du rayonnement solaire

En position abritée, les genres *Cladosporium*, *Aureobasidium* et *Ramularia* sont très présents. Ce sont des hyphomycètes, c'est-à-dire des champignons dont les hyphes se développent au sein du réseau poreux de la pierre. Les genres *Cladosporium* et *Aureobasidium* sont fréquemment identifiés sur les monuments en pierre sous climat tempéré humide (Pinheiro et al., 2019; Rosado et al., 2020; Paiva et al., 2022). Ils ont donc besoin d'humidité mais sont relativement ubiquistes.

En position non abritée, les communautés fongiques sont très différentes en fonction de l'orientation verticale ou horizontale. Les coupons horizontaux sont colonisés principalement par les genres *Lecania*, *Verrucaria* et *Macroventuria*. *Lecania* et *Verrucaria* sont des genres fongiques lichénisés, c'est-à-dire vivant en symbiose avec des microorganismes phototrophes, formant ainsi des lichens. Le genre *Lecania* correspond à un lichen crustacé fréquemment retrouvé sur les pierres (Saiz-Jimenez, 1984; Reese Næsborg et al., 2007; Essilmi et al., 2019; Dyda et al., 2021). Dans l'étude de Fuentes et al. (2021), les lichens sont principalement retrouvés sur les surfaces les plus exposées au rayonnement solaire, ce qui est en accord avec notre étude où les champignons lichénisés se retrouvent principalement en position non abritée horizontale. En effet les champignons lichénisés ont une forte capacité à résister aux surfaces exposées à un fort rayonnement solaire (Kranner et al., 2008). Le genre *Verrucaria* a notamment été identifié en Pologne sur des tombes en grès et en calcaire (Owczarek-Kościelniak et al., 2020). Les coupons verticaux sont eux colonisés par les genres *Devriesia*, *Vermiconia* et la famille des

Chaetothyriales. Les genres *Devriesia* et *Vermiconia* sont des champignons noirs, communément appelés « black fungi ». Ils sont identifiés sur les monuments en pierre, notamment en marbre (Sterflinger, 1995; Sterflinger and Krumbein, 1997; Seifert et al., 2004; Li et al., 2018; Coleine and Selbmann, 2021; De Leo et al., 2022).

Enfin les communautés fongiques étudiées montrent une prédominance des phyla Ascomycota et Basidiomycota, en accord avec Li et al. (2016) sur les pierres calcaires. Les genres *Knufia* et *Extremus* sont identifiés dans la majorité des échantillons verticaux en hiver comme en été. Le genre *Knufia* correspond à un champignon noir et a été identifié sous deux formes au sein de l'ensemble des échantillons *Knufia sp.* et *Knufia marmoricola*. Ce genre est souvent noté sur les monuments en pierre, notamment ceux composés de calcaire et de marbre (Owczarek-Kościelniak and Sterflinger, 2018; De Leo et al., 2019; Owczarek-Kościelniak et al., 2020; Isola et al., 2022; Toreno et al., 2024). Le genre *Knufia* correspond à un genre très résistant au stress climatique, ce qui explique notamment sa forte présence en été et en hiver sur les surfaces verticales où la variation hydrique de la pierre est plus importante (Breitenbach et al., 2018). Enfin, le genre *Extremus* est présent sous deux espèces dans cette étude : *Extremus sp.* et *Extremus adstrictus*. *Extremus adstrictus* a été retrouvé sur un mur en dolomite en Pologne ainsi que sur des formations calcaires à Mallorca en Espagne (Owczarek-Kościelniak, 2020). Ponctuellement, d'autres genres fongiques tels que *Penicilium*, *Neodevriesia*, *Coniosporium*, *Acremonium* et *Vermiconia* ont été identifiés sur différents échantillons. La majorité de ses genres sont des black fungi, fréquemment retrouvés sur des calcaires ou sur du marbre (Isola et al., 2016).

L'étude de Toreno et al., (2024) a étudié la recolonisation de statue en calcaire neuf ans après son nettoyage par des biocides. Les genres fongiques retrouvés après nettoyage sont principalement des « black fungi ». Les communautés fongiques issues de cette recolonisation sont plus proches de celle retrouvée sur les tombes du Père-Lachaise, notamment avec la prédominance du genre *Knufia*, que de celle retrouvée sur les coupons exposés pendant cinq ans.

⇒ **Les champignons, notamment les « black fungi » peuvent survivre à des conditions plus extrêmes et semblent donc moins dépendants des facteurs environnementaux.**

### 7.3. Interactions pollution - microorganismes

Les échantillons en position abritée et/ou verticale sont plus soumis au dépôt sec des polluants gazeux (NO<sub>x</sub>, SO<sub>2</sub>). Des variations en fonction de l'orientation peut donc révéler leur rôle sur les communautés bactériennes.

- Le cycle de l'azote

Après 5 ans d'exposition, les genres *Flavobacterium*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Roseomonas*, *Friedmaniella*, *Nocardoides* et *Marmoricola* sont retrouvés en proportion importante, quelles que soient leur position et/ou leur orientation. Une grande majorité de ses genres sont en mesure d'utiliser les composés azotés et notamment les nitrates comme source de nutriments (Zhang et al., 2008; Iwai et al., 2010; Cui et al., 2013; Cua and Stein, 2014). Ils sont donc capables de dégrader les nitrates. Les genres *Truepera* et *Roseomonas*, sont plutôt en position verticale. L'espèce *Roseomonas vinacea* qui représente environ 50 % des *Roseomonas* retrouvées en position abritée (où la concentration en nitrates est plus importante) peut réduire les nitrates en nitrites (Zhang et al., 2008). Le genre *Truepera* principalement retrouvé en position



non abritée et verticale est aussi une bactérie dénitrifiante (Huang et al., 2019; Shi et al., 2022; Fan et al., 2022; Zhao et al., 2023; Zhang et al., 2024). Sur les tombes anciennes, les genres bactériens *Truepera* et *Rubellimicrobium* sont également retrouvés.

En revanche, les membres de l'ordre des Rhizobiales connus pour être des fixateurs d'azote atmosphérique transformant le  $N_2$  atmosphérique en  $NH_3$  qui sera sous forme  $NH_4^+$  en présence d'eau sont peu présents. Les genres appartenant à cet ordre tels que *Mesorhizobium* ou encore *Aureimonas* sont en effet en proportion inférieure à 2 % dans les communautés microbiennes des tombes du Père-Lachaise. La concentration en ion ammonium, plus importante en position horizontale, ne serait donc pas induite par une plus forte proportion de microorganismes fixateurs d'azote, mais plutôt par la pollution ou par l'eau de pluie qui a de plus fortes chances de stagner dans cette position.

Pour les champignons, le genre *Cladosporium* a été identifié par plusieurs études comme étant un des premiers champignons colonisateurs des pierres calcaires en milieu urbain pollué (Pitzurra et al., 2003; Moroni et al., 2004; Moroni and Pitzurra, 2008). De plus, certaines études ont montré une corrélation entre le genre *Cladosporium* et les bactéries impliquées dans le cycle de l'azote (Gardner et al., 2022; Y. Zhang et al., 2023), ce qui est concordant avec les données en position abritée. Le genre *Ramularia*, est majoritairement représenté par l'espèce *Ramularia Pratensis*. Cette espèce est considérée comme un hyphomycète phytopathogène et est capable d'utiliser les nitrates comme source d'azote pour leur croissance (Fries and Gunnerbeck, 1981). L'étude d'Essilmi et al. 2019 a mis en évidence que la croissance de l'espèce *Lecania erysibe* était favorisée à de forts taux de pollution azotée.

Par ailleurs, que cela soit à court ou à long temps d'exposition, la présence de patine verdâtre est fréquemment visible. Cette patine est principalement induite par la présence de microorganismes photosynthétiques telles que les algues vertes et les cyanobactéries. Ces microorganismes utilisent les composés azotés comme sources de nutriments. D'après les discussions avec les conservateurs du Père-Lachaise, les phénomènes de verdissement des monuments et principalement des tombes sont assez récurrents depuis une vingtaine d'années. Plusieurs auteurs expliquent ce phénomène de verdissement par un effet de la pollution atmosphérique et notamment par la baisse de  $SO_2$  couplé à une stagnation voire à une augmentation des  $NO_x$  (Galloway et al., 2004; McCabe et al., 2011; Smith et al., 2011; Cutler et al., 2013b). Cet effet d'eutrophisation des algues provoqué par les pollutions azotées expliquerait cette patine verte très importante sur les coupons de calcaire après 5 ans d'exposition.

⇒ **La présence de certains genres majoritaires montre le que les communautés bactériennes sont en mesure de s'adapter à une source de pollution majeure actuelle, les  $NO_x$ .**

- Altération chimique vs. biologique

Du point de vue de l'altération physico-chimique, des différences notables sont visibles entre les coupons de calcaire exposé pendant 5 ans à l'atmosphère parisienne et les tombes du cimetière du Père-Lachaise datant de 200 ans. Dans le cas des tombes, la formation de gypse a été identifiée sur un tiers des échantillons étudiés. Celui-ci avait aussi été observé par Balland-Bolou-Bi et al. (2016) sur la stèle d'une tombe dans ce même cimetière. Le gypse est un sel fréquemment rencontré sur les monuments en pierre calcaire (Bonazza et al., 2007; Balland-Bolou-Bi et al., 2016; Saheb et al., 2016). Ce sel se forme à la surface des calcaires en présence de forte concentration en  $SO_2$  atmosphérique (Camuffo et al., 1983). Au cours du XIXème et du XXème siècle, le  $SO_2$  atmosphérique était l'une des principales causes de pollution, ayant entraîné

plusieurs épisodes de smog en Europe et aux États-Unis. Il était également en fortes concentrations à Paris (AIRPARIF, 2020). Mais sa concentration a fortement diminué depuis les années 1950 grâce aux politiques de réduction de la pollution soufrée (par les industries). Sur les coupons exposés sur la période 2016-2021, la formation de gypse n'est pas observée. Cependant, l'analyse par chromatographie ionique des éluions provenant des différents échantillons a montré de fortes proportions de sulfates solubles sur l'ensemble des échantillons verticaux, ce qui est cohérent avec la présence de gypse, provenant probablement de sa dissolution.

- ⇒ Il est donc possible que 5 ans d'exposition ne soient pas suffisants pour former du gypse, d'autant plus que les conditions atmosphériques actuelles sont beaucoup moins favorables que par le passé. Des études ont en effet montré que la formation de gypse à la surface de la pierre calcaire dépendait du ratio entre le  $\text{SO}_2$  et le  $\text{NO}_2$  atmosphérique (Moroni et al., 2004; Gibeaux et al., 2018). L'étude de Moroni et al. (2004), montre que pour un ratio  $\text{SO}_2/\text{NO}_2$  inférieur à 1:6, aucune formation de gypse n'est visible. Les données de Brimblecombe et Lefèvre (2021) indiquent que les concentrations moyenne annuelle de  $\text{SO}_2$  et  $\text{NO}_2$  à Paris en 1950 étaient respectivement de  $225 \mu\text{g.m}^{-3}$  et de  $50 \mu\text{g.m}^{-3}$ , équivalent à un ratio de  $\text{SO}_2/\text{NO}_2$  de 4:1 contre un ratio de 1:30 en 2013 (données AIRPARIF, moyenne annuelle en  $\text{SO}_2$  :  $1 \mu\text{g.m}^{-3}$  et  $\text{NO}_2$  :  $30 \mu\text{g.m}^{-3}$ ). Les concentrations actuelles en  $\text{SO}_2$  et  $\text{NO}_2$  ne permettraient donc pas la formation de gypse, ce qui est en accord avec son absence sur les échantillons exposés entre 2016 et 2021. Par ailleurs, la diminution du  $\text{SO}_2$  atmosphérique augmente la proportion relative d'autres polluants tels que les  $\text{NO}_x$  ou encore le  $\text{NH}_4^+$ .

Toutefois, le gypse présent sur les surfaces verticales des tombes peut influencer le développement des microorganismes. Les genres majoritaires sur les calcaires du Père-Lachaise sont *Acidiphilium* et *Rubellimicrobium*, ainsi que les Chlorophyta et des Cyanobacteria n'ayant pas été identifiés jusqu'à l'échelle du genre. Le genre *Acidiphilium* est connu pour sa capacité à oxyder les composés soufrés, entrant donc dans le cycle du soufre (Rohwerder and Sand, 2003). Cela est donc cohérent avec la présence de gypse sur les tombes du Père-Lachaise. Comme expliqué précédemment, les concentrations très faibles en  $\text{SO}_2$  ne permettent pas la formation actuelle de gypse. Le gypse retrouvé sur un tiers des tombes étudiées au cimetière du Père Lachaise correspondrait donc à des vestiges de pollution passée, notamment au cours du XXème siècle. Cependant l'étude de Moroni et Pitzurra (2008) a mis en évidence que la formation de gypse peut continuer en absence de  $\text{SO}_2$  atmosphérique en respectant certaines conditions : (1) une formation de gypse préexistante, (2) la présence de champignons (ex : *Cladosporium*), qui dans des conditions de vie optimales (humidité relative importante), libèrent des acides organiques capable de mobiliser les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  du gypse, et enfin (3) une forte humidité relative qui engendre des phénomènes de dissolution et re-précipitation pouvant entraîner la croissance de gypse.

Sur les coupons, une phase – le  $\text{KNO}_3$  – à tout de même été identifiée. Celle-ci avait notamment été observée sur une stèle du cimetière du Père-Lachaise par Balland-Bolou-Bi et al. (2016), ainsi que sur de nombreux autres monuments en pierre notamment en Pologne (climat tempéré) et en Egypte (climat désertique aride à semi-aride) (Marszałek et al., 2019; Magdy Abdullah et al., 2023). Le  $\text{KNO}_3$  n'a pas été identifié par nos analyses sur les tombes du Père Lachaise, cela pourrait être dû soit par son absence soit par sa présence en très faible proportion le rendant quasiment indétectable. La présence de ce sel est généralement interprétée comme étant induite par des remontées capillaires d'eau provenant du sol, riche en potassium et en nitrate, vers la pierre. Cependant, dans cette étude les coupons de calcaire ne sont pas en contact direct avec le sol et ne sont donc pas soumis à des remontées capillaires. Balland-Bolou-Bi et al. (2016) ont émis l'hypothèse que la présence de  $\text{KNO}_3$  était biologiquement induite, notamment par la

présence de microorganismes fixateurs d'azote. Au contraire, Marszałek et al. (2019) dans son étude explique que la formation de  $\text{KNO}_3$  serait liée à la pollution atmosphérique et notamment à la présence de composés oxydants tels que l'ozone ( $\text{O}_3$ ) ou encore des radicaux libres ( $\text{HO}^\cdot$ ) capable d'oxyder les  $\text{NO}_x$  en  $\text{NO}_3$ .

L'absence de microorganismes fixateurs d'azote dans cette étude conforte l'hypothèse que l'origine du  $\text{KNO}_3$  pourrait être plutôt liée à la pollution atmosphérique et à mettre en relation avec l'augmentation des  $\text{NO}_x$ . En effet, la présence de  $\text{NO}_x$  peut induire des dépôts secs sur les coupons abrités, qui seraient été oxydés en présence de fort taux d'ozone et/ou de radicaux libres ( $\text{HO}^\cdot$ ). Cette hypothèse est également confirmée par les genres majoritaires trouvés sur les coupons abrités (*Nocardioides*, *Friedmanniella*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Sphingomonas* et *Rubellimicrobium*). Au sein de ces genres, de nombreuses espèces sont des bactéries dénitrifiantes (i.e. pouvant réduire les nitrates). Les microorganismes s'adaptent donc aux nutriments disponibles dans un milieu, ici du  $\text{NO}_3^-$  (Iwai et al., 2010; Cui et al., 2013; Cua and Stein, 2014; Xing et al., 2018; Yun et al., 2019; Alessa et al., 2021). Cette étude met donc clairement en évidence un rôle de la pollution sur la sélection des communautés microbiennes et donc sur les phases d'altération.

### 7.4. Rôle des microorganismes sur la bio-altération

- Bactéries

Au-delà de leur effet chromatique, nous avons vu que les bactéries pouvaient avoir différents impacts physico-chimiques (cf Chap. 1 § 3.2). Il est difficile à ce stade de connaître quels sont les effets à imputer à chaque espèce bactérienne. Mais on peut suspecter le rôle de certaines. Par exemple, le genre *Acidiphilium* produit des enzymes permettant l'oxydation des sulfures en sulfates (Rohwerder and Sand, 2003).

- Effet délétère des champignons sur l'altération

Les champignons peuvent eux aussi avoir un effet significatif sur l'altération des calcaires. Les « black fungi » fortement présents sur nos échantillons sont considérés comme les champignons les plus préoccupants en termes de bio-détérioration de la pierre, notamment par leur caractère ubiquiste ainsi que par leur grande capacité à recoloniser rapidement un monument après leur restauration (Sterflinger and Piñar, 2013; Pinheiro et al., 2019; De Leo et al., 2022; Toreno et al., 2024). Parmi les « black fungi », de nombreux champignons sont capables de dégrader la pierre par altération physique (pénétration des hyphes au sein du réseau poreux de la roche) et par altération chimique, par la sécrétion d'acides organiques (Sterflinger and Krumbein, 1997; Sterflinger, 2000, 2010). Les *Knufia* sont à considérer comme d'importants agents de détérioration du calcaire (Owczarek-Kościelniak et al., 2020).

En position horizontale, des champignons lichénisés sont principalement identifiés avec les genres *Lecania*, *Verrucaria* et *Macroventura*. Ces champignons forment des lichens en symbiose avec des microorganismes photosynthétiques. Ils se forment principalement en position horizontale car ils requièrent un fort apport en eau. La majorité des espèces citées forment des lichens de type crustacé endolithique, c'est-à-dire que leurs thalles pénètrent en profondeur dans le réseau poreux de la roche, favorisant ainsi une détérioration physique de la pierre par désintégration. Par ailleurs le genre *Verrucaria* a été décrit comme formant des « bio-pitting », c'est-à-dire qu'il est capable de former des puits à la surface de la roche induite par la sécrétion

### Chapitre 3 : Etude du vieillissement naturel de la pierre calcaire

d'acide organique (McIlroy De La Rosa et al., 2012).

Les genres *Cladosporium* et *Aureobasidium* sont quant à eux en mesure de produire de la mélanine pouvant induire un changement de couleur de la pierre (Sterflinger, 2000; Trovão et al., 2020).

- ⇒ **A l'échelle de cette étude, les détériorations induites par les microorganismes entraînent principalement des changements chromatiques. Le mode de prélèvement des échantillons (sous forme de poudre) ne permet pas l'observation de faciès de bio-détérioration de la pierre. De plus, les oxalates de calcium (minéral formé par l'action des microorganismes) n'ont pas été identifiés sur les échantillons.**

**CHAPITRE 4 :  
ALTÉRATION EXPERIMENTALE DE LA PIERRE  
CALCAIRE**

### Introduction :

Les analyses menées sur les tombes du Père-Lachaise montrent un bilan de l'altération acquise dans un environnement évolutif à l'échelle des décennies d'exposition. En particulier, les communautés microbiennes présentes, ainsi que leur abondance, sont donc plus représentatives des conditions environnementales actuelles que passées.

Afin de mieux appréhender les processus d'altération observés sur le terrain ainsi que les interactions entre les calcaires et les microorganismes en fonction des conditions environnementales, il est crucial de s'orienter vers des simulations en laboratoire. Celles-ci permettent de mieux contrôler un système en y introduisant progressivement des paramètres d'altération clés. De plus, le couplage des mesures biologique et physico-chimique permet un suivi en temps réel des mécanismes d'altération en jeu.

Ainsi, plusieurs séries d'expériences ont été menées afin d'étudier les relations entre les microorganismes, les conditions environnementales et la détérioration de la pierre calcaire. Initialement, nous avons opté pour un système simple avec un échantillon de calcaire mis en présence de microorganismes et exposé à une eau de pluie synthétique ayant une composition similaire à celle des précipitations actuelles à Paris. Cette simulation a été réalisée à la fois dans la chambre d'interaction matériaux-environnement (CIME2) et dans des flacons de culture.

Dans une étape ultérieure, les échantillons de calcaire ont été préalablement exposés à la pollution suivant 2 stratégies (Figure 51). La première a consisté à soumettre les échantillons à une pollution particulaire et gazeuse, représentative d'une atmosphère contenant des concentrations élevées en  $\text{SO}_2$  et en suies. Celle-ci correspond aux conditions de l'ère industrielle et à l'essor des véhicules automobiles. Dans le second cas, c'est la composition de l'eau de pluie synthétique qui a été modifiée en y ajoutant des sulfates, des nitrates et de l'ammonium. Cette modification vise à reproduire les caractéristiques des précipitations présentes dans une atmosphère passée, actuelle et future. En effet, les politiques environnementales ont significativement réduit les niveaux de  $\text{SO}_2$  dans l'atmosphère. Cependant, des études menées dans des pays n'ayant pas adopté ses politiques ont montré que les précipitations présentaient encore des concentrations élevées de sulfate. Au fil du temps, la diminution du  $\text{SO}_2$  atmosphérique a laissé place à une pollution azotée, caractérisée par des concentrations plus élevées en nitrate et en ammonium dans les précipitations. Le choix des compositions d'eau de pluie traduit cette évolution.

Le but de ces expériences est donc de comprendre le comportement des communautés microbiennes face à des changements environnementaux et leurs implications dans la bio-détérioration des pierres calcaires du bâti.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

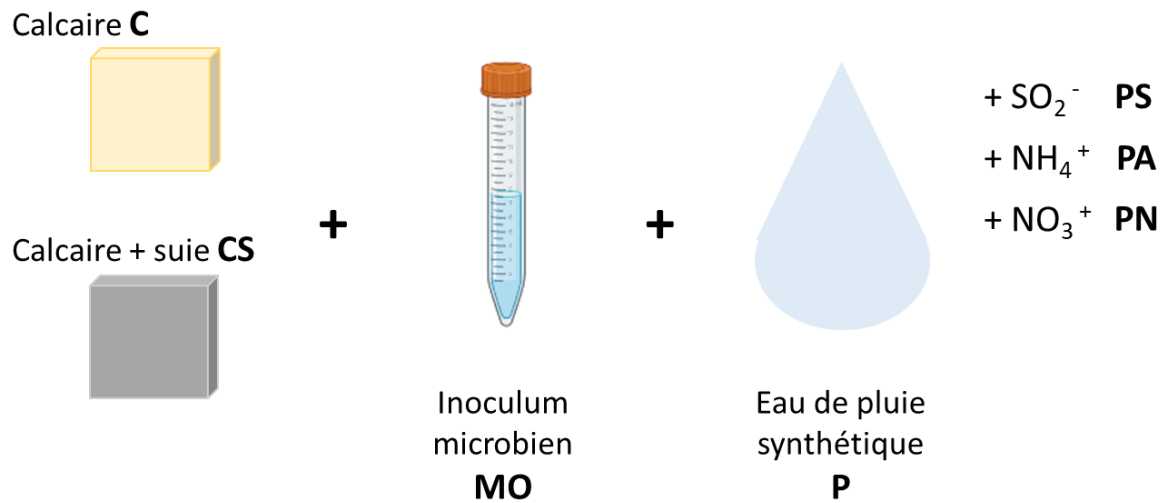


Figure 51 : Schéma récapitulatif des différentes conditions étudiées et des sigles employés. PS : pluie synthétique enrichie en sulfates ; PA : pluie synthétique enrichie en ammonium ; PN : pluie synthétique enrichie en nitrates.

## Chapitre 4.1 : Altération du calcaire sain en présence de pluie en conditions statiques

Cette série d'expériences correspond à un système simplifié qui comporte de l'eau de pluie synthétique de composition représentative d'une pluie actuelle à Paris, du calcaire sain et des microorganismes issus d'une communauté microbienne présente sur une tombe du cimetière du Père-Lachaise (Figure 52). Un suivi expérimental des paramètres biologiques et chimiques a été réalisé chaque semaine durant deux mois (63 jours). Par la suite, différentes observations ont été menées et les communautés bactériennes et fongiques ont été identifiées.

### Système simplifié

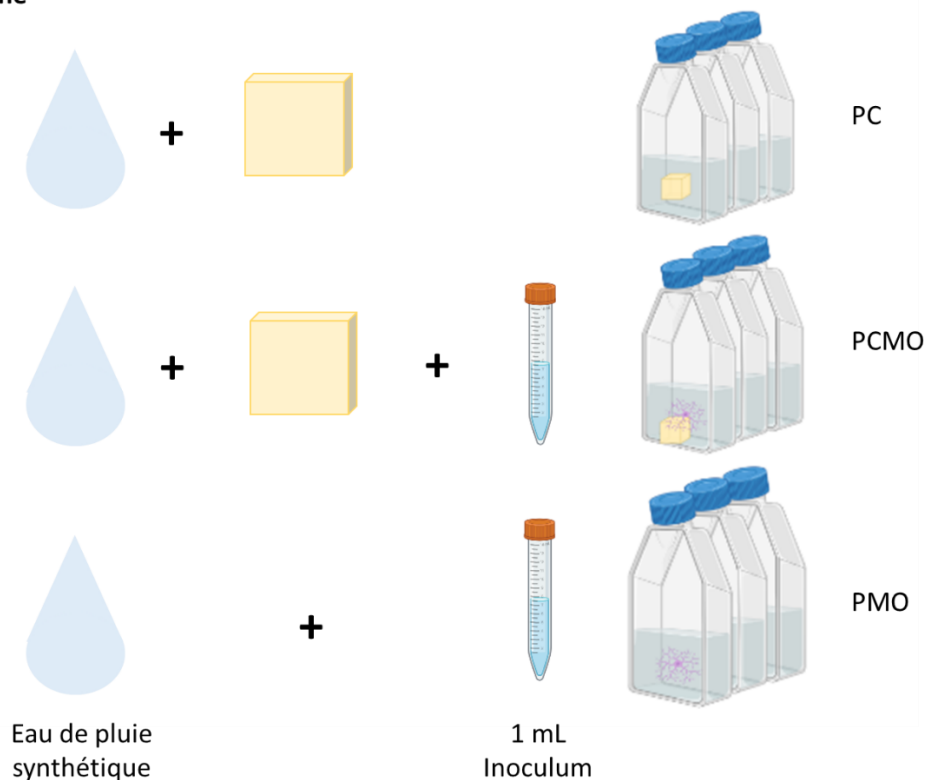


Figure 52 : Schéma récapitulatif des conditions expérimentales. (PC : 'pluie-calcaire' ; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes').

Trois conditions expérimentales (Figure 52) ont été réalisées en triplicats :

- Calcaire sain + eau synthétique, appelée **PC (Pluie + Calcaire)**
- Calcaire sain + eau synthétique + inoculum microbien, appelé **PCMO (Pluie + Calcaire + Microorganismes)**
- Eau synthétique + inoculum microbien, appelé **PMO (Pluie + Microorganismes)**



## 1. Évolution de la composition des microcosmes

### Dénombrement par cytométrie en flux

Afin de comparer l'évolution du nombre de microorganismes des différents cas étudiés (PC, PCMO et PMO), un dénombrement des cellules intactes a été réalisé par cytométrie en flux (Figure 53). La Figure 53 - B correspond à une représentation du nombre de cellules comptées par le cytomètre à T0 et T63.

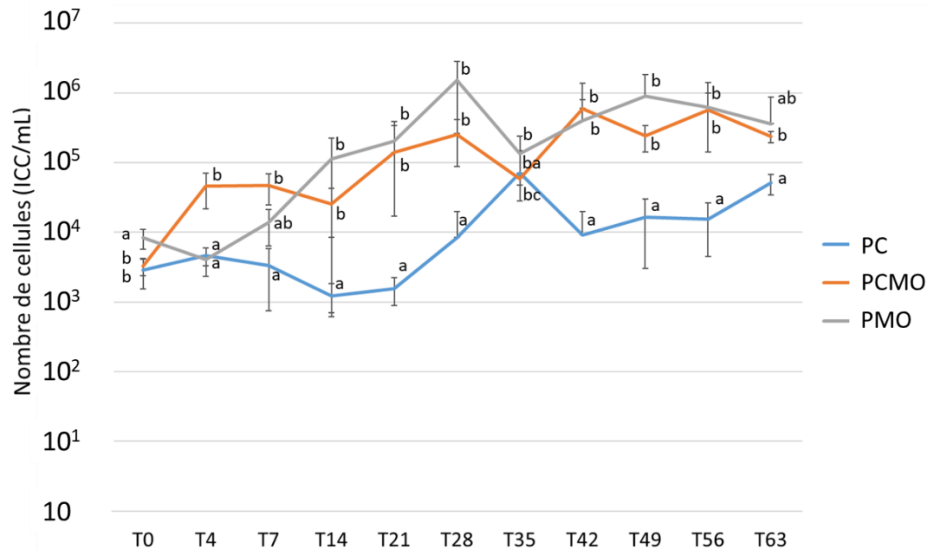


Figure 53 : Évolution du nombre de cellules intactes (ICC.mL<sup>-1</sup>) dans les microcosmes au cours du temps. PC : 'pluie-calcaire' ; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'. Les lettres a et b désignent le degré de similitude d'après les tests statistiques de Kruskal Wallis suivi du test post-hoc Conover corrigé Bonferroni.

Le nombre de cellules intactes varie entre 1 000 et 1 000 000 au cours du temps et en fonction de la composition des microcosmes (Figure 53). Les microcosmes sans ajout de microorganismes (PC) montrent une augmentation significativement plus faible (mais non négligeable) du nombre de cellules intactes par rapport aux microcosmes avec ajout d'inoculum microbien, avec des valeurs comprises entre 1 000 et 10 000 cellules contre 1 000 à 1 000 000 de cellules pour PCMO et PMO. Enfin les différences observées entre les microcosmes avec ajout d'inoculum microbien, ne sont pas significatives entre elles. La méthode de stérilisation utilisée pour les calcaires est donc partielle et ne permet pas d'éliminer tous les microorganismes, qui au cours du temps, ont pu se développer.

### Évolution du pH

La Figure 54 illustre l'évolution du pH des solutions au cours du temps.

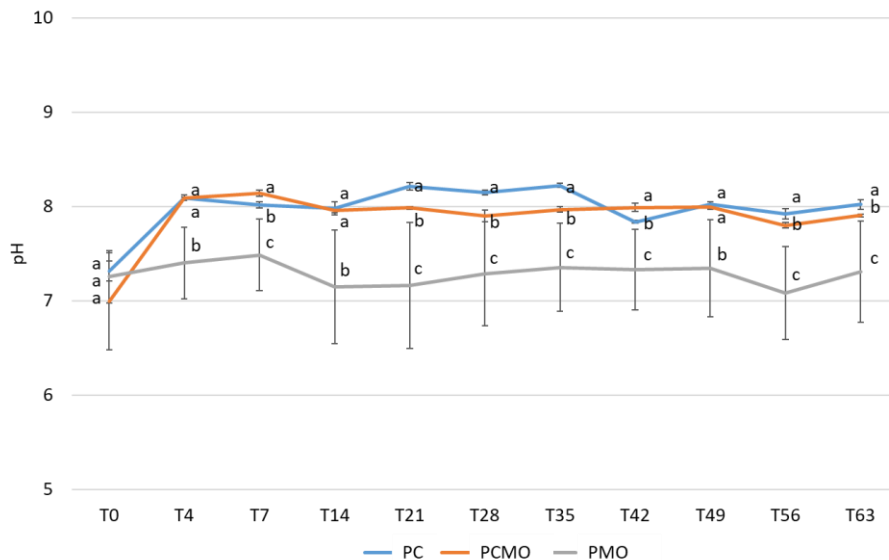


Figure 54 : Évolution du pH au cours du temps. PC : 'pluie-calcaire' ; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'. Les lettres a, b et c désignent le degré de similitude après le test statistique de Kruskal Wallis et le test post-hoc corrigé Bonferroni.

Durant l'expérience, le pH des solutions a très peu évolué avec des valeurs comprises entre 7 et 8,2. À T0, le pH des trois solutions est compris entre 7 et 7,5. Pour les microcosmes contenant du calcaire (PC et PCMO), le pH évolue assez rapidement (T4) pour se stabiliser à  $8,0 \pm 0,1$ , induit par le pouvoir tampon du calcaire. Le pH du microcosme ne contenant pas de calcaire (PMO) est plus acide et varie entre 7 et 7,5.

### Analyse de la composition ionique des solutions au cours du temps

L'évolution de la composition chimique de l'eau de pluie synthétique a été analysée au cours du temps par chromatographie ionique (Figure 55).

Les ions calcium sont rapidement libérés pour les microcosmes PC et PCMO au cours des quatre premiers jours de l'expérience. Les concentrations passent de 13 à 24  $\text{mg.L}^{-1}$  pour PC et de 13 à 28  $\text{mg.L}^{-1}$  pour PCMO. Ces niveaux restent relativement stables tout au long de l'expérience et ne présentent pas de différence significative jusqu'à T49. Pendant toute la durée de l'expérience, les échantillons PMO conservent des niveaux stables avec des concentrations avoisinant les 15  $\text{mg.L}^{-1}$ . Ces différences mettent donc en évidence une dissolution de la calcite mais un impact modéré des microorganismes.

En ce qui concerne les concentrations d'ammonium, une diminution relativement rapide est observée dans les microcosmes contenant l'inoculum microbien, passant d'environ 2  $\text{mg/L}$  à des concentrations allant de 0 à 0,25  $\text{mg.L}^{-1}$  à T21. Les échantillons PC montrent une diminution plus graduelle au fil du temps et atteignent des concentrations inférieures à 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  à partir de T56. La chute plus rapide de la concentration en ammonium dans les microcosmes contenant de l'inoculum peut être dû à la consommation de cet élément par les microorganismes qui sont en nombre plus important dans ces microcosmes. Sans ajout d'inoculum, les microorganismes mettent plus de temps pour se développer au sein des échantillons ce qui décalerait dans le temps cette consommation d'ammonium.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

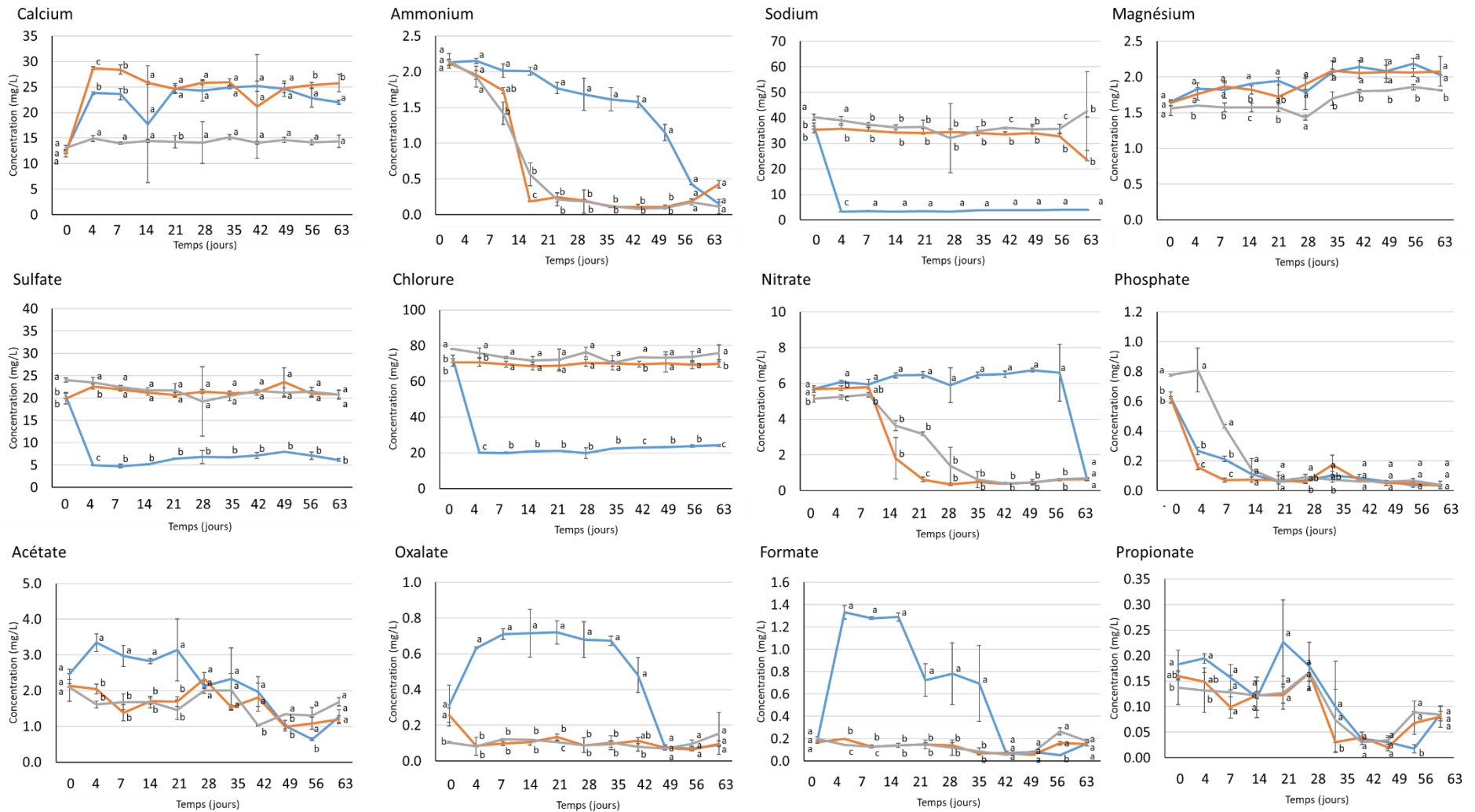


Figure 55 : Évolution de la concentration ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) en ions présents en solution au cours du temps. Les courbes orange correspondent aux échantillons PCMO ('pluie-calcaire-microorganismes'), les courbes bleues correspondent aux échantillons PC ('pluie-calcaire') et les courbes grises correspondent aux échantillons PMO ('pluie-microorganismes'). Les lettres a, b, et c correspondent au degré de similitude après test statistique de Kruskal Wallis et test post-hoc Conover corrigé Bonferroni.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

Les concentrations en sodium montrent une concentration assez stable pour les microcosmes PCMO et PMO avec des concentrations comprises entre 40 et 30 mg.L<sup>-1</sup> pendant toute l'expérience. La concentration des échantillons PC chute très rapidement entre T0 et T4 passant de 35 mg.L<sup>-1</sup> à 5 mg.L<sup>-1</sup> puis reste constante à 5 mg.L<sup>-1</sup> pendant le reste de l'expérience. Les concentrations plus importantes en sodium pour les microcosmes contenant des microorganismes sont induites par l'inoculum microbien contenant du NaCl à une concentration de 9 g.L<sup>-1</sup> (cf. Chap 2 § 4.1.3).

Enfin, les trois échantillons présentent une tendance similaire, caractérisée par une augmentation progressive de la concentration en magnésium, passant de 1,6 à 2,0 mg.L<sup>-1</sup>. Toutefois, les échantillons PMO maintiennent des niveaux légèrement inférieurs aux autres, augmentant de 1,5 à 1,8 mg.L<sup>-1</sup> tout au long de la durée de l'expérience. Cela peut également s'expliquer par une légère dissolution du calcaire.

Les ions sulfates et chlorures montrent le même comportement avec des valeurs très hautes et stationnaires, dans les microcosmes avec ajout de microorganismes PCMO et PMO. Les concentrations en sulfates varient entre 25 mg.L<sup>-1</sup> à T0 et 20 mg.L<sup>-1</sup> à T63, et les concentrations en chlorures sont comprises entre 70 et 80 mg.L<sup>-1</sup> tout au long de l'expérience pour les échantillons PCMO et PMO. Dans le cas de l'échantillon PC, une diminution significative des concentrations de deux composés est observée entre T0 et T4. Les sulfates passent de 20 à 5 mg.L<sup>-1</sup> et les chlorures de 70 à 20 mg.L<sup>-1</sup>, puis ces concentrations restent constantes pour le reste de l'expérience. Les concentrations en sulfates et en chlorures sont beaucoup plus importantes dans les microcosmes contenant des microorganismes. Cela pourrait être induit pour les sulfates par l'échantillon de calcaire ST10V1 qui montrent des concentrations en sulfates comprises entre 23 et 880 mg.L<sup>-1</sup> (Figure 30 – Annexe 2) et pour les chlorure par la présence de NaCl dans l'inoculum.

En ce qui concerne les nitrates, les concentrations restent stables pour les trois échantillons entre T0 et T7. Ensuite, une diminution rapide est visible pour les échantillons PMO et PCMO, atteignant moins de 1 mg.L<sup>-1</sup> à la fin de l'expérience. Pour PC, la concentration en nitrates reste stable jusqu'à T56, avec des valeurs comprises entre 6 et 7 mg.L<sup>-1</sup>, puis chute rapidement à moins de 1 mg.L<sup>-1</sup> à T63. Cela pourrait être due au développement de microorganismes dénitrifiant après 56 jours d'incubation.

Enfin, les concentrations en ions phosphate montrent une diminution rapide pour les trois échantillons sur une période de 14 jours, passant de 0,7 mg.L<sup>-1</sup> à 0,1 mg.L<sup>-1</sup>, et ces concentrations restent stables à 0,1 mg.L<sup>-1</sup> jusqu'à T63.

Les concentrations en acétate présentent des variations similaires pour les échantillons PMO et PCMO, restant comprises entre 2 et 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de T0 à T35. Pendant cette même période, l'échantillon PC montre des concentrations légèrement plus élevées, variant entre 2,5 et 3,5 mg.L<sup>-1</sup>. À partir de T35, les concentrations des trois échantillons deviennent assez similaires, avec une diminution allant de 1,5-2,5 -à - 0,6-1,3 mg.L<sup>-1</sup>.

Les ions oxalate et formate suivent des tendances similaires. Les échantillons PC connaissent une augmentation rapide, passant de 0,2 à 1,3 mg.L<sup>-1</sup> pour le formate et de 0,3 à 0,7 mg.L<sup>-1</sup> pour les oxalates. Une diminution rapide est ensuite observée au cours des trois dernières semaines de l'expérience, c les concentrations d'oxalate passant de 0,5 à 0,1 mg.L<sup>-1</sup> entre T42 et T56, et les concentrations de formate chutant de 0,8 à 0,1 mg.L<sup>-1</sup> entre T35 et T42. Pour les échantillons

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

PCMO et PMO, les concentrations en formate et en oxalate restent très faibles pendant toute la durée de l'expérience, variant entre 0,2 et 0,1 mg.L<sup>-1</sup>.

Enfin, les concentrations en propionate sont similaires pour les trois échantillons, présentant un plateau entre 0,2 et 0,1 mg.L<sup>-1</sup> jusqu'à T28, suivi d'une diminution rapide entre T28 et T35, avec des concentrations inférieures à 0,05 mg.L<sup>-1</sup>.

À partir des concentrations en ions identifiés et du pH mesuré, différentes modélisations de spéciation ont été réalisées à chaque pas de temps et pour chaque microcosme, utilisant le logiciel Visual Minteq (Figure 56).

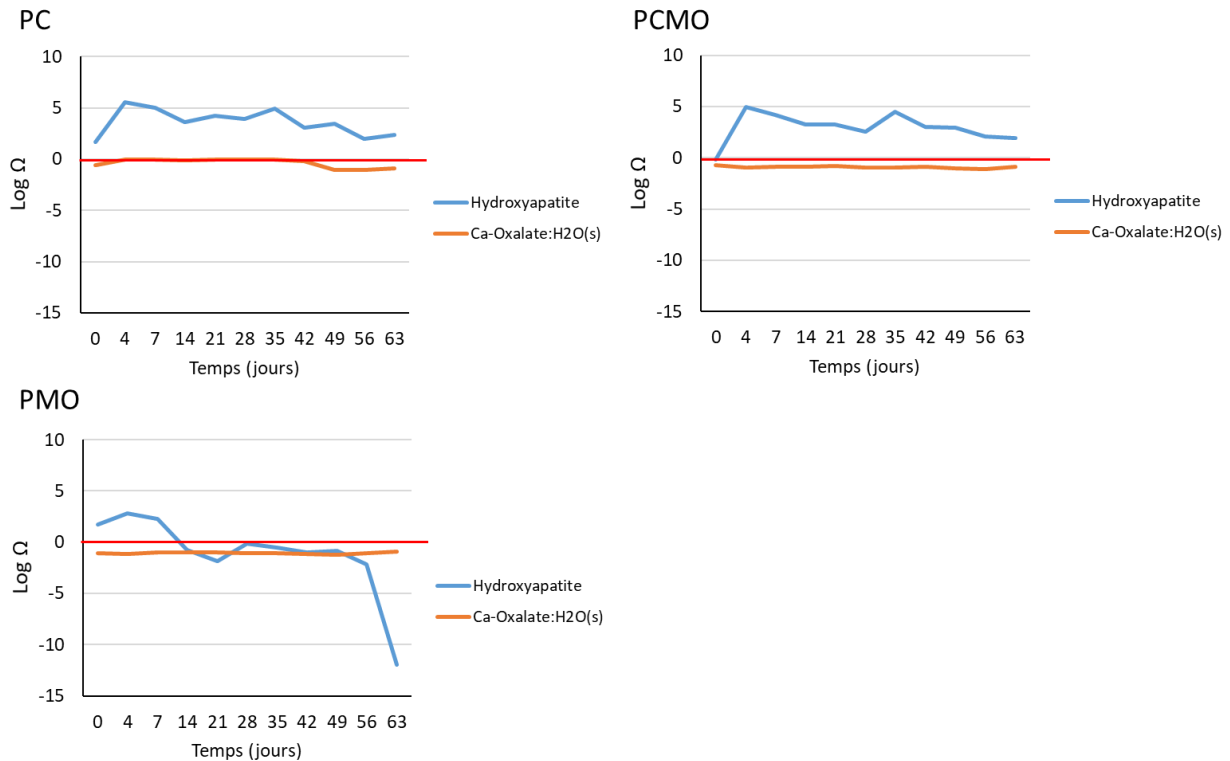


Figure 56 : Evolution de l'indice de saturation des phases formées au cours du temps. La ligne rouge correspond au seuil de saturation, au-dessus duquel les phases sont sursaturées et auraient donc pu précipiter. En dessous de cette ligne, les phases sont sous-saturées et les ions restent sous forme aqueuse.

Ces modélisations montrent deux phases sont proches de l'équilibre. Il s'agit de l'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) et de l'oxalate de calcium. Dans le cas de PC et PCMO, l'hydroxyapatite est constamment au-dessus du seuil de saturation. Cette phase aurait donc pu se former. Il est donc possible que cette phase soit contrôlée par la cinétique ou qu'une phase de phosphate se forme dans l'expérience mais avec une constante d'équilibre légèrement supérieure à celle de la base de donnée de Visual Minteq. En revanche, dans le cas de PMO, à partir de 7 jours d'incubation, le produit ionique de l'hydroxyapatite passe en dessous du seuil de saturation. L'oxalate de calcium est, pour les trois échantillons est très proche du seuil de saturation, d'autant plus pour les échantillons PC entre 4 et 42 jours d'incubation. Il est donc très probable que cette phase soit formée dans l'expérience.

⇒ **Différents groupes d'ions ayant des comportements similaires ressortent :**

- **Les composés azotés (ammonium et nitrate) montrent les mêmes tendances avec une diminution dès les premiers jours d'expérience pour les échantillons PCMO et PMO contrairement aux échantillons sans microorganismes. Cette chute rapide pourrait donc être expliquée par une consommation rapide des composés azotés par certains microorganismes présents dans l'inoculum.**
- **Les ions acétate, propionate et phosphate présentent des évolutions similaires quelles que soient les conditions.**
- **Les ions oxalates et formates ont des concentrations qui augmentent sans ajout d'inoculum. Cette tendance pourrait être expliquée par une stérilisation des calcaires trop faible ayant induit le développement de microorganisme.**
- **Le plateau observé entre 4 et 35 jours d'incubation pour l'oxalate dans les échantillons PC pourrait être expliqué par la précipitation d'oxalate de calcium.**
- **Les conditions de l'expérience permettent la formation d'hydroxyapatite dans les échantillons PC et PCMO, expliquant la forte diminution de phosphate soluble dans les microcosmes.**

## **2. Caractérisation des échantillons**

### **2.1. Observations microscopiques et colorimétrie**

Une évolution de l'apparence de la surface des échantillons est visible entre le calcaire non exposé (Figure 57 - A) et les calcaires altérés (Figure 57 - B et C), notamment par la diminution de la matrice entre les différents éléments constituant le calcaire marquée par la diminution des traces blanches. De plus, le calcaire altéré sans ajout de microorganismes semble plus poreux en surface et légèrement plus clair que le calcaire non altéré. Enfin, le calcaire altéré en présence de microorganismes montre la formation d'une patine orangée.

L'évolution de la couleur du calcaire est observable dans l'espace colorimétrique CIELAB (Figure 57 - D). Le calcaire altéré sans ajout de microorganismes montre une très faible variation de couleur puisque les points sont assez proches du calcaire non altéré dans la représentation 3D. Les calcaires altérés avec ajout de microorganismes montrent une variation de couleur beaucoup plus importante avec une diminution de la clarté (L) et une augmentation des paramètres a et b (augmentation respective allant vers le rouge et le jaune). La patine orangée des calcaires altérés en présence de microorganismes est donc confirmée par les données colorimétriques.

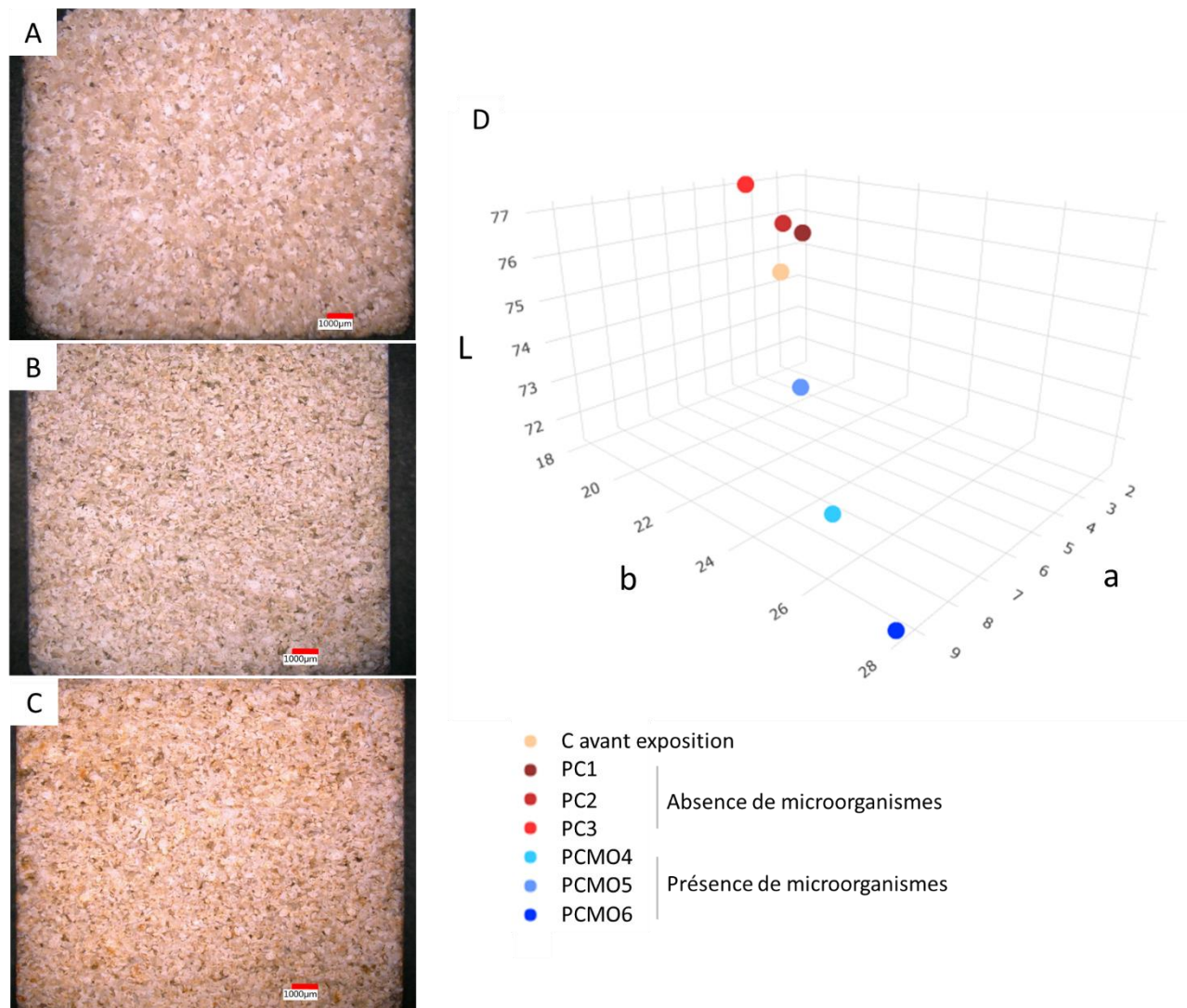


Figure 57 : Photographies au microscope numérique (A) du calcaire St Maximin roche fine avant exposition ; (B) PC (pluie-calcaire) après 63 jours d'altération ; (C) PCMO (pluie-calcaire-microorganismes) après 63 jours d'altération ; (D) Diagramme en 3D des différences colorimétriques dans l'espace CIELAB.

Les observations microscopiques à plus fort grossissement montrent la présence de plusieurs structures à la surface des calcaires altérés (Figure 58). Les échantillons altérés sans ajout de microorganismes (Figure 58 A - E) montrent pourtant une diversité importante de microorganismes visibles, notamment des structures sphériques vertes et orange (Figure 58 A - B) pouvant être assimilées à des microalgues, des colorations orange sans forme distinguable (Figure 58 - C) ou encore des structures filamenteuses grises et blanches (Figure 58 D - E) interprétées comme des hyphes de champignons. Les échantillons altérés en présence de microorganismes montrent quant à eux le même type de microorganismes présents en grande quantité. Ils se caractérisent par une structure sphérique orange, certainement à l'origine de la patine orange observée précédemment. Pour tous les échantillons, les microorganismes visibles semblent s'accrocher sur les cristallisations fines du calcaire (ciment micritique ou recristallisations sparitiques autour des milioles).

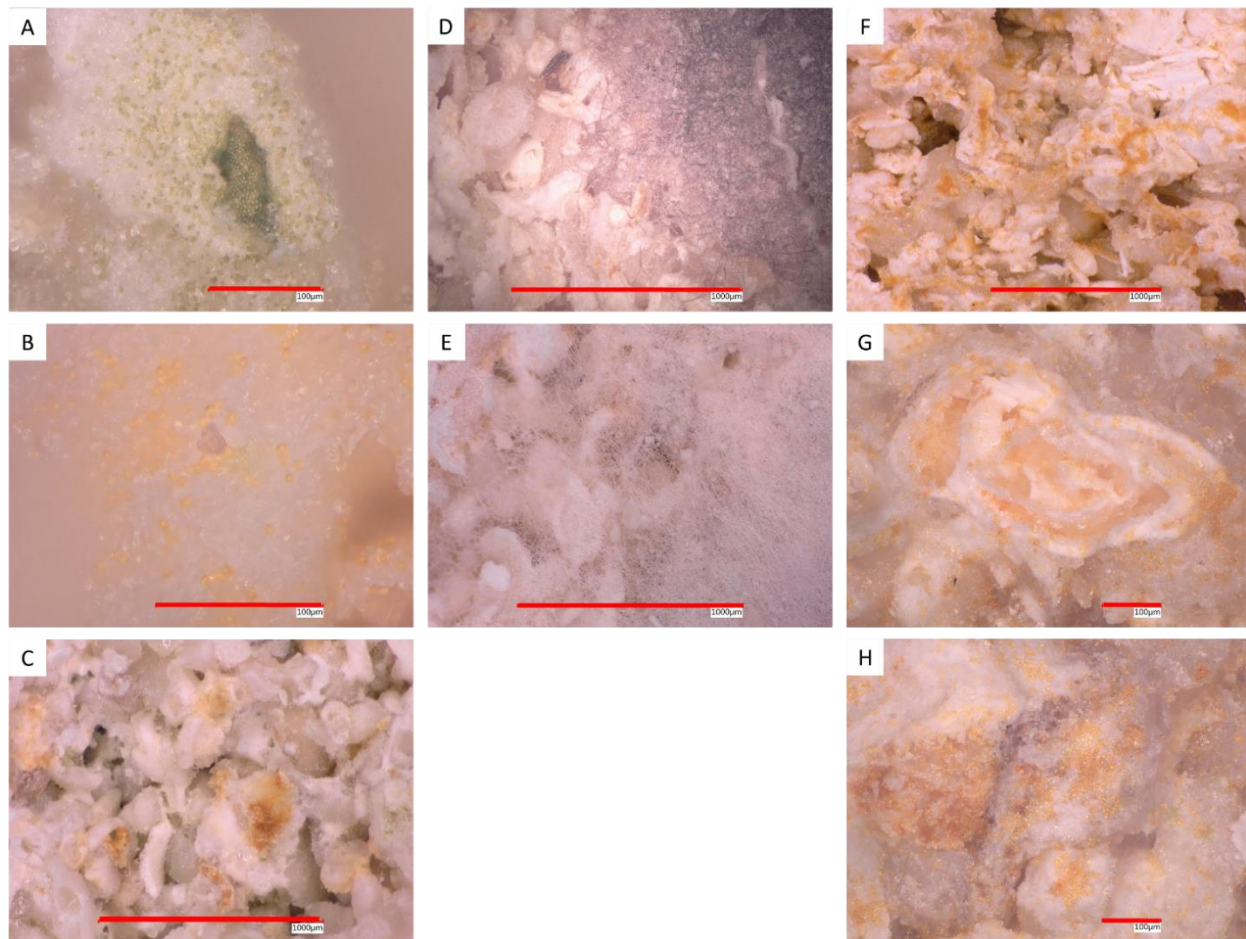


Figure 58 : Photographies au microscope numérique des échantillons altérés après 63 jours d'immersion ; (A-E) PC (pluie-calcaire); (F-H) PCMO (pluie-calcaire-microorganismes).

### 3. Communautés microbiennes

Après 63 jours d'incubation, une extraction d'ADN contenu dans l'eau, suivi d'un séquençage sur les différents microcosmes a été réalisés afin d'étudier l'évolution de la composition des communautés bactériennes et fongiques dans ces conditions différentes.

#### 3.1. Bactéries

##### 3.1.1. Indice de biodiversité des communautés bactériennes

Dans un premier temps, les indices de biodiversité alpha et bêta ont été calculés à l'échelle de l'espèce. Par la suite, la composition bactérienne sera déterminée à l'échelle des phyla et des genres.

##### Alpha-diversité

Différents indices d'alpha-diversité ont été calculés (Chapitre 2 §3.1.3) et sont présentés dans le Tableau 20.



## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

Tableau 20: Indice d'alpha-diversité à l'échelle des espèces bactériennes.

	Richesse spécifique	Chao 1	Shannon	Inverse Simpson
Inoculum	72	75	3,1	12,6
PC	15 ± 1,3	15,3 ± 1,6	1,2 ± 0,6	3,1 ± 1,4
PCMO	88 ± 2,6	101,4 ± 10,5	2,9 ± 0,1	10,5 ± 1,1
PMO	95,7 ± 8,4	111,1 ± 8,7	3,0 ± 0,2	9,3 ± 2,7

Les communautés bactériennes issues des échantillons PC présentent la plus faible richesse spécifique observée avec 15 espèces présentes contre 75 pour l'inoculum, 88 pour PCMO et 94 pour PMO. Les mêmes tendances sont visibles pour l'indice Chao1, correspondant à une estimation de la diversité totale, qui prend en compte la richesse spécifique ainsi que les espèces rares ou non observables. L'indice de Shannon est un indice qui intègre la richesse spécifique ainsi que l'équité des présences de ces espèces en prenant en compte les espèces rares. L'échantillon ayant l'indice de Shannon le plus élevé est l'inoculum suivi des échantillons PMO, PCMO et PC. L'inoculum et les échantillons PMO présentent dans ces conditions les diversités bactériennes les plus élevées. Enfin, les indices de diversité Inverse Simpson se basent sur les espèces dominantes et leurs distributions équitables. Ils sont élevés pour les échantillons PCMO, PMO et l'inoculum montrent que les diversités de ces échantillons sont dominées seulement par quelques espèces, contrairement à PC.

### Bêta-diversité

La Figure 59 est une carte de chaleur représentant l'indice de bêta-diversité de Bray-Curtis. Ce dernier permet de montrer les différences de communautés entre deux échantillons.

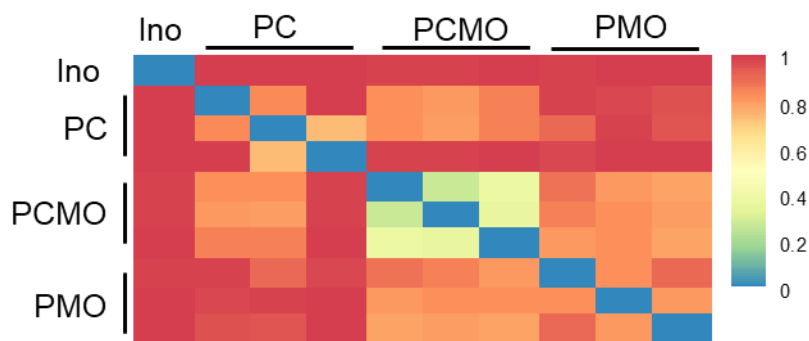


Figure 59 : Carte de chaleur représentant l'indice bactérien de bêta diversité de Bray-Curtis à l'échelle des espèces. Ino : inoculum initial ; PC : 'pluie-calcaire' ; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

Lorsque l'on compare les communautés présentes entre l'inoculum microbien initial et les communautés des différents essais (PC, PCMO et PMO), l'indice de bêta diversité est compris entre 0,9 et 1 ce qui indique des communautés totalement différentes et donc que les communautés bactériennes ont évolué et totalement changé en deux mois d'expérimentation.

Les communautés bactériennes au sein des triplicats sont assez différentes pour les PC (avec des indices compris entre 0,58 et 0,99) ainsi que pour PMO (avec des indices compris entre 0,61

et 0,92). C'est au sein des triplicats PCMO que les communautés sont les plus semblables avec des indices de bêta-diversité compris entre 0,25 et 0,29.

Ainsi, lorsque les différentes conditions expérimentales sont comparées entre elles, les indices de bêta diversité sont compris entre 0,6 et 0,99 pour les conditions PC et PCMO, entre 0,59 et 0,83 pour les conditions PCMO et PMO et enfin entre 0,74 et 0,99 pour les conditions PC et PMO. Les communautés bactériennes sont assez différentes en fonction des différentes conditions expérimentales.

### 3.1.2. Abondance des différents phyla dans les communautés bactériennes

Les abondances relatives des différents phyla bactériens présents dans les microcosmes sont présentées dans la Figure 60. L'inoculum microbien montre la plus grande diversité de phyla, avec 9 phyla présents. Les microcosmes avec ajout d'inoculum présentent aussi un nombre de phyla important, respectivement entre 6 et 8 pour PMO et entre 6 et 7 pour PCMO. Enfin PC, sans ajout d'inoculum, a le plus faible de nombre de phyla, entre 1 et 4.

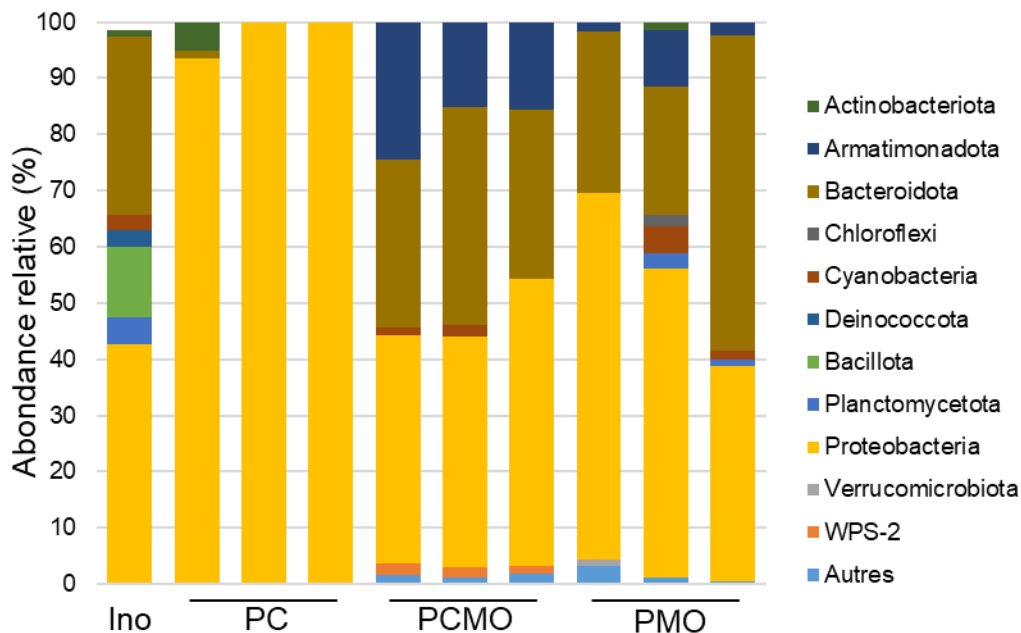


Figure 60 : Abondance relative des phyla bactériens (en %). Ino : inoculum initial ; PC : 'pluie-calcaire' ; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

Les Proteobacteria, les Bacteroidota ainsi que les Armatimonadota sont présents majoritairement au sein des différents échantillons avec des proportions qui varient en fonction de la composition des microcosmes. Les Proteobacteria représentent environ un tiers de la communauté bactérienne des conditions PCMO et PMO, 40 % de l'inoculum bactérien et 75 à 100 % des communautés présentes en PC.

Les Bacteroidota sont majoritairement représentées dans les échantillons PCMO, PMO et l'inoculum de départ avec des abondances relatives respectivement comprises entre 20 et 23 %, 12 et 40 % et de 30 % pour l'inoculum.

Enfin, les Armatibacteriota sont présentes dans les échantillons PCMO et PMO, avec des abondances relatives plus importantes pour PCMO (entre 10 et 15 %) que pour PMO (entre 2 et 5 %).

L'abondance relative des genres présents dans les microcosmes est présentée dans *Figure 61*. Les Proteobacteria majoritaires au sein des microcosmes (cf. *Figure 60*) présentent 4 genres majoritaires au sein des échantillons PC : *Sphingopyxis* (21 - 96 %), *Brevundimonas* (7,4 - 19 %), *Polaromonas* (6 - 16 %) et *Bosea* (0 - 18 %). Pour les échantillons PCMO, les genres majoritaires représentés sont les *Brevundimonas* (3 - 8 %), les *Polaromonas* (8 - 9 %) et les *Sphingaurandiacus* (0 - 9 %). Comme vu précédemment à l'aide des indices de bêta diversité, les compositions des communautés bactériennes sont assez différentes au sein des réplicats PMO. Le genre *Sphingomonas* par exemple compose 9 % de la communauté bactérienne d'un réplicat, mais n'est pas représenté dans les autres. Il en est de même pour différents genres tels que *Caulobacter* (18 %), *Devosia* (8 %), Xanthobacteraceae (9 %) et SM2D12 (10 %).

Comme constaté précédemment, les Bacteroidota sont présentes en proportion considérable dans les échantillons avec ajout d'inoculum microbien PCMO et PMO. Le genre *Flavisolibacter* est bien représenté dans les échantillons PCMO avec une abondance relative comprise entre 8 et 11 %, suivi du genre *Hassilia* (3-4 %) et de *Pedobacter* (2-4 %). Enfin, pour les échantillons PMO, les genres présents sont les *Flavobacterium* (0-8 %), les *Pedobacter* (0 - 30 %), les *Flavisolibacter* (0-5 %) et la famille Chitinophagaceae avec une abondance relative comprise entre 0 et 6 %.

Enfin, le phylum Armatibacteroidota est bien représenté par les Fimbrimonadaceae avec pour les PCMO des abondances comprises entre 8 et 17 % et pour les PMO avec des abondances comprises entre 1 et 5 %.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

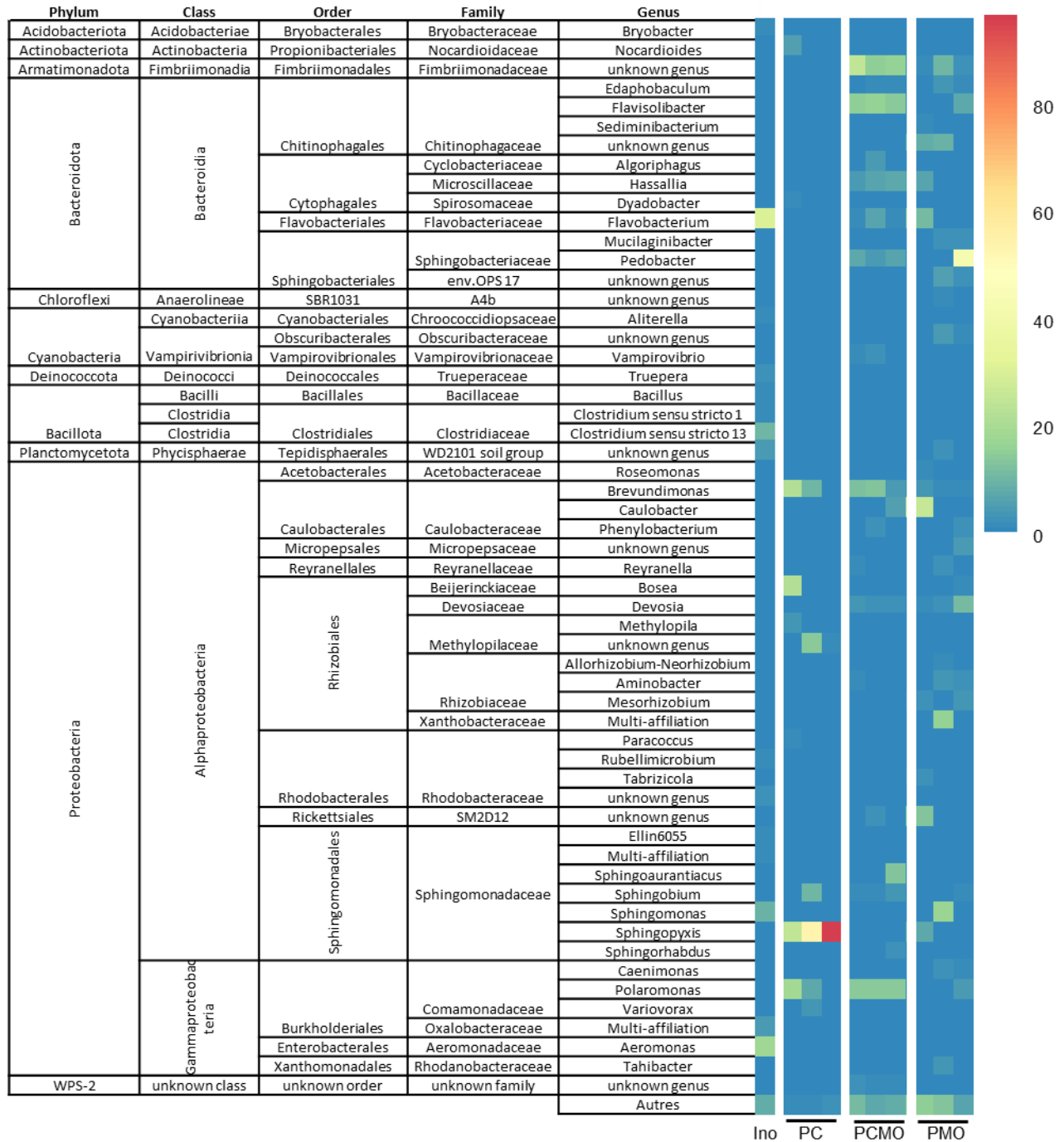


Figure 61: Abondance relative des genres bactériens (en %). Ino : inoculum initial ; PC : 'pluie-calcaire' ; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

## 3.2. Champignons

### 3.2.1. Indice de biodiversité des communautés fongiques :

#### Alpha-diversité

Le Tableau 21 regroupe les différents indices d'alpha-diversité calculée au sein des échantillons PC, PCMO, PMO ainsi que dans l'inoculum ajouté au début de l'expérience.

Tableau 21: Indice des alpha-diversité à l'échelle des espèces fongiques.

	<b>Richesse observée</b>	<b>Chao 1</b>	<b>Shannon</b>	<b>Inverse Simpson</b>
Inoculum	105	108	2,85	6,2
PC	7 ± 2	11,8 ± 10,7	0,4 ± 0.6	1,4 ± 0,4
PCMO	19 ± 2	22,7 ± 5,2	0,9 ± 0 .0	2,2 ± 0,0
PMO	43 ± 8	44,1 ± 10,4	2,2 ± 0.6	6,8 ± 2,3

L'inoculum se distingue par une richesse observée nettement supérieure à celle des autres échantillons, avec une valeur de 105, comparativement à 7 pour PC, 19 pour PCMO et 43 pour PMO. Cette tendance se répercute également dans les indices de Chao 1 et de Shannon.

Les échantillons PC et PCMO présentent des indices Inverse Simpson plus bas, indiquant une répartition plus équitable et uniforme des abondances des espèces. En contraste, les échantillons PMO et l'inoculum, avec des indices Inverse Simpson respectifs de 6,2 et 6,8, témoignent d'une prédominance de quelques espèces majeures au sein de leurs communautés.

En résumé, l'inoculum affiche une diversité plus élevée que les échantillons PC et PCMO. Ces derniers se caractérisent par une distribution équitable des espèces, alors que les échantillons PMO et l'inoculum montrent une prépondérance d'un petit nombre d'espèces dominantes.

#### Bêta-diversité

La Figure 62 correspond à une carte de chaleur illustrant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis.

Les coefficients de similarité de Bray-Curtis, utilisés pour évaluer les différences de composition des communautés fongiques entre divers échantillons, ainsi que l'inoculum, varient entre 0,98 et 1. Ces valeurs signalent des dissemblances importantes, suggérant que la communauté fongique de l'inoculum diffère radicalement de celles observées dans les autres échantillons.

Des dissemblances significatives sont également apparentes parmi les communautés présentes dans les échantillons PC. Les coefficients de Bray-Curtis se situent entre 0,01 et 1. Ainsi, parmi les trois échantillons constituant le triplicata, deux sont identiques en termes de composition fongique tandis que le troisième se distingue nettement.

Concernant les triplicats PCMO, les coefficients de dissemblance, se situant entre 0,01 et 0,18, témoignent d'une faible variation. Les communautés fongiques au sein de ces triplicats sont pratiquement identiques.

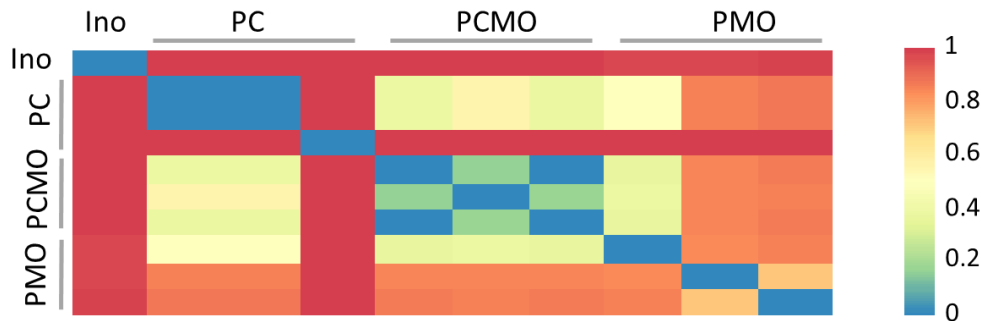


Figure 62 : Carte de chaleur représentant les indices fongiques de bêta diversité de Bray-Curtis. Ino : inoculum initial ; PC : 'pluie-calcaire' ; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

Enfin, pour les triplicats PMO, les indices de Bray-Curtis se situent entre 0,72 et 0,86, signifiant que les communautés sont différentes les unes des autres.

Lorsque l'on compare les communautés fongiques entre les échantillons PC et PCMO, les coefficients de Bray-Curtis oscillent entre 0,38 et 0,56, révélant une différence modérée entre ces deux communautés fongiques.

En revanche, les échantillons PMO affichent des coefficients de Bray-Curtis compris entre 0,37 et 0,86, ce qui traduit une divergence de modérée à marquer.

⇒ **Les communautés fongiques observées dans les échantillons PMO se distinguent considérablement de celles présentes dans les échantillons PC et PCMO.**

### 3.2.2. Abondance relative des phyla et genres fongiques

#### Phyla

Parmi les échantillons analysés, une proportion significative d'ADN fongique n'a pas pu être identifiée à l'aide de la base de données UNITE. Parmi les séquences d'ADN identifiées, deux phyla dominants ressortent : les Ascomycota et les Basidiomycota (Figure 63). Ces deux phyla sont présents dans les échantillons PC, PMO et dans l'inoculum, mais leurs proportions varient.

L'inoculum, introduit au début de l'expérience, est composé de 85 % d'Ascomycota. D'autres phyla ont également été identifiés, tels que les Basidiomycota, les Chytridiomycota, les Mucoromycota et les Rozellomycota, mais dans des proportions moindres.

En ce qui concerne le triplicat PC, la composition fongique varie considérablement entre les échantillons. Le premier échantillon est composé à 95 % de Basidiomycota, le deuxième ne contient pas d'ADN fongique identifiable et le troisième présente une composition équilibrée avec 50 % d'Ascomycota et 50 % de Basidiomycota.

Pour PCMO, de l'ADN fongique a été identifié, mais sa classification taxonomique au niveau du phylum n'a pas pu être établie.

Enfin, pour PMO, la composition semble majoritairement composée d'Ascomycota, avec deux échantillons affichant respectivement des proportions de 61 % et 93 %. Les Basidiomycota sont également présents, mais dans des proportions plus faibles, environ 15 %.

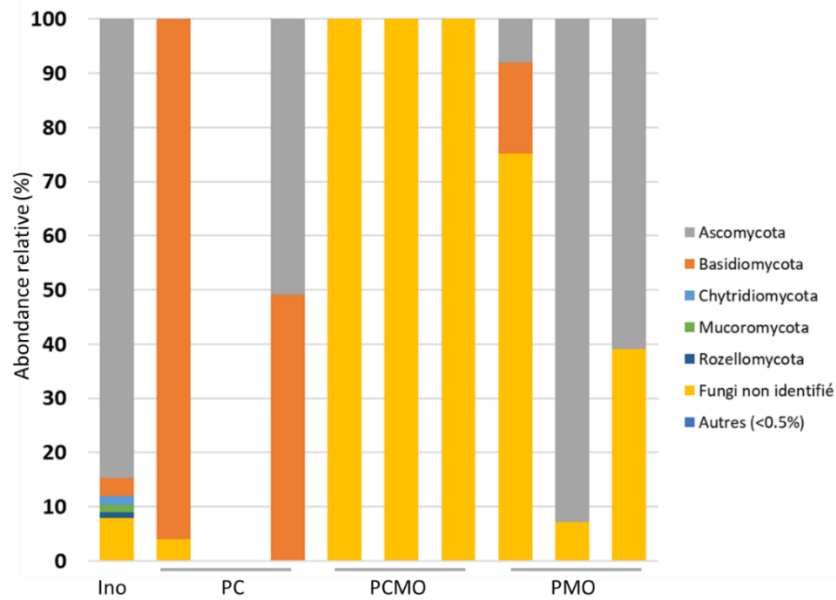


Figure 63 : Abondance relative des phyla fongiques (en %). Ino : inoculum initial ; PC : 'pluie-calcaire', PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

- ⇒ **Les phyla dominants identifiés sont les Ascomycota et les Basidiomycota, avec des proportions variables entre les échantillons. L'inoculum se caractérise par une prédominance d'Ascomycota, tandis que la composition fongique des autres échantillons, comme PC, PCMO et PMO, présente des variations importantes en termes de proportions et de diversité taxonomique.**

### Genre

La *Figure 64* présente l'abondance relative des différents genres fongiques au sein des échantillons, ainsi que leur classification taxonomique associée. Dans l'ensemble des échantillons, un nombre restreint de genres fongiques a été identifié. Au total, entre 7 et 75 % des champignons présents dans ces échantillons n'ont pas pu être identifiés.

L'inoculum initial se distingue par la présence du plus grand nombre de genres identifiés. Parmi ceux-ci, les genres *Knufia* (55 %) et *Extremus* (7 %) dominent. D'autres genres tels que *Rhinochrysiella*, *Penicillium*, *Thelebolus*, *Metapochonia*, *Buckleyzyma*, *Fimicolochytrium* et *Acremonium* ont été retrouvés, mais leur proportion est inférieure à 4 %. Seulement deux genres ont été identifiés au sein de PC, *Periconia* et *Pseudotomentella*. Dans PCMO, aucun genre fongique n'a pu être reconnu. Quant à PMO, le genre *Gamszarea* varie entre 3 et 57 %, le genre *Penicillium* entre 0 et 57 % et la classe Agaricomycetes entre 0 et 16 %.

- ⇒ **L'inoculum initial se caractérise par la présence de plusieurs genres, tandis que les autres échantillons montrent une diversité plus limitée. Certains genres sont prédominants, comme *Knufia* et *Extremus* dans l'inoculum, et la diversité taxonomique des genres fongiques varie considérablement entre les différents échantillons.**

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

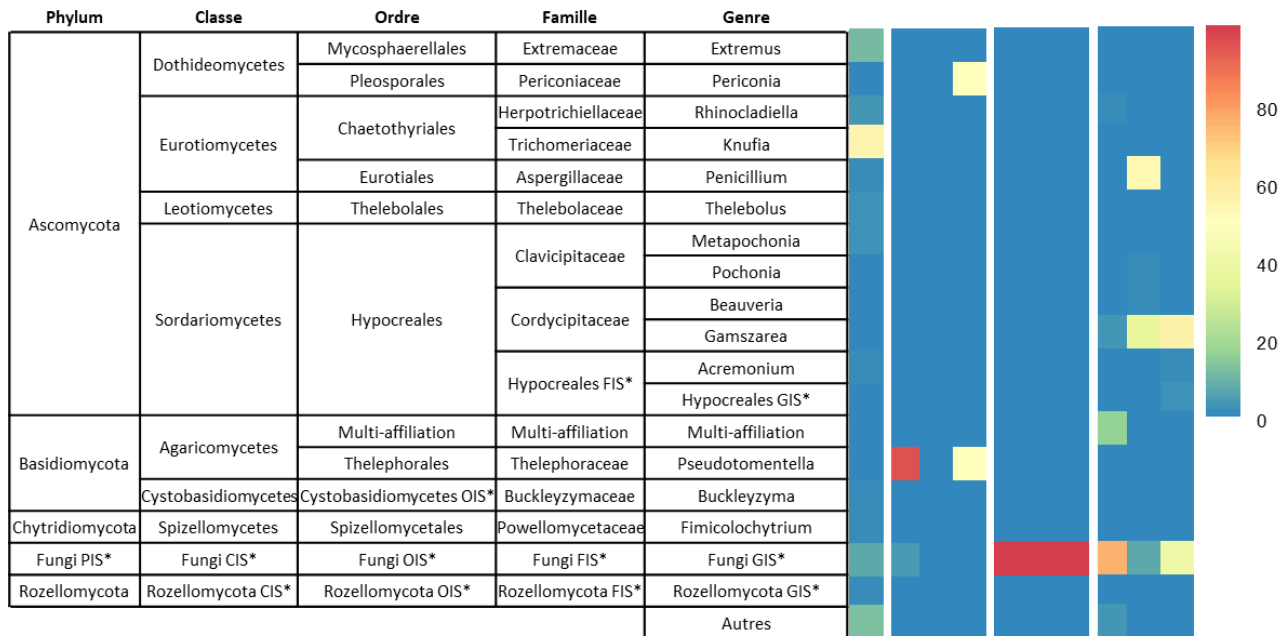


Figure 64: Abondance relative des genres fongiques (en %). Ino : inoculum initial ; PC : 'pluie-calcaire' ; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

### 3.3. Algues

#### 3.3.1. Indice de biodiversité

##### Alpha-diversité

	Richesse observée	Chao 1	Shannon	Inverse Simpson
Inoculum	36	39,3	1,5	2,4
PC	4,3 ± 0,9	4,3 ± 0,9	0,3 ± 0,0	1,1 ± 0,0
PCMO	19,7 ± 1,8	35,5 ± 14,3	0,9 ± 0,0	2,2 ± 0,0
PMO	31,7 ± 2,9	33,2 ± 3,8	2,1 ± 0,5	6,3 ± 2,3

##### Beta-diversité

La Figure 65 correspond à une carte de chaleur illustrant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis. Les coefficients de similarité de Bray-Curtis, utilisés pour évaluer les différences de composition des communautés algaires entre divers échantillons, ainsi que l'inoculum, varient entre 0,98 et 1. Ces valeurs signalent des dissemblances importantes, suggérant que la communauté algaire de l'inoculum diffère radicalement de celles observées dans les autres échantillons.

Des dissemblances significatives sont également apparentes parmi les communautés présentes dans les échantillons PC. Les coefficients de Bray-Curtis se situent entre 0,01 et 1. Ainsi, parmi les trois échantillons constituant le triplicata, deux sont identiques en termes de composition fongique tandis que le troisième se distingue nettement.



Concernant les triplicats PCMO, les coefficients de dissemblance, se situant entre 0,15 et 0,2, témoignent d'une faible variation. Les communautés fongiques au sein de ces triplicats sont pratiquement identiques.

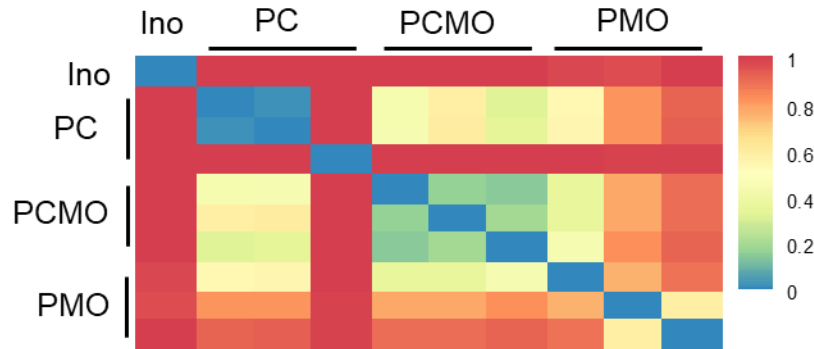


Figure 65: Carte de chaleur des indices de beta-diversité de Bray-Curtis pour les communautés algaires. Ino : Inoculum ; PC : 'pluie-calcaire' ; PCMO: 'pluie-calcaire-microorganismes'; PMO: 'pluie-microorganismes'.

Enfin, pour les triplicats PMO, les indices de Bray-Curtis se situent entre 0,6 et 0,8, signifiant que les communautés sont assez différentes les unes des autres.

Lorsque l'on compare les communautés fongiques entre les échantillons PC et PCMO, les coefficients de Bray-Curtis oscillent entre 0,3 et 0,9, révélant une différence modérée entre ces deux communautés algaires.

En revanche, les échantillons PMO affichent des coefficients de Bray-Curtis compris entre 0,5 et 0,9, ce qui traduit une divergence de modérée à marquer.

- ⇒ **Les communautés algaires observées dans les échantillons PMO se distinguent fortement de celles présentes dans les échantillons PC et PCMO.**

### 3.3.2. Abondance relatives des phyla et genres algaires

#### Phyla

La *Figure 66* illustre les différents phyla algaires identifiés dans les microcosmes. Pour l'ensemble des microcosmes, le phylum des Chlorophyta est largement majoritaire avec des proportions comprises entre 79 et 100%. Les Bryophyta ont seulement été identifiés dans un des microcosmes PMO ('pluie-microorganismes') avec une abondance relative de 21%.

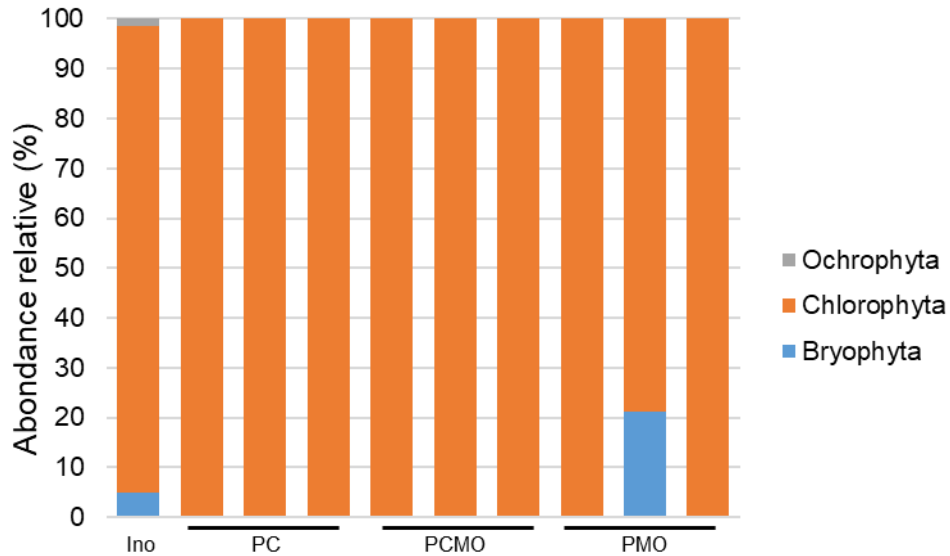


Figure 66: Abondance relative des phyla algaires (en %). Ino : Inoculum ; PC : 'pluie-calcaire'; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

### Genre

La Figure 67 présente les genres algaires identifiés dans les différents microcosmes. Le genre *Pseudomuriella* est identifié pour les trois microcosmes PC, PCMO et PMO. Il est le seul représenté dans les microcosmes PC composé de pluie synthétique et de calcaire. Dans les microcosmes PCMO, le genre *Chromochloris* est aussi identifié avec une proportion comprise entre 30 et 40%. Enfin dans les microcosmes PMO, la présence des genres *Tortula*, *Coccomyxa* et *Bracteococcus* est identifié en addition du genre *Pseudomuriella*.

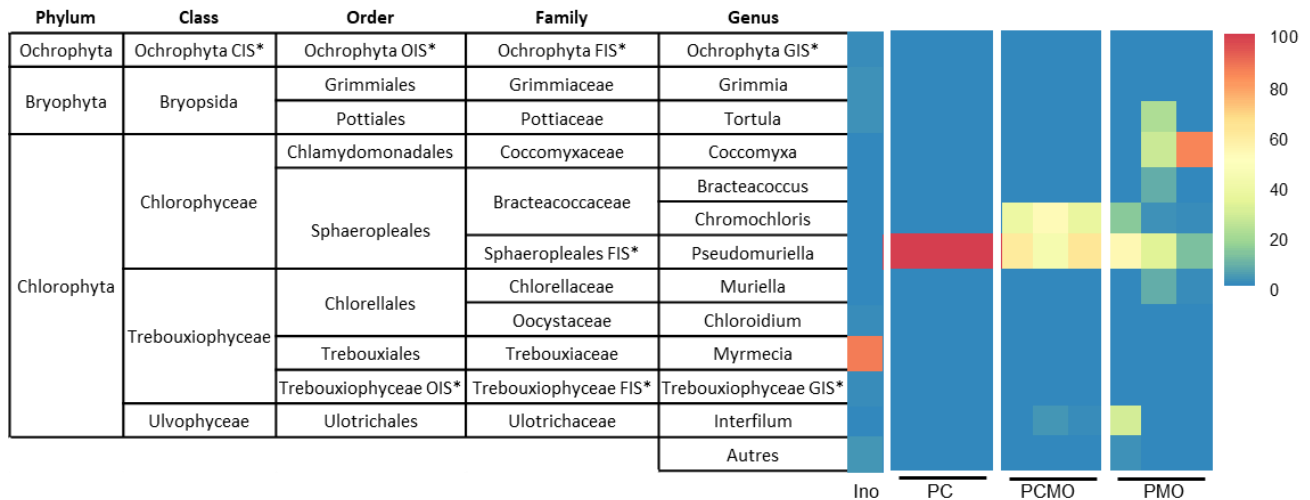


Figure 67: Abondance relative des genres algaires (en %). Ino : inoculum ; PC : 'pluie-calcaire' ; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

⇒ **Les microcosmes PMO possèdent la plus grande diversité algaire avec 7 genres identifiés.**

- ⇒ **La présence de calcaire dans les microcosmes semble favoriser le développement du genre *Pseudomuriella*.**

#### 4. Conclusion

Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'impact des microorganismes sur la détérioration de la pierre calcaire. Les microorganismes ont été introduits via un inoculum microbien mais certains étaient aussi présents sur le calcaire sain et se sont développés au cours de l'expérience en immersion dans une solution d'eau de pluie synthétique. Cependant, après une période de deux mois d'exposition, une teinte orangée est apparue à la surface des échantillons inoculés. Celle-ci est attribuée à des microorganismes sphériques qui pourraient être des microalgues. De plus, sur les échantillons, les communautés bactériennes se sont avérées beaucoup plus variées que les communautés fongiques, dont l'analyse s'est avérée plus complexe en raison de la difficulté à identifier les séquences d'ADN.

Deux analyses en composantes principales ont été réalisées corrélant la composition ionique des échantillons et les phyla bactériens (Figure 68 – A) ainsi que les classes fongiques (Figure 68 - B) après 63 jours d'incubation.

L'analyse en composante principale (ACP) pour les phyla bactériens (Figure 68 – A), montre que les dimensions 1 et 2 de l'ACP explique 65 % des données. Les échantillons contenant de l'inoculum microbien (PMO et PCMO) sont localisés dans un espace très proche indiquant des compositions assez similaires après 63 jours d'incubation. Ces microcosmes sont assez bien corrélés avec des proportions importantes de Chlorophyta, d'Armatimonadota ainsi qu'avec des concentrations importantes de magnésium et de calcium. Les échantillons PC sont quant à eux assez bien corrélés avec les Actinobacteriota et les Proteobacteria ainsi qu'avec des concentrations assez élevées en ammonium.

La deuxième ACP étudiant les classes fongiques (Figure 68 – B) exprime plus de 70 % des données et montrent les mêmes tendances que la première avec des compositions assez similaires des microcosmes PMO et PCMO, corrélées avec un grand nombre de champignons non identifiés (Fungi) ainsi que des concentrations importantes en calcium et magnésium. Les échantillons PC sont quant à eux assez bien corrélés avec les Agaricomycetes ainsi que des concentrations importantes en ammonium et oxalate.

La comparaison des différentes expériences montre que les populations présentes après 63 jours d'incubation sont très différentes de celles introduites par l'inoculum initial. De nouveaux phyla apparaissent (Figure 60) pour PCMO et PMO. En revanche, les différences entre PMO et PCMO sont moins marquées. Le calcaire joue donc un rôle faible dans la sélection des communautés microbiennes par rapport à l'eau de pluie.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

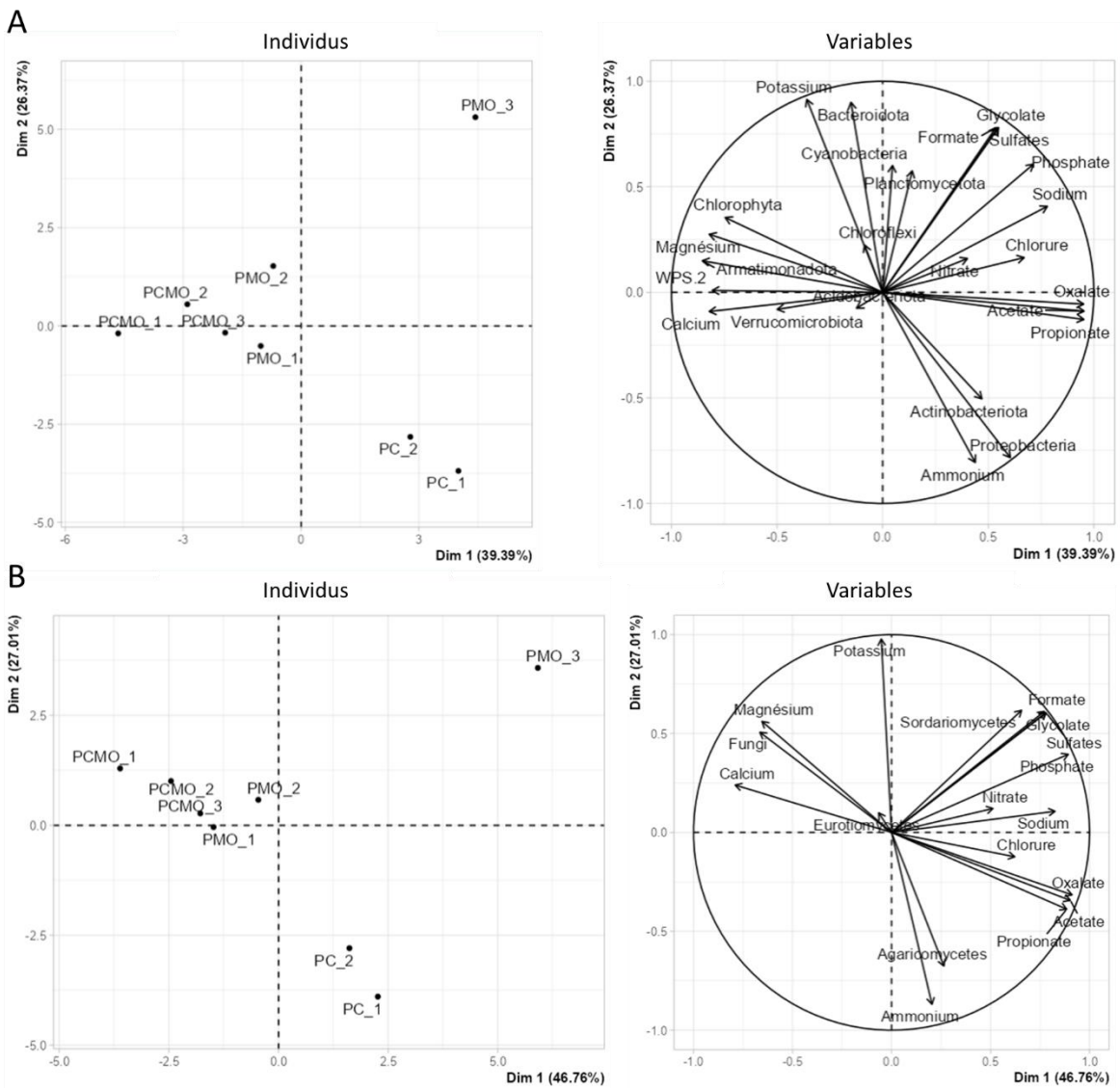


Figure 68: Analyses en composantes principales entre les compositions ioniques et les phyla bactériens (A) et entre les classes fongiques (B) après 63 jours d'incubation.

## Chapitre 4.2 : Altération du calcaire soumis à la pollution (particulaire et gazeuse) en présence de pluie en conditions statiques

Le chapitre précédent s'est focalisé sur la bio-détérioration de la pierre calcaire saine. Afin de complexifier le système et d'étudier les synergies pollution / bio-altération, les calcaires ont été soumis à une étape de pollution particulaire et gazeuse dans la chambre d'interaction matériaux — environnement (CIME).

Dans les conditions réelles, les monuments en pierre calcaire soumis à la pollution urbaine peuvent présenter des faciès d'altération de type encrassement ou encroûtements. Ces derniers sont composés de gypse ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) qui peut au cours de sa formation piéger des particules, notamment des suies (Camuffo et al., 1983; Vergès-Belmin, 2008).

Ainsi, dans cette étude, des coupons de calcaire sain ont été soumis à différents cycles d'altération avec des injections de  $\text{SO}_2$ , d' $\text{O}_3$  et des dépôts de suies afin d'initier la formation de croûtes noires. Pour rappel, le protocole suivant a donc été appliqué dans CIME :

- Dépôt de suie pendant 30 min puis sédimentation pendant 18h ;
- 6 séries d'injections par jour pendant un mois
  - o 20 injections de  $\text{SO}_2$  à 400 ppb
  - o 1 injection d' $\text{O}_3$  à 600 ppb pendant 12 min ( $\text{O}_3$  servant de catalyseur à la réaction)
  - o T 20°C et HR 100%

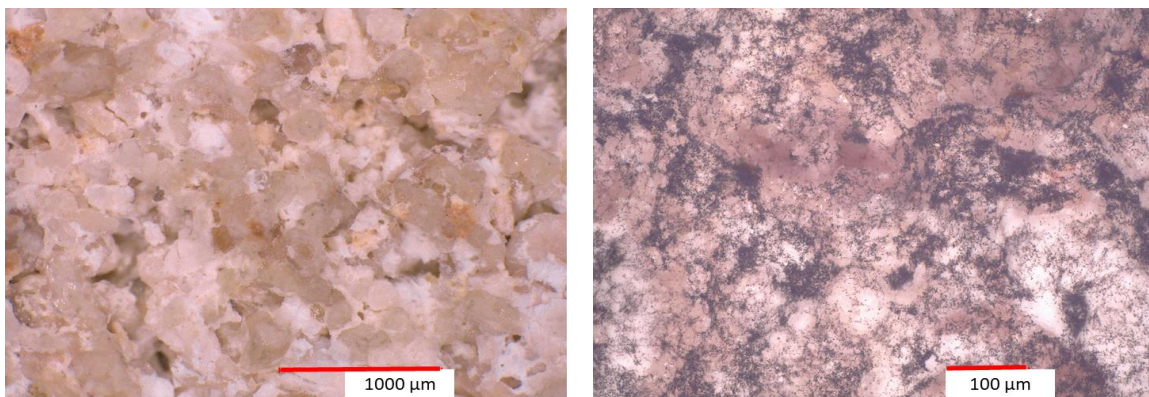


Figure 69 : Photographies au microscope numérique des calcaires avant et après un mois de vieillissement dans CIME.

L'état de surface du calcaire avant et après les cycles de vieillissement est montré Figure 69. Les particules de suie sont bien visibles après les cycles d'altération. Elles semblent se concentrer au niveau des interstices de la pierre.

Par la suite, ces échantillons artificiellement vieillis seront altérés suivant les mêmes conditions expérimentales que celle du chapitre 4.2 (Figure 70).

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

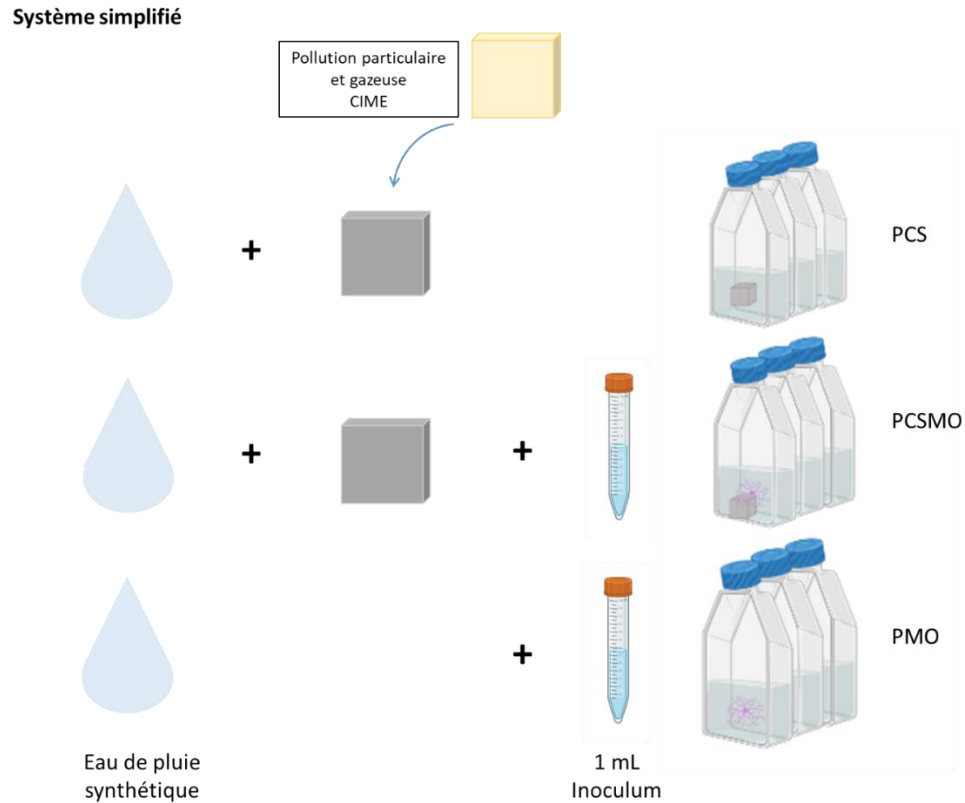


Figure 70 : Schéma de la démarche expérimentale. PCS : 'pluie-calcaire pollué' ; PCSMO : 'pluie-calcaire pollué-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

Les trois microcosmes sont composés de :

- Calcaire +  $\text{SO}_2$  +  $\text{O}_3$  + suie + eau synthétique, appelée **PCS**
- Calcaire +  $\text{SO}_2$  +  $\text{O}_3$  + suie + eau synthétique + inoculum microbien, appelé **PCSMO**
- Eau synthétique + inoculum microbien, appelé **PMO**

## 1. Évolution de la composition des microcosmes

L'évolution de différents paramètres biologiques et chimiques a été étudiée au cours du temps.

Dénombrement par cytométrie en flux

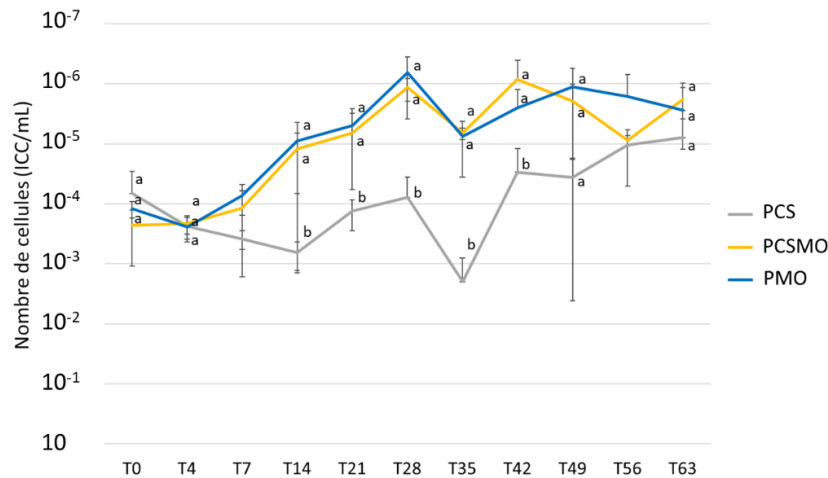


Figure 71 : Évolution du nombre de cellules intactes (ICC) par millilitre au cours du temps. . PCS : 'pluie-calcaire pollué', PCSMO : 'pluie-calcaire pollué-microorganismes' et PMO : 'pluie-microorganismes'. Les lettres a, b et c correspondent au degré de similitude après test statistique.

La Figure 71 illustre le développement de microorganismes au cours du temps, au sein des différents microcosmes. Le nombre de cellules intactes varie entre 1 000 et plus 1 000 000 au cours du temps et en fonction de la composition des microcosmes (Figure 71). Les microcosmes sans ajout de microorganismes (PCS) montrent une augmentation significativement plus faible du nombre de cellules intactes que pour les microcosmes avec ajout d'inoculum microbien. Enfin les différences observées entre les microcosmes avec ajout d'inoculum microbien, ne sont pas significatives entre elles.

Évolution du pH

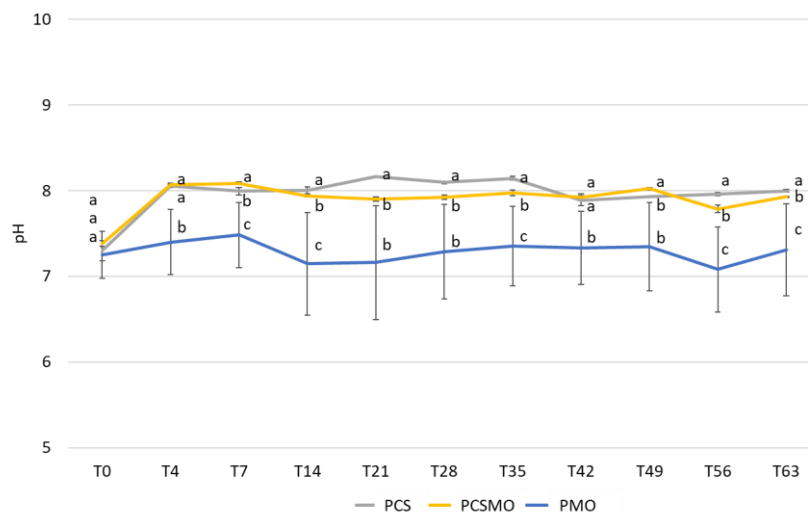


Figure 72 : Évolution du pH au cours du temps. PCS : 'pluie-calcaire polluée'; PCSMO : 'pluie-calcaire polluée-microorganismes'; PMO : 'pluie-microorganismes'. Les lettres a, b et c correspondent au degré de similitude après test statistique de Kruskal Wallis et test post-hoc Conover corrigé Bonferroni.

Durant l'expérience, le pH des solutions a très peu évolué avec des valeurs comprises entre 7 et 8,2 (

Figure 72). À T0, le pH des trois solutions est compris entre 7 et 7,5. Pour les microcosmes contenant du calcaire, S et PCSMO, le pH évolue assez rapidement (T4) pour se stabiliser à  $8,0 \pm 0,1$ . Le pH du microcosme ne contenant pas de calcaire (PMO) est plus acide, entre 7 et 7,5.

⇒ **Le pH des microcosmes PCS et PCSMO augmente significativement à cause du calcaire qui entraîne un effet tampon aux alentours de pH 8.**

Évolution de la composition ionique des solutions

La Figure 73 illustre l'évolution de la concentration des ions majeurs au cours du temps. Les résultats sont très similaires à ceux obtenus dans le chapitre 4.1 (Figure 55). En résumé, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  augmentent en présence de calcaire, alors que  $\text{NH}_4^+$  diminue en présence de bactéries et que  $\text{Na}^+$  diminue en présence de calcaire. Concernant les anions, les concentrations en sulfates restent stables en présence de microorganismes alors qu'elles diminuent en leur absence. La différence est plus marquée que pour l'expérience en présence de calcaire sain mais cela est dû à la différence de niveau initial. Les ions chlorures diminuent aussi sans microorganismes alors que les nitrates baissent en présence de microorganismes. Les concentrations en phosphates diminuent rapidement avec un léger décalage pour PMO. De même les résultats pour les anions organiques sont très semblables. On peut observer 2 pics pour les oxalates et les formates en présence de calcaire, mais des évolutions identiques pour l'acétate et le propionate.



## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

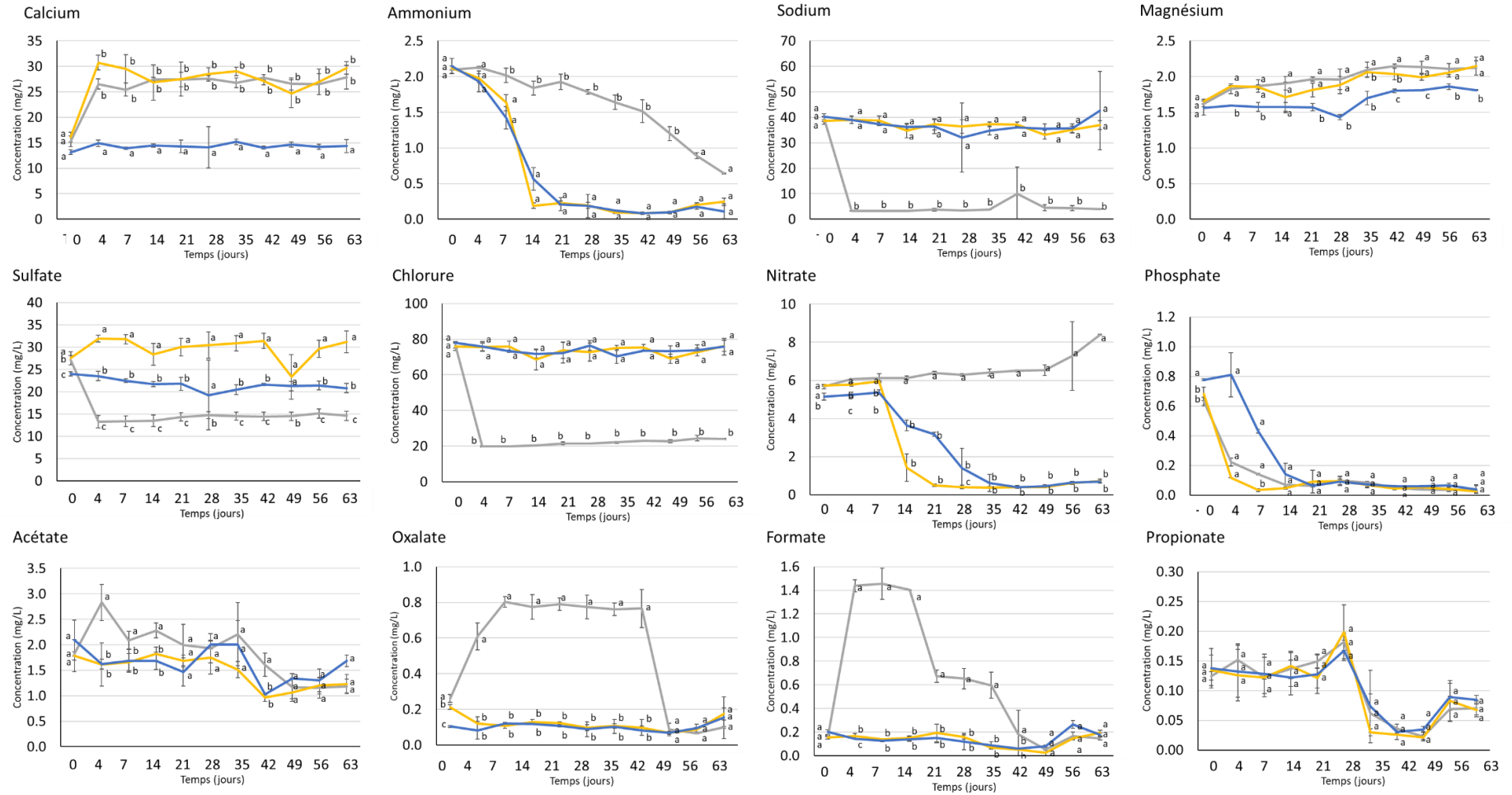


Figure 73 : Évolution des concentrations ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) des ions en solution au cours du temps. Les courbes grises correspondent aux échantillons PCS (pluie-calcaire pollué), les courbes jaunes aux échantillons PCSMO (pluie-calcaire-microorganismes) et les courbes bleues aux échantillons PMO (pluie-microorganismes). Les lettres a, b et c correspondent au degré de similitude après test statistique Kruskal Wallis et test Post-hoc Conover corrigé Bonferroni.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

À partir des concentrations en ions solubles et du pH mesuré, différentes modélisations de spéciation chimiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Visual MinTEq pour chaque microcosme (Figure 74).

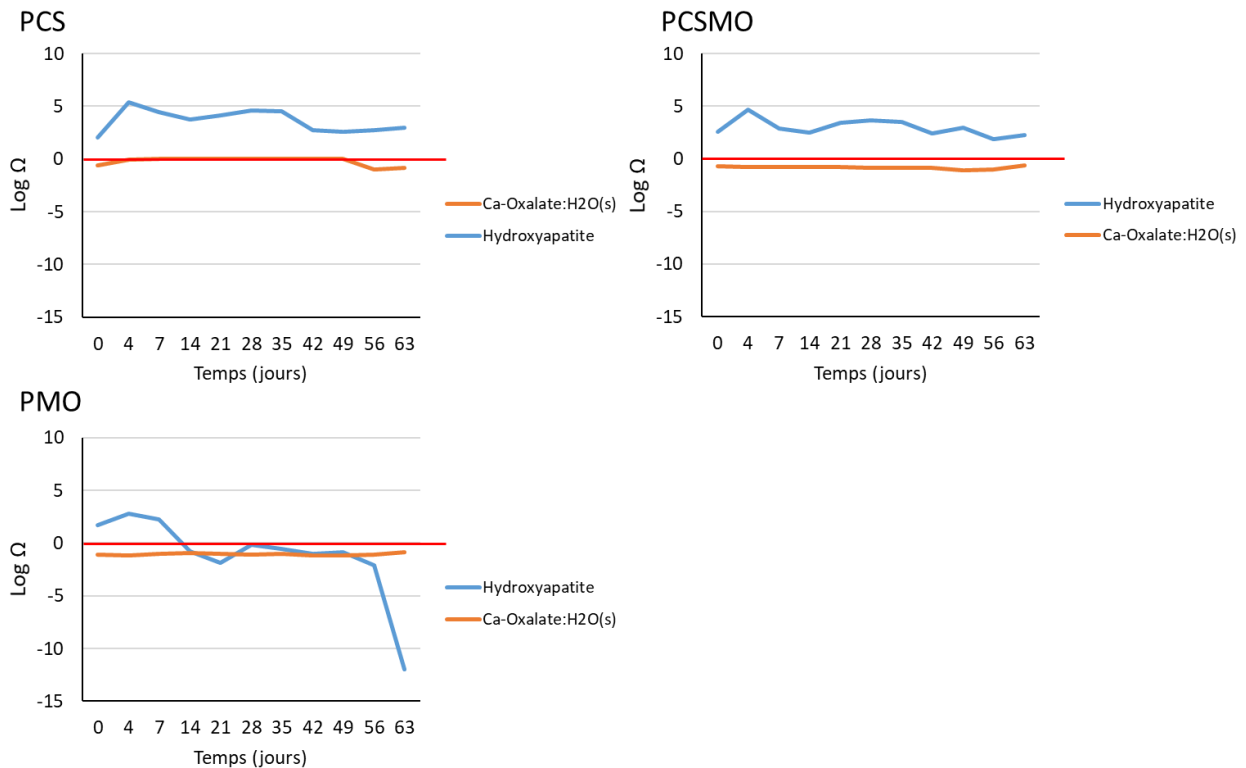


Figure 74 : Evolution de l'indice de saturation des phases formées au sein des différents microcosmes au cours du temps. La ligne rouge représente le seuil d'équilibre de solubilité au-dessus duquel les phases sont sursaturées.

Les modélisations de spéciation présentent des résultats très similaires à ceux observés sans pollution particulaire et gazeuse (Figure 56). L'hydroxyapatite est sursaturée pour les échantillons PCS et PCSMO et la solution est très proche de l'équilibre avec un oxalate de calcium dans l'ensemble des microcosmes.

⇒ **En termes de compositions ioniques les expériences avec (CS) et sans pollution particulaire et gazeuse (C) montrent très peu de différences.**

## 2. Caractérisation des calcaires après 63 jours d'altération :

La Figure 75 présente les changements colorimétriques des calcaires ayant subi une pollution particulaire et gazeuse puis une culture en présence ou non de microorganismes. La Figure 75 - A correspond au calcaire avant incubation, B après incubation sans ajout de microorganismes (PCS) et C après incubation avec ajout de microorganismes (PCSMO). Des différences chromatiques sont clairement observables entre les échantillons PCS et PCSMO. Ce dernier présente une patine orangée assez marquée. La représentation des échantillons au sein du domaine de couleur CIELAB (Figure 75 - D) montre une augmentation du paramètre L correspondant à la clarté entre les échantillons avant incubation et après incubation. Dans un

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

second temps, les paramètres a et b ont des valeurs plus élevées pour les échantillons PCSMO, ce qui indique un changement chromatique allant respectivement vers le rouge et le jaune, ce qui est cohérent avec la patine orangée observée en Figure 75 C.

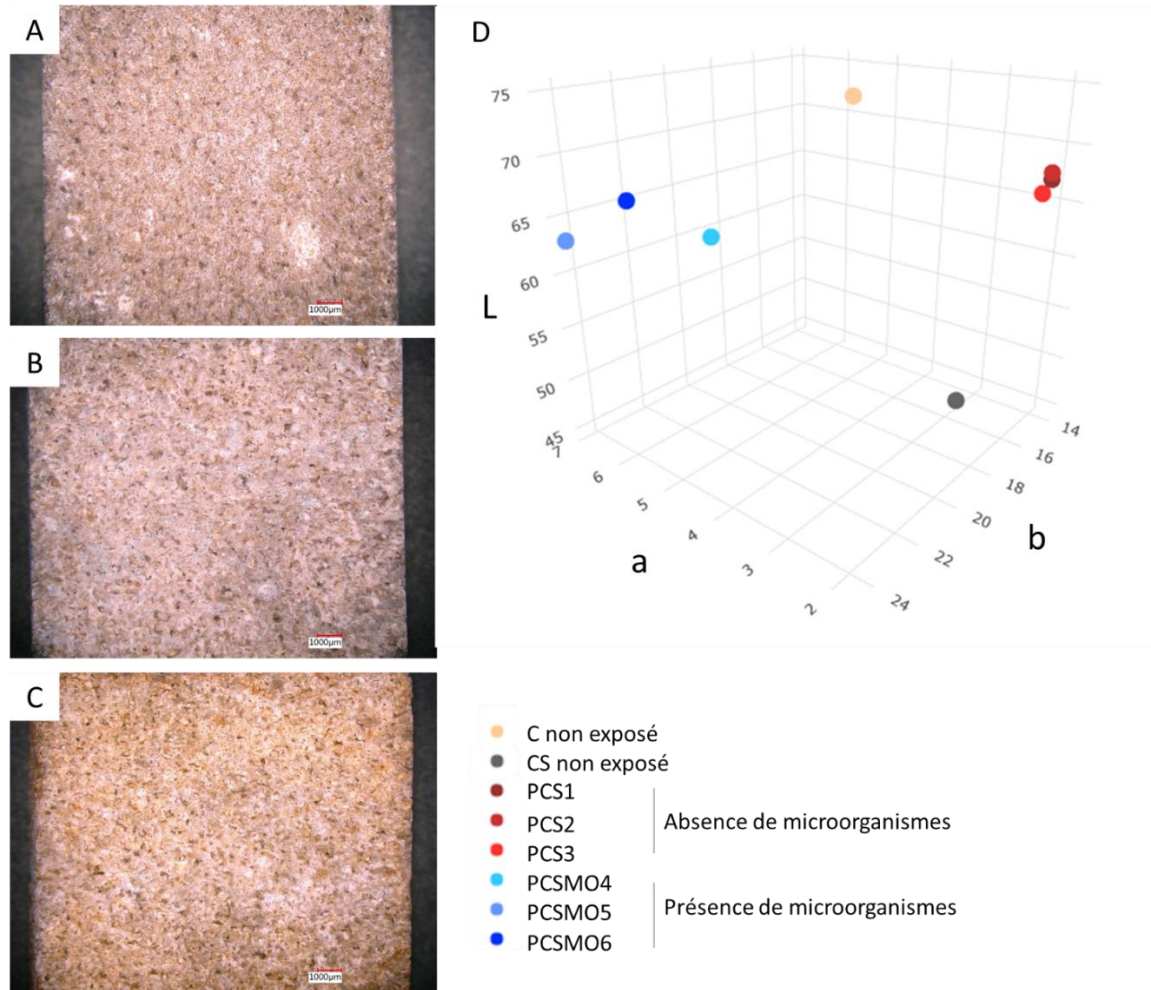


Figure 75 : (A) Photographies au microscope numérique du calcaire pollué avant incubation (CS) ; (B) PCS : 'pluie-calcaire pollué' ; (C) PCSMO : 'pluie-calcaire pollué-microorganismes' ; (D) Représentation en 3D des variations chromatiques dans l'espace CIELAB.

La Figure 76 correspond à des observations microscopiques des différents calcaires. Les échantillons avant incubation montrent une très grande quantité de particules sombres (sues de propane) pouvant être concentrées en amas au niveau de certains interstices du calcaire (Figure 76 A - B). Les images des échantillons PCS font apparaître la présence de suie en quantité inférieure (Figure 76 C - E). Des structures sphériques vertes (Figure 76 C - D) et orange (Figure 76 - E), possiblement d'origine biologique, sont observables. Enfin pour les échantillons PCSMO (Figure 76 F - H), la présence de suies est aussi plus faible qu'avant incubation. Ils présentent surtout des structures sphériques orange, visibles en grande quantité sur l'ensemble de la surface des calcaires et qui peuvent se regrouper en amas (Figure 76 - F).

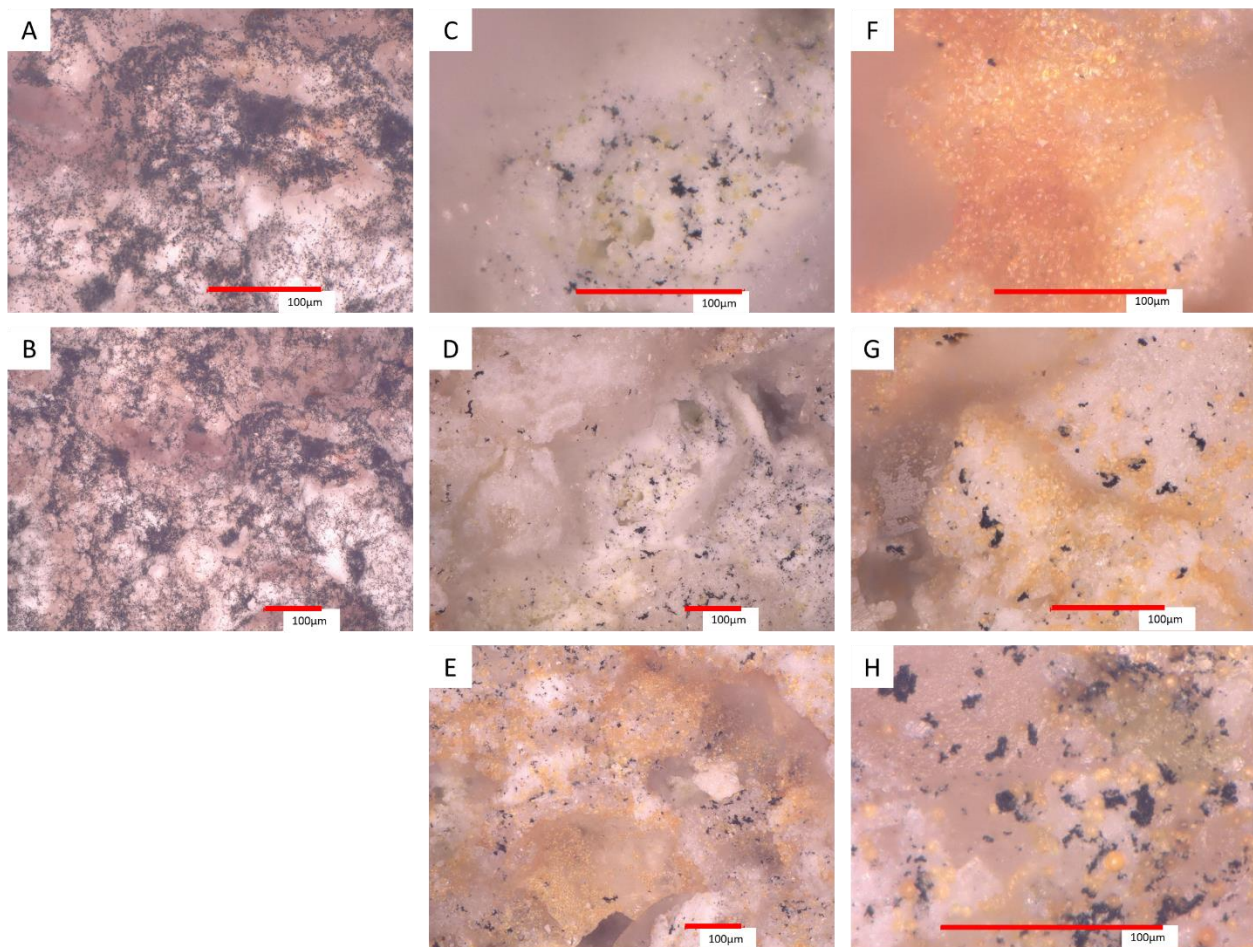


Figure 76 : Observations microscopiques des calcaires : (A-B) avant incubation ; (C-E) après incubation PCS ('pluie-calcaire pollué') ; (F-H) après incubation PCSMO ('pluie-calcaire pollué-microorganismes').

### 3. Communautés microbiennes

Les communautés bactériennes et fongiques présentes dans les différents microcosmes seront dans un premier temps étudiées en termes de diversité (alpha et bêta) puis une analyse des microorganismes présents à l'échelle des phyla et des genres sera réalisée.

#### 3.1. Bactéries

##### 3.1.1. Indice de biodiversité des communautés bactériennes

Alpha-diversité

Différents indices d'alpha-diversité sont présentés dans le Tableau 22.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

Tableau 22: Indice d'alpha-diversité des communautés bactériennes.

	Richesse observée	Chao 1	Shannon	Inverse Simpson
Inoculum	72	75	3,1	12,6
PCS	16,3 ± 2,4	16,4 ± 2,5	1,6 ± 0,2	3,5 ± 1
PCSMO	95,7 ± 8,2	107,9 ± 8,6	3,0 ± 0,2	12,0 ± 2,5
PMO	95,7 ± 8,4	111,1 ± 8,7	3,0 ± 0,2	9,3 ± 2,7

À nouveau, les résultats sont très similaires à l'expérience précédente. Les échantillons PCS présentent la plus faible richesse spécifique observée avec une moyenne de 16,3 espèces présentes contre 72 pour l'inoculum, 95,7 pour PCSMO et 95,7 pour PMO et des indices Chao1, de Shannon et Inverse Simpson faibles. Les valeurs sont similaires ou légèrement plus élevées pour PCSMO et PMO par rapport à l'inoculum et mettent donc en évidence des diversités bactériennes plus élevées, avec une dominance de quelques espèces.

### Bêta-diversité

La Figure 77 correspond à une carte de chaleur illustrant l'indice de bêta-diversité de Bray-Curtis. Au sein des réplicats PCS et PCSMO, les indices de Bray-Curtis sont compris entre 0,43 et 0,62 pour S et entre 0,36 et 0,43 pour PCSMO. Les communautés bactériennes au sein de ces réplicats sont donc assez semblables. Au sein des réplicats PMO, les indices de bêta-diversité sont compris entre 0,61 et 0,9, indiquant que les communautés bactériennes sont assez différentes.

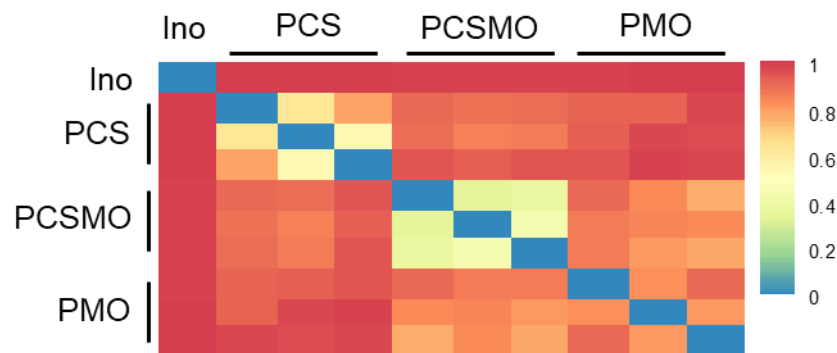


Figure 77 : Carte de chaleur représentant les indices de Bêta diversité de Bray-Curtis pour les bactéries. Ino : inoculum initial ; PCS : 'pluie-calcaire pollué' ; PCSMO : 'pluie-calcaire pollué-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

Les indices calculés entre les échantillons PCS et PCSMO et les échantillons PCS et PMO ont des valeurs comprises entre 0,83 et 0,97 et entre 0,88 et 0,98, respectivement. Les communautés bactériennes des échantillons PCS sont donc très différentes de celles de PCSMO et PMO. Entre ces 2 conditions, les indices sont compris entre 0,7 à 0,84 et indiquent alors des communautés bactériennes assez différentes.

### 3.1.2. Analyse des communautés bactériennes

La Figure 78 représente les abondances relatives de différents phyla au sein des microcosmes. L'inoculum microbien possède une grande diversité de phyla présents dans sa communauté bactérienne avec 9 phyla présents. Par comparaison, les échantillons PCS possèdent une faible diversité de phyla, entre 1 et 2. Les communautés des échantillons PCSMO et PMO ont entre 6 et 7 phyla. Les Bacteroidetes et les Proteobacteria sont les deux phyla présents majoritairement dans les échantillons, mais en proportion différente.

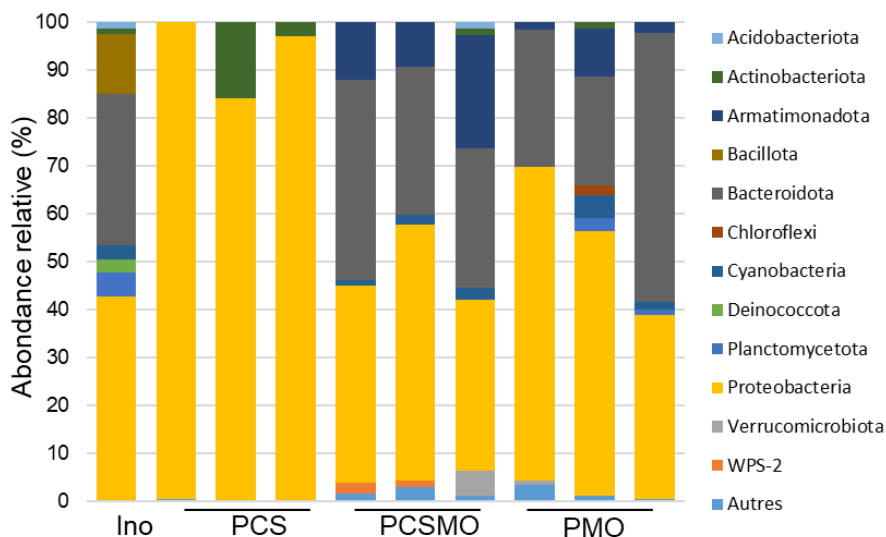


Figure 78 : Abondance relative des phyla bactériens (en %). Ino : inoculum initial ; PCS : 'pluie-calcaire pollué' ; PCSMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

Les Proteobacteria sont clairement présents en majorité dans les échantillons PCS avec des abondances relatives comprises entre 79 et 100 %. Pour les échantillons PMO et PCSMO, les Proteobacteria correspondent à environ un tiers des communautés bactériennes présentes. Les Bacteroidota sont présents dans les échantillons PMO et PCSMO avec des abondances relatives respectivement comprises entre 13 et 40 % et 24 et 37 %. Ce phylum n'est pas présent dans les échantillons PCS. Le phylum Armatimonadota est essentiellement présent en PCSMO avec des proportions comprises entre 7,5 et 20 %.

La Figure 79 représente l'abondance relative des genres bactériens présents dans les échantillons, ainsi que leurs taxonomies associées. Les Proteobacteria, dominants, sont représentés par quatre genres majoritaires dans les échantillons PCS : *Sphingomonas* (0 - 16 %), *Sphingopyxis* (34 - 55 %), *Pseudomonas* (0 - 13 %), *Polaromonas* (3 - 8 %) et par la famille Alcaligenaceae avec une abondance relative entre 7 et 30 %. Les Proteobacteria présents dans les échantillons PCSMO sont majoritairement représentés par les genres *Brevundimonas* (7 - 14 %) et *Polaromonas* (10 - 13 %). Enfin, les communautés PMO étant différentes au sein des triplicats, les genres prédominants diffèrent et sont : *Caulobacter* (18 %), *Bosea* (9 %) et *SM2D12* (10 %). Deux genres sont majoritaires au sein des Bacteroidota : *Pedobacter* (6 - 23 % pour PCSMO et 0 - 30 % pour PMO) et *Flavisobacter* (présents seulement pour PCSMO entre 6 et 12 %). Enfin les Armatimonadota sont représentées par la famille des Fimbrimonadaceae ayant des abondances relatives comprises entre 8 et 20 % pour les PCSMO et entre 1 et 6 % pour les PMO.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

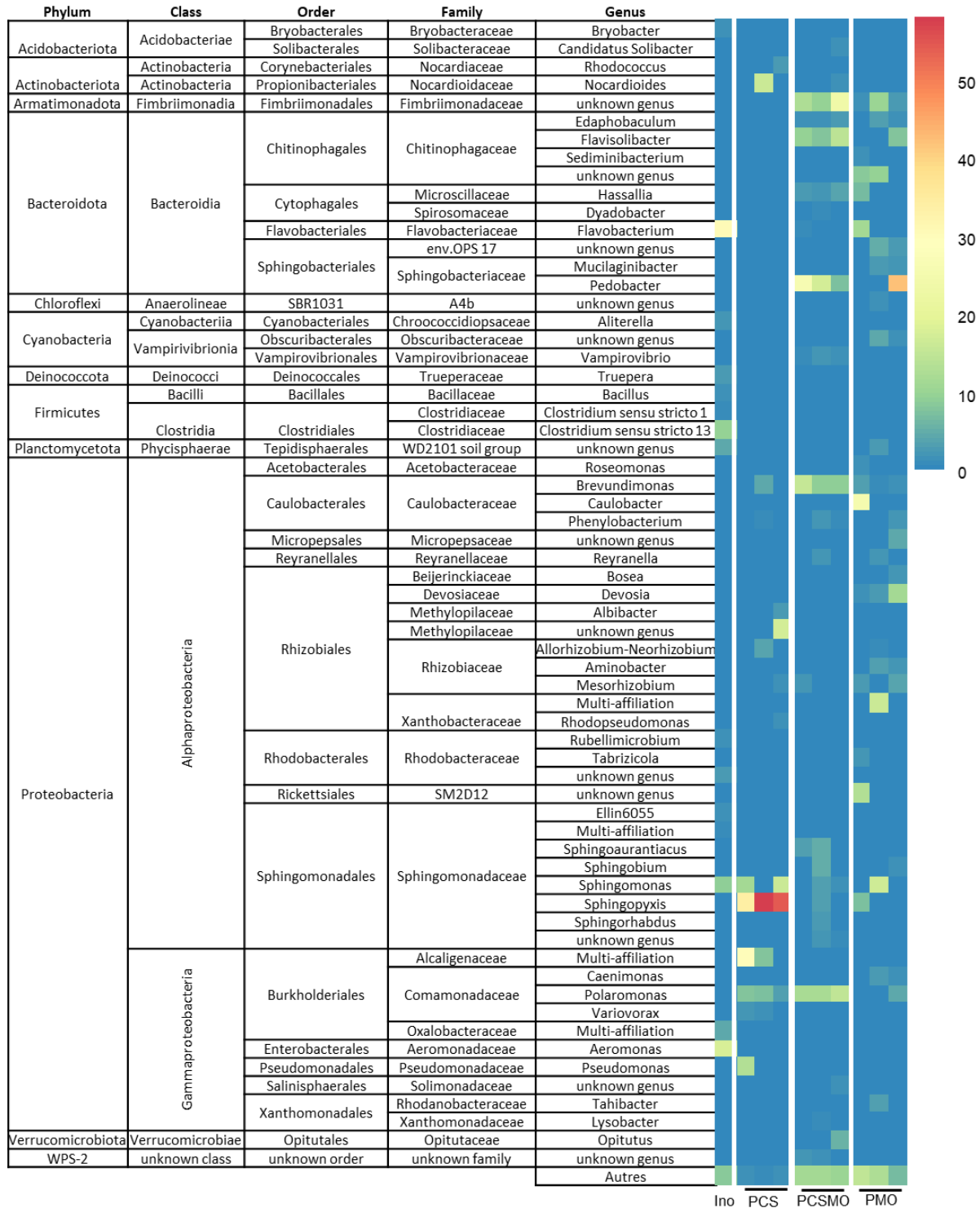


Figure 79: Abondance relative des genres bactériens (en %). Ino : inoculum initial ; PCS : 'pluie-calcaire pollué' ; PCSMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

### 3.2. Champignons

#### 3.2.1. Indice de biodiversité des communautés fongiques

##### Alpha-diversité

Le Tableau 23 représente les différents indices d'alpha-diversité pour chaque échantillon.

Tableau 23 : Indices d'alpha-diversité des communautés fongiques

	Richesse observée	Chao 1	Shannon	Inverse Simpson
Inoculum	105	108	2,85	6,2
PCS	15 ± 3	15,33 ± 3,21	1,50 ± 0,77	3,9 ± 1,8
PCSMO	22 ± 5	24,22 ± 3,98	1,13 ± 0,11	2,6 ± 0,4
PMO	43 ± 9	44,06 ± 10,39	2,21 ± 0,56	6,8 ± 2,3

L'inoculum se démarque par la plus grande richesse observée, atteignant 105 espèces, suivi des échantillons PMO avec 43 espèces, PCSMO avec 22 espèces et PCS avec 15 espèces. Les mêmes tendances se reflètent dans les indices Chao 1 et Shannon. Ainsi, selon ces trois indices, l'inoculum puis PMO présentent la plus grande diversité.

Le plus important indice Inverse Simpson est observé pour l'échantillon PMO, avec une valeur de 6,8, indiquant une répartition plus équitable des espèces présentes, contrairement aux autres échantillons dominées par quelques espèces majoritaires.

En résumé, l'inoculum et les échantillons PMO affichent une plus grande diversité fongique, tandis que les autres échantillons (PCS et PCSMO) montrent une plus grande prépondérance de certaines espèces majoritaires.

##### Bêta-diversité

La Figure 80 illustre l'indice de diversité bêta entre chaque échantillon sous forme d'une carte de chaleur.

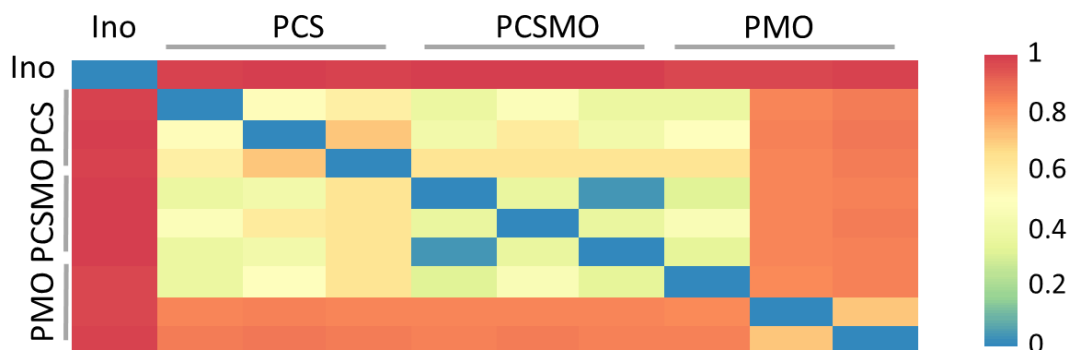


Figure 80 : Carte de chaleur représentant les indices de diversité bêta de Bray-Curtis des communautés fongiques. Ino : inoculum initial ; PCS : 'pluie-calcaire pollué' ; PCSMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.



Pour l'inoculum, les indices de bêta-diversité varient entre 0,98 et 1, ce qui montre que les communautés fongiques sont très différentes de celles identifiées à la fin de l'expérience. Au sein des triplicats, les communautés fongiques présentent des différences assez marquées pour PCS (indice entre 0,52 et 0,72), plus faibles pour PCSMO (0,04 - 0,37) et fortes pour PMO (0,72 et 0,86).

Les échantillons PCS et PCSMO présentent des différences notables avec des indices 0,38 et 0,72. Par ailleurs, PMO se distingue aussi fortement de PCS et PCSMO avec des valeurs entre 0,38 et 0,88.

### 3.2.2. Communautés fongiques

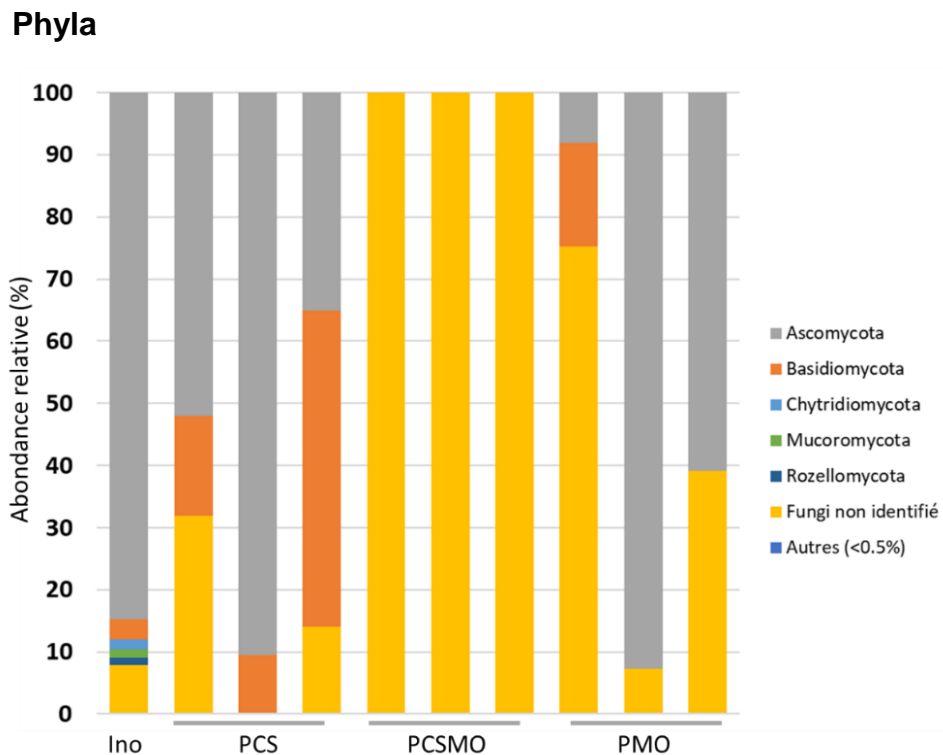


Figure 81 : Abondance relative des phyla fongiques (en %). Ino : inoculum bactérien ; PCS : 'pluie-calcaire pollué' ; PCSMO : 'pluie-calcaire pollué-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

De la même manière que pour les échantillons contenant du calcaire sain, un grand nombre de séquences fongiques n'a pas pu être identifié au niveau du phylum. De plus, deux phyla majeurs se démarquent également, les Ascomycota et les Basidiomycota (Figure 81).

L'inoculum présente la plus grande diversité en termes de nombre de phylum. Les Ascomycota prédominent largement au sein des échantillons PCS, PMO et de l'inoculum. Les Basidiomycota représentent quant à eux entre 9 et 50 % des échantillons PCS et entre 0 et 17 % des échantillons PMO des communautés fongiques. Pour l'inoculum, on retrouve aussi des phyla tels que Basidiomycota, Chytridiomycota, Mucoromycota et Rozellomycota.

## Genre

La *Figure 82* présente les divers genres présents au sein des échantillons. L'échantillon d'inoculum possède la plus grande diversité fongique. Le genre *Knufia* est majoritaire, représentant 55 % de la communauté, suivi du genre *Extremus* (11 %) et des genres minoritaires, en proportions inférieures à 4 %. Pour PCSMO, aucun genre n'a pu être identifié. Pour PCS, 10 genres ont été identifiés. Les genres majoritaires sont *Inocybe*, avec une présence variant entre 8 et 42 %, *Aureobasidium*, entre 0 et 88 %, *Periconia*, entre 0 et 52 %, ainsi que *Blumeria*, entre 0 et 18 %. Quelques genres sont présents en proportions minimales, telles que *Malassezia* et l'ordre Trechisporales. Pour les échantillons PMO, 3 genres sont majoritaires : *Gamszarea* (4 à 56 %), *Penicillium* (0 à 53 %) et *Agaricomycetes* (0 à 16 %).

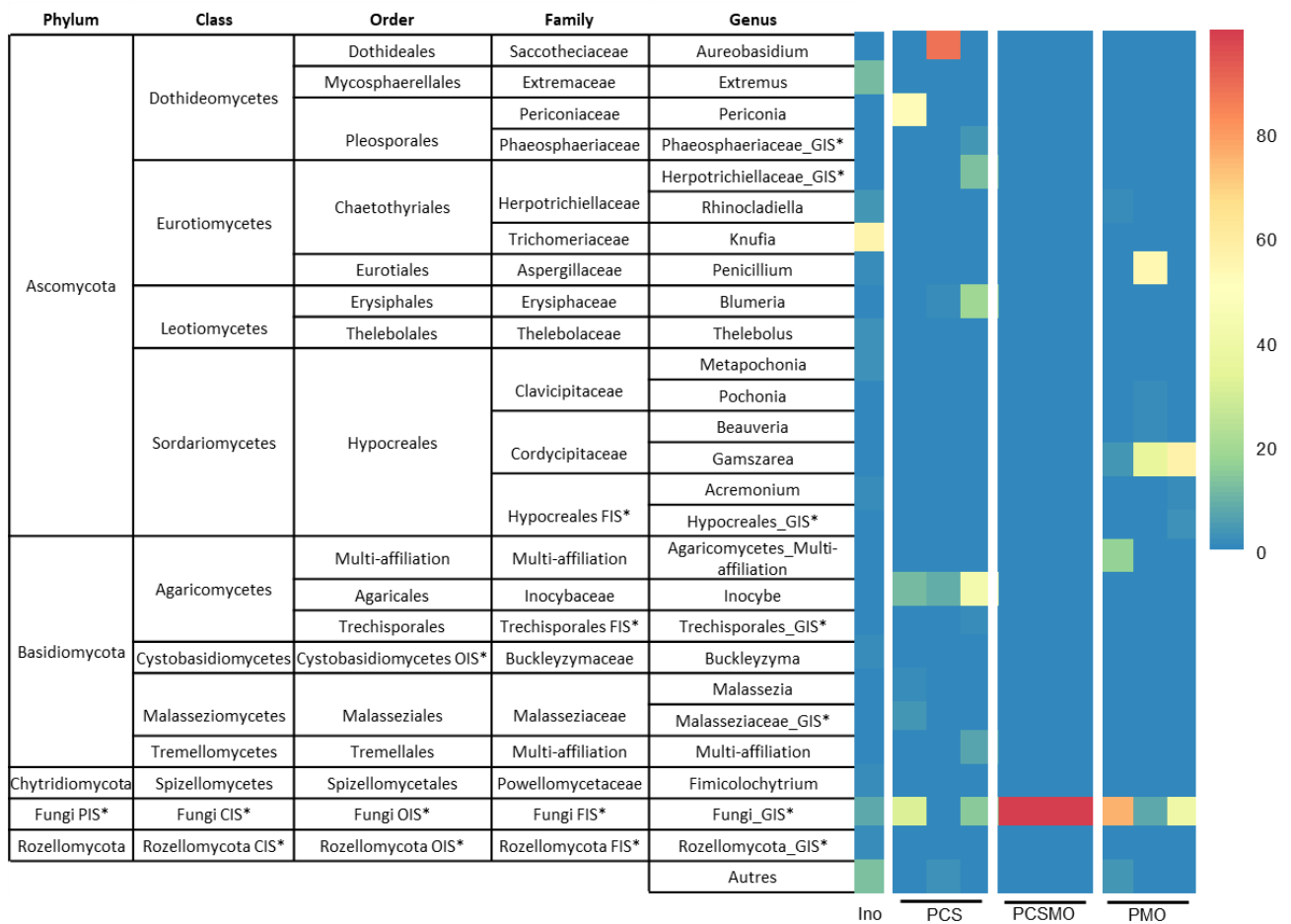


Figure 82: Abondance relative de genres fongiques (en %). Ino : inoculum initial ; PCS : 'pluie-calcaire pollué', PCSMO : 'pluie-calcaire pollué-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

### 3.3. Algues

#### 3.3.1. Indice de biodiversité

##### Alpha-diversité

Tableau 24: Indice d'alpha-diversité des communautés algaires.

	Richesse observée	Chao 1	Shannon	Inverse Simpson
Inoculum	36	39,3	1,5	2,4
PCS	6,3 ± 0,9	6,3 ± 0,9	0,7 ± 0,3	1,7 ± 0,3
PCSMO	21,7 ± 0,8	27,3 ± 3,8	1,0 ± 0,0	2,3 ± 0,1
PMO	31,7 ± 2,9	33,2 ± 3,8	2,1 ± 0,5	6,3 ± 2,3

Le *Tableau 24* présente les différents d'indice d'alpha-diversité. Comme observé précédemment pour les communautés fongiques et bactériennes, les microcosmes PMO présentent la plus grande diversité algale, avec une richesse moyenne observée de 31,5 et un indice de Chao 1 moyen de 33,2. Les indices de Shannon et d'Inverse Simpson sont également les plus élevés, avec des valeurs respectives de 2,1 et 6,3, ce qui indique que les communautés algaires sont très diversifiées et dominées par plusieurs espèces principales.

Les microcosmes PCS possèdent quant à eux la diversité algale la plus faible avec des indices de Chao 1 et une richesse observée de 6,3. Les indices de Shannon et d'Inverse Simpson sont aussi plus faible, indiquant une diversité algale plus faibles et dominée par quelques espèces prédominantes.

##### Bêta-diversité

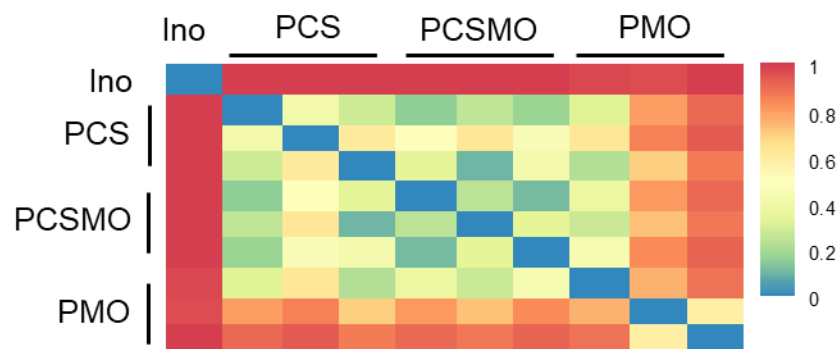


Figure 83: Carte de chaleur des indices de bêta-diversité de Bray Curtis. Ino : inoculum ; PCS : 'pluie-calcaire-suie'; PCSMO : 'pluie-calcaires-suie-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

La *Figure 83* illustre les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis (BC). Au sein des réplicats PCS et PCSMO, les indices de BC sont compris entre 0,2 et 0,4 indiquant une forte similarité des communautés algaires au sein des réplicats. Le réplicat PMO montre quant à lui des indices de bêta-diversité compris entre 0,6 et 0,8, montrant une dissimilarité moyenne à importante, donc des communautés différentes. Les indices de BC liés à l'inoculum sont compris entre 0,9 et 1, montrant des dissimilarité importantes entre les communautés présentes dans les microcosmes

et celle retrouvés dans l'inoculum, ce qui indique une forte évolution des communautés algales. Les microcosmes PCS et PCSMO présentent de faibles différences avec des valeurs comprises entre 0,2 et 0,4. Enfin, les communautés PMO sont assez dissemblable des communautés PCS et PCSMO avec des valeurs comprises entre 0,8 et 1.

### 3.3.2. Communautés algales

#### Phyla

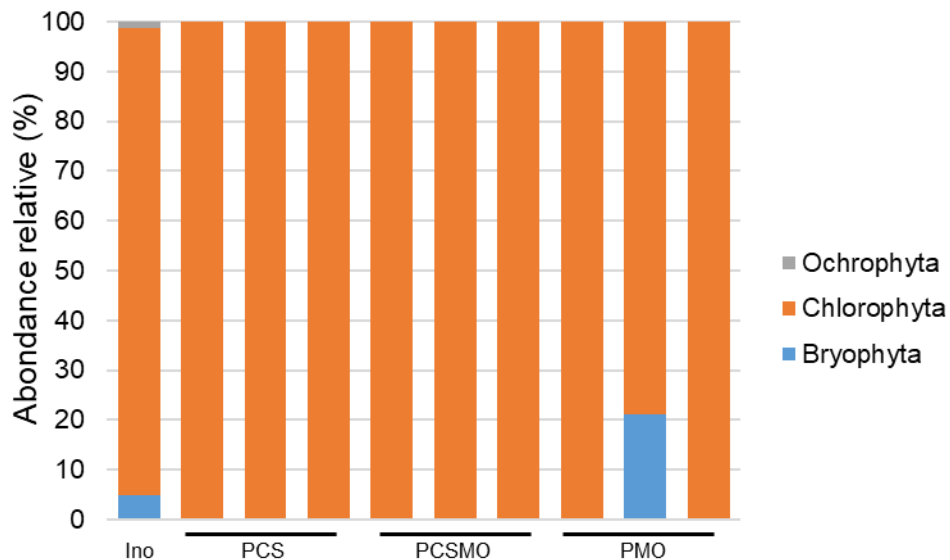


Figure 84: Abondance relative des phyla algaires identifiés dans les différentes conditions expérimentales. Ino : inoculum ; PCS : 'pluie-calcaire-suie' ; PCSMO : 'pluie-calcaire-suie-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

La *Figure 84* présente les abondances relatives des phyla identifiés dans les différentes conditions expérimentales. Les communautés algales sont majoritairement composées de Chlorophyta, présents dans l'ensemble des microcosmes, où ils représentent entre 80 et 100 % des communautés. Le phylum des Bryophyta a été détecté dans l'inoculum et dans les microcosmes PMO, avec une abondance relative variant de 5 à 20 %. Enfin, les Ochrophyta n'ont été identifiés que dans l'inoculum, avec une abondance très faible d'environ 2 %.

#### Genre

La *Figure 85* représente sous la forme d'une carte de chaleur les abondances relatives des genres algaires identifiés dans les différentes conditions expérimentales. L'inoculum, qui a été ajouté aux différents microcosmes contenant des microorganismes (PMO et PCSMO) est principalement composé du genre *Myrmecia*. Ce dernier n'a pas été identifié dans les communautés algaires après 2 mois de simulation. Les genres *Pseudomuriella* et *Chromochloris* sont principalement retrouvés dans les conditions PCS et PCSMO, en proportion similaire (~50%) pour PCSMO. Pour PCS, le genre *Pseudomuriella* est prédominant avec des proportions comprises entre 75 et 90 %. La condition PMO est la plus diversifiée en termes de genres algaires, avec la présence des genres *Coccomyxa*, *Tortula*, *Bracteacoccus*, *Chromochloris* et *Pseudomuriella*.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

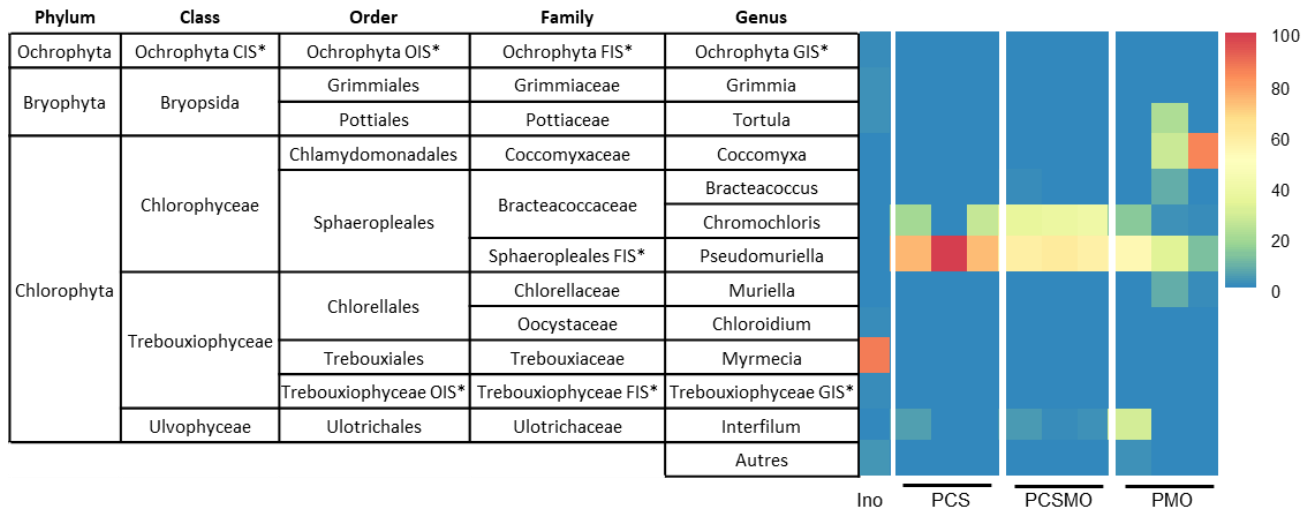


Figure 85: Abondance relatives des genres algaires identifiés dans les différentes conditions expérimentales. Ino : inoculum ; PCS : 'pluie-calcaire-suie' ; PCSMO : 'pluie-calcaire-suie-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

Des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées entre les concentrations en ions solubles et les phyla bactérien (Figure 86 – A) ainsi que les classes fongiques (Figure 86 – B).

Les deux ACP montrent des différences assez marquées entre les différents microcosmes. Les échantillons PCS montrent des concentrations importantes en nitrate et en ammonium corrélées avec les Proteobacteria (Figure 86 - A) et les classes fongiques Tremollomycetes, Agaricomycetes, Leotiomycetes et Dothiedomycetes (Figure 86 – B). Les échantillons PCSMO montrent des concentrations importantes en sulfate, chlorure, sodium, formate et oxalate, corrélées avec les phyla bactériens WPS.2, Armatimonadota, Verrucomicrobia, Bacteroidota et les Acidobacteriota. Enfin les microcosmes PMO montrent une corrélation positive entre la concentration de propionates et les phyla bactériens Cyanobacteria, Chloroflexi et Planctomycetota (Figure 86 – A). De plus, une corrélation notable est observée avec les Chlorophyta, ainsi qu'avec les classes fongiques Eurotiomycetes et Sordariomycetes (Figure 86 – B).

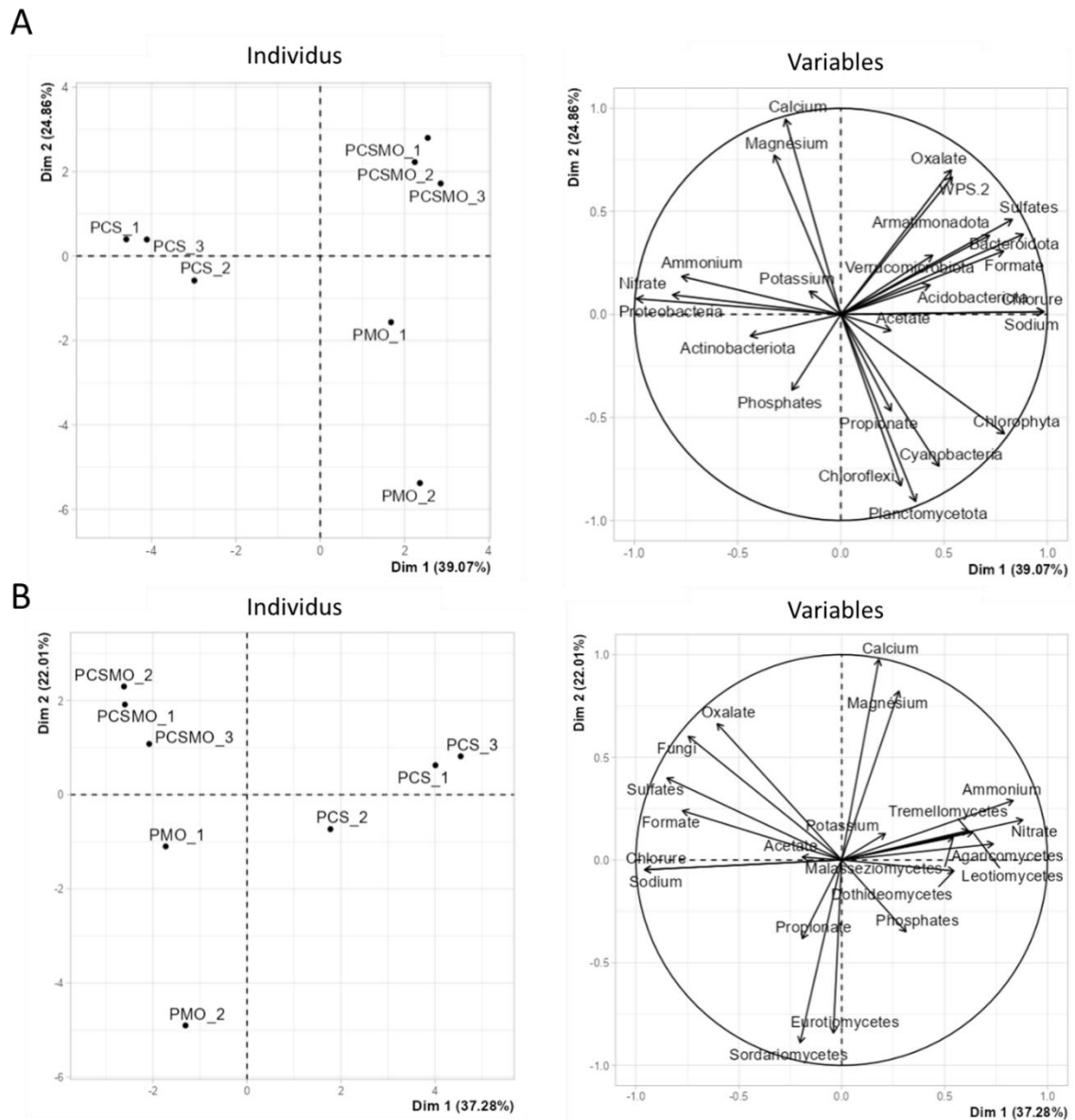


Figure 86: Analyses en composantes principales des ions solubles et des phyla bactériens (A) ainsi que des classes bactériennes (B).

#### 4. Comparaison entre PC et S

L'objectif de la comparaison entre PC et PCS est de déterminer si la pollution a un effet sur la sélection des communautés microbiennes. Le Tableau 6 présente donc les p-valeurs obtenues à partir d'analyses statistiques qui ont été menées pour comparer les échantillons de calcaire non pollué (PC) et de calcaire pollué (PCS) au fil du temps.

Concernant le nombre de microorganismes, il n'y a pas de différences significatives entre les échantillons PC et PCS. Pour les échantillons PCMO et PCSMO, la comparaison est plus complexe. Sur les 11 pas de temps étudiés, 5 présentent une différence significative dans le nombre de microorganismes.

Les évolutions du pH sont similaires pour les échantillons PC et PCS, suggérant que le calcaire tamponne la solution de manière semblable dans les deux cas.

La quantification des ions par chromatographie ionique montre que :

- Aucune différence significative n'est observée pour les anions organiques (acétate, formate, oxalate et propionate), pour les anions chlorures, nitrates et phosphates et pour les cations ammonium et magnésium entre PC et PCS et entre PCMO et PCSMO. Cela indique que la pollution par le SO<sub>2</sub> et les suies n'affecte pas leur évolution.
- Les concentrations en sulfates diffèrent entre les échantillons PC et PCS du fait des conditions expérimentales. En effet, les échantillons pollués par le SO<sub>2</sub> et les suies de propane induisent nécessairement des concentrations en sulfates plus élevées.
- Les concentrations en calcium et en sodium diffèrent de manière significative. Les échantillons PCS ont des valeurs supérieures à celles des échantillons PC sur 7 des 11 pas de temps, mais cette différence est moins marquée dans les échantillons contenant un ajout de microorganismes. Pour le sodium, les concentrations dans les échantillons PCSMO sont supérieures dans 6 des 11 points de temps analysés.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

Tableau 25: p-valeur correspondant aux comparaisons entre les échantillons de calcaire sain et de calcaire pollué. L'astérisque \* signale une différence significative

	T0	T4	T7	T14	T21	T28	T35	T42	T49	T56	T63	
Dénombrement	PC-PCS	0,27	0,74	0,67	0,58	0,06	0,27	0,049*	0,27	0,39	0,28	0,28
	PCMO-PCSMO	0,62	0,049*	0,046*	0,23	0,94	0,05*	0,01*	0,53	0,37	0,049*	0,51
Acétate	PC-PCS	0,001*	0,09	0,51	0,049*	0,06	0,55	0,85	0,25	0,82	0,01*	0,55
	PCMO-PCSMO	0,12	0,16	0,17	0,12	1	0,054	0,5	0,02*	0,37	0,45	0,83
Formate	PC-PCS	0,09	0,83	0,81	0,51	0,08	0,5	0,5	0,82	0,046*	0,04*	0,49
	PCMO-PCSMO	0,27	0,02*	0,28	0,64	0,5	0,26	1	0,25	0,82	0,12	0,49
Oxalate	PC-PCS	0,49	0,51	0,01*	0,63	0,12	0,24	0,04*	0,23	0,82	0,24	0,046*
	PCMO-PCSMO	0,14	0,07	0,56	0,09	0,28	0,37	0,28	0,51	0,77	0,04*	0,01*
Propionate	PC-PCS	0,04*	0,1	0,68	0,82	0,51	0,27	0,35	0,35	0,35	0,046*	0,48
	PCMO-PCSMO	0,21	0,37	0,18	0,37	0,83	0,35	1	0,18	0,64	0,51	0,64
Chlorure	PC-PCS	0,06	0,69	0,89	0,03*	0,51	0,83	0,56	0,27	0,18	0,52	0,62
	PCMO-PCSMO	0,03*	0,06	0,03*	0,98	0,19	0,49	0,01*	0,01*	0,75	0,13	0,049*
Nitrate	PC-PCS	0,75	0,91	0,45	0,06	0,38	0,51	0,73	0,95	0,29	0,82	0,049*
	PCMO-PCSMO	0,61	0,56	0,09	0,51	0,21	0,5	0,03*	0,46	0,45	1	0,82
Phosphate	PC-PCS	0,5	0,1	0,046*	0,046*	0,25	0,18	1	0,51	0,046*	0,79	0,51
	PCMO-PCSMO	0,15	0,51	0,01*	0,11	0,74	0,043*	0,046*	0,046*	1	0,36	0,48
Sulfate	PC-PCS	8,10-	0,049*	2,10-4*	0,049*	0,049*	1,10-3*	1,10-4*	3,10-4*	0,049*	5,10-4*	1,10-4*
	PCMO-PCSMO	2,10-	8,10-5*	1,10-3*	8,10-3*	1,10-3*	6,10-3*	6,10-4*	5,10-4*	0,51	1,10-2*	0,03*
Calcium	PC-PCS	0,01*	9,10-3*	0,13	0,049*	0,05	0,06	0,03*	0,01*	0,049*	0,08	0,049*
	PCMO-PCSMO	3,10-	0,07	0,53	0,51	0,22	0,02*	7,10-3*	0,82	0,51	0,51	0,03*
Magnesium	PC-PCS	0,5	0,96	0,61	0,5	0,47	0,35	0,73	0,95	0,68	0,24	0,37
	PCMO-PCSMO	0,82	0,046*	0,68	0,43	0,47	0,79	0,74	0,26	0,24	0,94	0,63
Sodium	PC-PCS	0,048*	0,51	0,55	0,5	0,51	0,38	0,29	0,12	0,27	0,82	0,86
	PCMO-PCSMO	0,047*	0,045*	0,035*	0,75	0,11	0,32	0,01*	0,01*	0,6	0,08	0,049*
Ammonium	PC-PCS	0,44	0,48	0,82	0,046*	0,11	0,5	0,81	0,59	0,59	0,12	0,18
	PCMO-PCSMO	0,82	0,66	0,24	0,81	0,82	0,65	0,26	0,35	0,48	0,68	0,82



À la fin de l'expérience, une même patine orangée s'est développée sur les échantillons avec ajout de microorganismes (PCMO et PCSMO). Elle est induite par la présence de nombreux microorganismes sphériques de couleur orange. En ce qui concerne la composition des communautés microbiennes, les cartes de chaleur de l'indice de bêta-diversité (Figure 87) met en évidence des différences importantes entre les communautés microbiennes présentes dans les échantillons PC et PCS (indices entre 0,42 et 0,99 pour les communautés bactériennes, Figure 87 - A, et entre 0,01 et 1 pour les communautés fongiques, Figure 87 - B). Ces différences pourraient être induites par la présence de suies qui peuvent exercer une forme de sélection sur les communautés microbiennes mais peuvent également résulter en partie du fait que les échantillons n'ont été que partiellement stérilisés, permettant ainsi le développement de communautés microbiennes issues des populations initialement présentes dans chaque échantillon.

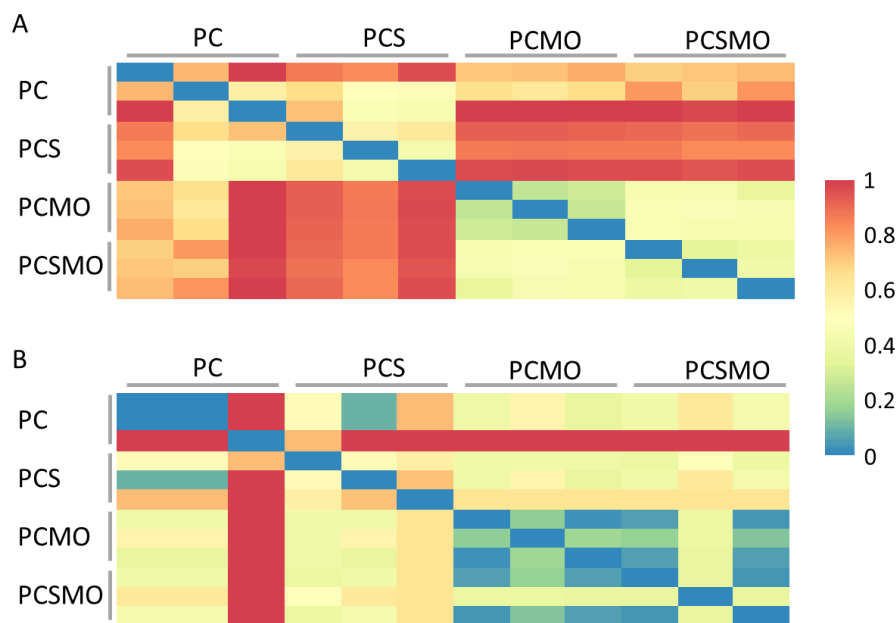


Figure 87 : Carte de chaleur des indices de Bêta diversité de Bray-Curtis, (A) communautés bactériennes ; (B) communautés fongiques. PCS : 'pluie-calcaire pollué' ; PCSMO : 'pluie-calcaire pollué-microorganismes' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

Pour les échantillons avec ajout de microorganismes (PCMO et PCSMO), les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis varient entre 0,25 et 0,46 pour les communautés bactériennes (Figure 87 A) et entre 0,03 et 0,38 pour les communautés fongiques (Figure 87 B). Ces indices suggèrent que les communautés bactériennes et fongiques présentes dans ces échantillons sont très similaires.

⇒ **En conclusion, il existe peu de différences entre les échantillons ayant subi une pollution particulaire et gazeuse et les échantillons de calcaire sain. Cette dernière n'est pas suffisamment marquée pour induire une sélection des communautés microbiennes.**

### Chapitre 4.3 : Altération du calcaire en présence de pluie polluée

Le chapitre précédent n'a pas mis en évidence de différences majeures sur l'altération du calcaire lors de l'ajout de pollution particulaire et gazeuse, Afin de déterminer si la pollution atmosphérique pourrait agir sur l'altération du calcaire, différentes expérimentations ont été réalisées en modifiant la composition de l'eau de pluie synthétique pour reproduire différents niveaux de pollution, À cette fin, trois composés ont été sélectionnés : les sulfates, les nitrates et l'ammonium, à des concentrations respectives de 23,85 mg.L<sup>-1</sup>, 31,92 mg.L<sup>-1</sup> et 14,24 mg.L<sup>-1</sup>.

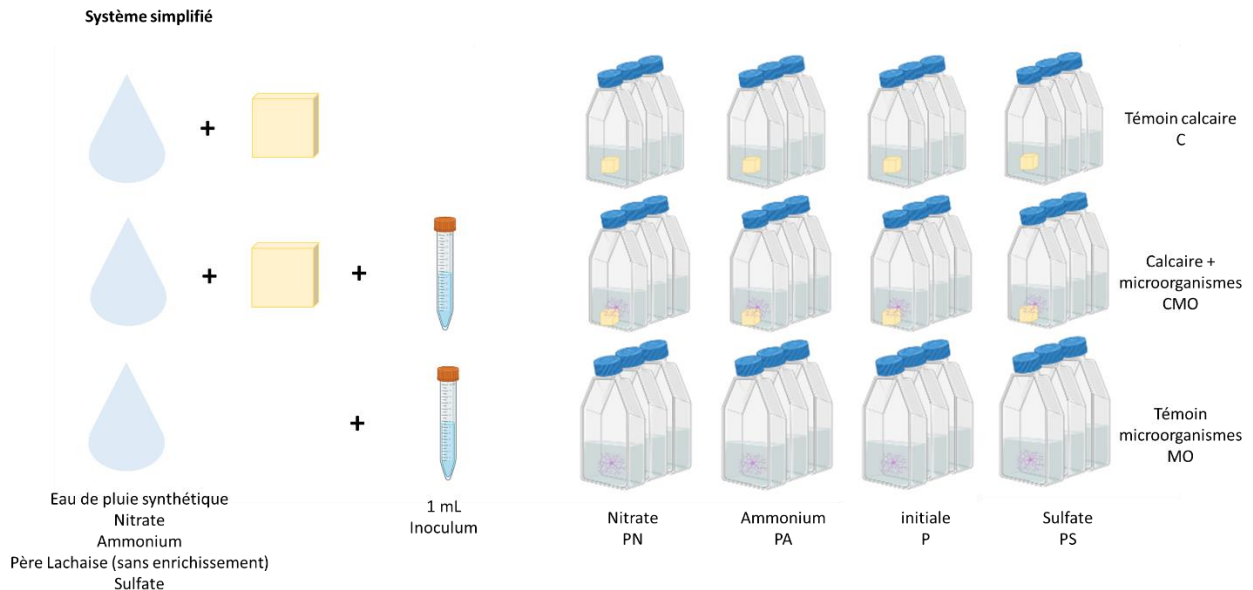


Figure 88 : Schéma de la démarche expérimentale. PN : pluie enrichie en nitrates ; PA : pluie enrichie en ammonium ; P : pluie non enrichie ; PS : pluie enrichie en sulfates.

Pour chaque pluie synthétique, trois microcosmes ont été réalisés (Figure 88)

- Eau de pluie + calcaire sain
- Eau de pluie + calcaire sain + inoculum microbien
- Eau de pluie + inoculum microbien

Chaque eau de pluie est basée sur la composition initiale caractéristique de celle récoltée au Père Lachaise (P) à laquelle sont ajoutés ou non des nitrates (PN), de l'ammonium (PA) et des sulfates (PS). Dans la suite de l'étude, chaque échantillon sera nommé par le type d'eau utilisée : P, PN, PA ou PS, suivi des acronymes C, CMO et MO, correspondant respectivement aux conditions 'témoin calcaire', 'calcaire et microorganismes' et 'témoin microorganismes'.

Les paramètres biologiques et chimiques seront examinés dans le temps et l'altération sera analysée après 63 jours d'exposition.

## 1. Évolution de la composition des microcosmes au cours de l'étude

### Dénombrement bactérien et fongique sur boîte de Petri

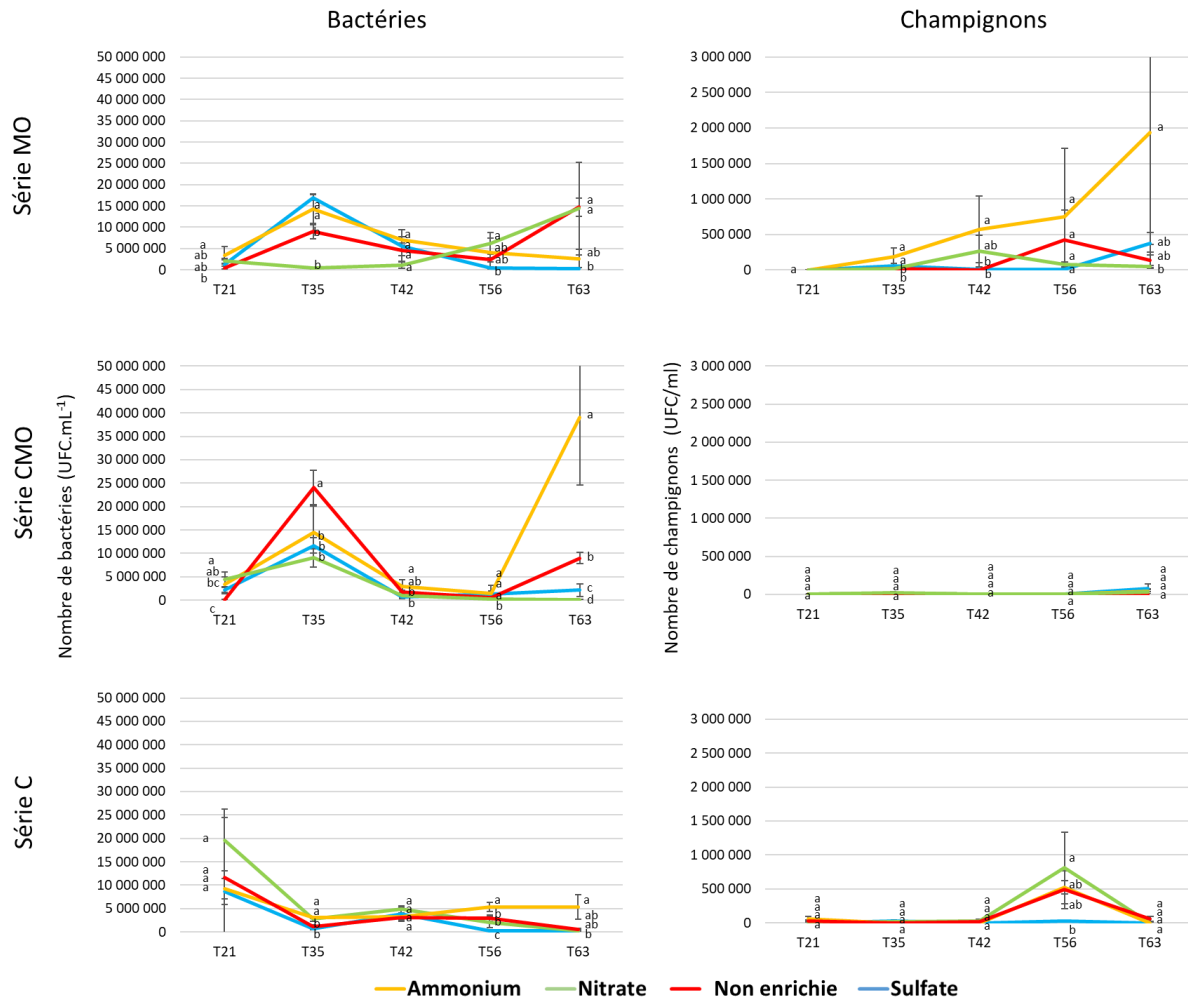


Figure 89 : Dénombrement bactérien et fongique en UFC.mL<sup>-1</sup> en fonction des différentes pluies et des conditions expérimentales, Série MO : 'pluie-microorganismes'; Série CMO : 'pluie-calcaire-microorganismes'; Série C 'pluie-calcaire'.

La Figure 89 illustre le nombre de bactéries et de champignons hétérotrophes cultivables au cours du temps dans les différents microcosmes entre T21 et T63. Le nombre de bactéries présentes dans les divers microcosmes dépasse systématiquement le nombre de champignons. Les quantités de bactéries varient entre 10 000 et 100 000 000 UFC.mL<sup>-1</sup>, tandis que celles de champignons se situent entre 0 et 2 000 000 d'UFC.mL<sup>-1</sup>.

Dans les microcosmes témoins contenant des microorganismes (Figure 89 - Série MO), on observe une hausse du nombre de bactéries entre les temps T21 et T35 puis une diminution progressive jusqu'à T63 pour les échantillons PAMO et PSMO. Pour les échantillons PNMO, on observe une diminution du nombre de bactéries de T21 à T35, suivie d'une augmentation jusqu'à T63.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

Les microcosmes contenant du calcaire et des microorganismes (Figure 89 - Série CMO) montrent une augmentation du nombre de bactéries entre T21 et T35 puis une diminution dans tous les milieux. À partir de T56, on observe une nouvelle augmentation du nombre de bactéries pour tous les milieux sauf les PNMO qui continuent leur diminution. À T63, les microcosmes enrichis en ammonium ont le plus grand nombre de bactéries, suivis des milieux non enrichis (P).

Enfin, les microcosmes témoins calcaires (Figure 89 - Série C) montrent très peu de variation au fil du temps. À partir de T56, une tendance se dégage où le milieu enrichi en ammonium possède le plus grand nombre de bactéries, comme observé précédemment pour les microcosmes contenant du calcaire et des microorganismes.

En ce qui concerne le nombre de champignons au sein des microcosmes, les quantités se situent entre 0 et 2 000 000 UFC.mL<sup>-1</sup> au fil du temps. Les échantillons de microcosmes témoins contenant des microorganismes ont la plus grande quantité de champignons et présentent une augmentation progressive au fil du temps. Cette augmentation est particulièrement marquée pour le milieu enrichi en ammonium. Les microcosmes composés de calcaire et de microorganismes présentent le nombre le plus faible de champignons, avec des valeurs proches de zéro tout au long de l'expérience. Les échantillons témoins avec du calcaire montrent également des valeurs assez faibles au fil du temps, proches de zéro. L'absence de calcaire pourrait favoriser certaines espèces plus à même de se développer dans des conditions aqueuses. Entre les jours 42 et 56 de l'expérience, on observe une augmentation rapide du nombre de champignons pour les milieux enrichis en nitrate, en ammonium et pour le milieu non enrichi, atteignant respectivement des valeurs comprises entre 500 000 et 750 000 UFC.mL<sup>-1</sup>,

### Quantification des algues vertes, cyanobactéries et diatomée par BenthosTorch

Des mesures des concentrations en microorganismes benthiques (algues vertes, diatomées et cyanobactéries) ont été réalisées à l'aide de la BenthosTorch (bbe Molendank®). Seules des concentrations en algues vertes ont été détectées dans les différents échantillons. La Figure 90 présente l'évolution de la concentration en chlorophylle due aux algues vertes au sein des différents microcosmes au cours du temps.

Les essais contenant du calcaire et de l'inoculum microbien montrent un développement rapide et important d'algues vertes, notamment dans les milieux enrichis en ammonium et en nitrate, avec un pic de concentration à T42 atteignant 1 µg.mL<sup>-1</sup> pour le milieu enrichi en nitrate et 3 µg.mL<sup>-1</sup> pour le milieu enrichi en ammonium. Pour le milieu non enrichi (P), la concentration en chlorophylle α est quasi nulle avec seulement un pic de 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> visible à T28. Enfin le milieu enrichi en sulfate ne montre pas de développement d'algues vertes au cours du temps.

Les microcosmes 'Témoins calcaires' montrent une légère tendance à l'augmentation de la concentration en algues vertes. Les concentrations sont faibles pour P, PA et PN à T21 et augmentent jusqu'à environ 1 µg.mL<sup>-1</sup> pour PN et PA. Pour les autres milieux, une légère croissance d'algues vertes est visible à partir de T28, mais reste assez faible avec une concentration moyenne de 0,25 µg.mL<sup>-1</sup>.

Dans les microcosmes 'Témoins microorganismes', les concentrations augmentent faiblement à partir de T28 jusqu'à 0,5 µg.L<sup>-1</sup> pour P, PA et PS et de manière plus conséquente jusqu'à 1 µg.mL<sup>-1</sup> pour PN.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

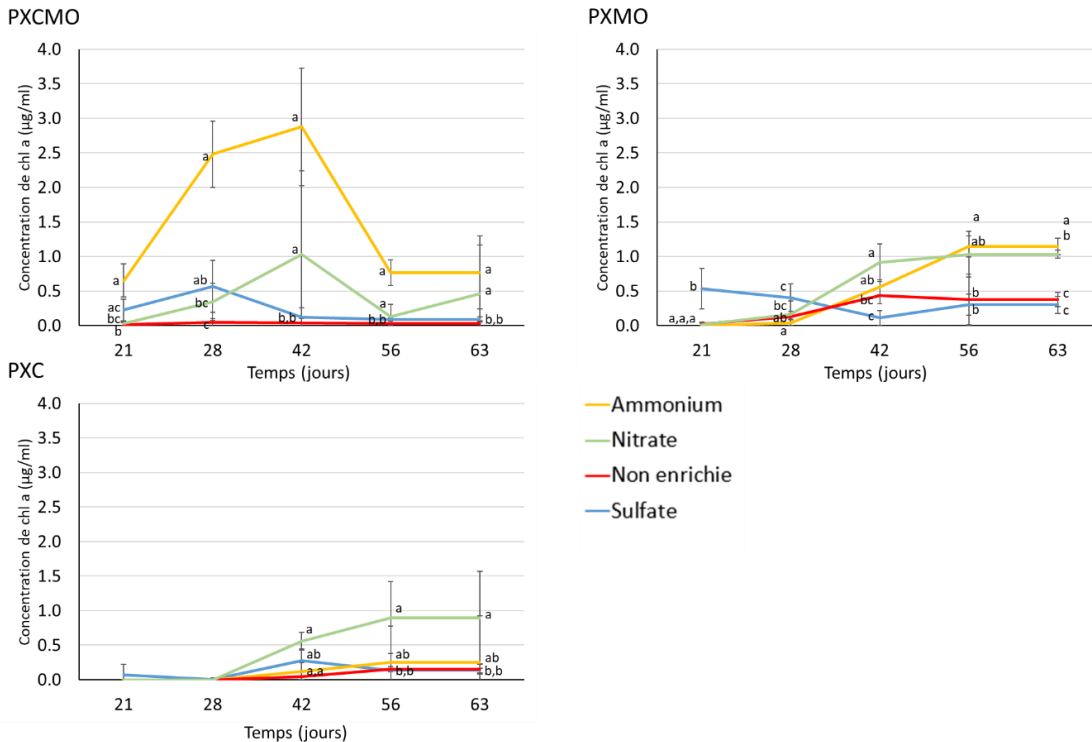


Figure 90 : Évolution de la concentration en algues vertes au cours du temps (en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), en fonction des différentes pluies. PXC MO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PXMO : 'pluie-microorganismes' ; PXC 'pluie-calcaire'. Les lettres a, b et c représentent le degré de similarité après test de Kruskal Wallis et test post-hoc Conover suivant la méthode Bonferroni,

### Évolution du pH au cours du temps

L'évolution dans les microcosmes contenant du calcaire et de l'inoculum microbien montre une évolution des pH entre 7 et 8 au cours du temps, pour les différentes pluies (Figure 91 - série PXC MO), Les pluies enrichies en ammonium et nitrates ont des pH légèrement plus élevés que les pluies non enrichies (PL) et enrichies en sulfates, pour les pas de temps T7, T14, T35, T49 et T56.

Dans les microcosmes témoins microorganismes ne contenant pas de calcaire (Figure 91 – série PXMO), le pH varie entre 3 et 8. À T4, l'ensemble des microcosmes a un pH autour de 7. Puis, le pH de la série enrichie en nitrates va chuter jusqu'à 5,5 à T28 puis remonter jusqu'à atteindre un pH de 8 à T63. Les séries PL et enrichie en ammonium vont rester assez stable jusqu'à T28. Entre T28 et T35 une chute du pH est observée, elle va se stabiliser pour la série PL qui va atteindre un pH autour de 7. La série enrichie en ammonium va quant à elle continuer de chuter, jusqu'à atteindre un pH de 3 à la fin de l'expérience. Cette variation de pH pourrait être induite par la production d'acides organiques par les microorganismes présents dans les microcosmes MO.

Les témoins calcaires sans microorganismes ne montrent pas de variation significative de pH avec une valeur constante de 8. La présence de calcaire dans les échantillons a donc un effet tampon dans les différents microcosmes (Figure 91 séries PXC MO et PXC).

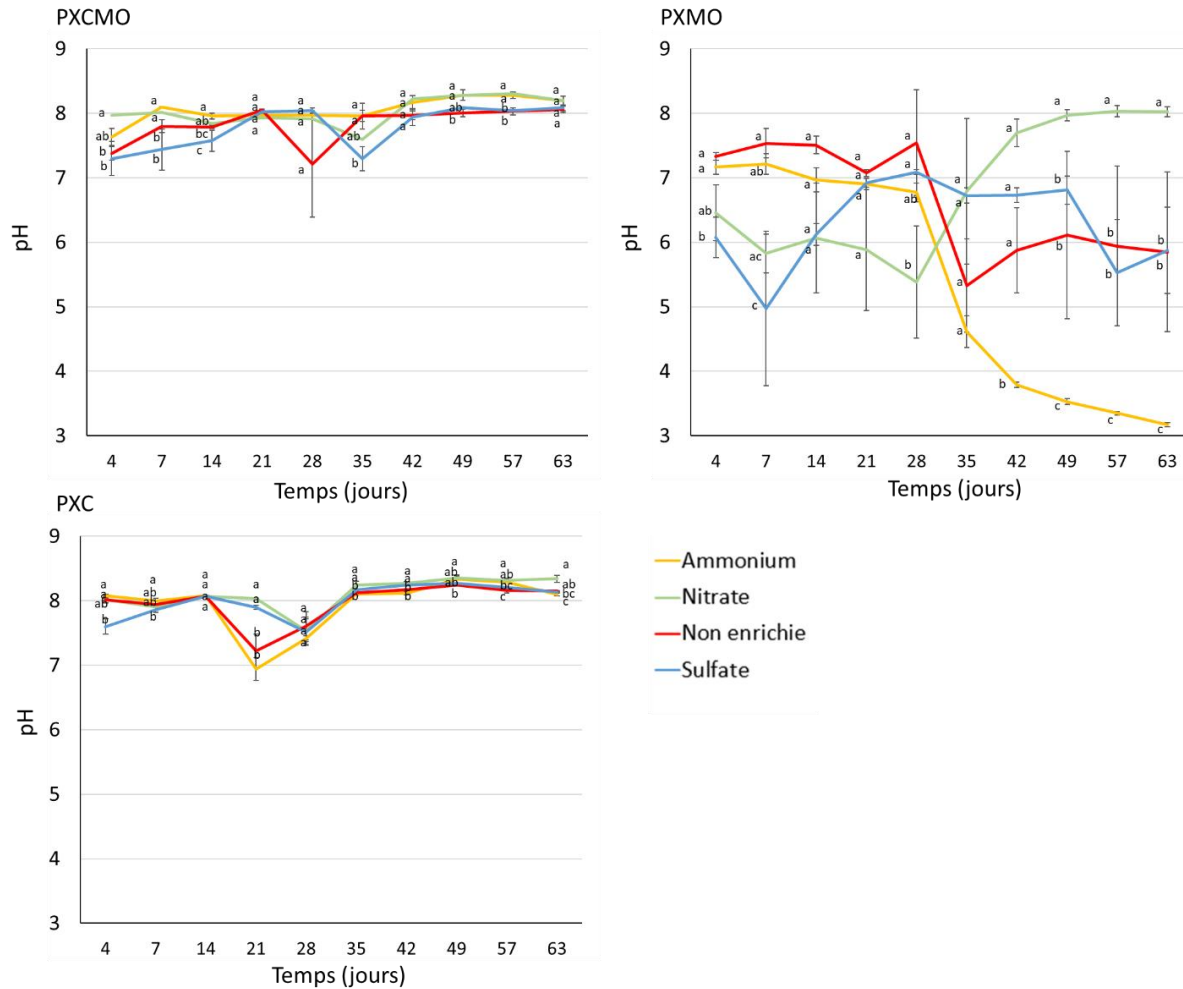


Figure 91 : Évolution du pH au cours du temps, en fonction des différentes pluies. PXC MO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PX MO : 'pluie-microorganismes' ; PXC : 'pluie-calcaire'. Les indices a, b et c correspondent au degré de similarité après les tests statistiques de Kruskal Wallis et test Post hoc Conover corrigé Bonferroni.

### Évolution de la concentration ionique des solutions

Les Figure 92 Figure 93 Figure 94 tracent respectivement les concentrations de différents cations, anions inorganiques et organiques au cours du temps.

Les concentrations en sodium évoluent de manière similaire. Elles restent constantes pour le témoin calcaire et augmentent en présence de MO. La quantification des ions présents dans les différentes solutions a été réalisée sur les solutions avant la mise en place des microcosmes. Cette augmentation de la concentration en sodium provient de l'inoculum microbien lui-même, car il est constitué de NaCl à une concentration de  $9 \text{ g.L}^{-1}$  (cf Chap 2 § 4.1.3).

En ce qui concerne l'ammonium, les concentrations initialement élevées diminuent au cours du temps. Peu de différences significatives sont observées entre les conditions expérimentales, à l'exception des précipitations enrichies en ammonium. L'échantillon calcaire et microorganismes diminue plus rapidement que le témoin calcaire (C) et le témoin MO (MO) pour atteindre des concentrations quasiment nulles.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

Les concentrations en calcium évoluent aussi de manière semblable. Elles augmentent fortement à T14 et se stabilisent ensuite. De plus, les échantillons MO (témoins microorganismes) ont des valeurs systématiquement inférieures à celles de C (témoin calcaire), elles-mêmes plus basses que CMO (calcaire avec microorganismes) pour toutes les pluies. L'évolution des concentrations en anions inorganiques est présentée dans la Figure 44. La tendance pour les chlorures est elle aussi identique pour tous les types de milieux. Elles augmentent pour les échantillons CMO et TMO entre T0 et T14 puis se stabilisent, hormis pour le milieu nitrate qui présente une forte hausse à T63. En revanche, les échantillons TC maintiennent des concentrations de chlorure stables du début à la fin de l'expérience.

Les concentrations en nitrates des différents échantillons suivent la même tendance pour tous les milieux et conditions expérimentales étudiées. Une phase stationnaire est observée entre T0 et T14, suivie d'une diminution entre T14 et T63. Dans tous les types de milieux, les microcosmes composés de calcaire et de microorganismes présentent une baisse plus marquée des concentrations en nitrate que les autres microcosmes.

Malgré des différences de concentration en phosphate entre les précipitations initiales (T0) pour les différents échantillons, une tendance similaire est observée au fil du temps. Les concentrations en phosphate diminuent rapidement entre T0 et T14, puis restent stables jusqu'à la fin de l'expérience, avec des valeurs inférieures à 5 mg.L<sup>-1</sup>. Aucune différence significative n'a été constatée entre les diverses conditions expérimentales.

Les concentrations en sulfates présentent deux tendances distinctes. Pour les milieux enrichis en sulfates et en ammonium, où les concentrations en sulfates à T0 sont plus élevées (respectivement 130 mg.L<sup>-1</sup> et 50 mg.L<sup>-1</sup>), une diminution des concentrations est observée entre T0 et T14, suivie d'un relatif plateau. Pour les milieux non enrichis et enrichis en nitrates, qui ont des concentrations plus faibles à T0 (~20 mg.L<sup>-1</sup>), une augmentation des concentrations de sulfates est notée pour les conditions TMO et CMO entre T0 et T14, suivie d'une stagnation, alors qu'elles diminuent pour TC.

Les concentrations des anions organiques (Figure 93) présentent peu de variations au cours du temps et en fonction des conditions expérimentales. Les concentrations en acétate varient généralement entre 1 et 4 mg.L<sup>-1</sup>. Pour tous les microcosmes, une augmentation des concentrations d'acétate est observée entre le moment initial (T0) et le jour 14 (T14), puis une diminution à T49 et à nouveau une nouvelle augmentation. Celle-ci est particulièrement remarquable pour les échantillons PNCMO, avec une valeur de 6,5 mg.L<sup>-1</sup> à T63. Les concentrations en formate varient entre 0 et 3 mg.L<sup>-1</sup>. Tous les échantillons présentent des tendances très similaires, montrant une diminution des concentrations entre T0 et T14, suivie d'une augmentation jusqu'à T35. De T35 à T63, les concentrations restent stables, et aucune différence significative n'est observée entre les différentes conditions expérimentales. Les concentrations de propionate dans les différents échantillons se situent entre 0 et 1 mg.L<sup>-1</sup> et restent relativement constantes au fil du temps. Enfin, les concentrations en oxalate sont extrêmement faibles (entre 0 et 0,4 mg.L<sup>-1</sup>) et présentent peu de variations au cours de l'expérience.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

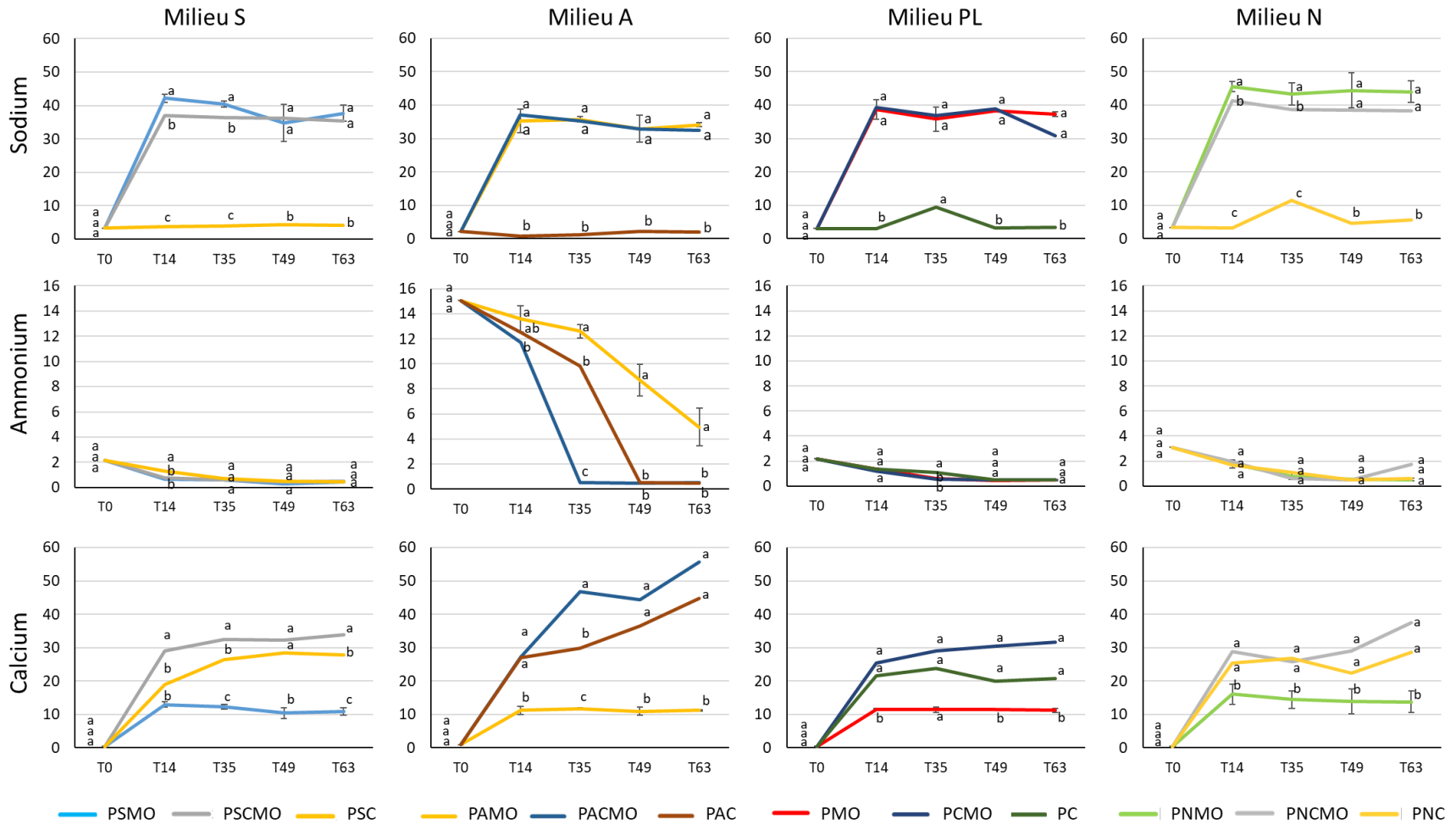


Figure 92: Évolution des concentrations en cations (en  $\text{mg.L}^{-1}$ ) au cours du temps. PXMO : 'pluie-microorganismes' ; PXCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PXC : 'pluie-calcaire'. X correspond à la composition du milieu avec S pour enrichi en sulfates, A enrichi en ammonium et N enrichi en nitrates. Les lettres a, b et c correspondent au degré de similitude après test statistique Kruskal Wallis et test post hoc Conover corrigé Bonferroni.



## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

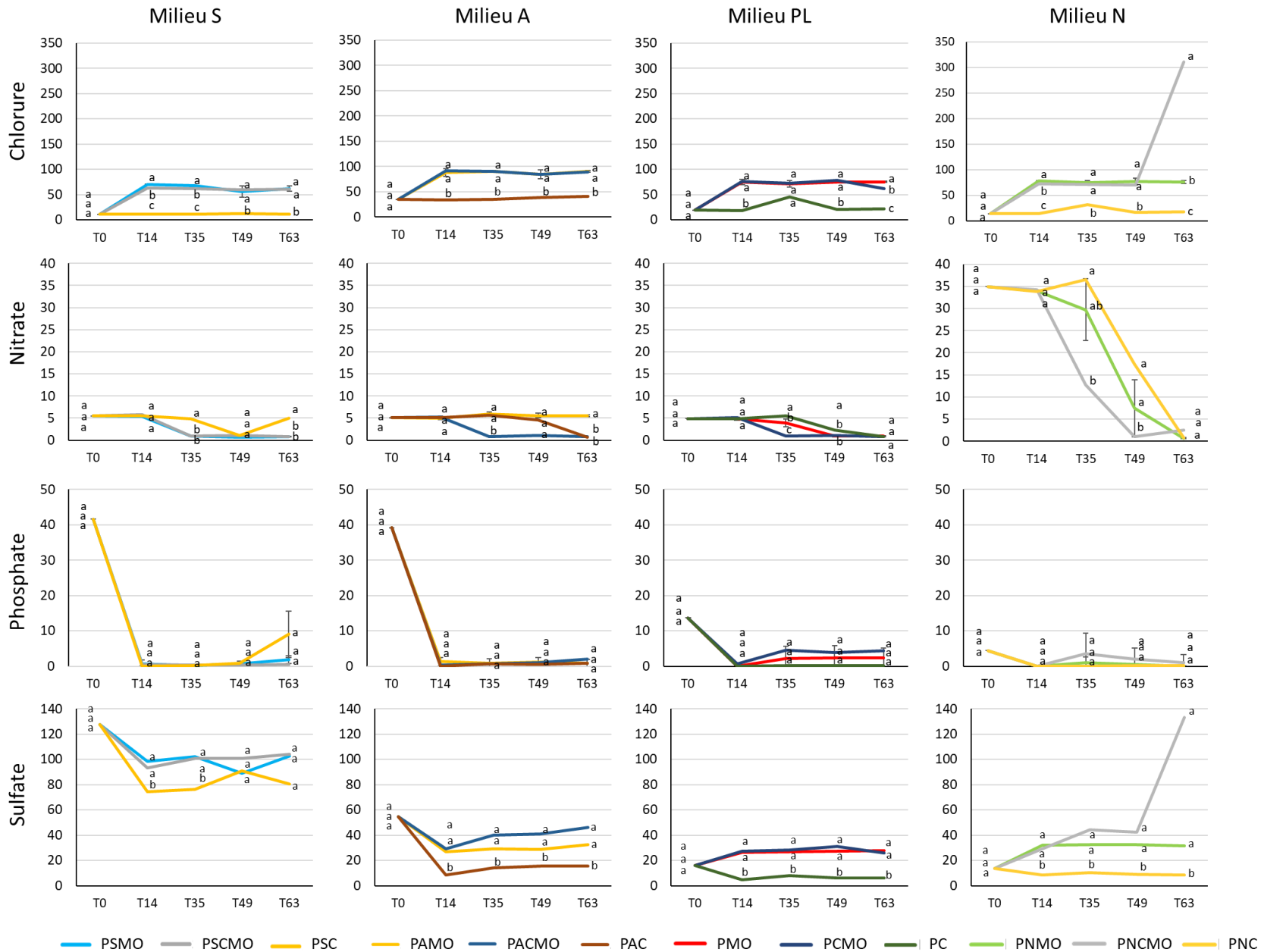


Figure 93 : Évolution de la concentration en anions inorganiques (en mg.L<sup>-1</sup>) en fonction du milieu au cours du temps. PXMO : 'pluie-microorganismes' ; PXC MO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PXC : 'pluie-calcaire'. X correspond à la composition du milieu avec S pour enrichi en sulfates, A enrichi en ammonium et N enrichi en nitrates. Les lettres a, b et c correspondent au degré de similitude après test statistique Kruskal Wallis et test post hoc Conover corrigé Bonferroni.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

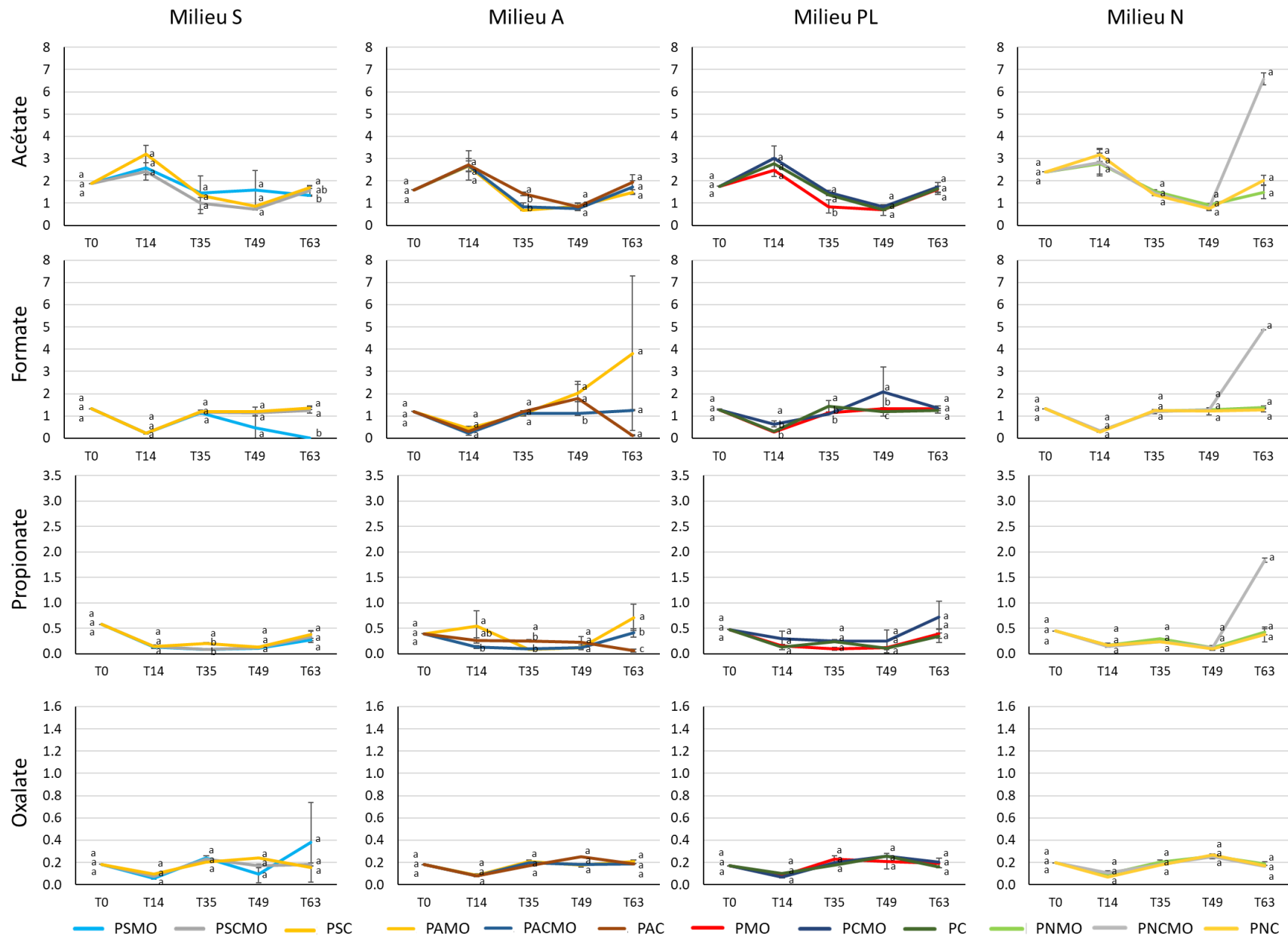


Figure 94 : Évolution des concentrations en anions organiques (en mg.L<sup>-1</sup>) au cours du temps, en fonction du milieu et des conditions expérimentales. PXMO : 'pluie-microorganismes' ; PXCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PXC : 'pluie-calcaire'. X correspond à la composition du milieu avec S pour enrichi en sulfates, A enrichi en ammonium et N enrichi en nitrates. Les lettres a, b et c correspondent au degré de similitude après test statistique Kruskal Wallis et test post hoc Conover corrigé Bonferroni.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

À partir des concentrations en ions solubles et des pH mesurés au cours du temps, différentes modélisations de spéciation chimique ont été réalisées au cours du temps utilisant le logiciel Visual MinTEq (cf chap 2 § 4.2.2.3).

La Figure 95 illustre l'évolution des indices de saturation des phases formées au cours du temps. Lorsque celui-ci est supérieur à 0, cela indique que la phase est sursaturée en solution.

Les phases sursaturées ou proches de l'équilibre sont principalement des phosphates de calciums sous différentes formes :  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (am2),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (beta),  $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (s) et de l'hydroxyapatite de formule chimique  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ . Les phosphates de calcium sont formés dans l'ensemble des microcosmes, excepté pour PSMO. L'hydroxyapatite présente des indices de saturations supérieurs à la limite de saturation, Les autres formes de phosphate de calcium sont quant à elle souvent en dessous de la limite de saturation, mais reste tout de même très proche.

Les indices de saturations des oxalates de calcium (Ca-oxalate,  $\text{H}_2\text{O}$ ) sont très proches de la limite de saturation (légèrement inférieurs) dans tous les microcosmes, excepté dans PAMO.

Enfin, deux autres phases sont proches de l'équilibre dans le microcosme PSMO : un phosphate de magnésium  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  et la struvite de formule chimique  $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . À T0, les indices de saturation de ces deux phases sont supérieurs à 0, puis à partir de 14 jours, ils repassent en dessous de l'équilibre.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

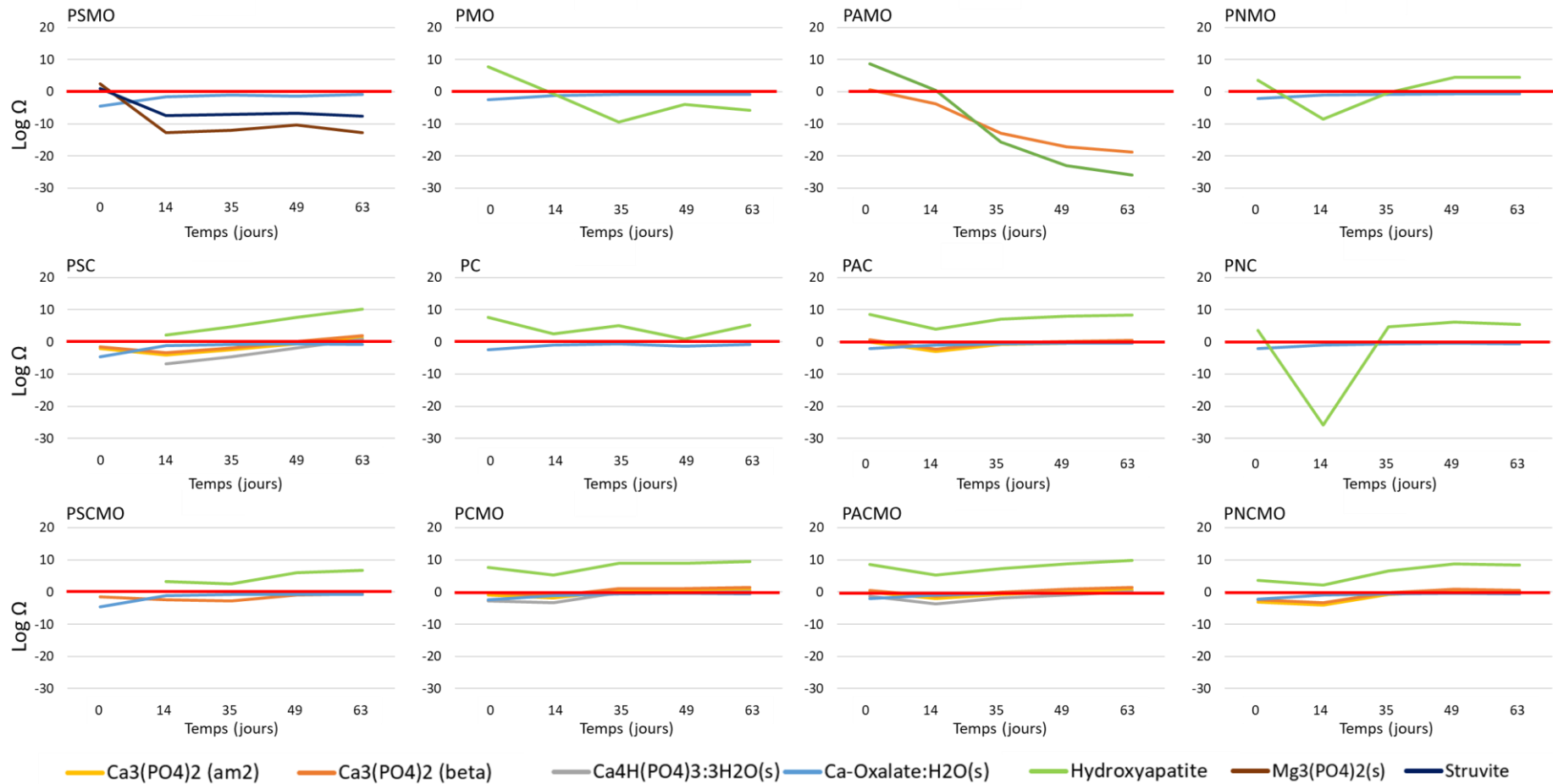


Figure 95: Evolution de l'indice de saturation des différentes phases formées au cours du temps. La ligne rouge correspond à l'équilibre.

## 2. Résultats après 63 jours d'altérations

À l'issue de l'expérience, la solution contenue dans les microcosmes montre un changement de couleur par rapport à l'état initial (T0).

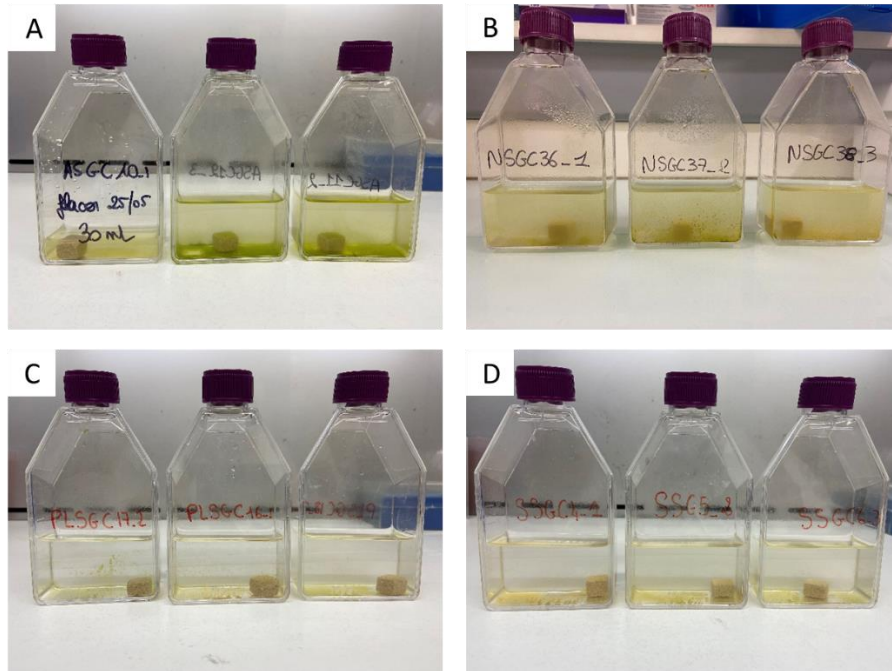


Figure 96 : Photographies des flacons composés de pluie-calcaire-microorganismes à T63, (A) PACMO : enrichi en ammonium, (B) PNCMO : enrichi en nitrates, (C) PCMO : non enrichi et (D) PSCMO : enrichi en sulfates.

La Figure 96 montre une évolution de la couleur des solutions contenue dans les microcosmes CMO, Une coloration verte est visible pour les échantillons enrichis en composés azotés PACMO et PNCMO, Les microcosmes PCMO et PSCMO montrent quant à eux une couleur plus orangée.

Pour évaluer si les variations colorimétriques observées dans les solutions ont entraîné une altération chromatique de la pierre calcaire, une analyse quantitative de l'évolution chromatique a été effectuée par colorimétrie.

Les paramètres  $L^*a^*b$ , en réflectance spéculaire incluse, ont été représentés sous forme d'un graphique en 3D (Figure 97). Celui-ci permet d'observer que, après 63 jours d'incubation, les échantillons ayant été exposés à des pluies enrichies en sulfates, nitrates et ammonium ont développé des patines colorées très différentes de la couleur initiale du calcaire (représentée en noir). En revanche, les échantillons avec une composition de pluie non enrichie conservent une couleur assez proche de celle d'origine.

Les échantillons enrichis en nitrates et en ammonium exhibent des couleurs assez similaires, ce qui est perceptible par une augmentation du paramètre  $b$  ainsi qu'une légère diminution du paramètre  $a$ , indiquant une teinte jaune se rapprochant du vert. En contraste, ces échantillons diffèrent considérablement de ceux enrichis en sulfates, qui montrent une augmentation des paramètres  $a$  et  $b$ , traduisant une coloration plus orangée.

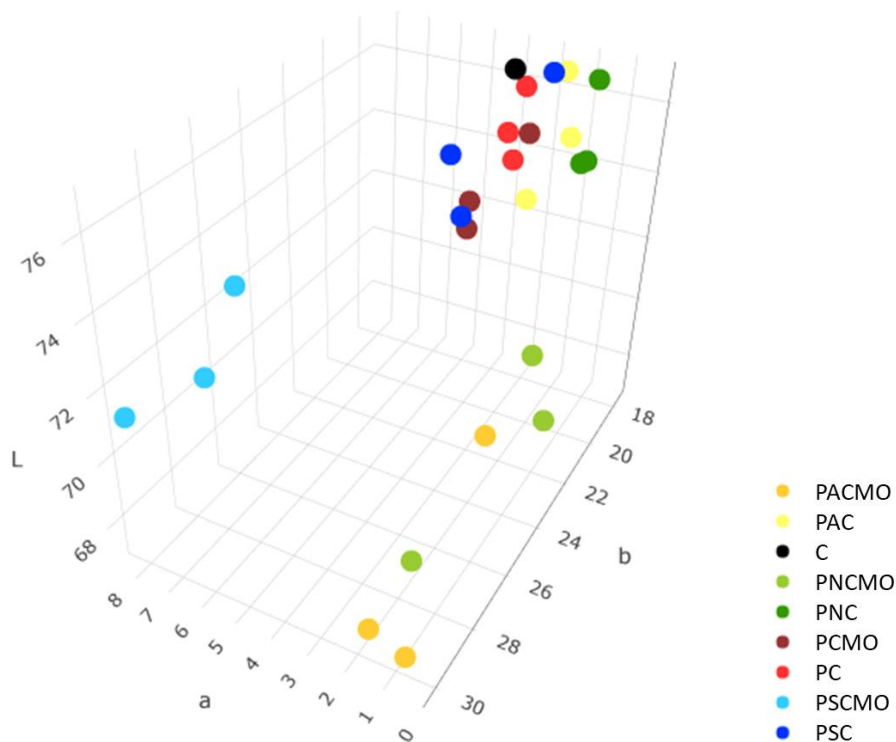


Figure 97 : Représentation en 3D de l'évolution colorimétrique des pierres calcaires après 63 jours d'incubation dans l'espace de couleur CIELAB. C correspond au calcaire initial, PXMO : 'pluie-microorganismes' ; PXCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes ; PXC : 'pluie-calcaire'. X correspond à la composition du milieu avec S pour enrichi en sulfates, A : enrichi en ammonium et N : enrichi en nitrates.

La Figure 98 présente les résultats des observations microscopiques effectuées sur les calcaires en présence de microorganismes dans les différentes eaux de pluie. Dans les environnements riches en azote, avec un apport en ammonium (Figure 98 A1 - 3) et en nitrates (Figure 98 B1 - 3), les calcaires développent une couche de coloration verte, due à des microorganismes sphériques de la même teinte. Dans le cas du milieu enrichi en nitrates, les Figure 98 B2 et B3 mettent en évidence la présence de filaments qui pourraient être assimilés à des hyphes de champignons. Dans le milieu non enrichi PL (Figure 98 C1 - 3), on observe des microorganismes sphériques de couleur variant du vert à l'orange. Pour le milieu enrichi en sulfates (Figure 98 C1 - 3), des microorganismes sphériques de couleur orangée sont visibles.

Ces observations corroborent les résultats obtenus précédemment par colorimétrie, suggérant que les couches de coloration semblent être engendrées par une gamme de microorganismes sphériques de couleurs différentes, pouvant potentiellement être assimilés à des microalgues.

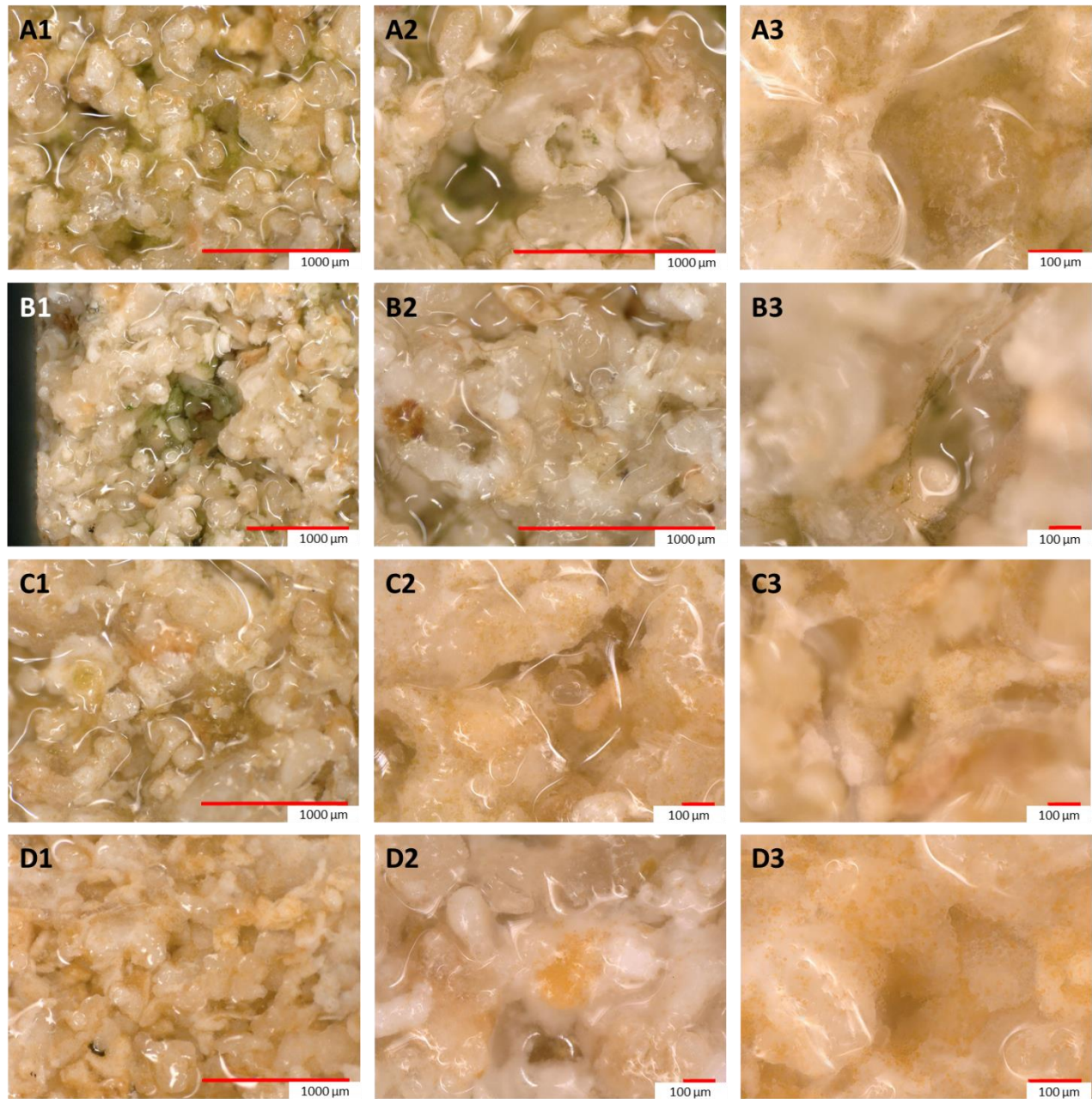


Figure 98 : Observation microscopique des échantillons pluie-calcaire-microorganismes, après 63 jours. (A1 - 3) PACMO : enrichi en ammonium ; (B1 - 3) PNCMO : enrichi en nitrates ; (C1 - 3) PCMO : non enrichi ; (D1 - 3) PSCMO : enrichi en sulfates.

### 3. Communautés microbiennes

#### 3.1. Bactéries

##### 3.1.1. Indice de biodiversité des communautés bactériennes

###### Alpha-diversité

Tableau 26 : Tableau représentant la moyenne des indices bactériens d'alpha-diversité en fonction des différentes conditions expérimentales. PMO : 'pluie-microorganismes' ; CMO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; PC : 'pluie-calcaire'.

Condition	Type de pluie	Richesse observée	Chao1	Shannon	Inverse Simpson
Inoculum		64	70,4	2,6	6,4
PCMO	Ammonium	117 ± 7,3	127,7 ± 9,7	3,2 ± 0,0	13,5 ± 0,5
	Nitrate	117,3 ± 16,2	134,2 ± 20,6	3,1 ± 0,3	11,8 ± 5,6
	Non enrichie	117,7 ± 11,8	130,8 ± 13,3	3,1 ± 0,2	12,7 ± 0,3
	Sulfate	122 ± 8	149,0 ± 8,0	2,4 ± 0,6	5,3 ± 3,7
PC	Ammonium	80,3 ± 12,9	92,5 ± 17,2	2,5 ± 0,3	7,1 ± 3,5
	Nitrate	88 ± 7,3	104,8 ± 2,6	2,5 ± 0,4	6,9 ± 2,9
	Non enrichie	72,3 ± 8,4	78,5 ± 9,6	2,1 ± 0,1	3,8 ± 0,3
	Sulfate	109,7 ± 15,8	119,5 ± 21,3	2,7 ± 0,1	7,3 ± 1,7
PMO	Ammonium	11,3 ± 4,44	18,9 ± 8,6	0,7 ± 0,4	1,6 ± 0,2
	Nitrate	69 ± 18	90,3 ± 20,0	2,7 ± 0,3	8,5 ± 2,3
	Non enrichie	101 ± 20	118,2 ± 28,2	2,7 ± 0,7	10 ± 6,6
	Sulfate	52,0 ± 28,7	60,6 ± 32,4	2,2 ± 0,7	7,5 ± 4,9

Le Tableau 26 présente les indices calculés pour 4 mesures d'alpha-diversité. Les expériences contenant à la fois du calcaire et de l'inoculum microbien ont des indices similaires quelles que soient les pluies. Ils révèlent également une grande diversité au sein des communautés bactériennes, avec quelques espèces prédominantes, accompagnées d'une répartition inégale des espèces au sein de la communauté.

L'analyse de la diversité bactérienne pour les échantillons témoins contenant du calcaire montre aussi des valeurs similaires mais légèrement plus faibles qu'en présence de microorganismes. Ces différents indices indiquent également une grande diversité bactérienne, avec une distribution non équitable des espèces, où quelques espèces prédominent.

Enfin, en ce qui concerne la diversité bactérienne pour l'échantillon témoin contenant des microorganismes (C), des tendances se dessinent en fonction de la pluie. La communauté bactérienne présente dans la pluie enrichie en ammonium révèle une diversité très faible (richesse observée, Chao1 et Shannon), avec une distribution équitable des espèces au sein de la communauté (Inverse Simpson). Pour les autres pluies, les communautés bactériennes montrent une grande diversité avec une distribution non équitable des espèces, dominée seulement par quelques-unes, surtout pour la pluie non enrichie (P).



Bêta-diversité

- Différence de communautés bactérienne entre l'inoculum initial et les microcosmes finaux

Les cartes de chaleurs de l'indice de Bray-Curtis (Figure 99) permet d'évaluer les différences entre les milieux et l'inoculum microbien initial.

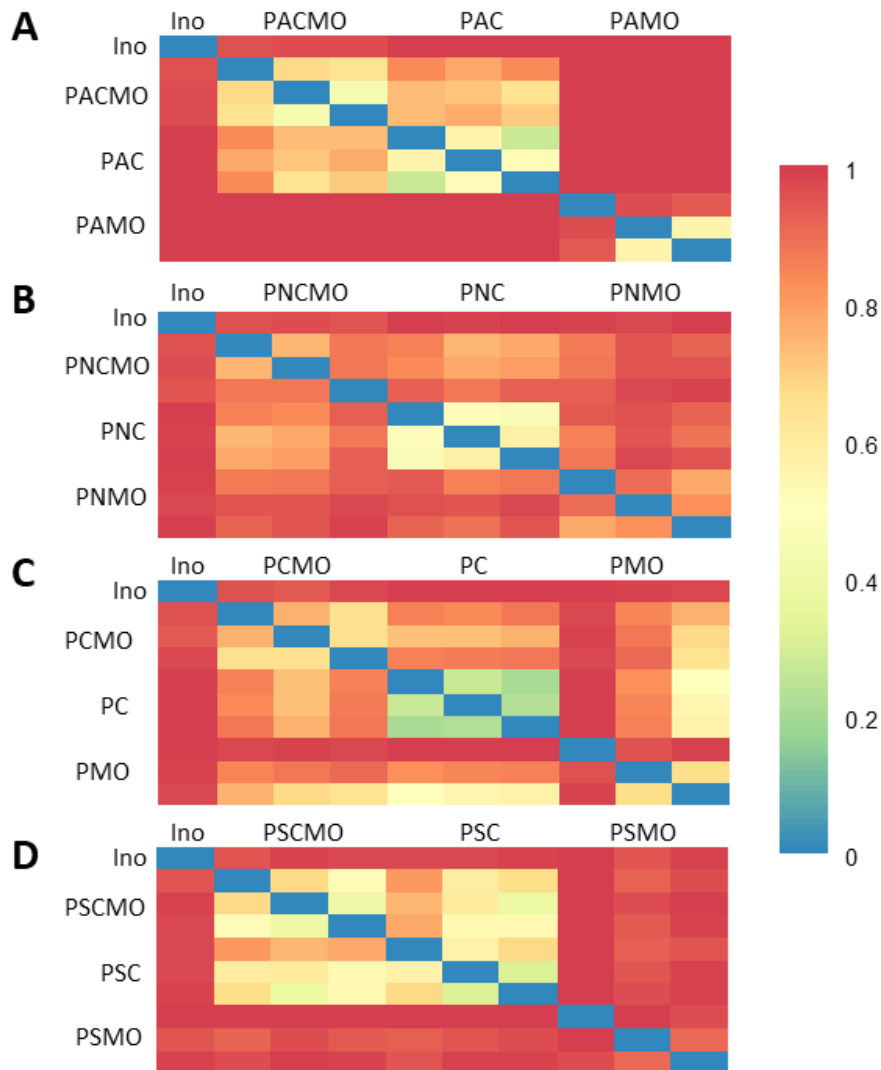


Figure 99 : Cartes de chaleur représentant les indices bactériens de Bray-Curtis en fonction de chaque pluie, (A) Pluie enrichie en ammonium, (B) pluie enrichie en nitrates, (C) pluie non enrichie, (D) pluie enrichie en sulfate. Ino : inoculum initial, PXCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes', PXC : 'pluie-calcaire' et PXMO : 'pluie-microorganismes'.

Les distances de Bray-Curtis entre l'inoculum initial et les microcosmes (Figure 99 - A) varient entre 0,81 et 1 pour l'ammonium, entre 0,88 et 0,99 pour les nitrates (Figure 99 - B), entre 0,87 et 1 pour les pluies P (Figure 99 - C) et entre 0,92 et 0,99 pour les PS (Figure 99 - D). Ces valeurs proches de 1 indiquent une dissemblance très marquée entre l'inoculum initial et les différents microcosmes, mettant en évidence une évolution significative des communautés bactériennes.

Quelle que soit la pluie, il apparaît également que les milieux MO sont très différents des milieux CMO et C (teintes orange foncé et rouge), sauf pour la pluie non enrichie qui présente des teintes plus jaunes – orange, A l'inverse TC et CMO sont plus semblables (teintes jaune – verte).

- Répétabilité au sein des triplicats

La Figure 100 représente les distances de Bray-Curtis des différentes pluies testées en fonction de chaque condition : essai pluie-microorganismes-calcaire (CMO – Figure 100 - A), pluie-microorganismes (MO – Figure 100 - B) et pluie-calcaire (C – Figure 100 - C).

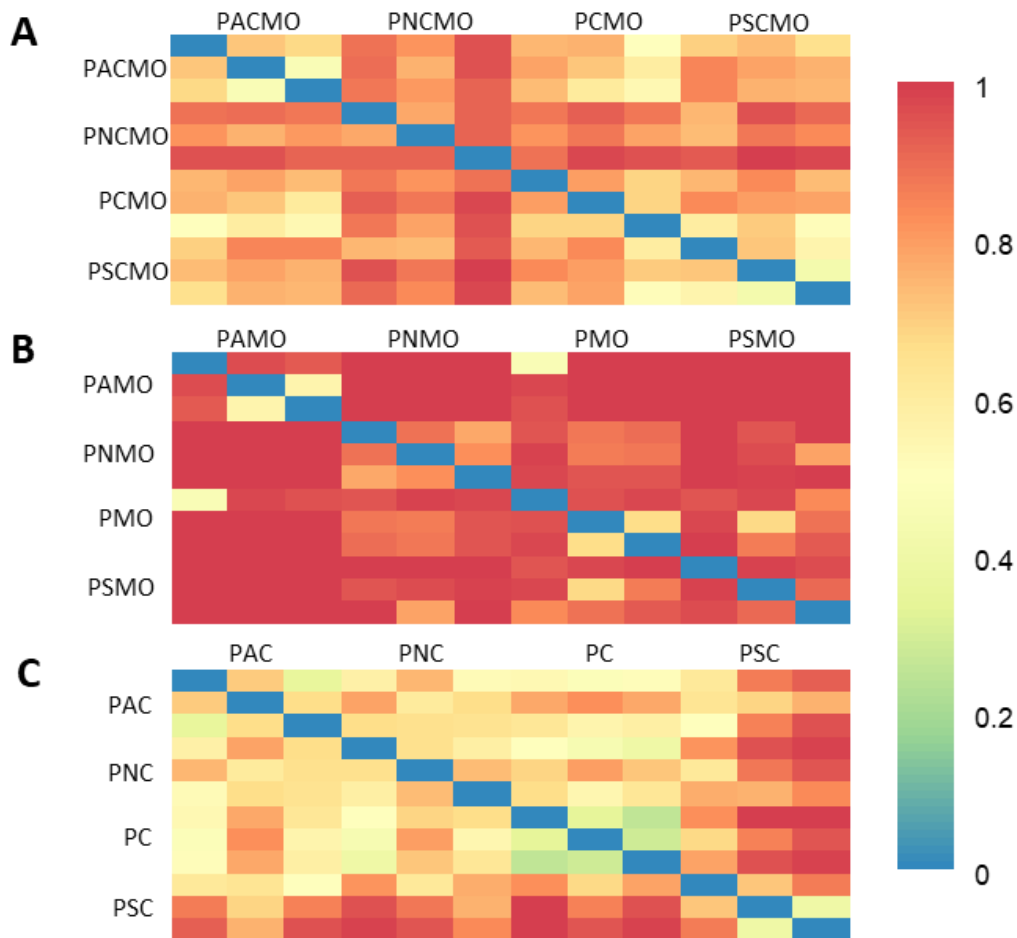


Figure 100 : Cartes de chaleur représentant les indices bactériens de Bray-Curtis correspondant à l'impact des différentes pollutions dans les mêmes conditions expérimentales, (A) PXC MO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; (B) PXMO : 'pluie-microorganismes' ; (C) PXC : 'pluie-calcaire'.

Au sein des essais contenant à la fois du calcaire et des microorganismes (Figure 100 - A), les distances de Bray-Curtis révèlent des différences substantielles au niveau des communautés bactériennes. Ces différences sont encore plus marquées pour les essais MO (Figure 100 - B). En revanche, pour les essais C (Figure 100 - C), les similitudes sont fortes entre les communautés bactériennes.

- Différence de communautés microbiennes en fonction des pluies

En ce qui concerne les échantillons CMO (Figure 100 - A), les communautés bactériennes sont assez différentes les unes des autres. Pour les échantillons constitués d'eau de pluie synthétique et de microorganismes (Figure 100 - B), des communautés bactériennes très distinctes se sont établies pour chaque type de pluie, soulignant ainsi l'importance capitale de la composition des précipitations dans la configuration des communautés bactériennes. Enfin, pour les échantillons dépourvus de microorganismes (Figure 100 - C), les communautés bactériennes établies dans ces divers environnements présentent des similitudes significatives. Elles diffèrent davantage dans les milieux enrichis en sulfates. Sans ajout de microorganismes, les communautés bactériennes se développant sur du calcaire ne changent pas beaucoup avec un enrichissement en composés azotés, alors qu'elles évoluent plus dans un milieu enrichi en sulfates.

### 3.1.2. Identification par séquençage des communautés bactériennes

#### 3.1.2.1. Témoin microorganismes

La Figure 101 correspond à l'abondance relative des différents phyla en absence de calcaire en fonction des différentes pollutions de pluie.

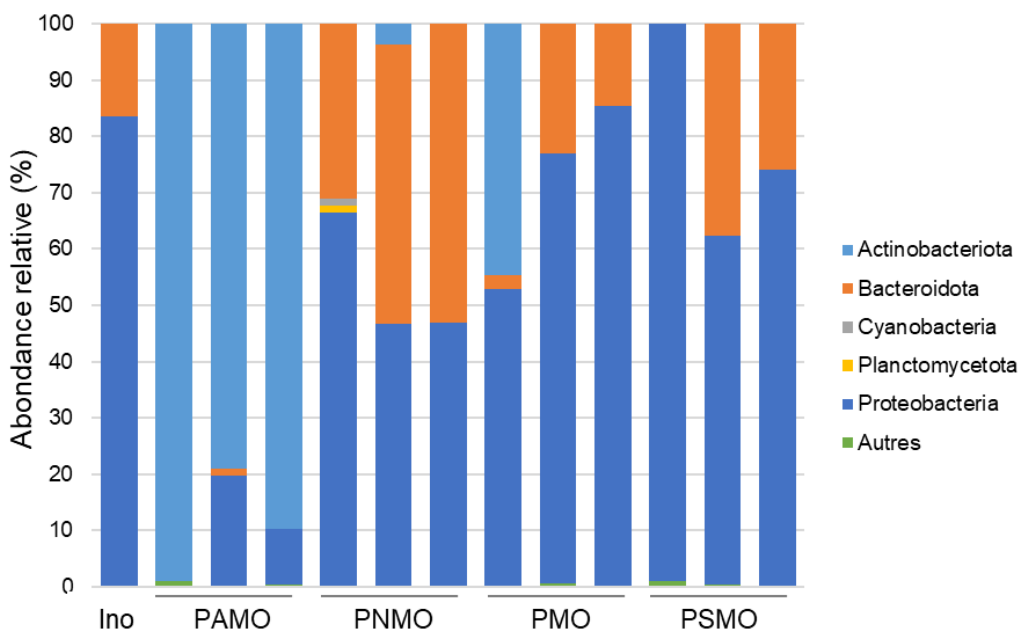


Figure 101 : Abondance relative des phyla bactériens dans les conditions PXMO 'pluie-microorganismes' en fonction des différents milieux (en %). Ino : inoculum initial ; PAMO : enrichi en ammonium ; PNMO enrichi en nitrates ; PMO : non enrichi ; PSMO enrichi en sulfates.

Le nombre de phyla présents au sein des différents échantillons varie en fonction de la composition de l'eau de pluie synthétique. Les quatre phyla – Proteobacteria, Chlorophyta, Bacteroidota et Actinobacteria – composent la majeure partie des communautés bactériennes présentes en fonction de la composition des pluies. Ces différents phyla ont des abondances relatives assez différentes en fonction des conditions expérimentales. L'inoculum ajouté dans les microcosmes est composé de 2 phyla : Proteobacteria et Bacteroidota, alors que dans le milieu riche en ammonium (PAMO) se développent les Actinobacteria (0-36 %) et Cyanobacteria (1 - 2 %). Les échantillons enrichis en nitrates (PNMO) sont composés de 3 phyla majoritaires :

Proteobacteria (31 - 44 %) et Bactéroidota (20 - 46 %) et en moindre proportion Actinobacteria (0 - 3 %), Cyanobacteria (0 - 1 %) et Planctomycetota (0 - 1 %). Les phyla sont identiques chez les communautés bactériennes PMO mais en proportion différente : Proteobacteria (46 - 81 %), Bacteroidota (2 - 19 %) et Actinobacteria (0 - 39 %). Les Actinobacteria disparaît dans les échantillons enrichis en sulfate (PSMO). On y retrouve Proteobacteria (51 à 56 %), Bacteroidota (0 à 31 %) et Cyanobacteria (2 à 11 %).

⇒ **Il existe donc une forte différence entre le milieu enrichi en ammonium et les autres milieux dans la composition des communautés bactériennes.**

La *Figure 102* représente les genres composant les communautés bactériennes de chacun des microcosmes ainsi que leur taxonomie associée.

L'inoculum utilisé dans cette étude est majoritairement composé de *Flavobacterium* (15 %), de *Sphingomonas* (18 %) et de *Brevundimonas* (40 %). D'autres genres composent l'inoculum avec de plus faibles abondances tels que les *Pedobacter* (1,2 %), les *Devosia* (3,7 %), les *Novosphingobium* (1,2 %) ou encore les *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (8 %).

Les échantillons PAMO montrent une diversité bactérienne très faible avec très peu de genres. Les Actinobacteria présents dans le réplicat sont composés du genre *Leifsonia* avec une abondance relative de 36 %.

Les genres présents en majorité dans les échantillons PNMO proviennent de 2 phyla : Bacteroidota et Proteobacteria. Les Bacteroidota sont majoritairement composés de *Pedobacter* (0 - 38 %) et de la famille de Chitinophagaceae (0 - 19 %). Les genres présents appartenant au phylum de Proteobacteria sont *Methylobacterium-Methylorubrum* (1-10 %) et *Sphingorhabdus* (0 - 11 %).

Au sein des triplicats PMO, les communautés bactériennes des échantillons sont assez différentes les unes des autres et présentent un grand nombre de genres. Le genre *Leifsonia* est le représentant du phylum Actinobacteria avec une abondance relative comprise entre 0 et 39 %. Le genre *Pedobacter* est le plus abondant au sein du phylum des Bacteroidota avec une abondance relative entre 0 et 10 %. Enfin le phylum des Proteobacteria est le plus diversifié en termes de genres. Les plus abondants sont les genres : *Sphingobium*, avec une abondance relative comprise entre 0 et 41 %, *Pantoea* (0 et 23 %), *Luteibacter* (0 - 16 %), *Methylobacterium-Methylorubrum* (0 - 12 %) et les *Brevundimonas* (0 - 11 %).

Les triplicats PSMO présentent (comme les triplicats précédents) une grande diversité de genres. Deux genres sont prédominants au sein du phylum des Bacteroidota : *Pedobacter* et *Pseudocyanosarcina*, avec respectivement des abondances relatives comprises entre 0 et 19 % et entre 2,5 et 10 %. Enfin les genres prédominants au sein du phylum Proteobacteria sont les *Luteibacter* (0 - 35 %), les *Stenotrophomonas* (0 - 9 %) et les *Erwinia* (0 - 10 %).

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

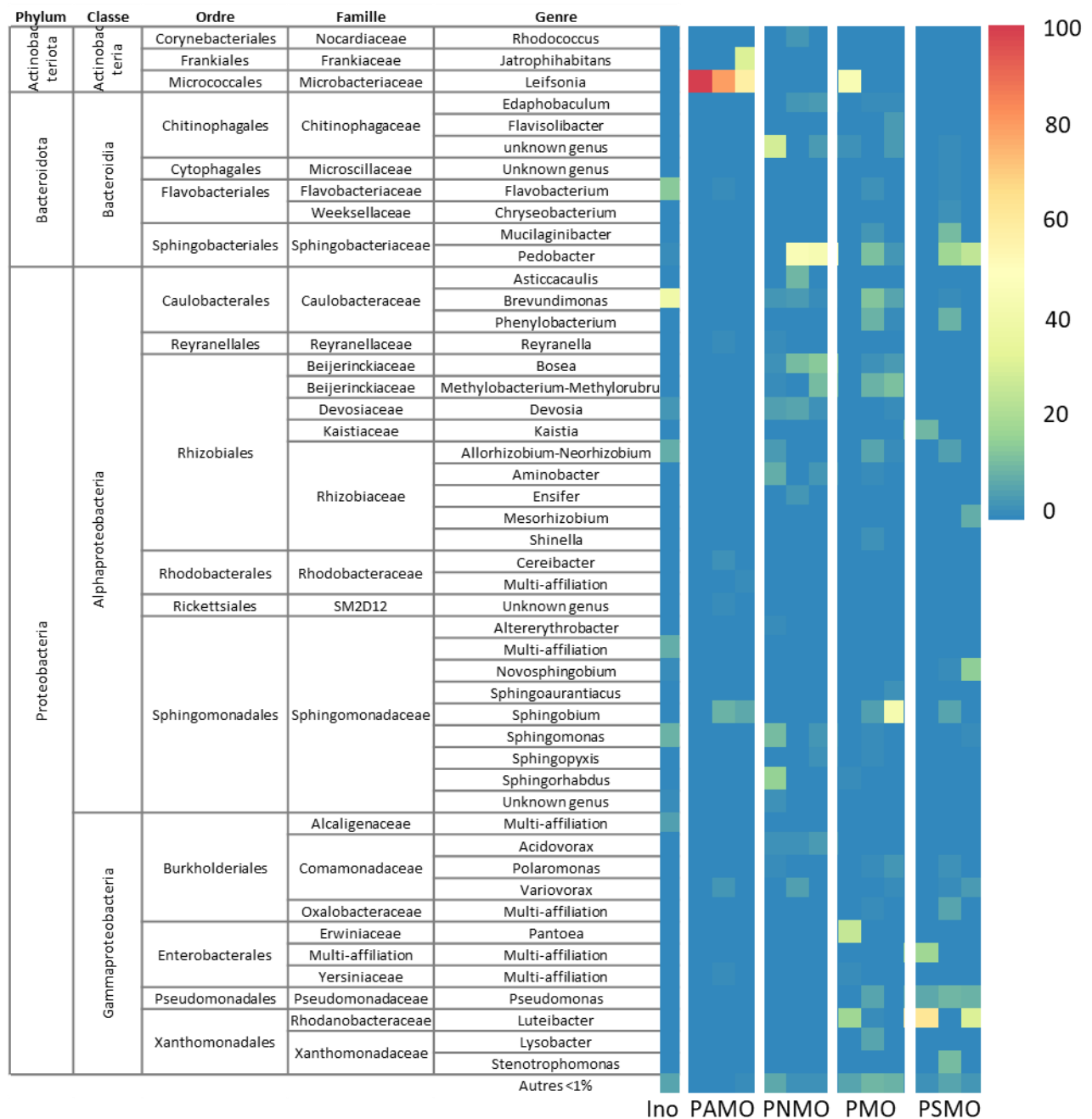


Figure 102: Abondance relative des différents genres bactériens dans les conditions PXMO 'pluie-microorganismes' (en %). Ino : inoculum initial ; PAMO : enrichi en ammonium ; PNMO : enrichi en nitrates ; PMO : non enrichi ; PSMO : enrichi en sulfates.

### 3.1.2.2. Essai calcaire avec ajout de microorganismes

La Figure 103 présente les abondances relatives des différents phyla présents au sein des microcosmes composés d'eau de pluie synthétique, de calcaire et d'inoculum microbien.

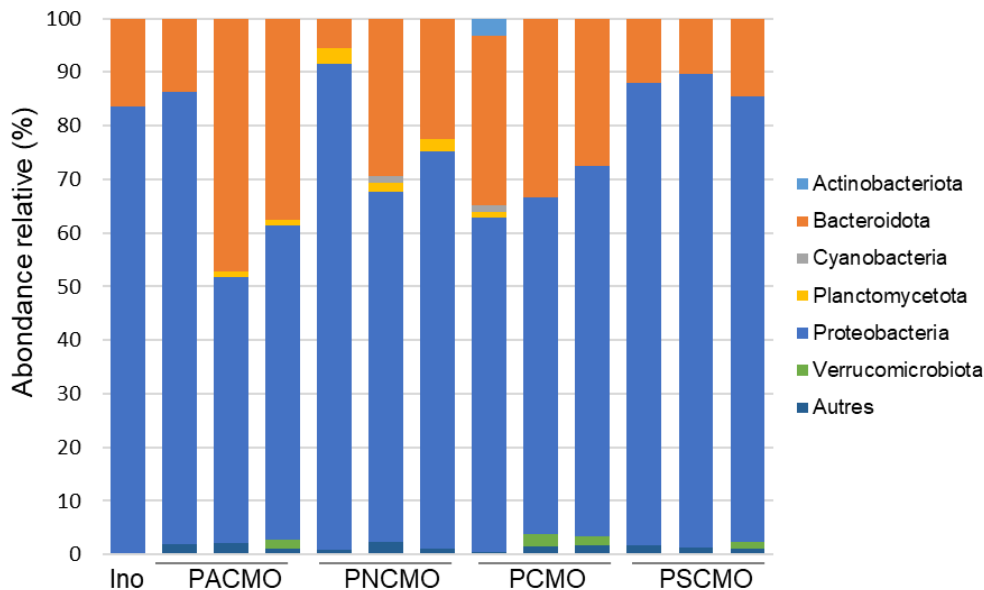


Figure 103 : Abondance relative des phyla bactériens dans les microcosmes PXCMO 'pluie-calcaire-microorganismes' (en %). Ino : inoculum initial ; PACMO : enrichi en ammonium ; PNCMO enrichi en nitrates ; PCMO : non enrichi ; PSCMO : enrichi en sulfates.

Les phyla majoritaires sont les Proteobacteria et les Bacteroidota. Le phylum des Proteobacteria prédomine dans toutes les pluies. Ils sont les plus abondants dans les pluies PS (entre 79 et 88 %), puis PN (entre 59 et 84 %), puis les pluies P (entre 54 et 70 %), et enfin les pluies PA (entre 40 à 82 %).

Les Bacteroidota sont présentes dans tous les échantillons avec des proportions comprises entre 5 et 38 %. Ce phylum est le plus abondant dans les échantillons PACMO (13-38 %) et le plus faible au sein des pluies PSCMO (10 - 14 %). Enfin, la présence des Planctomycetota est observable dans toutes les compositions de pluies, mais en proportion très faible, allant de 0,6 à 2 %.

La Figure 104 présente les abondances relatives des genres présents dans les échantillons ainsi que leurs taxonomies associées. De nombreux genres sont présents, indiquant une grande diversité bactérienne pour chaque pluie. Parmi eux, de nombreux genres appartenant au phylum des Proteobacteria sont identifiés, notamment *Sphingobium*, *Brevundimonas*, *Cereibacter* et *Sphingopyxis*. Le genre *Sphingobium* prédomine largement dans les échantillons PSCMO, avec des proportions relatives comprises entre 24 et 71 %, tandis que dans les autres milieux, ces proportions sont de 1 à 21 %. Le genre *Brevundimonas* est présent dans l'ensemble des milieux, avec des pourcentages compris entre 6 et 14 %. Le genre *Sphingopyxis* est également présent dans tous les milieux, mais il est plus abondant dans les échantillons PNCMO, avec des proportions variant entre 2 et 40 %, alors que dans les autres milieux, ces proportions sont comprises entre 0 et 7 %. Enfin, le genre *Cereibacter* est présent dans tous les milieux, à l'exception du milieu enrichi en sulfate, avec des pourcentages allant de 1 à 12 %.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

Le phylum des Bacteroidota est également majoritairement composé du genre *Flavobacterium* et de la famille Chitinophagaceae. Le genre *Flavobacterium* représente la majeure partie de Bacteroidota, avec des abondances variant de 4 à 25 %. Les échantillons PACMO et PNCMO ont une abondance plus élevée que les autres types de pluies, avec des proportions respectivement comprises entre 8 et 20 % et 4 et 18 %.

⇒ **La présence de calcaire St Maximin Roche Fine dans les microcosmes modifie les communautés bactériennes, malgré que l'inoculum a été échantillonné sur le calcaire du Père Lachaise.**

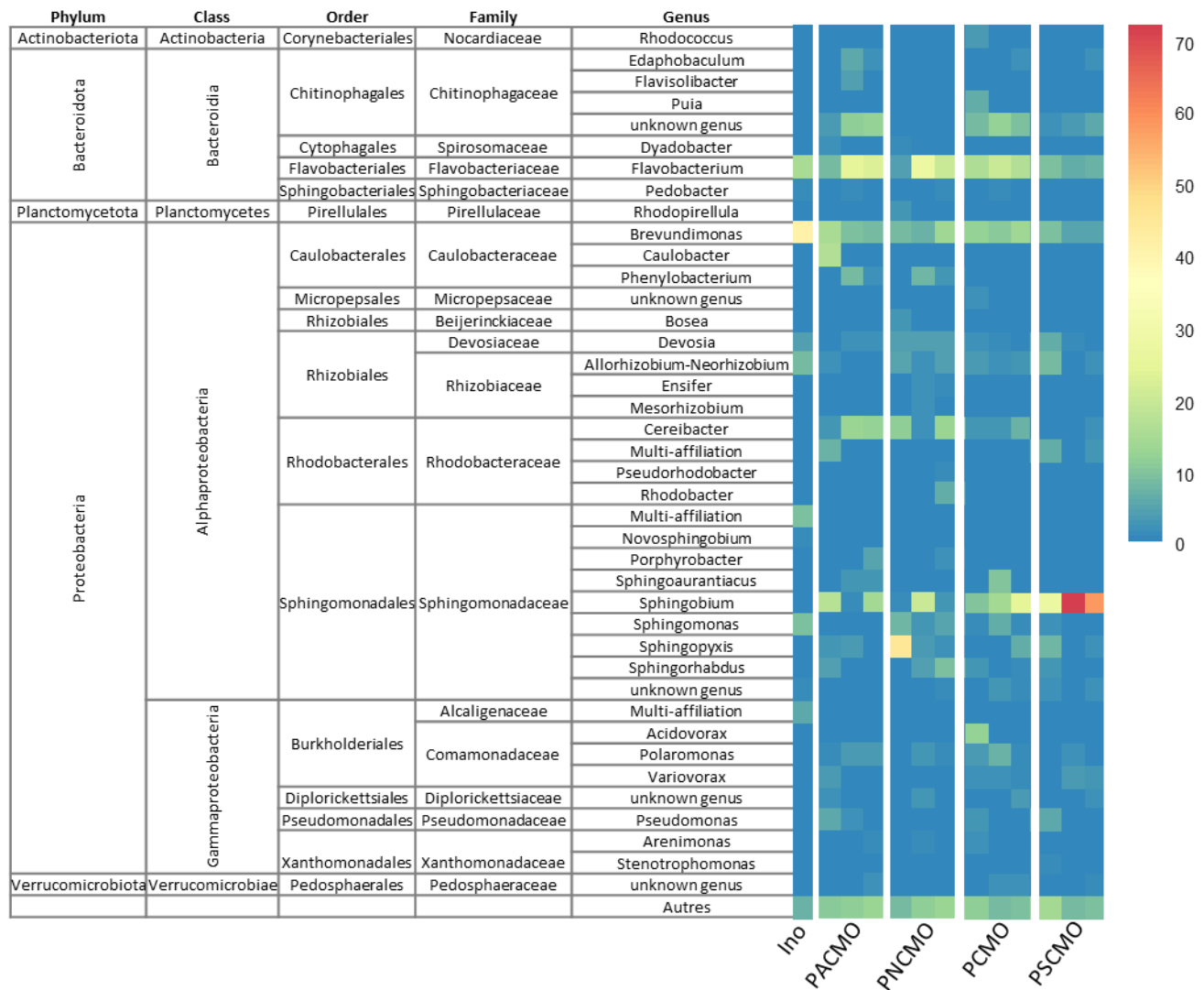


Figure 104: Abondance relative des genres bactériens présents dans les microcosmes PXCMO 'pluie-calcaire-microorganismes' (en %). Ino : inoculum initial ; PACMO : enrichi en ammonium ; PNCMO : enrichi en nitrates ; PCMO : non enrichi ; PSCMO enrichi en sulfates.

### 3.1.2.3. Témoin calcaire

La Figure 105 illustre les différents phyla identifiés dans les conditions calcaires sans l'ajout de microorganismes.

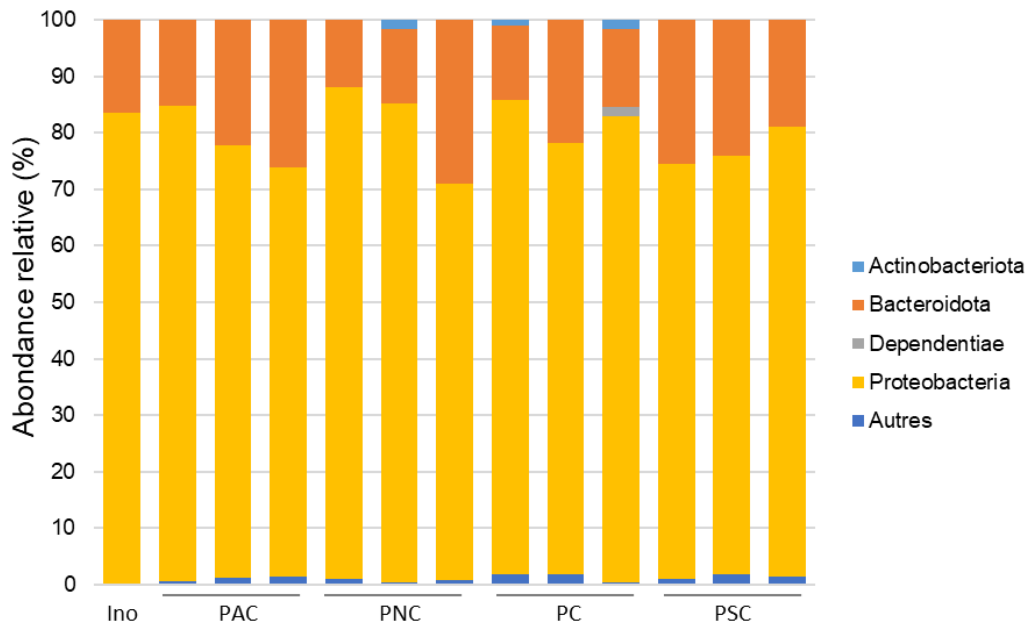


Figure 105 : Abondance relative des phyla bactériens présents dans les microcosmes PXC 'pluie-calcaire' (en %). Ino : inoculum initial ; PAC : enrichi en ammonium ; PNC : enrichi en nitrates ; PC : non enrichi ; PS : enrichi en sulfates.

Les phyla Proteobacteria et Bacteroidota dominent les communautés bactériennes identifiées dans les différentes pluies, représentant plus de 90 % de la composition totale. Le phylum Proteobacteria prédomine largement, avec des proportions comprises entre 70 et 85 %, tandis que les Bacteroidota représentent entre 12 et 28 %. Les échantillons ont donc globalement une composition très similaire.

La Figure 106 présente les genres identifiés au sein des différents milieux, ainsi que leur taxonomie associée. Les genres identifiés dans les échantillons sans ajout de microorganismes montrent peu de variations en fonction des milieux utilisés. Parmi eux, *Flavobacterium* et *Edaphobaculum* dominent le phylum Bacteroidota. Le genre *Flavobacterium* est plus abondant dans les échantillons PSC, représentant entre 17 et 22 %, tandis que dans les autres milieux, ses proportions varient entre 2 et 25 %. Quant au genre *Edaphobaculum*, il présente une abondance relative comprise entre 0 et 9 % dans tous les milieux, à l'exception des échantillons PSC où sa présence est inférieure à 1 %.

Le phylum Proteobacteria se compose principalement de cinq genres : *Sphingobium*, *Brevundimonas*, *Sphingopyxis*, *Sphingorhabdus* et *Methylobacterium-Methylorubrum*. Tous ces genres appartiennent à la classe des Alphaproteobacteria. Le genre *Sphingobium* prédomine largement dans toutes les conditions, avec des proportions allant de 20 à 62 %. Le genre *Brevundimonas* montre des abondances plus élevées dans les échantillons PAC (entre 6 et 14 %) et PNC (entre 4 et 15 %). Dans les autres milieux, son abondance varie entre 1 et 7 %. Le genre *Sphingopyxis* présente une abondance plus importante dans les échantillons PNC (entre 4 et 11 %) que dans les autres milieux (entre 0 et 9 %). Enfin, le genre *Methylobacterium-Methylorubrum* est plus abondant dans les échantillons PAC (entre 2 et 10 %) ainsi que dans les échantillons PC (entre 8 et 11 %). Dans les milieux enrichis en nitrates (PNC) et en sulfates (PSC), ce genre est peu représenté, avec une abondance inférieure à 2 %.



## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

- ⇒ Les communautés bactériennes identifiées dans les témoins calcaires sont plus semblables à celle retrouvées dans les essais calcaires et microorganismes que dans les témoins microorganismes.
- ⇒ La présence de calcaire dans les microcosmes modifie donc les communautés bactériennes capables de se développer dans ces conditions.

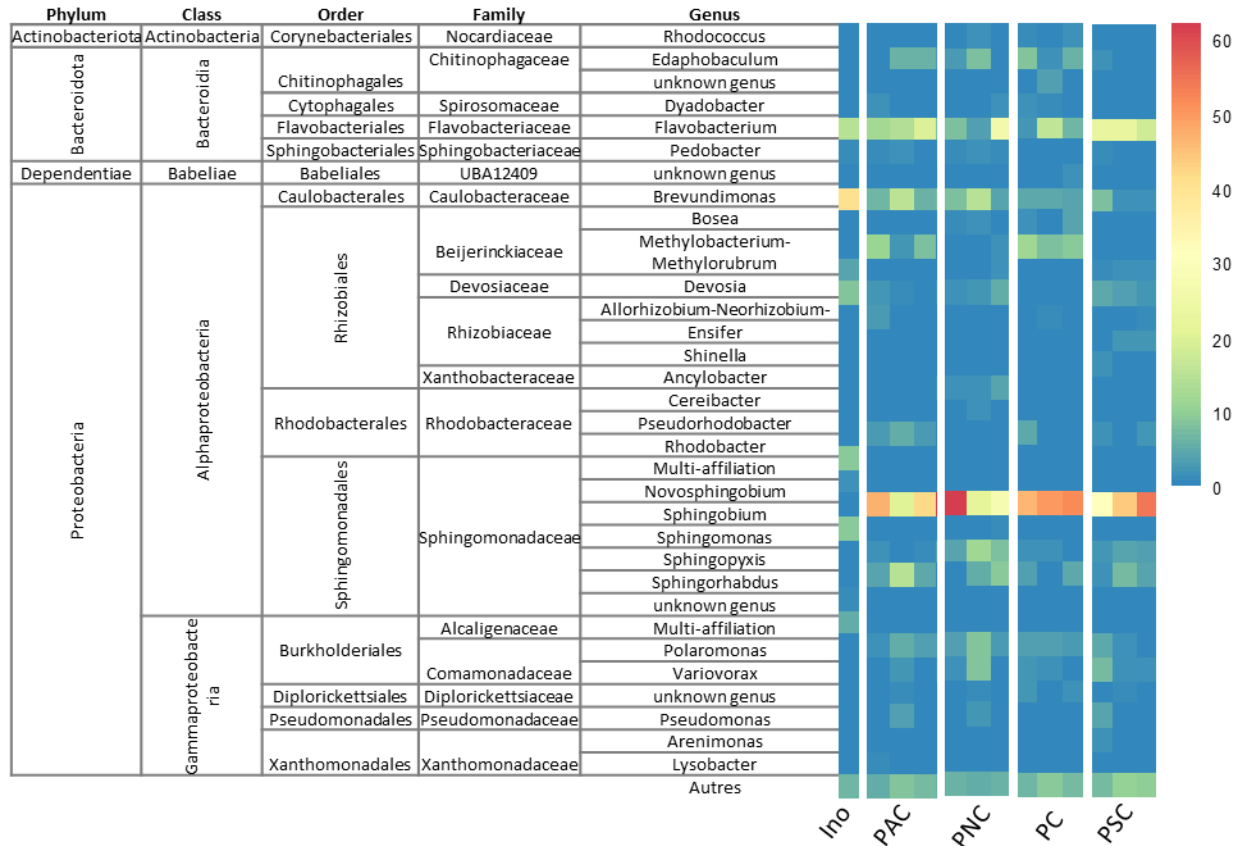


Figure 106 : Abondance relative des genres bactériens des microcosmes PXC 'pluie-calcaire' (en %). Ino : inoculum initial ; PAC : enrichi en ammonium ; PNC : enrichi en nitrates ; PC : non enrichi ; PS : enrichi en sulfates.

## 3.2. Champignons

### 3.2.1. Indice de biodiversité des communautés bactériennes

#### Alpha-diversité

Tableau 27 : Indices d'alpha-diversité des communautés fongiques à l'échelle des espèces en fonction des différents milieux et conditions expérimentales. PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes', PC : 'pluie-calcaire' ; PMO : 'pluie-microorganismes'.

Condition	Type de pluie	Richesse observée	Chao1	Shannon	Inverse Simpson
Inoculum		12	12	2,02	6,12
PCMO	Ammonium	22,3 ± 3,1	23,8 ± 2,4	1,7 ± 0,2	3,8 ± 1,1
	Nitrate	26 ± 1,3	26,8 ± 1,4	2,8 ± 0,2	6,3 ± 1,2
	Père-Lachaise	26,3 ± 2,4	27,8 ± 1,8	0,9 ± 0,2	1,7 ± 0,4
	Sulfate	21,7 ± 2,2	22,5 ± 2,6	1,6 ± 0,6	4,0 ± 1,8
PC	Ammonium	7,3 ± 1,1	7,7 ± 1,6	0,7 ± 0,3	1,7 ± 0,4
	Nitrate	12,7 ± 1,8	12,7 ± 1,7	0,7 ± 0,3	1,8 ± 0,6
	Père-Lachaise	13 ± 1,3	15,2 ± 0,7	0,9 ± 0,3	1,8 ± 0,4
	Sulfate	14,3 ± 1,6	14,5 ± 1,3	0,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1
PMO	Ammonium	20,3 ± 0,9	23,3 ± 2,9	1,3 ± 0,1	2,8 ± 0,2
	Nitrate	17 ± 2,7	19,3 ± 3,2	1,0 ± 0,2	2,8 ± 0,3
	Père-Lachaise	34 ± 4	40,5 ± 5,7	1,6 ± 0,7	4,0 ± 1,8
	Sulfate	34,7 ± 1,8	41,3 ± 7,8	0,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2

Pour les microcosmes composés à la fois de calcaire et d'inoculum microbien (CMO), les valeurs des différents indices sont similaires. La diversité fongique est grande, avec plusieurs espèces qui prédominent. Pour les microcosmes constitués uniquement de calcaire, les valeurs de la richesse observée et de l'indice de Chao 1 sont plus faibles, mais demeurent relativement homogènes pour les quatre milieux. Cependant, les indices de Shannon et Inverse Simpson sont plus élevés pour les précipitations enrichies en nitrates et en sulfates que pour les milieux à base d'ammonium et non enrichis qui présentent une distribution inégale des espèces, dominée par quelques-unes.

Enfin, les communautés fongiques présentes dans les microcosmes constitués uniquement de microorganismes sont un peu moins riches pour les milieux riches en ammonium et en nitrates. Les autres valeurs sont homogènes et mettent en évidence une communauté fongique étendue, mais inégalement répartie, caractérisée par seulement quelques espèces prédominantes.

#### Bêta-diversité

- Comparaison avec l'inoculum initial

Les communautés fongiques à la fin de l'expérience sont totalement différentes de celles initialement introduites (Figure 107, 1<sup>ère</sup> colonne).

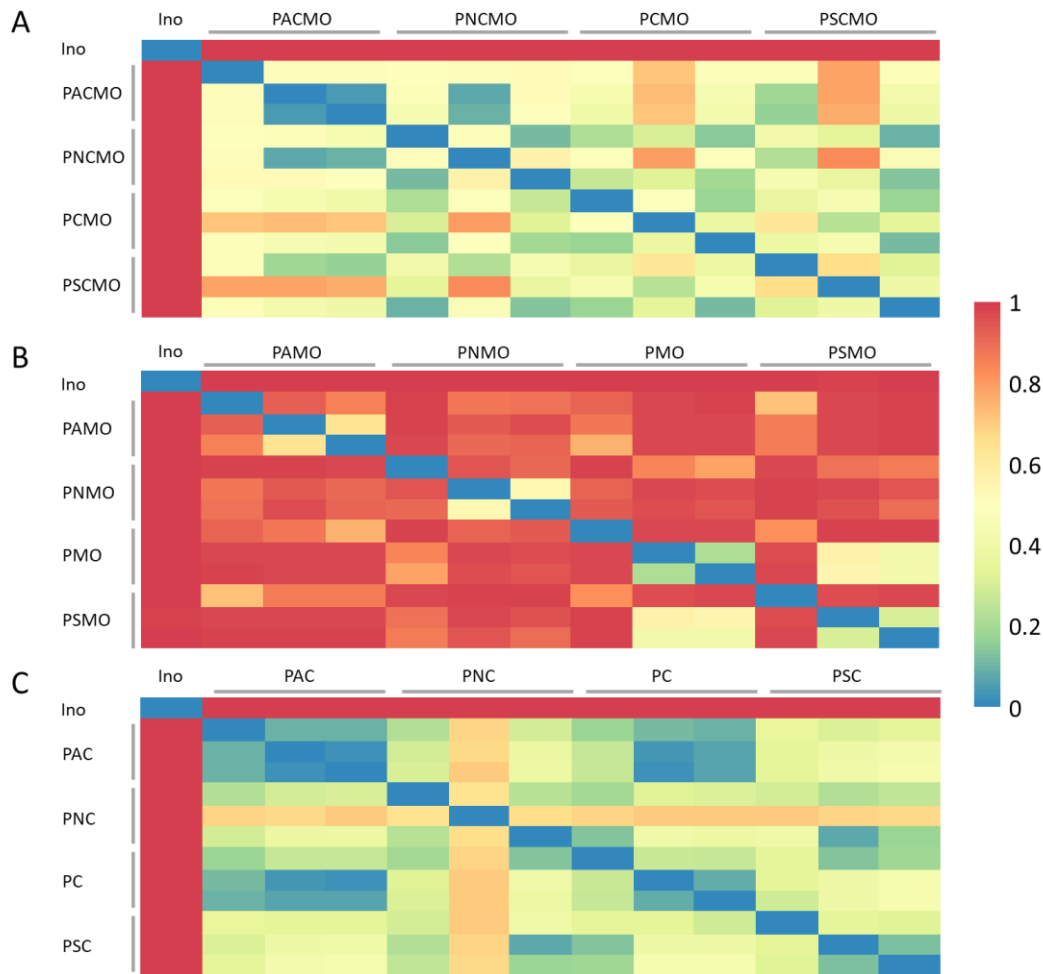


Figure 107 : Carte de chaleur représentant les indices fongiques de bêta-diversité de Bray-Curtis. (A) PXC MO : 'pluie-calcaire-microorganismes' ; (B) PX MO : 'pluie-microorganismes' ; (C) PX C : 'pluie-calcaire' avec X la variable composition de pluies avec A pour enrichi en ammonium, N pour enrichi en nitrates et S pour enrichi en sulfates, Ino : inoculum initial.

- Composition des triplicats

Pour les microcosmes contenant à la fois du calcaire et des microorganismes (Figure 107 - A), les teintes jaunes et vertes indiquent un bon niveau de similarité et donc une faible variabilité au sein des réplicats. Cette tendance est encore plus marquée pour le témoin calcaire (Figure 107 - B). En revanche, les différences sont fortes pour le témoin microorganismes (Figure 107 - C) avec des teintes proches du rouge. En résumé, en présence de calcaire, la composition fongique des réplicats semble beaucoup moins variable.

- Comparaison des communautés fongiques entre chaque pluie

Pour les microcosmes contenant à la fois du calcaire et des microorganismes (Figure 107 - A), les échantillons PACMO et PNCMO montrent de faibles variations des indices de BC (entre 0,07 et 0,52). Il en va de même pour les milieux sans enrichissement (PL) et enrichis en sulfates (entre 0,17 et 0,62), indiquant des relatives similarités. Dans les témoins microorganismes, les valeurs plus élevées indiquent des différences plus importantes entre les communautés fongiques en

fonction de la composition des milieux. Enfin dans les microcosmes composés uniquement de calcaire, les compositions fongiques sont relativement similaires.

⇒ **À nouveau, la présence de calcaire favorise des communautés identiques.**

### 3.2.2. Communautés fongiques

#### 3.2.2.1. Étude calcaire en présence de microorganismes

La Figure 108 présente les phyla fongiques identifiés dans les microcosmes contenant du calcaire, ainsi que de l'inoculum bactérien, en fonction des différents milieux.

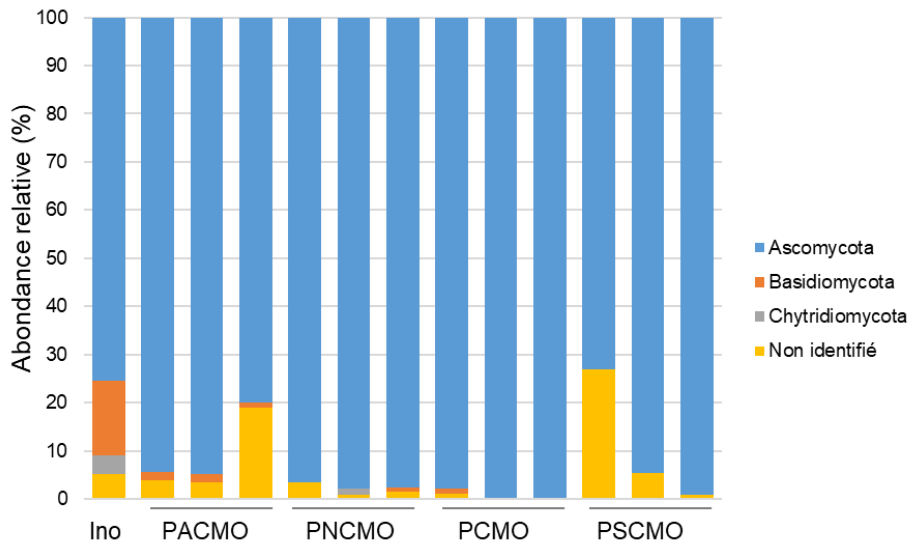


Figure 108 : Abondance relative des phyla fongiques des microcosmes PXC MO 'pluie-calcaire-microorganismes' en fonction des différentes compositions de milieux (en %). Ino : inoculum initial ; PACMO enrichi en ammonium ; PNCMO : enrichi en nitrates ; PCMO : non enrichi ; PSCMO enrichi en sulfates.

Au sein de l'inoculum ajouté aux microcosmes, trois phyla ont été identifiés : Ascomycota (61 %), Basidiomycota (15 %) et Chytridiomycota (4 %). Ces phyla contribuent à la composition fongique initiale avant l'introduction des autres milieux et conditions.

En comparaison, le phylum Basidiomycota disparaît entièrement alors que Chytridiomycota n'apparaît que dans un échantillon PNCMO (~ 1 %). Le phylum Ascomycota domine toujours largement la composition fongique (entre 57 et 96 %). Un autre phylum Mortiellomycota est identifié dans les échantillons PNCMO mais en abondance également faible (~ 1 %).

La Figure 109 présente la composition fongique des microcosmes au niveau du genre, accompagnée de leur taxonomie respective. La plupart des genres identifiés appartiennent aux classes Eurotiomycetes et Sordariomycetes. Les Eurotiomycetes identifiés sont affiliés à l'ordre des Chaetothyriales. Un genre spécifique, le genre *Knufia*, a été identifié, avec des abondances relatives plus élevées dans les échantillons PNCMO (entre 15 et 29 %) et PSCMO (entre 6 et 25 %). Dans les autres milieux, les abondances du genre *Knufia* sont plus faibles, variant entre 0 et 20 %. Des tendances similaires sont observées pour les Chaetothyriales non identifiés dans ces milieux.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

Les Sordariomycetes identifiés appartiennent à deux ordres : Hypocreales et Xylariales. Dans l'ordre des Hypocreales, deux genres prédominants ont été identifiés : *Lecanicillium* et *Purpureocillium*. Le genre *Lecanicillium* montre des abondances relatives plus élevées dans les échantillons PACMO (entre 43 et 62 %) ainsi que dans les échantillons PCMO (entre 10 et 81 %), tandis que dans les autres milieux, ses abondances sont plus faibles, variant entre 0 et 5 %. Quant au genre *Purpureocillium*, il présente une abondance relative élevée dans les échantillons PACMO (entre 3 et 18 %) ainsi que dans les échantillons PNCMO (entre 3 et 24 %).

Le genre *Phialemoniopsis*, appartenant à l'ordre des Xylariales, présente une abondance élevée dans les échantillons PACMO, avec des proportions comprises entre 13 et 20 %. En revanche, dans les autres milieux, ce genre est peu ou non représenté, avec des abondances relatives inférieures 6 %.

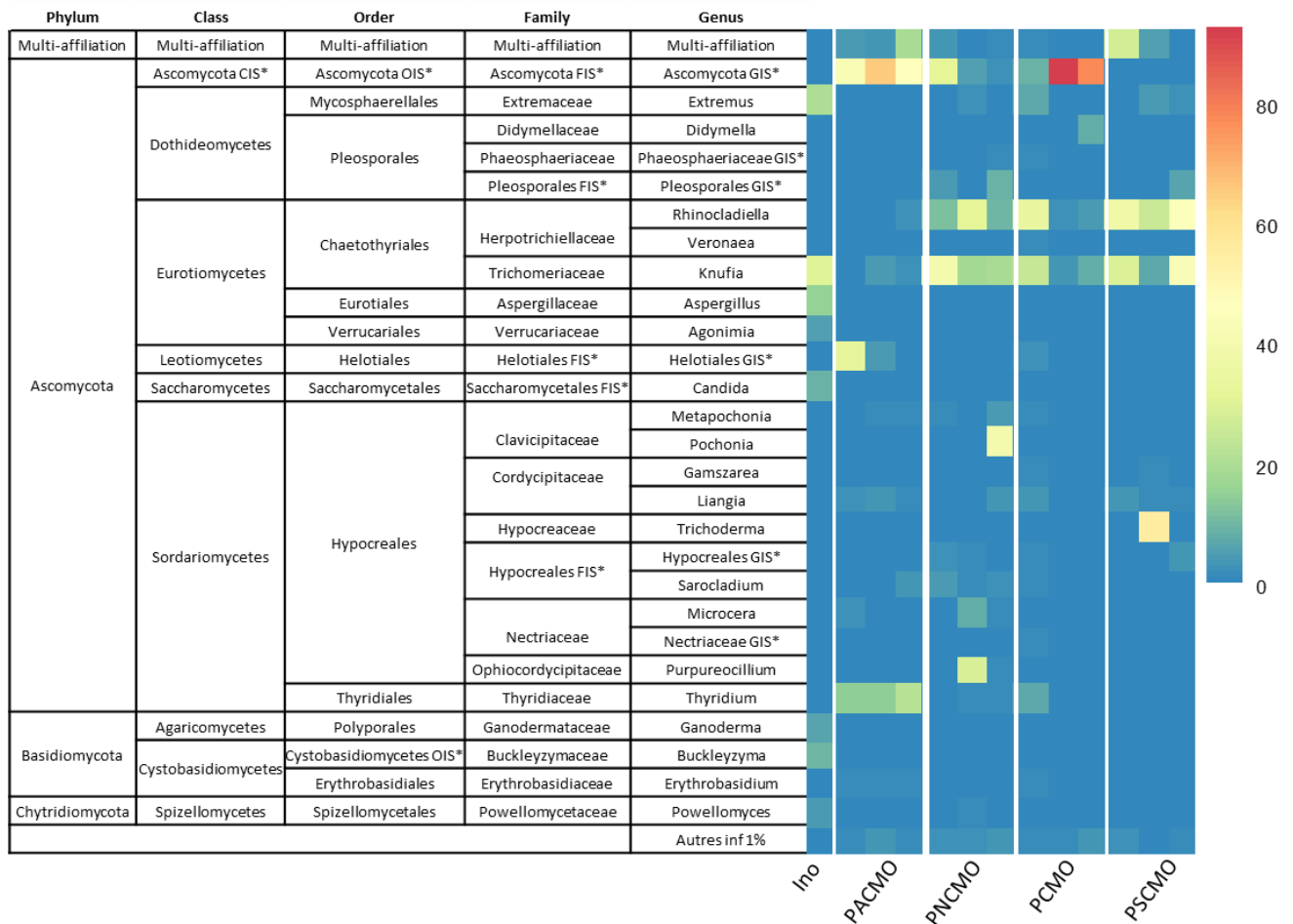


Figure 109: Abondance relative des genres fongiques au sein des microcosmes PXCMO 'pluie-calcaire-microorganismes' (en %). Ino : inoculum initial ; PACMO : enrichi en ammonium ; PNCMO : enrichi en nitrates ; PCMO : non enrichi ; PSCMO : enrichi en sulfates.

### 3.2.2.2. Microorganismes sans calcaire

La Figure 110 expose les différents phyla fongiques présents au sein des microcosmes contenant seulement des microorganismes issus de l'inoculum.

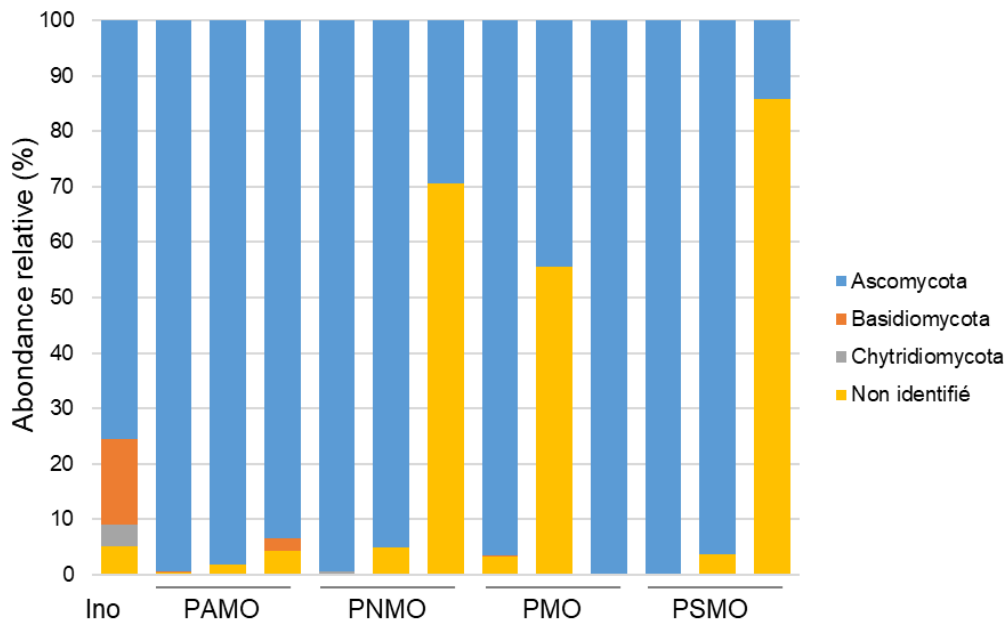


Figure 110 : Abondance relative des phyla fongiques des microcosmes PXMO 'pluie-microorganismes' (en %). Ino : inoculum initial ; PAMO : enrichi en ammonium ; PNMO : enrichi en nitrates ; PMO : non enrichi ; PSMO : enrichi en sulfates.

Le groupe taxonomique Ascomycota est dominant dans l'ensemble des échantillons, avec des proportions variant de 14 à 100 %. Il est le seul identifié dans les échantillons PAMO et PNMO, En revanche, pour les échantillons PMO et PSMO, la présence de Mortierellomycota est observée avec des proportions variant de 0 à 85 %.

La Figure 110 montre l'abondance relative des genres identifiés au sein des différents échantillons ainsi que leur taxonomie associée. Les milieux enrichis en composés azotés sont majoritairement composés de genres appartenant à l'ordre des Hypocreales, mais leur composition diffère en raison de l'abondance variable des différents genres. Dans les échantillons PAMO, le genre *Lecanicillium* prédomine avec des proportions allant de 28 à 61 %. D'autres genres sont également présents en proportions importantes, tels que *Sarocladium* (0-49 %), *Fusarium* (0-25 %), *Microcera* (4-14 %), et *Phialemoniopsis* (2-17 %). Pour les échantillons PNMO, les familles Clavicipitaceae (3-43 %) et Cordicipitaceae (0-75 %) sont majoritaires, mais elles n'ont pas pu être identifiées au niveau du genre. Le genre *Purpureocillium* est également dominant dans ces échantillons, avec des proportions comprises entre 0 et 71 %, Deux genres sont présents en proportions plus faibles : *Lecanicillium* (0-5 %) et *Stibella* (0-3 %).

Les échantillons PMO et PSMO sont principalement composés de genres appartenant aux ordres des Hypocreales et des Pleosporales. Dans le milieu P, les Hypocreales sont majoritaires et sont représentés par des genres non identifiés de la famille des Cordycipitaceae (0-96 %), ainsi que par le genre *Microcera* (0-40 %). Les genres *Lecanicillium* et *Purpureocillium* sont présents en proportions minoritaires, inférieures à 5 %. Dans ce milieu, de nombreux Pleosporales n'ont pas

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

été identifiés au niveau du genre, mais ils représentent de 0 à 29 % de la communauté fongique. Le genre *Kalmusia*, appartenant aux Pleosporales, a pu être identifié avec des proportions comprises entre 0 et 13 %.

Pour les échantillons PSMO, la composition fongique des réplicats varie considérablement d'un échantillon à l'autre. Les Hypocreales sont principalement représentés par trois genres : *Lecanicillium* (0-39 %), *Fusarium* (0-64 %) et *Microcera* (0-14 %). Les Pleosporales dans ce milieu sont minoritaires, avec des proportions inférieures à 5 %. Le genre *Knufia* a été identifié avec des proportions comprises entre 0 et 21 %. Enfin, le genre *Mortierella* est le seul représentant du phylum Mortierellomycota et compose entre 0 et 83 % des communautés fongiques du milieu enrichi en sulfates.

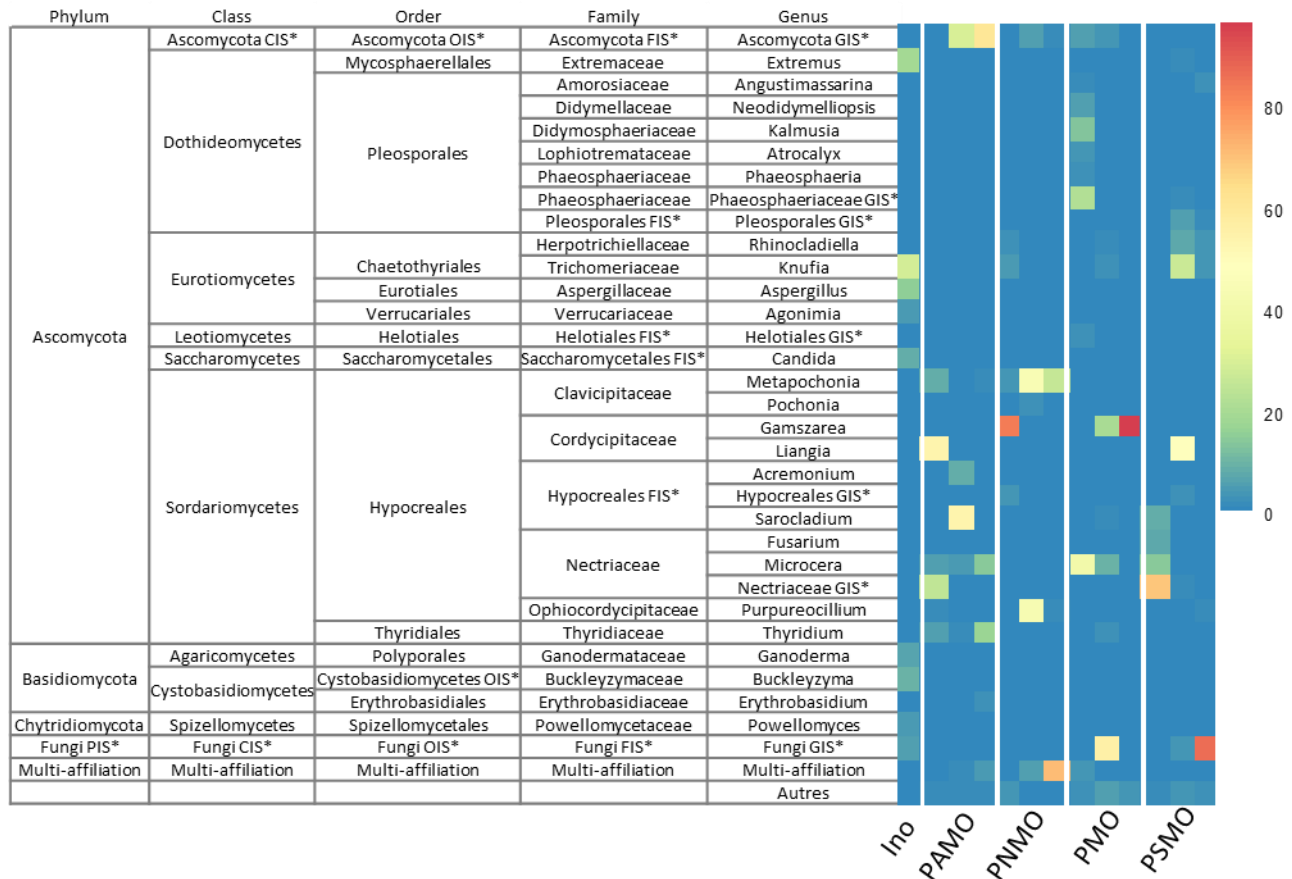


Figure 111: Abondance relative des genres bactériens des microcosmes PXMO 'pluie-microorganismes' (en %). Ino : inoculum initial ; PACMO : enrichi en ammonium ; PNCMO : enrichi en nitrates ; PCMO : non enrichi ; PSMO : enrichi en sulfates.

### 3.2.2.3. Témoin calcaire

La Figure 112 illustre les phyla identifiés au sein des microcosmes contenant du calcaire sans ajout d'inoculum microbien.

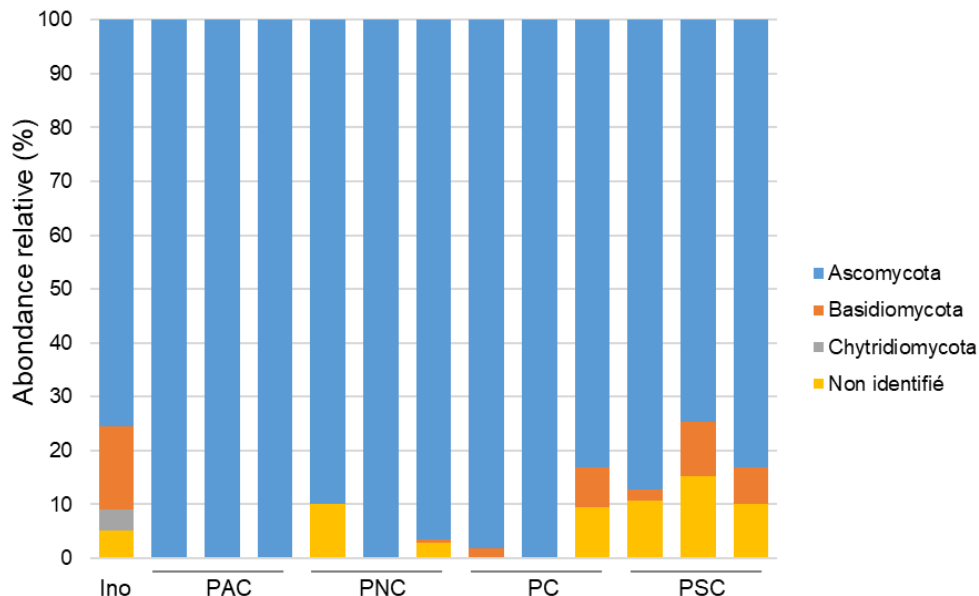


Figure 112 : Abondance relative des phyla fongiques des microcosmes PXC 'pluie-calcaire' (en %). Ino : inoculum initial ; PAC : enrichi en ammonium, PNC : enrichi en nitrates, PC : non enrichi et PSC : enrichi en sulfates.

L'inoculum présente la plus forte diversité fongique avec 3 phyla identifiés : Ascomycota, Basidiomycota et Chytridiomycota. Dans les pluies, cette diversité diminue, Le groupe taxonomique Ascomycota englobe alors la totalité des communautés fongiques identifiées avec une abondance supérieure à 87 %. Toutefois, dans les échantillons PSC, le phylum Basidiomycota est observé avec une proportion de 2 %.

Les genres qui ont été identifiés (*Figure 113*) sont largement affiliés à l'ordre des Hypocreales, parmi lesquels deux genres prédominent : *Lecanicillium* et *Purpureocillium*, présents dans tous les échantillons, mais avec des proportions variables. Le genre *Lecanicillium* est le plus abondant, avec des valeurs entre 10 et 99 %. Le genre *Purpureocillium* est davantage présent dans les environnements PAC et PSC, avec des proportions respectivement comprises entre 0 et 53 % et entre 6 et 15 %.

Les milieux PAC et PNC présentent une moindre diversité par rapport aux échantillons PSC et PC, principalement en raison d'une plus grande prépondérance des genres minoritaires dans ces derniers. Les genres *Sarocladium* et *Trichoderma* se distinguent par leur abondance particulièrement marquée dans les échantillons PSC, avec des proportions entre 0 et 27 % pour le premier et entre 0 et 17 % pour le second.

Certains genres peuvent apparaître ponctuellement avec des proportions significatives, comme c'est le cas pour *Microcera* dans les échantillons PAC et PSC.

⇒ **La composition des communautés fongiques est très influencée par la présence de calcaire ou non.**



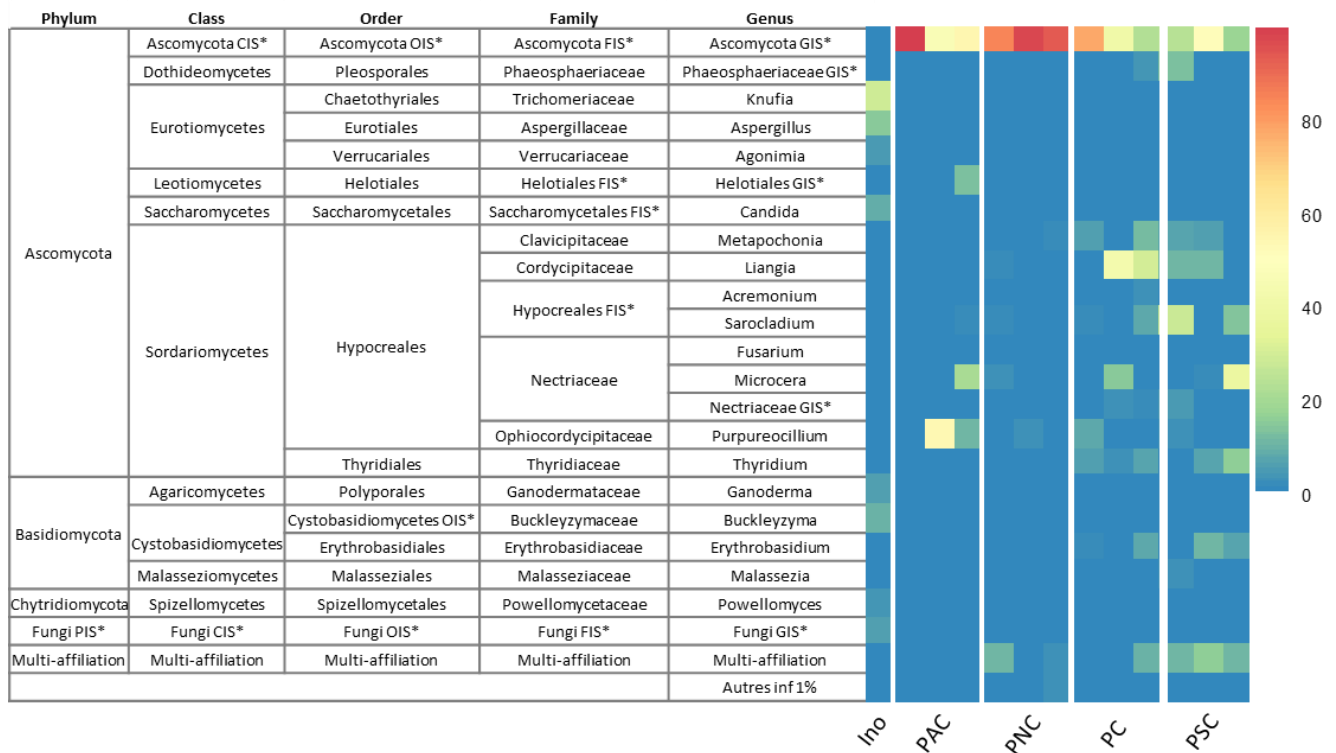


Figure 113: Abondance relative des genres fongiques au sein des microcosmes PXC 'pluie-calcaire' (en %). Ino : inoculum initial ; PAC : enrichi en ammonium ; PNC : enrichi en nitrates ; PC : non enrichi ; PSC : enrichi en sulfates.

### 3.3. Algues

#### 3.3.1. Indice de biodiversité

##### Alpha-diversité

Le Pour les microcosmes composés de calcaire et d'inoculum microbien (CMO), les valeurs des différents indices sont similaires pour toutes les conditions de pluie étudiées, avec une richesse observée comprise entre 32 et 37, un indice de Chao 1 variant entre 33 et 42, un indice de Shannon entre 1 et 1,1, et un indice d'Inverse Simpson entre 2 et 2,1. La diversité algale y est élevée, bien que dominée par quelques espèces.

Dans les microcosmes constitués uniquement de calcaire (PC), les valeurs de la richesse observée, de l'indice de Chao 1 et de l'indice de Shannon sont plus faibles, mais restent relativement homogènes entre les quatre milieux étudiés. Cependant, l'indice d'Inverse Simpson montre des variations plus marquées, notamment dans le milieu enrichi en nitrate, où il est nettement plus élevé que dans les autres milieux (13 contre ~1). Cette valeur plus élevée indique que le milieu enrichi en nitrate est caractérisé par une communauté algale dominée par plusieurs espèces, alors que les autres milieux sont dominés par seulement quelques espèces prédominantes.

Enfin, les communautés algales présentes dans les microcosmes constitués uniquement de microorganismes présentent une richesse légèrement inférieure dans les milieux enrichis en

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

ammonium et en nitrate. Les autres indices sont homogènes et révèlent une communauté algale dominée par un petit nombre d'espèces principales.

Tableau 28 décrit les indices d'alpha-diversité des communautés algales en fonction des différentes conditions expérimentales ainsi qu'en fonction des différentes pluies.

Pour les microcosmes composés de calcaire et d'inoculum microbien (CMO), les valeurs des différents indices sont similaires pour toutes les conditions de pluie étudiées, avec une richesse observée comprise entre 32 et 37, un indice de Chao 1 variant entre 33 et 42, un indice de Shannon entre 1 et 1,1, et un indice d'Inverse Simpson entre 2 et 2,1. La diversité algale y est élevée, bien que dominée par quelques espèces.

Dans les microcosmes constitués uniquement de calcaire (PC), les valeurs de la richesse observée, de l'indice de Chao 1 et de l'indice de Shannon sont plus faibles, mais restent relativement homogènes entre les quatre milieux étudiés. Cependant, l'indice d'Inverse Simpson montre des variations plus marquées, notamment dans le milieu enrichi en nitrate, où il est nettement plus élevé que dans les autres milieux (13 contre ~1). Cette valeur plus élevée indique que le milieu enrichi en nitrate est caractérisé par une communauté algale dominée par plusieurs espèces, alors que les autres milieux sont dominés par seulement quelques espèces prédominantes.

Enfin, les communautés algales présentes dans les microcosmes constitués uniquement de microorganismes présentent une richesse légèrement inférieure dans les milieux enrichis en ammonium et en nitrate. Les autres indices sont homogènes et révèlent une communauté algale dominée par un petit nombre d'espèces principales.

Tableau 28: Indice d'alpha-diversité pour les différentes conditions expérimentales.

Condition	Type de pluie	Richesse observée	Chao1	Shannon	Inverse Simpson
Inoculum		7	7	1,5	3,8
PCMO	Ammonium	35 ± 4	37,7 ± 5,8	1,0 ± 0,3	2,0 ± 0,3
	Nitrate	37,3 ± 2,4	42 ± 3,3	1,1 ± 0,2	2,1 ± 0,4
	Père-Lachaise	32,7 ± 4,2	33,1 ± 4,1	1,0 ± 0,1	2,1 ± 0,3
	Sulfate	35,7 ± 3,6	38,6 ± 6,6	1,0 ± 0,2	2,0 ± 1,4
PC	Ammonium	17,3 ± 0,9	17,3 ± 0,9	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,0
	Nitrate	20 ± 2	20,6 ± 1,8	0,6 ± 0,1	13 ± 0,1
	Père-Lachaise	14 ± 0,7	14,5 ± 1,0	0,3 ± 0,0	1,2 ± 0,0
	Sulfate	17,7 ± 1,6	19,7 ± 2,4	0,7 ± 0,1	1,6 ± 0,2
PMO	Ammonium	12,7 ± 1,1	12,7 ± 1,1	1,7 ± 0,1	3,9 ± 0,6
	Nitrate	24,3 ± 7,1	25,2 ± 6,6	1,7 ± 0,4	4,6 ± 2,2
	Père-Lachaise	34,7 ± 8,4	36 ± 8,7	1,5 ± 0,6	4,0 ± 2,9
	Sulfate	32,7 ± 3,1	38,4 ± 2,7	1,7 ± 0,3	3,3 ± 1,4

### Bêta-diversité

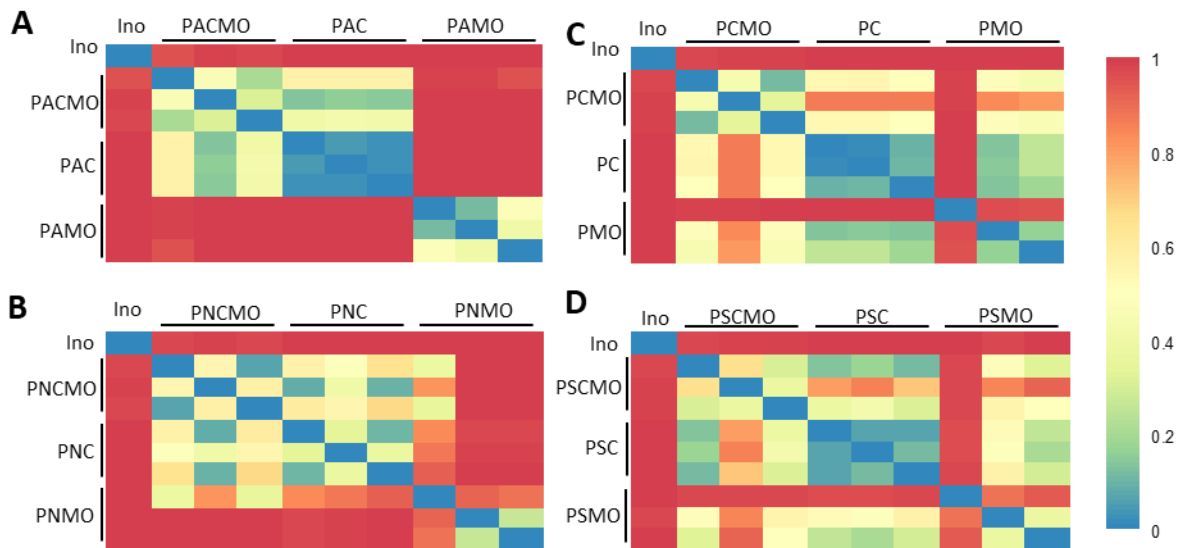


Figure 114: Carte de chaleur des indices de bêta-diversité de Bray-Curtis en fonction du type de pluie. (A) pluie enrichie en ammonium ; (B) pluie enrichie en nitrates ; (C) pluie sans enrichissement ; (D) pluie enrichie en sulfates.

La *Figure 114* présente quatre cartes de chaleurs des indices de bêta-diversité de Bray-Curtis en fonction du type de milieu.

- Comparaison par type de pluie

Pour le milieu enrichi en ammonium (*Figure 114-A*), les communautés algaires des réplicats pour chaque condition expérimentale sont similaires, avec des indices de Bray-Curtis (BC) compris entre 0,2 et 0,4 pour la condition CMO, entre 0 et 0,1 pour la condition C, et entre 0,1 et 0,4 pour la condition MO. Les communautés algaires des conditions CMO et C présentent peu de différences, avec des indices de BC compris entre 0,2 et 0,4. En revanche, ces communautés sont très différentes de celles observées dans la condition MO, avec des valeurs proches de 1

Le milieu enrichi en nitrate (*Figure 114-B*) présente des indices de BC similaire à ceux retrouvés avec le milieu enrichi en ammonium précédemment décrit. Les communautés algaires des réplicats pour chaque condition sont assez similaires, à l'exception de la condition PNMO, qui montre de plus grandes variations. De la même manière, les conditions CMO et C présentent des communautés algaires similaires, mais très différentes de celles retrouvées dans la condition PMO.

Pour le milieu sans enrichissement (*Figure 114-C*), les communautés algaires présentes peu de variations avec des indices de BC compris entre 0,1 et 0,4, excepté pour PMO où les indices sont compris entre 0,2 et 0,9. Cette fois, les communautés algaires des conditions C et MO sont très similaires avec des valeurs comprises entre 0 et 0,3. Les communautés algaires CMO sont assez dissimilaires des communautés présentes en C et en MO avec des indices de BC compris entre 0,5 et 0,8.

Enfin le milieu enrichi en sulfates (*Figure 114-D*), montre des communautés algaires similaires au sein de chaque réplicat avec des valeurs comprises entre 0,2 et 0,6 pour CMO, 0,1 et 0,2 pour C. Pour le réplicat MO, les communautés algaires varient davantage avec des indices compris

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

entre 0,4 et 0,8. Les communautés algaires entre les différentes conditions expérimentales sont assez similaires avec des valeurs comprises entre 0,2 et 0,7.

- Comparaison par condition expérimentale

La *Figure 115* correspond à des cartes de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis en fonction des différentes conditions expérimentales.

Pour la condition « pluie-calcaire-microorganismes » (CMO, *Figure 115 – A*), que ce soit au sein des réplicats pour chaque milieu ou entre les différents milieux, les indices de bêta-diversité sont majoritairement compris entre 0,1 et 0,5, ce qui reflète de faibles différences dans la composition des communautés algaires, malgré la diversité des milieux.

En revanche, la condition « pluie-microorganismes » (MO, *Figure 115 – B*) présente une variabilité beaucoup plus marquée. Au sein des réplicats, seul le milieu enrichi en ammonium (PAMO) présente des indices de Bray-Curtis (BC) faibles, compris entre 0,2 et 0,4, indiquant une forte similarité des communautés algaires. Pour les autres milieux, les indices de BC varient entre 0,2 et 0,9, témoignant d'une forte hétérogénéité des communautés algaires entre réplicats. Lors de la comparaison entre les différents milieux, on observe des couleurs très rouges, ce qui traduit des dissimilarités importantes entre les communautés algaires. Cependant, des dissimilarités plus faibles sont observées entre le milieu non enrichi (PMO) et le milieu enrichi en sulfate (PSMO), avec des indices de BC variant également entre 0,2 et 0,9, suggérant des communautés algaires relativement similaires dans ces deux milieux.

Enfin, la condition « pluie-calcaire » (C, *Figure 115 – C*) présente les variations les plus faibles en termes de communauté algaire, que ce soit au sein des réplicats ou entre les milieux, avec des indices de bêta-diversité majoritairement compris entre 0,1 et 0,5. Un seul des réplicats du milieu enrichi en nitrate (PNC) affiche des indices de bêta-diversité entre 0,7 et 0,9, ce qui indique le développement d'une communauté algaire très différente de celles des autres réplicats.

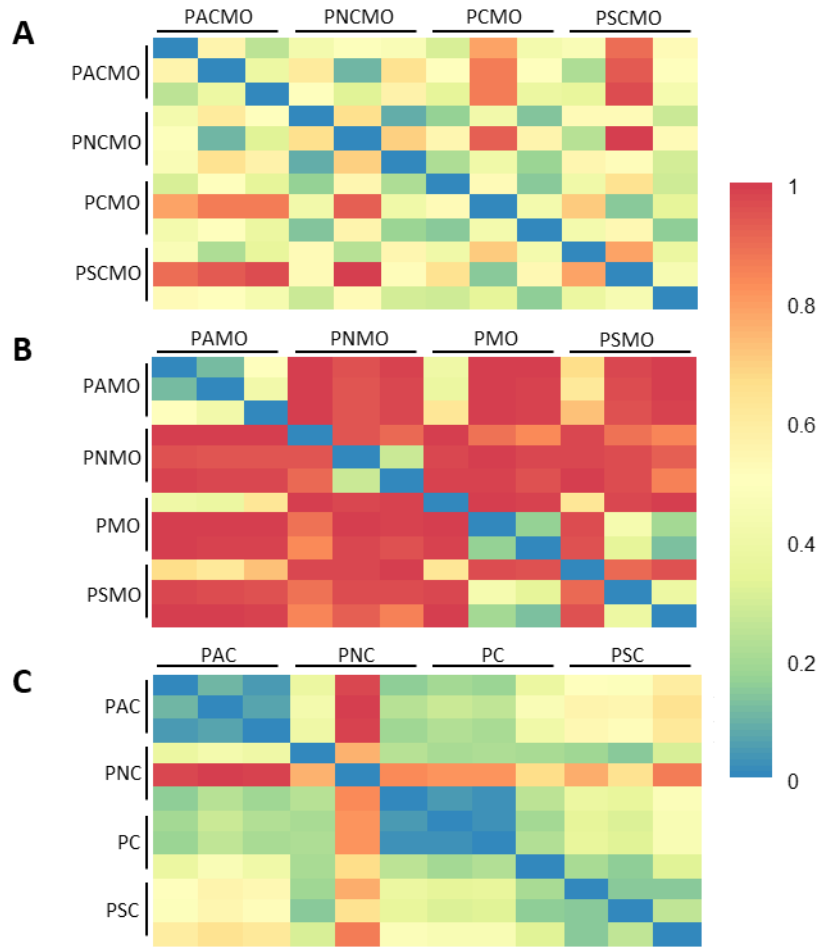


Figure 115: Carte de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis en fonction des conditions expérimentales. (A) condition 'pluie-calcaire-microorganismes'; (B) condition 'pluie-microorganismes'; (C) condition 'pluie-calcaire'.

### 3.3.2. Composition des communautés algaires

La *Figure 116* correspond à l'abondance relative des différents phyla identifiés dans les microcosmes. Les Chlorophyta correspondent au seul phylum identifié dans tous les microcosmes, après 2 mois d'expérimentation. Le phylum des Ochrophyta a été identifié seulement dans l'inoculum avec une proportion de 60%.

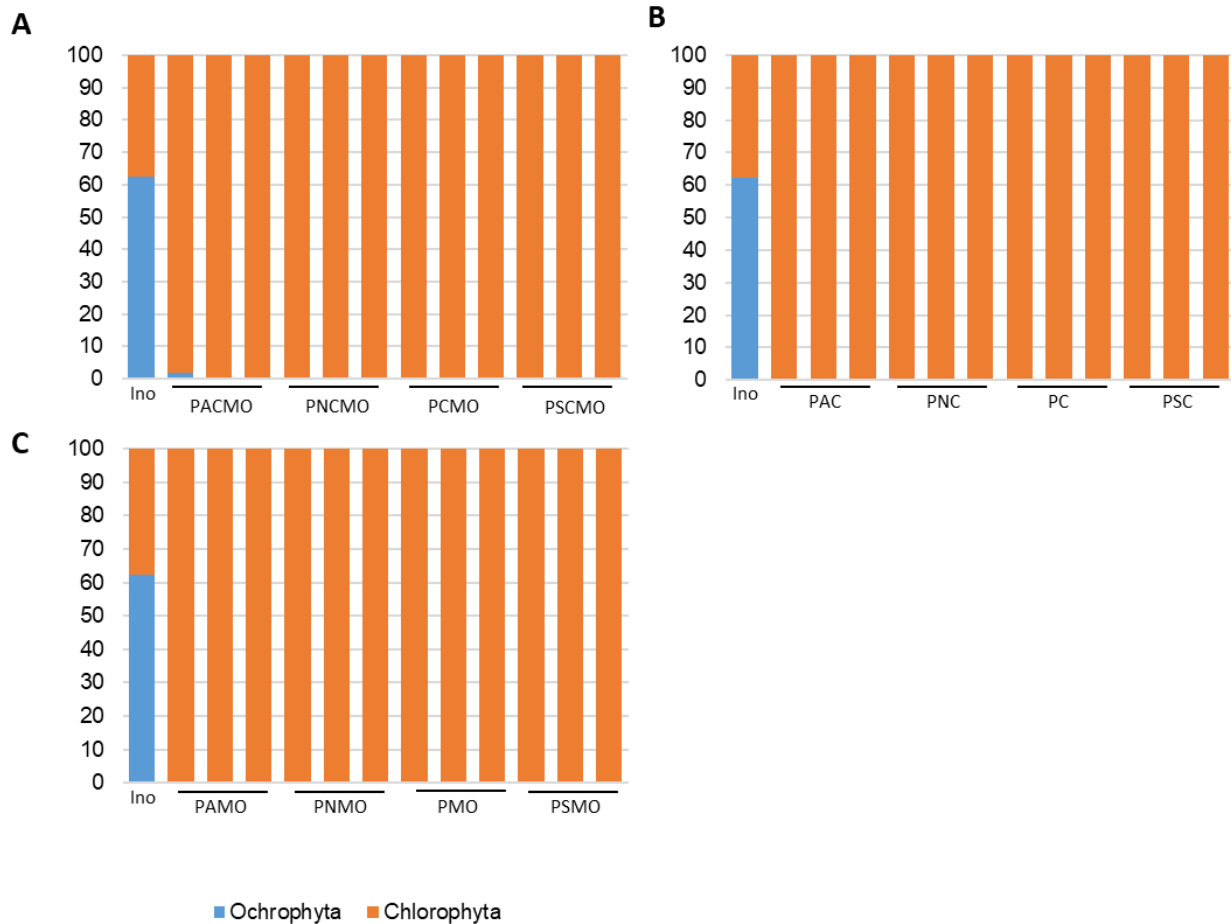


Figure 116: Abondance relative des différents phyla. (A) condition 'pluie-calcaire-microorganismes'; (B) condition 'pluie-calcaire'; (C) condition 'pluie-microorganisme'. Les lettres A, N et S permettent d'identifier l'enrichissement des milieux : A correspond au milieu enrichi en ammonium, N au milieu enrichi en nitrates et S enrichi en sulfates.

- Condition 'pluie-calcaire-microorganismes'

La Figure 117 correspond à l'abondance relative des différents genres algaires identifiés dans la condition 'pluie-calcaire-microorganismes' en fonction des différents milieux.

Pour tous les milieux étudiés, les genres *Pseudomuriella* et *Chromochloris* composent la majeure partie des communautés algales. Pour les milieux enrichis en composé azotés (PACMO et PNMO) le genre *Pseudomuriella* est majoritaire avec des abondances relatives comprises entre 45 et 85 %. Pour les milieux non enrichi et enrichi en sulfates, le genre *Chromochloris* est cette fois-ci prédominant avec des abondances relatives comprises entre 30 et 80%.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

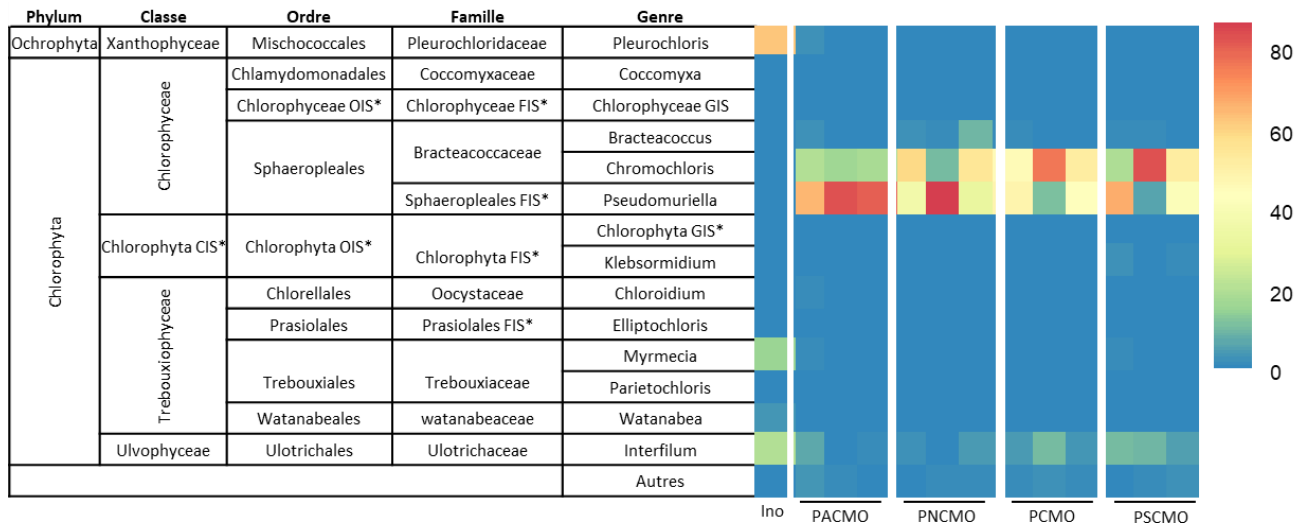


Figure 117: Abondance relative des genres algaires identifiés dans la condition 'pluie-calcaire-microorganismes' en fonction des différents milieux (en %).

- Condition 'pluie-calcaire'

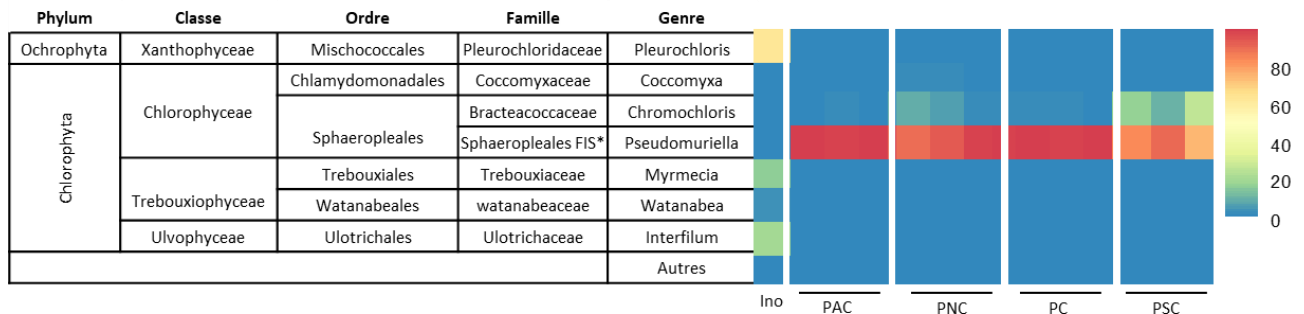


Figure 118 : Abondance relative des genres algaires identifiés dans la condition 'pluie-calcaire' en fonction des différents milieux (en %).

La Figure 118 correspond à l'abondance relative des genres algaires identifiés en condition 'pluie-calcaire' en fonction des différents milieux. Pour l'ensemble des milieux étudiés, le genre *Pseudomuriella* est très largement majoritaire avec des abondances relatives comprises entre 65 et 95%. L'abondance de ce dernier est légèrement plus faible dans le milieu enrichi en sulfates (PSC) où une proportion considérable du genre *Chromochloris* est aussi observée (10 – 30 %).

- Condition 'pluie-microorganismes'

La Figure 119 correspond à l'abondance relative des genres algaires identifiés en condition 'pluie-microorganismes' en fonction des différents milieux. Pour les milieux enrichis en composés azotés (PAMO et PNMO) le genre *Coccomyxa* domine les communautés algaires avec des proportions comprises entre 50 et 95%. Le genre *Pseudomuriella* est quant à lui prédominant dans les milieux enrichis en sulfates et sans enrichissement. Au sein de ces milieux, la présence des genres *Coccomyxa* et *Bracteacoccus* est aussi considérable avec des valeurs comprises entre 10 et 60%.

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

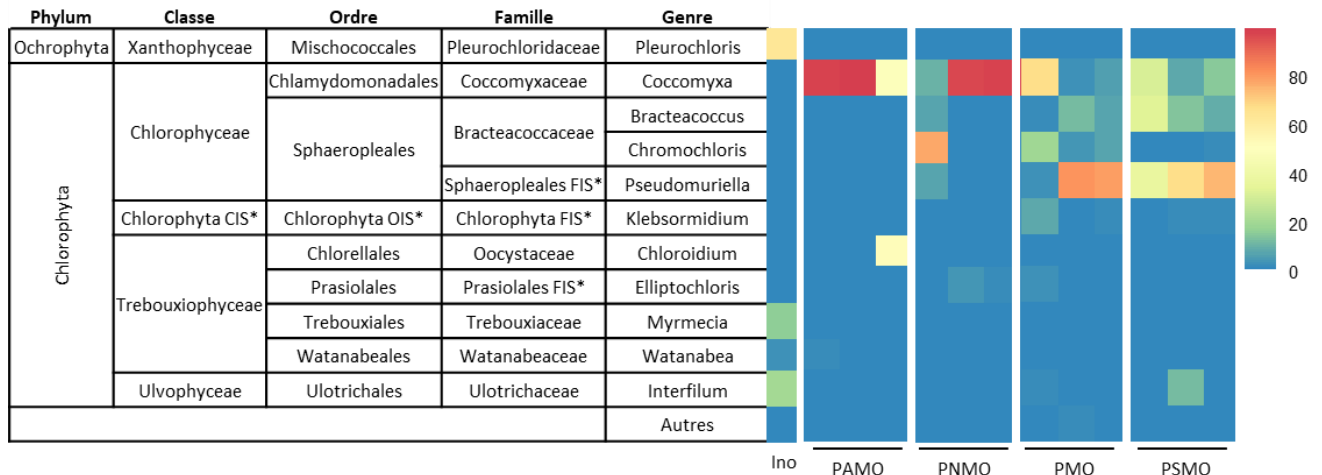


Figure 119: Abondance relative des genres algaires identifiés dans la condition 'pluie-microorganismes' en fonction des différents milieux (en %).

Afin de mettre en évidence des liens entre les communautés microbiennes et les ions solubles, les analyses en composantes principales ont été réalisées pour les phyla bactériens (Figure 120) et les classes fongiques (Figure 121), en fonction de la composition des microcosmes.

### Bactéries

Les individus des microcosmes de composition PC (Figure 120 – Série PC) sont différenciés en trois groupes : (1) PC et PNC, (2) PAC et (3) PSC. Les échantillons PC et PNC sont en effet similaires avec des concentrations plus importantes en ammonium et sont assez bien corrélées avec des proportions plus grandes en Actinobacteriota, Proteobacteria et Dependientiae. Les échantillons PAC montrent des concentrations importantes en calcium, chlorure, oxalate et formate corrélées avec les Chlorophyta. Enfin les échantillons PSC présentent des concentrations importantes en sulfate, nitrate, magnésium et phosphate corrélées avec des proportions plus élevées en Verrucomicrobiota.

De la même manière que précédemment, les microcosmes de composition PMO (Figure 120 – Série PMO) se différencient en trois groupes : (1) PMO et PNMO, (2) PAMO et (3) PSMO. PMO et PNMO montrent de plus importantes concentrations en calcium, sodium et acétate, corrélées avec de plus importantes proportions en Planctomycetota, Bacteroidota et Proteobacteria. Les microcosmes PAMO montrent des concentrations plus importantes en ammonium, nitrate, chlorure, phosphate, propionate et formate, corrélées avec une proportion importante en Chlorophyta. Enfin les microcosmes PSMO montrent quant à eux des concentrations plus importantes en magnésium, sulfates et oxalates, corrélées avec de plus fortes proportions en Cyanobacteria.

Contrairement aux compositions précédentes, les échantillons de composition PCMO (Figure 120 – Série PCMO) ne montrent pas de séparations nettes en fonction de la composition de l'eau de pluie. Cependant, certaines variables semblent quand même assez bien corrélées avec les compositions de pluies. Les échantillons PCMO sont assez bien corrélés avec des fortes concentrations en anions organiques (propionate, acétate, formate, oxalate) ainsi qu'avec le phylum Verrucomicrobiota. Les échantillons PACMO montrent des concentrations plus importantes en nitrate corrélées avec des proportions importantes de Cyanobacteria, Chlorophyta et



## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

Bacteroidota. Les échantillons PSCMO montrent quant à eux des concentrations importantes en sulfate et magnésium corrélées avec des proportions importantes en Proteobacteria. Enfin les échantillons PNCMO montrent des concentrations importantes en sodium corrélées avec des proportions importantes en Actinobacteria et en Dependientiae.

- ⇒ **Les milieux enrichis en nitrates et non enrichis sont assez similaires et semblent favoriser le développement d'Actinobacteria et de Dependientiae.**
- ⇒ **Les milieux enrichis en ammonium favorisent le développement de Chlorophyta.**
- ⇒ **Le milieu enrichi en sulfates ne semble pas favoriser un phyla bactérien en particulier.**

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

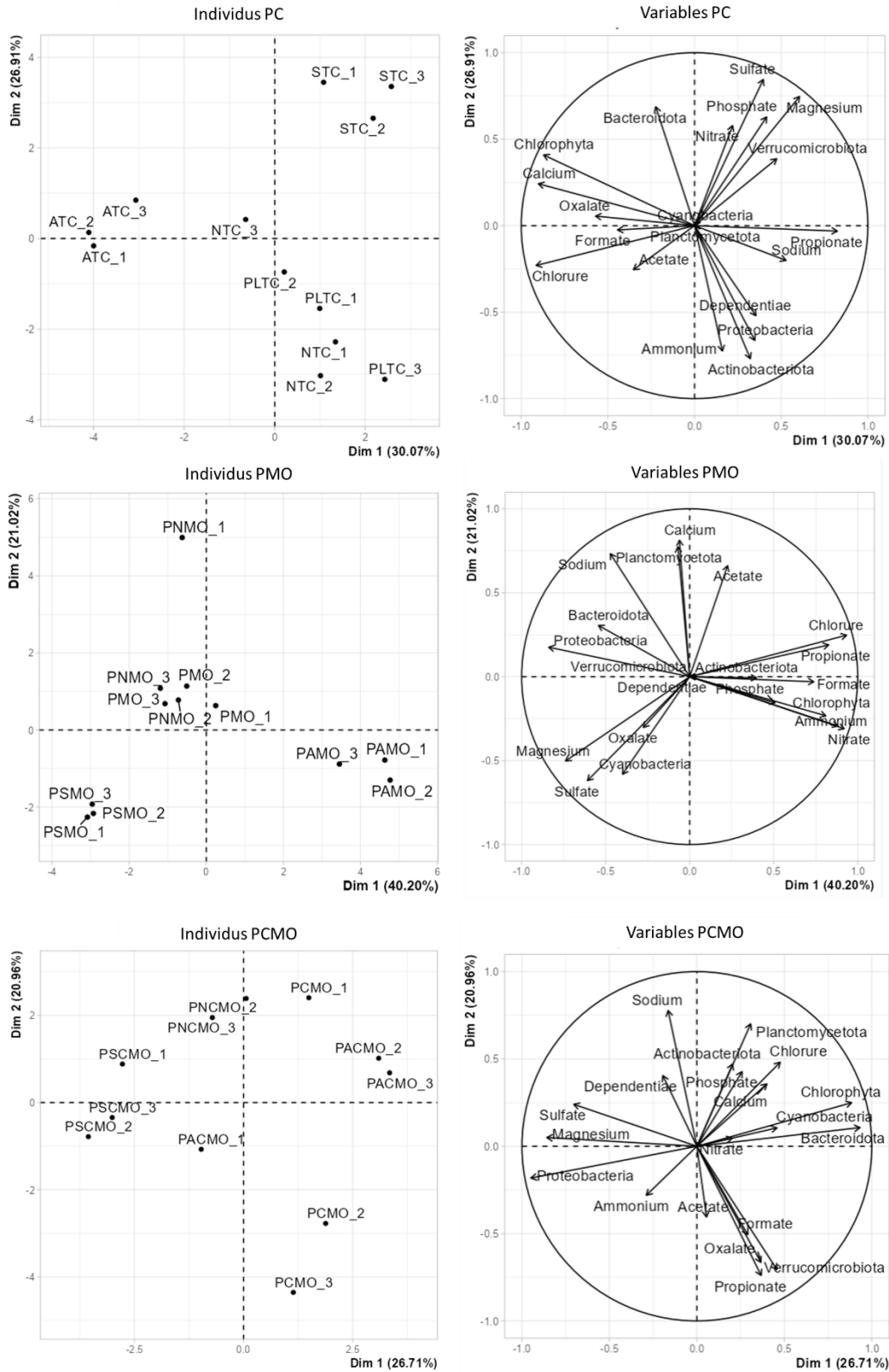


Figure 120: Analyses en composantes principales entre les ions en solution et les phyla bactériens par composition de microcosmes. PC : 'pluie-calcaire' ; PMO : 'pluie- microorganismes' ; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes'.

## Champignons

Les individus des microcosmes de composition PC (Figure 121 – Série PC) sont différenciés en quatre groupes : PC, PNC, PAC et PSC, avec PNC et PC qui semble avoir des compositions assez proches. Les échantillons PC et PNC sont similaires avec des concentrations plus importantes en ammonium et acétate, et sont assez bien corrélées avec des proportions plus grandes en Leotiomyces. Les échantillons PAC montrent des concentrations importantes en calcium, chlorure, oxalate et formate corrélées avec les Eurotiomyces. Enfin les échantillons PSC présentent des concentrations importantes en sulfate, nitrate, magnésium et phosphate corrélées avec des proportions plus élevées en Dothiedomyces et Sordariomyces. Les échantillons PSC sont anti-corrélés avec la classe fongique des Leotiomyces.

Les microcosmes de composition PMO (Figure 121 – Série PMO) se différencient en trois groupes : PMO et PNMO, PAMO et PSMO. Les microcosmes PMO et PNMO montrent de plus importantes concentrations en calcium, sodium et acétate, corrélées avec de plus importantes proportions en Sordariomyces, Tremellomyces et Spizellomyces. Les microcosmes PAMO montrent des concentrations plus importantes en ammonium, nitrate, phosphate, et formate, corrélées avec une proportion importante en Eurotiomyces et Cystobasidiomyces. Enfin les microcosmes PSMO montrent quant à eux des concentrations plus importantes en magnésium, sulfates et oxalates, corrélées avec de plus fortes proportions en Mortiellomyces, Saccharomyces, Dothiedomyces et Malasseziomyces.

Enfin les échantillons de composition PCMO (Figure 121 – Série PCMO) ne montrent pas de séparations nettes en fonction de la composition de l'eau de pluie. Cependant, certaines variables semblent quand même assez bien corrélées avec les compositions de pluies. Les échantillons PACMO montrent des concentrations plus importantes en calcium, chlorure et ammonium corrélées avec des proportions importantes d'Eurotiomyces. Les échantillons PSCMO montrent quant à eux des concentrations importantes en sulfate et magnésium corrélées avec des proportions importantes en Saccharomyces, Dothiedomyces et Sordariomyces.

- ⇒ **Les pluies enrichies en nitrates et sans enrichissement ont des compositions assez semblables que ce soit du point de vue chimique ou microbiologique.**
- ⇒ **Les pluies enrichies en nitrate semblent favoriser la présence de la classe des Eurotiomyces.**
- ⇒ **Les pluies enrichies en sulfates semblent favoriser le développement des classes Dothiedomyces, Sordariomyces et Saccharomyces.**

## Chapitre 4 : altération expérimentale de la pierre calcaire

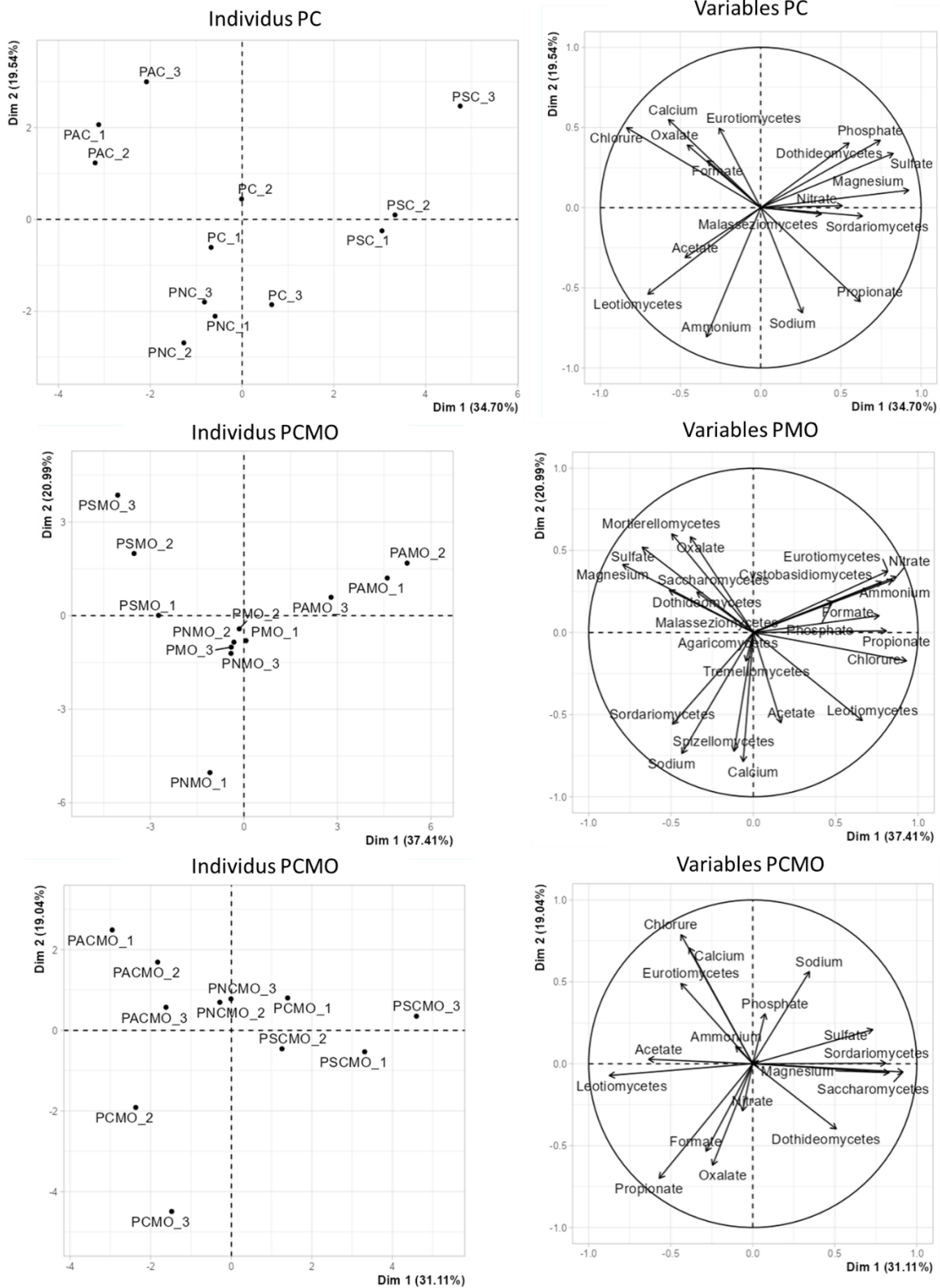


Figure 121: Analyses en composante principale entre les ions en solution et les classes fongiques par composition de microcosmes. PC : 'pluie-calcaire' ; PMO : 'pluie- microorganismes' ; PCMO : 'pluie-calcaire-microorganismes'.

## 4. Discussion

Les simulations en milieu contrôlé réalisées dans cette étude permettent d'évaluer l'impact de quatre types de pollution sur la colonisation biologique et sur l'évolution des communautés microbiennes initialement présentes sur le calcaire.

Nous avons vu précédemment (Chapitre 4.2) que la pollution particulaire et gazeuse déposée sur le substrat n'influçait pas significativement la diversité des communautés microbiennes aux échelles de temps et aux niveaux de pollution considérés, que cela soit du point de vue de la colonisation biologique ou de l'évolution des communautés préexistantes.

C'est pour cela que la discussion va s'axer principalement sur l'influence des pollutions en sulfate, nitrate et ammonium. Celle-ci a été testée sur des calcaires sans inoculum (série 'pluie-calcaire') et avec inoculum microbien (série 'pluie-calcaire-microorganismes') provenant de la tombe ST10V1. Même en l'absence d'inoculum, les calcaires étaient colonisés par des microorganismes. Les deux séries d'expériences permettent donc de comparer l'effet de la communauté microbienne de départ (même si celle des calcaires sains n'a pas pu être identifiée) et de la quantité de microorganismes et d'observer dans un cas la colonisation et dans le second l'évolution des communautés.

### 4.1. Influence du type de pollution sur la bio-altération du calcaire

- Changement chromatique

#### Sans inoculum microbien

Après 63 jours d'incubation, de légers changements chromatiques ont été observés, notamment sur les échantillons enrichis en ammonium et en nitrate avec une patine de couleur **verte**. Les calcaires altérés dans des conditions enrichies en sulfate présentent eux une patine plus **orangée**. Ces patines sont induites par la présence de microorganismes qui sont sphériques lors de leurs observations au microscopes. Les mesures réalisées à l'aide de la BenthosTorch® montrent des concentrations plus importantes en chlorophylle-a sur les échantillons azotés (ammonium et nitrate), indiquant donc que ces microorganismes sphériques pourraient correspondre à des micro-algues vertes. Les analyses de séquençage ont mis en évidence la présence de deux seul genres de Chlorophyta, les *Pseudomuriella* et *Chromochloris*. Le premier a été identifié pour toutes les pollutions étudiées mais il est plus abondant dans le milieu enrichi en ammonium (100% pour le milieu enrichi en ammonium et inférieur à 1% pour les autres milieux).

#### Avec inoculum microbien

Après 63 jours, d'importantes patines colorées se sont développées pour toutes les pollutions. Les calcaires traités avec une pollution azotée (ammonium et nitrate) présentent des patines d'altération **vertes**, tandis que les calcaires traités avec une pollution soufrée (sulfate) présentent une patine d'altération **orangée**. Elles semblent également être liées à la présence de microorganismes sphériques. Les importantes concentrations en chlorophylle-a détectées pour les échantillons azotés semblent confirmer que ces microorganismes sont des microalgues vertes. Les analyses NGS ont mis en évidence la présence de deux genres de Chlorophyta dans les microcosmes quel que soit le type de pollution : *Pseudomuriella* et *Chromochloris*.

- ⇒ Le changement de patine (et de couleur) entre la pollution azotée et soufrée peut être attribuée aux algues vertes mais celles-ci produisent une coloration différente. On peut donc supposer un développement différent des algues vertes induit par une modification

du milieu dans lequel elles évoluent. Ainsi, dans des conditions azotées, les algues seraient riches en chlorophylle-a, tandis qu'en présence de sulfate, elles produiraient des pigments de type caroténoïdes. Des études précédentes montrent que lorsque les cultures de ces genres sont jeunes, elles sont vertes, mais en vieillissant, elles développent une teinte orangée (Fucikova, 2011). Ce changement chromatique est aussi décrit dans la littérature comme pouvant être induit par un stress, notamment par la privation de composés azotés, entraînant une chute de la concentration de chlorophylle-a (couleur verte), au sein de cellules, au profit de caroténoïde secondaire (couleur orange) (Bar et al., 1995; Wood et al., 2023).

⇒ **Le stress provoqué par privation des composés azotés serait cohérent avec les données de cette étude, où une patine verte est visible dans les microcosmes enrichis en azote, et une patine orange dans les microcosmes enrichis en sulfates (limitant rapidement les composés azotés de ce milieu).**

- Phases secondaires

En présence ou non d'inoculum microbien, les calculs de spéciation chimique en solution ont permis de repérer différentes phases qui sont proches de l'équilibre ou sursaturée : des phosphates de calcium (hydroxyapatite) et des oxalates de calcium. Etant donné leur proximité avec l'équilibre, il se pourrait que ces phases aient précipité sur nos échantillons. Des analyses de diffraction à rayon X (DRX) permettraient de confirmer cette hypothèse.

## 4.2. Influence du type de pollution sur la colonisation biologique du calcaire

- Bactéries

### Sans inoculum

Les genres microbiens principaux, par type de pollution, dans les expériences 'pluie-calcaire' sont résumés dans la Figure 122.

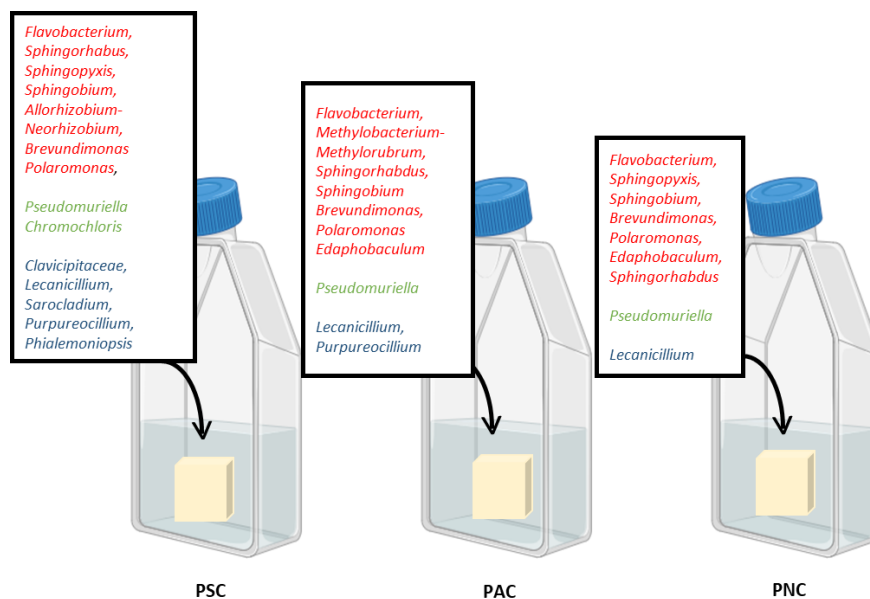


Figure 122: Schéma récapitulatif des genres identifiés en fonction du type de pollution dans les conditions 'pluie-calcaire'. PSC : pollution en sulfate ; PAC : pollution en ammonium ; PNC : pollution en nitrate. La couleur rouge correspond aux genres bactériens, verte aux genres algues et bleue aux genres fongiques.

Les communautés bactériennes des échantillons pollués en nitrates, en ammonium et en sulfates sont composés des mêmes phyla principaux : les Proteobacteria, les Bacteroidota et pour les algues, les Chlorophyta. Les genres bactériens majoritaires sont présents pour les trois types de pollution, mais leurs proportions varient. Les genres *Flavobacterium*, *Sphingobium*, *Polaromonas* et *Brevundimonas* sont retrouvés en proportion importante pour tous les types de pollution. Les *Flavobacterium* ont été identifiés sur de nombreux monuments en pierre calcaire et sont aussi fréquemment retrouvés en milieu aquatique (Bernardet et Bowman, 2006). L'espèce *Sphingobium limneticum* est le principal représentant du genre *Sphingobium* identifié dans cette étude (données non montrées). Cette espèce a été identifiée dans l'étude menée par Liu et al. (2021) comme ayant un métabolisme producteur d'ammonium par ammonification. Le genre *Brevundimonas* est représenté dans cette étude par l'espèce *Brevundimonas denitrificans* qui est impliquée dans le cycle de l'azote, notamment pour sa capacité à réduire les nitrates (Tsubouchi et al., 2014). Dans différentes études, le genre *Polaromonas* a été identifié comme un des agents majeurs de dénitrification dans différents milieux (Jang et al., 2019; Rodriguez-Sanchez et al., 2020; Tian and Wang, 2021). Le genre *Sphingorhabdus* est identifié partout mais principalement dans le milieu enrichi en ammonium. Ce genre est décrit comme étant une bactérie hétérotrophe nitrifiante – dénitrifiante aérobie (HN AD), c'est-à-dire capable d'utiliser la matière organique comme source de carbone afin d'oxyder l'ammoniac en nitrites et nitrates, puis de les convertir en diazote dans des conditions aérobies. Le genre *Flavobacterium* a aussi été décrit comme étant une bactérie HN AD (Fu et al., 2022; Z. Zhang et al., 2023).

- ⇒ **La présence de composés azotés au sein des différents milieux semble avoir un impact déterminant sur le développement des communautés bactériennes.**
- ⇒ **La présence de sulfate ne semble pas avoir d'effet sur la colonisation bactérienne des pierres. Cela pourrait être induit par de trop faibles concentrations de sulfates dans l'expérience. La concentration en sulfates utilisée pour cette expérience provient de Anatolaki et Tsitouridou (2009) et correspond à des taux de sulfates réalistes et actuels. Cependant, les concentrations en SO<sub>2</sub> atmosphérique étaient plus importantes au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle. En conséquence, la concentration en sulfates dans les pluies l'était aussi. Il serait donc intéressant d'augmenter le taux de sulfates dans cette expérience afin d'identifier l'incidence d'une plus forte pollution sulfatée sur la colonisation biologique.**

Avec inoculum microbien

Les genres microbiens principaux dans l'inoculum et pour chaque type de pollution sont récapitulés dans la Figure 123.

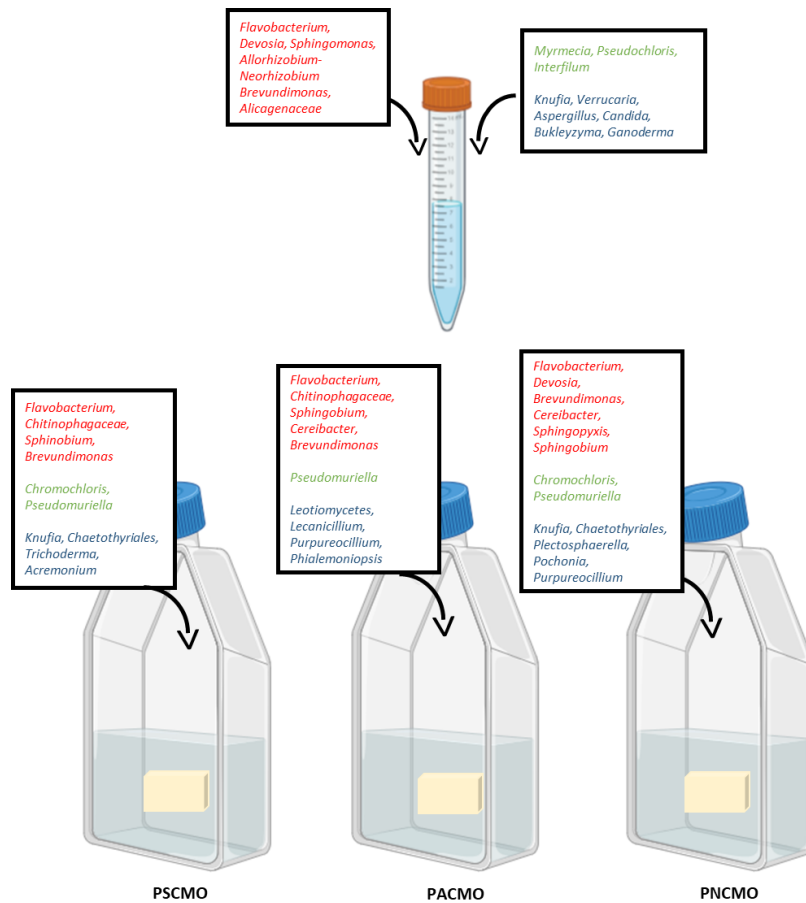


Figure 123: Schéma récapitulatif des genres microbiens initiaux (inoculum) et après exposition aux différentes pollutions dans les conditions 'pluie-calcaire-microorganismes'. PSCMO : pluie enrichie en sulfates ; PACMO : pluie enrichie en ammonium ; PNCMO : pluie enrichie en nitrates. La couleur rouge correspond aux genres bactériens, verte aux genres algaires et bleue aux genres fongiques.

L'inoculum est composé de deux phyla principaux : Bacteroidota et Proteobacteria. Trois genres de Chlorophyta sont identifiés *Pleurochloris*, *Myrmezia* et *Interfilum*. Les genres majoritairement identifiés correspondent aux : *Flavobacterium*, *Devosia*, *Sphingomonas*, *Allorhizobium-Neorhizobium*, *Brevundimonas* et à la famille des Alicagenaceae. Après 63 jours, les genres *Flavobacterium* et *Brevundimonas* ont été identifiés dans tous les milieux pollués. Comme expliqué précédemment, ces genres interviennent au sein du cycle de l'azote, principalement pour leur capacité dénitrifiante (utilisation des nitrates). Le genre *Sphingobium*, bien qu'absent de l'inoculum initial, a été identifié dans tous les milieux. Dans cette étude l'espèce principale composant ce genre, est *Sphingobium limneticum*. Cette espèce a été décrite par Liu et al. 2021, comme étant capable de précipiter du CaCO<sub>3</sub> dans l'eau via des phénomènes d'ammonisation à partir d'acides aminés (acides aminés → ammoniac). La forte abondance de ce genre au sein du milieu enrichi en ammonium est cohérente avec son métabolisme. Le genre *Cereibacter* a, quant à lui, été identifié majoritairement dans les milieux enrichis en composé azotés (nitrate et ammonium). L'espèce associée à ce genre est *Cereibacter changlensis*. Ce dernier est très peu décrit dans la littérature. Le genre *Devosia* était présent dans l'inoculum initial est retrouvé



seulement dans le milieu enrichi en nitrate. Ce genre est décrit et utilisé pour sa capacité à réaliser la nitrification ( $\text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_3$ ) dans des études de biotechnologie (Zhao et al., 2016).

- ⇒ **Les principaux genres identifiés pour toutes les pollutions sont impliqués dans le cycle de l'azote**
- ⇒ **Aucun genre, même pour les pollutions enrichies en sulfates, n'est identifié comme étant impliqué dans le cycle du soufre.**

### *Comparaison entre les simulations avec et sans inoculum microbien*

Comme on pouvait s'y attendre, les microcosmes contenant l'inoculum microbien présentent une abondance (nombre de microorganismes) et une diversité (nombre d'OTU) plus importante que les échantillons sans inoculum. Cependant, une patine colorée beaucoup plus marquée, corrélée avec les concentrations en chlorophylle-a, se développe sur les échantillons enrichis en inoculum.

Avec ou sans inoculum, les genres omniprésents des communautés bactériennes sont : *Flavobacterium*, *Brevundimonas* et *Sphingobium*. Ces derniers ont clairement été identifiés comme participant au cycle de l'azote par leur métabolisme dénitrifiant (*Brevundimonas* et *Flavobacterium*) et ammonisant (*Sphingobium*).

La présence d'inoculum bactérien ne semble pas avoir joué un rôle déterminant en termes de composition des communautés bactériennes. En revanche, il a permis un développement plus rapide et plus important des microorganismes.

### • **Champignons**

#### *Sans inoculum microbien*

Les champignons ayant colonisé les calcaires après 63 jours d'altération appartiennent au phylum des Ascomycota. Pour toutes les types de pollution, le genre *Lecanicillium* a été identifié. Ce genre a été décrit comme ayant la capacité à solubiliser le  $\text{CaCO}_3$  (Ponizovskaya et al., 2019). Le genre *Purpureocillium* a aussi été identifié dans les milieux enrichis en sulfates et en ammonium. Ce genre est principalement représenté par l'espèce *Purpureocillium lilacinum* (ou *Paecilomyces lilacinus*) dans cette étude (données non montrées). Cette espèce a été trouvée sur de nombreux monuments en pierre et est décrite comme délétère pour les pierres du fait de sa production d'enzymes (Nuhoglu et al., 2006; Boniek et al., 2019; Ponizovskaya et al., 2019). Le genre *Sarocladium* a été identifié en présence de *Lecanicillium* et de *Purpureocillium* sur du calcaire en Egypte et en Russie et est considéré comme alcalino-tolérant (Ponizovskaya et al., 2019; Sheir et al., 2020).

- ⇒ **Les champignons présents ne semblent pas être affectés (du point de vue métabolique) par une source de pollution particulière.**

#### *Avec inoculum microbien*

La communauté fongique de l'inoculum initial est composée de deux phyla : Ascomycota et Basidiomycota. Seul le phylum des Ascomycota est retrouvé à la fin des simulations pour tous les types de pollution étudiés. A l'échelle des genres, l'inoculum est principalement composé de : *Knufia*, *Verrucaria*, *Aspergillus*, *Buckeyzyma* et *Ganoderma*.

Après 63 jours d'incubation avec les différentes pollutions, seul le genre *Knufia* est encore présent dans les microcosmes enrichis en sulfate et en nitrate, ce qui montre une évolution très importante

des communautés fongiques. Le genre *Lecanicillium* est présent lorsque le genre *Knufia* est absent ce qui pourrait indiquer une compétitivité entre ces deux genres fongiques.

Le genre *Purpureocillium*, représenté par l'espèce *Purpureocillium lilacinum* est identifié dans les milieux enrichis en composés azotés. Cette espèce est décrite comme produisant des acides organiques notamment de l'acide acétique (Nagachandrabose, 2020). Negi et Sarethy 2019 décrivent l'acide lactique et l'acide acétique comme étant capables de réagir avec les hydroxydes de calcium contenus dans les pierres, formant ainsi des sels très solubles qui seront extraits de la matrice par lessivage. Ainsi, avec le temps, la matrice intergranulaire est progressivement dissoute et la pierre s'altère chimiquement.

⇒ **Pour les champignons, les genres *Lecanicillium*, *Phialemoniopsis* et *Purpureocillium* ne semblent pas être influencés par un type de pollution en particulier.**

### Comparaison entre les simulations avec et sans inoculum microbien

Avec ou sans inoculum, et principalement pour les échantillons ayant été soumis à une pollution particulaire et gazeuse, de nombreux OTU n'ont pas pu être identifiés. Ce manque pourrait être dû à une limitation au niveau de la base de données UNITE\_Fungi\_8 utilisée. Pourtant, cette dernière est une des bases les plus complètes pour l'affiliation taxonomique des champignons. Mais l'ADN fongique reste l'un des plus complexes à étudier par la méthode de NGS. Ces bases de données étant en permanente évolution, une étude ultérieure pourrait déboucher sur de nouvelles affiliations taxonomiques. De plus, dans cette étude, le choix pour le séquençage fongique a porté sur les amplicons ITS, qui sont majoritairement utilisés dans les études des communautés fongiques impliquées dans la bio-détérioration. Cependant, l'ADN fongique aurait aussi pu être séquençé sur les amplicons 18S, ce qui aurait peut-être permis l'identification d'autres champignons.

La majorité des champignons identifiés après deux mois d'expérimentation sont relativement similaires que cela soit en présence ou non d'inoculum et sans dépendance visible à un type de pollution en particulier. Le genre *Knufia* est l'exception : il ne se développe qu'en présence d'inoculum où il était présent à l'origine. Le genre *Knufia* est considéré comme un champignon noir (« black fungi »), fréquemment décrit comme étant particulièrement résistant. En effet, ce sont les premiers à recoloniser une pierre nettoyée et restaurée (Sterflinger, 2000; Sterflinger and Krumbein, 1997; De Leo et al., 2022; Isola et al., 2022).

Les références bibliographiques sur les métabolismes prédominants des champignons identifiés majoritairement dans les différents microcosmes ne mettent pas en relief des métabolismes liés aux composés soufrés et azotés. Une exception est cependant mentionnée pour le genre *Purpureocillium lilacinum* identifié dans des milieux enrichis en composés azotés.

Diverses études ont montré que la pollution de l'air pouvait influencer la composition des communautés fongiques. En Italie, des recherches ont notamment démontré que les composés soufrés servaient de nutriments aux champignons du genre *Cladosporium*, *Penicillium* ou encore *Rhodotorula* (Pitzurra et al., 2003; Moroni et al., 2004; Moroni and Pitzurra, 2008). Au Brésil, l'abondance des espèces *Sarcinomyces sp.* et *Pseudocyphellaria coriifolia* sont corrélées avec des taux de SO<sub>2</sub> importants (Boniek et al., 2019).

L'étude de Hawkes et al. (2011), a mis en évidence que plus les précipitations étaient abondantes, moins les communautés fongiques étaient diversifiées et nombreuses. Dans notre cas, le fait que l'expérience se soit déroulée dans des conditions immergées, a pu influencer le développement des communautés fongiques, les rendant beaucoup moins diversifiées que celles récoltées au cimetière du Père Lachaise.

## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES :

L'objectif initial de cette étude était de comprendre les effets des microorganismes sur l'altération des pierres calcaires en milieu urbain pollué. Pour répondre à cette question, il est nécessaire de décrire dans un premier temps le système étudié et d'identifier les microorganismes susceptibles d'être impliqués dans la biodétérioration. Ce travail de thèse se concentre donc sur cette description du système. Il a permis d'identifier les microorganismes présents au sein des communautés microbiennes et d'observer leurs réactions face à un changement d'environnement. Pour cela, trois types d'échantillons ont été étudiés : des pierres tombales du cimetière du Père-Lachaise (~200 ans d'altération), des coupons de calcaire exposés in situ pendant 5 ans, et des coupons de calcaire altérés artificiellement en laboratoire sous différentes conditions de pollution sur une période de 2 mois.

### 1. Faciès d'altération du calcaire en milieu urbain pollué

La pollution atmosphérique a évolué depuis les débuts de la révolution industrielle (milieu XIX<sup>e</sup> siècle) (*Figure 124*). Entre 1850 et 1950, les concentrations en SO<sub>2</sub> dans la capitale étaient en constante augmentation. À partir de 1950, de nombreuses politiques environnementales, mises en place par le gouvernement, ont permis une diminution drastique de cette pollution, jusqu'à atteindre des concentrations quasiment nulles aujourd'hui. À l'inverse, les oxydes d'azote ont augmenté jusqu'à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle pour baisser par la suite, mais de manière moins prononcée. De ce fait, les proportions des pollutions azotées telles que les NH<sub>4</sub> et les NO<sub>x</sub> ont augmenté au cours du temps.

Après 200 ans d'altération, les tombes du Père-Lachaise présentent essentiellement des figures de dissolution / érosion dans les parties exposées aux pluies et des croûtes noires dans les parties protégées. Ces dernières ne se sont pas formées sur les coupons de calcaire exposés entre 2016 et 2021 dans le même environnement. Nous pouvons donc supposer que le temps d'exposition est trop court, mais également que les très faibles concentrations en SO<sub>2</sub> actuelles ralentissent le phénomène de sulfatation et la formation de croûtes noires. Ces dernières, identifiées seulement sur les tombes, correspondent donc à des témoins de la pollution soufrée ancienne. Par ailleurs, du KNO<sub>3</sub> a été analysé sur les coupons abrités, ce qui peut être attribué à l'impact des NO<sub>x</sub> et à l'évolution de l'atmosphère actuelle, où le NH<sub>3</sub> et les NO<sub>x</sub> constituent les principales sources de pollution. Cette phase n'a pas été retrouvée sur les tombes anciennes dans cette étude, mais elle l'avait été par Bolou-Bi et al. (2016). Cette phase est très soluble dans l'eau (270 g.L<sup>-1</sup> à 20 °C et 410 g.L<sup>-1</sup> à 60 °C), contrairement au gypse (~ 2 g.L<sup>-1</sup>). Elle peut donc être facilement dissoute, mais elle a de fait plus de chance de se former dans l'environnement actuel.

L'érosion du calcaire est facilement visible sur les statues et les tombes du Père-Lachaise, mais elle est plus difficile à évaluer de manière quantitative. La littérature montre cependant que celle-ci diminue avec la baisse du pH des pluies et l'évolution de la pollution (Inkpen et al., 2012). En revanche, elle pourrait augmenter dans le futur avec la hausse des concentrations en CO<sub>2</sub> et des températures (Brimblecombe and Lefèvre, 2021).

Sur l'ensemble des échantillons, d'importantes patines colorées sont visibles. Ces dernières sont principalement induites par des microorganismes phototrophes comme les algues vertes. Ce verdissement est d'ailleurs constaté depuis une vingtaine d'années par les conservateurs du Père-Lachaise. Ce changement chromatique se développe de manière importante dans les périodes

## Conclusion générale et perspectives

les plus humides. Il est accéléré en présence de pollution azotée qui facilite l'eutrophisation des algues.

- ⇒ L'évolution de la pollution atmosphérique et du climat favorise le verdissement des tombes, mais limite la formation de phases secondaires et probablement l'érosion.
- ⇒ Ainsi l'altération des coupons ne correspond pas aux premiers stades d'altération des tombes, car l'environnement a fortement changé. Cependant, elle peut nous aider à prévoir l'évolution de l'altération des calcaires dans les années à venir. Nos résultats montrent que la biocolonisation et la bioaltération seront des phénomènes prédominants.

## 2. Communautés microbiennes

Les communautés microbiennes présentes à la surface des monuments en pierre calcaire, sont dépendantes de l'environnement dans lequel elles évoluent actuellement, notamment de la pollution, mais aussi des facteurs météorologiques et saisonniers tels que l'apport en eau (pluie, humidité), la température ou encore l'ensoleillement. Les résultats ont montré des fortes similitudes entre les communautés microbiennes des calcaires anciens et récents, ce qui met bien en évidence que, quel que soit le substrat, elles sont principalement sélectionnées par l'environnement.

### 2.1. Effet du climat

Cinq phyla bactériens sont identifiés dans tous les échantillons : Actinobacteria, Bacteroidota, Deinococcota, Cyanobacteria et Proteobacteria. Les genres microbiens identifiés en condition réelle (tombe et coupons) sont fréquemment identifiés sur les calcaires dans la littérature. Cependant aucun effet du type de calcaire (bio-réceptivité) sur la colonisation biologique n'a pu être mis en évidence.

Le rôle de l'apport en eau sur le développement des microorganismes a été confirmé, notamment en position horizontale. Cette position augmente la rétention d'eau, ce qui permet un développement microbien plus important. De plus, des genres fréquemment retrouvés en milieu aqueux, par exemple *Flavobacterium*, ont été identifiés. La position horizontale favorise aussi l'installation des champignons lichénisés tels que les *Lecania* et les *Verrucaria* et le développement privilégié des mousses.

De ce fait, sur certaines tombes, un effet saisonnier a été constaté. En hiver (où l'apport en eau est plus important), il se manifeste par la présence d'algues vertes et de *Flavobacterium* et en été (où l'apport en eau est plus faible), les genres précédemment cités sont remplacés par des microorganismes plus résistants à la dessiccation tels que les Cyanobacteria.

En position verticale, deux genres fongiques sont identifiés majoritairement : *Knufia* et *Extremus*. Ces champignons décrits comme des « black fungi » sont très résistants, ce qui permet leur développement sur des surfaces sujettes aux stress hydriques importants. Ils sont moins dépendants du climat.

### 2.2. Effet de la pollution atmosphérique

Sur les tombes du Père-Lachaise comportant des croûtes noires gypseuses ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), seul le genre *Acidiphilium* a été identifié en tant que genre impliqué dans le cycle du soufre. Pour les coupons de calcaires altérés expérimentalement avec des pluies enrichies en sulfates, les microorganismes sulfato-réducteurs ou sulfato-oxydants n'ont pas été mis en évidence. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les concentrations en sulfates utilisés dans cette étude correspondent à des niveaux de décroissance du  $\text{SO}_2$  (typiques des années 2000). Par le passé (notamment sur la période 1850-1950), les concentrations en  $\text{SO}_2$  atmosphérique plus élevées augmentaient drastiquement les concentrations en sulfates dans les pluies anciennes. L'effet inhibiteur du  $\text{SO}_2$  atmosphérique est d'ailleurs décrit dans la littérature, diminuant ainsi la diversité microbienne et privilégiant les microorganismes capables d'utiliser les composés soufrés, tels que les bactéries sulfato-oxydantes : *Thiocapsa*, *Halochromatium*, *Allochromatium*, *Thiococcus* et *Thermochromatium*, ainsi que les bactéries sulfato-réductrices : *Desulfovibrio* (Mitchell and Gu, 2000; Villa et al., 2015). Nos résultats montrent que ces bactéries sont donc très peu impliquées dans la biocolonisation actuelle des calcaires.

À l'inverse, sur l'ensemble des échantillons étudiés (tombes, coupons et simulations en laboratoire), des genres et espèces impliqués dans le cycle de l'azote ont été principalement identifiés.

La majorité de ces microorganismes participe au cycle de l'azote par le biais du phénomène de dénitrification ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$ ). Les nitrates sont apportés sur le substrat par la pluie et notamment par la solubilisation des  $\text{NO}_x$ . En revanche, peu de microorganismes ont pu être identifiés comme participant aux réactions d'ammonisation et de nitrification. Or, le phénomène de nitrification est largement décrit dans la littérature comme pouvant impacter l'altération des pierres par la production biologique d'acide nitreux et nitrique pouvant induire des phénomènes de dissolution (Gaylarde, 2020; Th. Warscheid and Braams, 2000; Zhang et al., 2019). Cependant, il est important de souligner que les archées, bien qu'elles n'aient pas été étudiées dans ce travail, peuvent jouer un rôle significatif dans les processus de nitrification et d'ammonisation.

En résumé :

- ⇒ La pollution soufrée actuelle influence très peu les communautés microbiennes dans le sens où elle ne favorise pas la prédominance de bactéries impliquées dans le cycle du soufre.
- ⇒ La pollution azotée influence fortement les communautés microbiennes. En effet, les principaux genres composant les communautés microbiennes identifiés sur les calcaires utilisent les nitrates apportés par la pollution actuelle comme nutriment. De plus, cette pollution favorise la croissance des algues vertes et le verdissement du substrat.
- ⇒ Cette étude démontre donc l'importante adaptabilité des communautés microbiennes qui sont dépendantes de l'environnement dans lequel elles évoluent.

### 3. Scénario pour le futur

Pour conclure ce travail de thèse, nous pouvons nous livrer à une sorte d'exercice de projection de l'évolution de l'altération des calcaires dans le futur à partir de données climatiques et de pollution tirées de Brimblecombe et Lefèvre (2021) (*Figure 124*). Dans certains cas, des fonctions

## Conclusion générale et perspectives

dose-réponse (FDR) ont été utilisées afin d'estimer les altérations des monuments en pierre calcaire dans le futur. C'est le cas de l'étude de Brimblecombe et Lefèvre (2021) qui estime le taux d'érosion des monuments en calcaire en utilisant la fonction dose-réponse de Lipfert (Lipfert, 1989) ou celle du programme ICP-Materials (Kucera et al., 2007). Pour l'encrassement ('soiling') avec la FDR de Brimblecombe et Grossi (2009). Comme données d'entrée, ils utilisent les données climatiques des scénarii RCP 2,6 et RCP 8,5 du GIEC (*Figure 124 A et B*) et des sorties du modèle GAINS pour la pollution.

Les autres phénomènes impliqués dans l'altération du calcaire n'ont pas été étudiés. Par exemple, la formation de croûtes noires n'a pas été estimée par ce type de fonctions. En effet, les croûtes noires sont issues de phénomènes de sulfatation du calcaire, en présence de forte concentration de  $\text{SO}_2$  atmosphérique. Leur vitesse de croissance est difficile à prévoir car elle dépend de l'environnement mais aussi des propriétés de la pierre, des flux d'eau au sein de la porosité et donc de l'architecture locale. Ainsi, dans la *Figure 124 - F*, sa formation est représentée par une courbe qualitative en relation avec la concentration de  $\text{SO}_2$  (*Figure 124 - E*). L'atmosphère actuelle parisienne (pauvre en  $\text{SO}_2$ ) ne permet pratiquement plus la formation de croûte noire, laissant place à la formation d'autre croûte cristalline telle que le  $\text{KNO}_3$ . Dans la mesure où la formation de cette dernière (*Figure 124 - F*) peut être attribuée à la pollution aux  $\text{NO}_x$  (Marszałek et al., 2019), nous pouvons faire l'hypothèse que son évolution suit la concentration du  $\text{NO}_2$  de la *Figure 124 - E*, même si sa détection peut dépendre des conditions d'échantillonnage et des événements météorologiques récents.

En ce qui concerne la bioaltération, dans cette étude, nous avons mis en évidence l'importance de la pollution azotée sur les communautés microbiennes (algues vertes et champignons). Dans une étude précédente (Reboah et al., 2023), une fonction dose-réponse a été établie pour estimer le développement d'algues vertes en fonction de certains paramètres environnementaux tels que la température, l'humidité relative et les événements pluvieux. En prenant en compte les prédictions RCP2.6 et RCP8.5 sur l'augmentation de la température et des précipitations (*Figure 124 C et D*), ainsi que sur les concentrations en  $\text{NO}_2$  (*Figure 1 - E*), une courbe représentant le développement des algues vertes (induisant un verdissement des façades) a été estimée qualitativement (*Figure 124 - F*).

Enfin, les communautés bactériennes sont fortement influencées par la pollution atmosphérique. En effet, les études de Mitchell et Gu (2000) et Villa et al. (2015) ont mis en évidence la présence de bactéries sulfato-oxydantes et sulfato-réductrices sous atmosphère urbaine, riche en  $\text{SO}_2$ . De ce fait, il est très probable que ces microorganismes aient été prédominants lors des périodes de fortes concentrations en  $\text{SO}_2$  atmosphérique (1850-1980). Actuellement ce sont les bactéries dénitrifiantes qui sont prédominantes au sein des communautés microbiennes étudiées (*Figure 124 - F*). En revanche, les communautés fongiques ne semblent pas être influencées par le type de pollution. En effet, les genres identifiés sont comparables aux autres études de la littérature et sont connus pour être relativement ubiquistes.

Du point de vue des métabolismes, certaines bactéries sont capables de produire des acides tels que l'acide sulfurique, nitreux et nitrique. Ces acides sont connus pour induire la dissolution des pierres calcaires. L'acide sulfurique est produit par certaines bactéries sulfato-oxydantes (ex : *Thiobacillus*). Il est donc probable qu'une partie des figures de dissolution visibles sur les monuments altérés à long terme soit induite par la production biogénique de cet acide. Les acides nitreux et nitriques sont quant à eux engendrés lors de la phase de nitrification du cycle de l'azote transformant l'ammoniac en nitrate. Les bactéries produisant ces acides (*Nitrosomonas* et

## Conclusion générale et perspectives

*Nitrobacter*) ne sont pas retrouvées dans cette étude. Nos résultats suggèrent donc une diminution des dissolutions bio-induites au cours du temps. Enfin les phases bio-induites telles que les oxalates et phosphates de calcium sont très probablement formées sur les échantillons altérés au laboratoire. Ces phases n'ont certes pas été retrouvées sur les échantillons du Père Lachaise mais sont fréquemment décrites dans la littérature (Bonazza et al., 2015; Del Monte et al., 1987; Di Bonaventura et al., 1999).

## Conclusion générale et perspectives

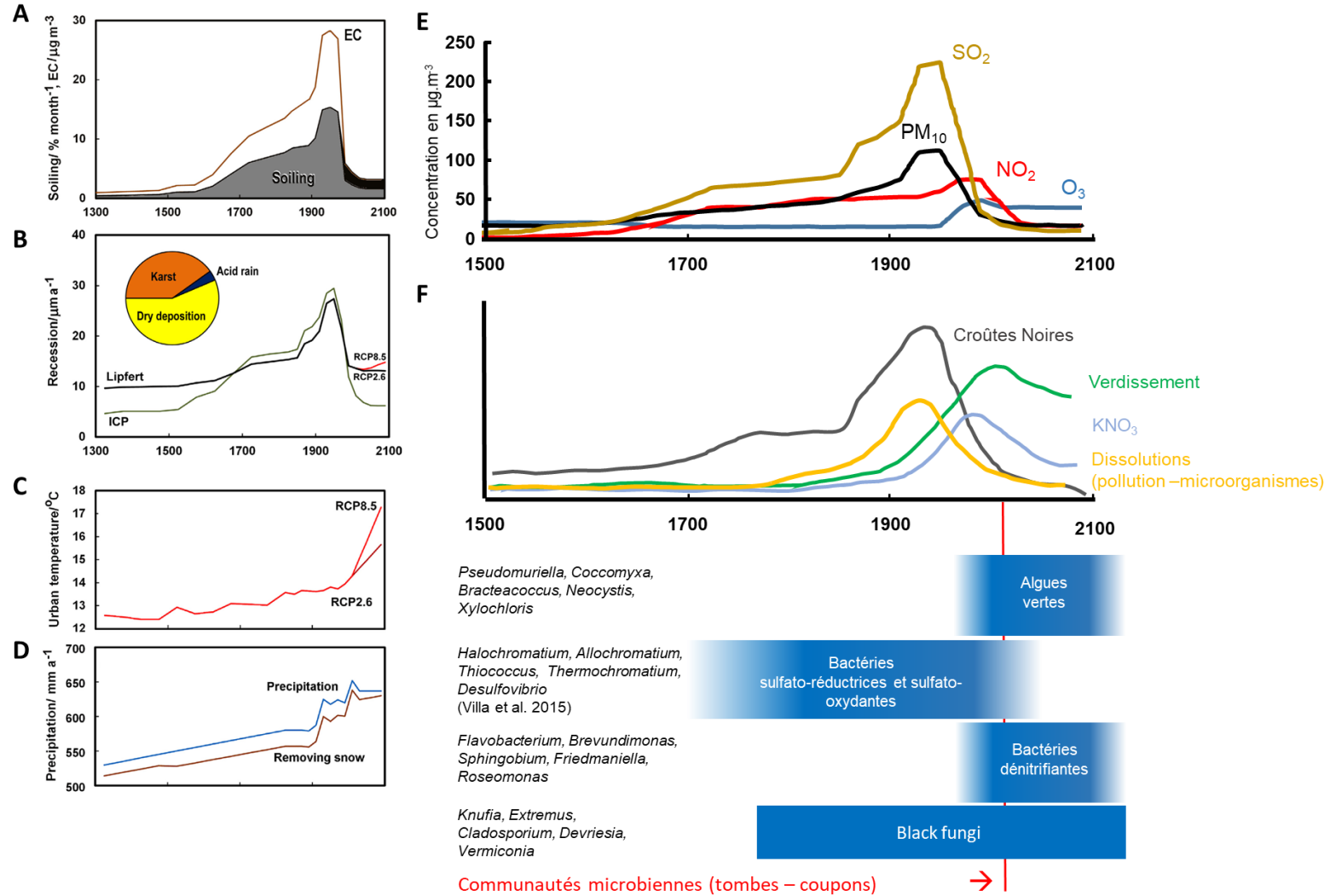


Figure 124 : Scénario des altérations des calcaires au cimetière du Père-Lachaise. (A), (B), (C), (D) sont tirées de (Brimblecombe and Lefèvre, 2021). (A) Évolution du noircissement des surfaces abritées en fonction de la concentration en carbone élémentaire (EC) de la matière particulaire (PM); (B) Evolution de la récession des calcaires des façades estimées à partir des FDR établies par Lipfert (1989) et Kucera et al. (2007) ; (C) Scénario de l'évolution de la température en milieu urbain ; (D) Scénario de l'évolution des précipitations (modifié d'après Brimblecombe et Lefèvre (2021)) ; (E) Scénario de l'évolution des concentrations en polluants atmosphériques ; (F) Scénario de l'altération chimique et de la colonisation biologique. des pierres calcaires établis dans cette étude.



### 4. Perspectives d'études :

Au vu des résultats précédemment résumés, dans un premier temps, cette étude pourrait être complétée :

→ Par l'identification des phases bioinduites :

Pour les simulations d'altération, des analyses plus poussées par diffraction à rayons X ou Raman pourraient permettre de confirmer si les phases de phosphate et d'oxalate de calcium prédites par le modèle de spéciation chimique Minteq ont réellement précipité. Un lien avec les champignons qui sécrètent l'acide oxalique pourrait alors être établi.

→ L'importance des algues :

Cette étude a démontré l'importance du rôle des algues dans la bio-détérioration des monuments. Il serait donc intéressant de mieux les identifier. Les Chlorophyta ont été retrouvées dans cette étude via le séquençage d'amplicons 16 S (préférentiellement utilisé pour l'analyse des bactéries). Or les Chlorophyta sont des Eucaryotes. Dans cette étude, le séquençage d'amplicon ITS n'a été utilisé que pour l'identification taxonomique des champignons (base de données UNITE\_Fungi\_8). De nombreuses OTU provenant de ce séquençage n'ont pas été affiliées. Actuellement une étude sur ces OTU, en utilisant la base de données UNITE\_Eukaryote\_9 est réalisée. Les premiers résultats confirment l'identification des espèces de Chlorophyta réalisée en 16 S pour les espèces majoritaires. L'affiliation taxonomique des OTU les moins nombreuses est en revanche meilleure en utilisant les amplicons ITS.

Pour poursuivre cette étude, il serait également intéressant d'étudier les points suivants :

→ Le rôle des autres polluants :

Cette étude s'est focalisée uniquement sur l'effet des pollutions azotées et soufrées sur les communautés microbiennes. Cependant, l'impact d'autres polluants, tels que les HAP, les COV, les particules fines ou encore les métaux lourds pourrait être étudié. Par exemple, les COV pourraient être déposés sur des coupons de calcaire en utilisant la chambre de simulation CIME. Puis une simulation similaire à celle réalisée dans cette étude pourrait être réalisée avec une pluie synthétique non enrichie en flacon de culture.

→ Le rôle d'autres communautés microbiennes

Cette étude a permis d'identifier les taxons bactériens, fongiques et algaires en utilisant les régions V3-V5 en 16 S et ITS1 en ITS. Pour avoir une vision encore plus réaliste de la composition des communautés microbiennes présentes à la surface des monuments historiques, il serait intéressant, d'utiliser une base de données spécifique aux Archées. De plus, comme expliqué précédemment, un séquençage en 18 S pour les Eucaryotes pourrait mettre en évidence d'autres espèces afin de compléter les communautés microbiennes.

→ Le rôle du métabolisme :

Pour confirmer la prédominance des métabolismes de l'azote sur celui du soufre, il serait intéressant de réaliser des analyses sur les gènes fonctionnels des microorganismes identifiés en utilisant ceux impliqués :

## Conclusion générale et perspectives

- dans l'oxydation du soufre : soxB.
- dans la réduction des sulfates : drsA.
- dans la dénitrification : narG, narH, narI, napA, napB, nirK, nirS, norB, norC et nosZ.
- dans la nitrification : amoA, hao.
- dans l'ammonisation : nifHDK, nifH, nifG.

→ L'effet des métabolismes sur la biodissolution :

Les **acides organiques** n'ont pas pu être dosés durant cette thèse suite à des problèmes techniques. Il serait intéressant de les détecter en priorité sur les éluions provenant des tombes du Père-Lachaise, puis sur les coupons de calcaires. Les différents acides organiques identifiés pourraient être ainsi corrélés avec les données sur les communautés microbiennes afin d'apporter plus de précision sur les métabolismes impliqués.

Dans cette optique, nous pourrions aussi conduire des tests de dissolution du calcaire en boîte de Petri en sélectionnant les genres ou espèces majoritaires des communautés microbiennes pour préciser leur rôle en particulier.

Enfin, ce travail de thèse s'est inscrit dans un projet ANR MIAM qui avait pour objectif de comprendre l'effet des communautés microbiennes sur l'altération du calcaire en milieu urbain puis de développer un produit biocide permettant de limiter l'impact de ses microorganismes. Ainsi, en parallèle de cette étude, différents polymères (éco-friendly) ont été développés puis testés en laboratoire et en conditions réelles. Le produit développé a montré des résultats probants en laboratoire, inhibant le développement de bactéries. Dans cette étude, les bactéries semblent avoir un faible impact sur la bio-détérioration. Cependant, les algues vertes et les champignons ont été identifiés comme jouant un rôle majeur dans la bio-détérioration des pierres. Les tests en conditions réels sont actuellement toujours en cours, et l'efficacité de ces polymères sur les algues et les champignons n'a pas encore été évaluée. Il serait donc très intéressant de se focaliser sur des produits biocides efficaces sur les algues vertes et les champignons.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- Adhikary, S.P., Keshari, N., Urzi, C., De Philippis, R., 2015. Cyanobacteria in biofilms on stone temples of Bhubaneswar, Eastern India. *algol\_stud* 147, 67–93. [https://doi.org/10.1127/algol\\_stud/2015/0190](https://doi.org/10.1127/algol_stud/2015/0190)
- Agrawal, S., Khumlianlal, J., Devi, S.I., 2023. Uncovering the Fungal Diversity and Biodeterioration Phenomenon on Archaeological Carvings of the Badami Cave Temples: A Microcosm Study. *Life* 14, 28. <https://doi.org/10.3390/life14010028>
- AIRPARIF, 2020. Bilan de la qualité de l'air Année 2019, surveillance et information en Ile de France. AIRPARIF.
- Alessa, O., Ogura, Y., Fujitani, Y., Takami, H., Hayashi, T., Sahin, N., Tani, A., 2021. Comprehensive Comparative Genomics and Phenotyping of Methylobacterium Species. *Front. Microbiol.* 12, 740610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.740610>
- Alotaibi, M.O., Sonbol, H.S., Alwakeel, S.S., Suliman, R.S., Fodah, R.A., Abu Jaffal, A.S., AlOthman, N.I., Mohammed, A.E., 2020. Microbial Diversity of Some Sabkha and Desert Sites in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27, 2778–2789. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.038>
- Aly, N., Gomez–Heras, M., Hamed, A., Álvarez De Buergo, M., Soliman, F., 2015. The influence of temperature in a capillary imbibition salt weathering simulation test on Mokattam limestone. *Mater. construcc.* 65, e044. <https://doi.org/10.3989/mc.2015.00514>
- An, S., Couteau, C., Luo, F., Neveu, J., DuBow, M.S., 2013. Bacterial Diversity of Surface Sand Samples from the Gobi and Taklamaken Deserts. *Microb Ecol* 66, 850–860. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0276-2>
- Anatolaki, Ch., Tsitouridou, R., 2009. Relationship between acidity and ionic composition of wet precipitation. *Atmospheric Research* 92, 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2008.09.008>
- Angeli, M., Hébert, R., Menéndez, B., David, C., Bigas, J.-P., 2010. Influence of temperature and salt concentration on the salt weathering of a sedimentary stone with sodium sulphate. *SP* 333, 35–42. <https://doi.org/10.1144/SP333.4>
- Ariño, X., Llop, E., Gomez-Bolea, A., Saiz-Jimenez, C., 2010. Effects of climatic change on microorganisms colonizing cultural heritage stone materials, in: *Climate Change and Cultural Heritage*. pp. 193–198.
- Ausset, P., Del Monte, M., Lefèvre, R.A., 1999. Embryonic sulphated black crusts on carbonate rocks in atmospheric simulation chamber and in the field: role of carbonaceous fly-ash. *Atmospheric Environment* 33, 1525–1534. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(98\)00399-9](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(98)00399-9)
- Austigard, M.S., Mattsson, J., 2019. Monitoring climate change related biodeterioration of protected historic buildings. *IJBPA* 38, 529–538. <https://doi.org/10.1108/IJBPA-11-2018-0094>
- Bahadur, A., Zhang, W., Sajjad, W., Nasir, F., Zhang, G., Liu, G., Chen, T., 2021. Bacterial diversity patterns of desert dunes in the northeastern Qinghai-Tibet Plateau, China. *Arch Microbiol* 203, 2809–2823. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02272-z>
- Bahadur, A., Zhang, Z., Sajjad, W., Nasir, F., Zia, M.A., Liu, G., Chen, T., Zhang, W., 2022. Bacterial community structure and functions in microhabitats associated with black stones in Black Gobi desert, China. *Ecological Indicators* 142, 109168. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109168>
- Balland-Bolou-Bi, C., Bolou-Bi, E.B., Alphonse, V., Giusti-Miller, S., Jusselme, M.D., Livet, A., Grimaldi, M., Bousserhine, N., 2019. Impact of microbial activity on the mobility of metallic elements (Fe, Al and Hg) in tropical soils. *Geoderma* 334, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.07.044>

## Références bibliographiques

- Balland-Bolou-Bi, C., Saheb, M., Alphonse, V., Livet, A., Reboah, P., Abbad-Andaloussi, S., Verney-Carron, A., 2023. Effect of Cultivable Bacteria and Fungi on the Limestone Weathering Used in Historical Buildings. *Diversity* 15, 587. <https://doi.org/10.3390/d15050587>
- Balland-Bolou-Bi, C., Saheb, M., Bousserhine, N., Abbad-Andaloussi, S., Alphonse, V., Nowak, S., Chabas, A., Desboeufs, K., Verney-Carron, A., 2016. Effect of microorganism activities in a polluted area on the alteration of limestone used in historical buildings. *Science and Art: A Future For Stone* 25.
- Bar, E., Rise, M., Vishkautsan, M., Arad, S. (Malis), 1995. Pigment and Structural Changes in *Chlorella zofingiensis* upon Light and Nitrogen Stress. *Journal of Plant Physiology* 146, 527–534. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82019-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82019-5)
- Barberousse, H., Lombardo, R.J., Tell, G., Couté, A., 2006. Factors involved in the colonisation of building façades by algae and cyanobacteria in France. *Biofouling* 22, 69–77. <https://doi.org/10.1080/08927010600564712>
- Beck, H.E., Zimmermann, N.E., McVicar, T.R., Vergopolan, N., Berg, A., Wood, E.F., 2018. Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Sci Data* 5, 180214. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214>
- Beloin, N.J., Haynie, F.H., 1975. Soiling of building materials. *Journal of the Air Pollution Control Association* 25, 399–403. <https://doi.org/10.1080/00022470.1975.10470099>
- Benoit, P., Blanc, A., Gély, J.-P., Guini-Skliar, A., Obert, D., Viré, M., 2000. La pierre de Paris. Méthode d'étude de la pierre à bâtir depuis son extraction jusqu'à sa mise en œuvre, in: *La Pierre Dans La Ville Antique et Médiévale. Actes Du Colloque d'Argentomagus, Supplément à La Revue Archéologique Du Centre de La France. Fédération pour l'édition de la Revue archéologique du Centre de la France.*
- Berdoulay, M., Salvado, J.C., 2009. Genetic characterization of microbial communities living at the surface of building stones. *Letters in Applied Microbiology* 49, 311–316. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02660.x>
- Bernardet, J.-F., Bowman, J.P., 2006. The Genus *Flavobacterium*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp. 481–531. [https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8\\_17](https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_17)
- Beysens, D., Mongruel, A., Acker, K., 2017. Urban dew and rain in Paris, France: Occurrence and physico-chemical characteristics. *Atmospheric Research* 189, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2017.01.013>
- Biswas, J., Sharma, K., Harris, K.K., Rajput, Y., 2013. Biodeterioration agents: Bacterial and fungal diversity dwelling in or on the pre-historic rock-paints of Kabra-pahad, India. *Iran J Microbiol* 5, 309–314.
- Blanc, A., Gely, J.-P., Vire, M., 2001. Le calcaire lutétien, ses carrières, son utilisation dans les monuments. *Muséum d'histoire naturelle, Paris* 38–46.
- Blanc, A., Gely, J.-P., Vire, M., 2000. Le calcaire lutetien, ses carrières, son utilisation dans les monuments, in: *Le Lutétien, La Pierre de Paris*. pp. 38–46.
- Blanc, A., Lorenz, C., 1994. Les matériaux de construction des thermes de Paris. *Lapidicina* 5, 1–10.
- Bonazza, A., Brimblecombe, P., Grossi, C.M., Sabbioni, C., 2007. Carbon in Black Crusts from the Tower of London. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4199–4204. <https://doi.org/10.1021/es062417w>
- Bonazza, A., Natali, C., Ghedini, N., Vaccaro, C., Sabbioni, C., 2015. Oxalate Patinas on Stone Monuments in the Venetian Lagoon: Characterization and Origin. *International Journal of Architectural Heritage* 9, 542–552. <https://doi.org/10.1080/15583058.2013.837546>
- Boniek, D., Damaceno, Q.S., De Abreu, C.S., De Castro Mendes, I., Dos Santos, A.F.B., De Resende Stoianoff, M.A., 2019. Filamentous fungi associated with Brazilian stone

## Références bibliographiques

- samples: structure of the fungal community, diversity indexes, and ecological analysis. *Mycol Progress* 18, 565–576. <https://doi.org/10.1007/s11557-019-01470-w>
- Brady, A.L., Goordial, J., Sun, H.J., Whyte, L.G., Slater, G.F., 2018. Variability in carbon uptake and (re)cycling in Antarctic cryptoendolithic microbial ecosystems demonstrated through radiocarbon analysis of organic biomarkers. *Geobiology* 16, 62–79. <https://doi.org/10.1111/gbi.12263>
- Brake, W.H.T., 1975. Air Pollution and Fuel Crises in Preindustrial London, 1250-1650. *Technology and Culture* 16, 337. <https://doi.org/10.2307/3103030>
- Bray, J.R., Curtis, J.T., 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27, 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Breitenbach, R., Silbernagl, D., Toepel, J., Sturm, H., Broughton, W.J., Sasaki, G.L., Gorbushina, A.A., 2018. Corrosive extracellular polysaccharides of the rock-inhabiting model fungus *Knufia petricola*. *Extremophiles* 22, 165–175. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0984-5>
- Brimblecombe, P., 2012. *The Big Smoke (Routledge Revivals)*, 0 ed. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780203813898>
- Brimblecombe, P., Grossi, C.M., 2009. Millennium-long damage to building materials in London. *Science of The Total Environment* 407, 1354–1361. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.09.037>
- Brimblecombe, P., Lefèvre, R.-A., 2021. Weathering of materials at Notre-Dame from changes in air pollution and climate in Paris, 1325–2090. *Journal of Cultural Heritage* 50, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.06.007>
- Camuffo, D., 2016. Weathering of Building Materials, in: Brimblecombe, P. (Ed.), *Urban Pollution and Change to Material and Building Surfaces*. pp. 19–59.
- Camuffo, D., 1991. Physical weathering of monuments. Presented at the Weathering and Air Pollution. First Course, Community of Mediterranean Universities, Mario Adda Editore, Bari, University School of Monument Conservation, pp. 51–66.
- Camuffo, D., 1986. Deterioration Processes of Historical Monuments, in: *Studies in Environmental Science*. Elsevier, pp. 189–221. [https://doi.org/10.1016/S0166-1116\(08\)70884-7](https://doi.org/10.1016/S0166-1116(08)70884-7)
- Camuffo, D., Bernardi, A., Zanetti, M., 1988. Analysis of the real-time measurement of the pH of rainfall at Padova, Italy: Seasonal variation and meteorological aspects. *Science of The Total Environment* 71, 187–200. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(88\)90166-0](https://doi.org/10.1016/0048-9697(88)90166-0)
- Camuffo, D., Del Monte, M., Ongaro, A., 1984. The pH of the atmospheric precipitation in Venice, related to both the dynamics of precipitation events and the weathering of monuments. *Science of The Total Environment* 40, 125–139. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(84\)90347-4](https://doi.org/10.1016/0048-9697(84)90347-4)
- Camuffo, D., Del Monte, M., Sabbioni, C., 1983. Origin and growth mechanisms of the sulfated crusts on urban limestone. *Water Air Soil Pollut* 19, 351–359. <https://doi.org/10.1007/BF00159596>
- Caneva, G., Ceschin, S., Salvadori, O., Kashiwadani, H., Moon, K.H., Futagami, Y., 2012. Biodeterioration of stone in relation to microclimate in the Ta Nei Temple - Angkor (Cambodgia). Presented at the 12th International Congress on the Deterioration and Conservation of Stone Columbia University, New York.
- Cardell, C., Delalieux, F., Roumpopoulos, K., Moropoulou, A., Auger, F., Van Grieken, R., 2003. Salt-induced decay in calcareous stone monuments and buildings in a marine environment in SW France. *Construction and Building Materials* 17, 165–179. [https://doi.org/10.1016/S0950-0618\(02\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0950-0618(02)00104-6)
- Caroll, D., 1962. Rainwater as a Chemical Agent of Geologic Processes - A Review | Resolution Copper Project and Land Exchange Environmental Impact Statement.
- Carr, N.G., Whitton, B.A., 1982. *The biology of cyanobacteria*, Univ of California Press. ed.
- Chabas, A., Fouqueau, A., Attoui, M., Alfaro, S.C., Petitmangin, A., Bouilloux, A., Saheb, M., Coman, A., Lombardo, T., Grand, N., Zapf, P., Berardo, R., Durantou, M., Durand-Jolibois,

## Références bibliographiques

- R., Jerome, M., Pangu, E., Correia, J.J., Guillot, I., Nowak, S., 2015. Characterisation of CIME, an experimental chamber for simulating interactions between materials of the cultural heritage and the environment. *Environ Sci Pollut Res* 22, 19170–19183. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5083-5>
- Chabas, A., Jeannette, D., 2001. Weathering of marbles and granites in marine environment: petrophysical properties and special role of atmospheric salts. *Environmental Geology* 40, 359–368. <https://doi.org/10.1007/s002540000157>
- Chabas, A., Kloppmann, W., Sizun, J.-P., Wille, G., Coman, A., Petitmangin, A., Nowak, S., Martin, E., Jurgens, M.-A., 2022. Sources and chronology of soluble salt formation in a medieval dovecote caught up in urbanisation: a resilience story? *Environ Earth Sci* 81, 550. <https://doi.org/10.1007/s12665-022-10665-6>
- Chao, A., Chazdon, R.L., Colwell, R.K., Shen, T.-J., 2006. Abundance-Based Similarity Indices and Their Estimation When There Are Unseen Species in Samples. *Biometrics* 62, 361–371. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2005.00489.x>
- Charola, A.E., Pühringer, J., Steiger, M., 2007. Gypsum: A review of its role in the deterioration of building materials. *Environmental Geology* 52, 207–220. <https://doi.org/10.1007/s00254-006-0566-9>
- Charola, A.E., Ware, R., 2002. Acid deposition and the deterioration of stone: a brief review of a broad topic. *SP 205*, 393–406. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2002.205.01.28>
- Chebbi, A., Carlier, P., 1996. Carboxylic acids in the troposphere, occurrence, sources, and sinks: A review. *Atmospheric Environment* 30, 4233–4249. [https://doi.org/10.1016/1352-2310\(96\)00102-1](https://doi.org/10.1016/1352-2310(96)00102-1)
- Checucci, A., Borruso, L., Petrocchi, D., Perito, B., 2022. Diversity and metabolic profile of the microbial communities inhabiting the darkened white marble of Florence Cathedral. *International Biodeterioration & Biodegradation* 171, 105420. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2022.105420>
- Chimienti, G., Piredda, R., Pepe, G., Van Der Werf, I.D., Sabbatini, L., Crecchio, C., Ricciuti, P., D’Erchia, A.M., Manzari, C., Pesole, G., 2016. Profile of microbial communities on carbonate stones of the medieval church of San Leonardo di Siponto (Italy) by Illumina-based deep sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 8537–8548. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7656-8>
- Choe, Y.-H., Kim, M., Woo, J., Lee, M.J., Lee, J.I., Lee, E.J., Lee, Y.K., 2018. Comparing Rock-inhabiting Microbial Communities in Different Rock Types from a High Arctic Polar Desert. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy070>
- Coelho, C., Mesquita, N., Costa, I., Soares, F., Trovão, J., Freitas, H., Portugal, A., Tiago, I., 2021. Bacterial and archaeal structural diversity in several biodeterioration patterns on the limestone walls of the old cathedral of Coimbra. *Microorganisms* 9, 709.
- Coleine, C., Selbmann, L., 2021. 2.1 Black fungi inhabiting rock surfaces, in: Büdel, B., Friedl, T. (Eds.), *Life at Rock Surfaces*. De Gruyter, pp. 57–86. <https://doi.org/10.1515/9783110646467-003>
- Coleine, C., Stajich, J.E., Zucconi, L., Onofri, S., Pombubpa, N., Egidi, E., Franks, A., Buzzini, P., Selbmann, L., 2018a. Antarctic Cryptoendolithic Fungal Communities Are Highly Adapted and Dominated by Lecanoromycetes and Dothideomycetes. *Front. Microbiol.* 9, 1392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01392>
- Coleine, C., Zucconi, L., Onofri, S., Pombubpa, N., Stajich, J., Selbmann, L., 2018b. Sun Exposure Shapes Functional Grouping of Fungi in Cryptoendolithic Antarctic Communities. *Life* 8, 19. <https://doi.org/10.3390/life8020019>
- Conley, C.A., Ishkhanova, G., McKay, C.P., Cullings, K., 2006. A Preliminary Survey of Non-Lichenized Fungi Cultured from the Hyperarid Atacama Desert of Chile. *Astrobiology* 6, 521–526. <https://doi.org/10.1089/ast.2006.6.521>

## Références bibliographiques

- Creighton, P.J., Lioy, P.J., Haynie, F.H., Lemmons, T.J., Miller, J.L., Gerhart, J., 1990. Soiling by atmospheric aerosols in an urban industrial area. *Journal of the Air and Waste Management Association* 40, 1285–1289. <https://doi.org/10.1080/10473289.1990.10466783>
- Cua, L.S., Stein, L.Y., 2014. Characterization of denitrifying activity by the alphaproteobacterium, *Sphingomonas wittichii* RW1. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00404>
- Cui, Y., Woo, S.-G., Lee, J., Sinha, S., Kang, M.-S., Jin, L., Kim, K.K., Park, J., Lee, M., Lee, S.-T., 2013. *Nocardioides daeguensis* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from activated sludge of an industrial wastewater treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 3727–3732. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.047043-0>
- Cutler, N.A., Oliver, A.E., Viles, H.A., Ahmad, S., Whiteley, A.S., 2013a. The characterisation of eukaryotic microbial communities on sandstone buildings in Belfast, UK, using TRFLP and 454 pyrosequencing. *International Biodeterioration & Biodegradation* 82, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.010>
- Cutler, N.A., Viles, H.A., Ahmad, S., McCabe, S., Smith, B.J., 2013b. Algal 'greening' and the conservation of stone heritage structures. *Science of The Total Environment* 442, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.050>
- Dakal, T.C., Cameotra, S.S., 2012. Microbially induced deterioration of architectural heritages: routes and mechanisms involved. *Environ Sci Eur* 24, 36. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-24-36>
- De La Rosa-García, S. del C., Ortega-Morales, B.O., Gaylarde, C., Beltran-Garcia, M., Quintana-Owen, P., Reyes-Estebanez, M., 2011. Influence of fungi in the weathering of limestone of Mayan monuments, in: *Revista Mexicana de Micología*. pp. 43–51.
- De Leo, F., Antonelli, F., Pietrini, A.M., Ricci, S., Urzì, C., 2019. Study of the euendolithic activity of blackmeristematic fungi isolated from a marble statue in the Quirinale Palace's Gardens in Rome, Italy. *Facies* 65, 18. <https://doi.org/10.1007/s10347-019-0564-5>
- De Leo, F., Marchetta, A., Urzì, C., 2022. Black Fungi on Stone-Built Heritage: Current Knowledge and Future Outlook. *Applied Sciences* 12, 3969. <https://doi.org/10.3390/app12083969>
- De Leo, F., Urzì, C., De Hoog, G.S., 1999. Two *Coniosporium* species from rock surfaces. *Studies in Mycology* 70–79.
- Decina, S.M., Templer, P.H., Hutyra, L.R., 2018. Atmospheric Inputs of Nitrogen, Carbon, and Phosphorus across an Urban Area: Unaccounted Fluxes and Canopy Influences. *Earth's Future* 6, 134–148. <https://doi.org/10.1002/2017EF000653>
- Del Monte, M., Sabbioni, C., Zappia, G., 1987. The origin of calcium oxalates on historical buildings, monuments and natural outcrops. *Science of The Total Environment* 67, 17–39. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(87\)90063-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(87)90063-5)
- Di Bonaventura, M.P., Del Gallo, M., Cacchio, P., Ercole, C., Lepidi, A., 1999. Microbial Formation of Oxalate Films on Monument Surfaces: Bioprotection or Biodeterioration? *Geomicrobiology Journal* 16, 55–64. <https://doi.org/10.1080/014904599270749>
- Diakumaku, E., 1996. Investigations on the role of black fungi and their pigments in the deterioration of monuments. Oldenburg, Germany.
- Dias, L., Pires, V., Sitzia, F., Lisci, C., Candeias, A., Caldeira, A.T., Mirão, J., 2023. Evaluating the biosusceptibility of natural stone as an supporting tool to prevent Cultural Heritage biodeterioration. *Eur. Phys. J. Plus* 138, 570. <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-023-04185-w>
- Ding, Y., Salvador, C.S.C., Caldeira, A.T., Angelini, E., Schiavon, N., 2021. Biodegradation and microbial contamination of limestone surfaces: an experimental study from Batalha Monastery, Portugal. *Corrosion and Materials Degradation* 2, 31–45.

## Références bibliographiques

- Dyda, M., Laudy, A., Decewicz, P., Romaniuk, K., Ciekowska, M., Szajewska, A., Solecka, D., Dziewit, L., Drewniak, L., Skłodowska, A., 2021. Diversity of Biodeteriorative Bacterial and Fungal Consortia in Winter and Summer on Historical Sandstone of the Northern Pergola, Museum of King John III's Palace at Wilanow, Poland. *Applied Sciences* 11, 620. <https://doi.org/10.3390/app11020620>
- ElBaghdady, K.Z., Tolba, S.T., Houssien, S.S., 2019. Biogenic deterioration of Egyptian limestone monuments: treatment and conservation. *Journal of Cultural Heritage* 38, 118–125.
- Essilmi, M., Loudiki, M., El Gharmali, A., 2019. STUDY OF THE LICHENS OF THE MOROCCAN ATLANTIC COAST SAFI-ESSAOUIRA: BIOINDICATION OF AIR QUALITY AND LIMITING FACTORS. *Appl. Ecol. Env. Res.* 17, 4305–4323. [https://doi.org/10.15666/aeer/1702\\_43054323](https://doi.org/10.15666/aeer/1702_43054323)
- Essoussi, I., Boujmil, R., Nouioui, I., Abbassi-Ghozzi, I., Hamza, A., Boudabous, A., Gtari, M., 2012. Genetic Diversity and Esterase-Profilng of Actinobacteria Isolated from Sahara Desert Stones and Monuments. *Geomicrobiology Journal* 29, 23–28. <https://doi.org/10.1080/01490451.2010.521367>
- Eyssautier-Chuine, S., Mouhoubi, K., Reffuveille, F., Bodnar, J.L., 2020. Thermographic imaging for early detection of biocolonization on buildings. *Building Research and Information* 48, 856–865. <https://doi.org/10.1080/09613218.2020.1730740>
- Eyssautier-Chuine, S., Vaillant-Gaveau, N., Charpentier, E., Reffuveille, F., 2021. Comparison of biofilm development on three building and restoration stones used in French monuments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 165, 105322. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105322>
- Fan, G., Zhang, J., Wang, Y., Huang, K., Wang, S., Yao, Y., Luo, J., 2022. Microbial community and nitrogen transformation pathway in bioretention system for stormwater treatment in response to formulated soil medium. *Process Safety and Environmental Protection* 161, 594–602. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.03.077>
- Favero-Longo, S.E., Viles, H.A., 2020. A review of the nature, role and control of lithobionts on stone cultural heritage: weighing-up and managing biodeterioration and bioprotection. *World J Microbiol Biotechnol* 36, 100. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02878-3>
- Fehér, K., Török, Á., 2022. Detecting short-term weathering of stone monuments by 3D laser scanning: lithology, wall orientation, material loss. *Journal of Cultural Heritage* 58, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2022.10.012>
- Fitzner, B., Heinrichs, K., 2001. Damage diagnosis on stone monuments – weathering forms, damage categories and damage indices.
- Fitzner, B., Heinrichs, K., La Bouchardiere, D., 2002. Limestone weathering of historical monuments in Cairo, Egypt. *SP* 205, 217–239. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2002.205.01.17>
- Frank-Kamenetskaya, O., Vlasov, D., Zelenskaya, M., Knauf, I., Timasheva, M., 2009. Decaying of the marble and limestone monuments in the urban environment. Case studies from Saint Petersburg, Russia. *Studia UBB, Geologia* 54, 17–22. <https://doi.org/10.5038/1937-8602.54.2.4>
- Friedmann, E.I., 1980. Endolithic microbial life in hot and cold deserts. *Origins Life Evol Biosphere* 10, 223–235. <https://doi.org/10.1007/BF00928400>
- Fries, N., Gunnerbeck, E., 1981. Nutritional characters in *Ramularia* species. *Mycopathologia* 74, 73–78. <https://doi.org/10.1007/BF01259461>
- Fronteau, G., Pascal, A., Barbin, V., 1999. CARACTERISATION SEDIMENTOLOGIQUE ET PETROPHYSIQUE DE PIERRES DE TAILLE CALCAIRES, DURABILITE EN ŒUVRE ET MODES D'ALTERATIONS, in: *Livre Des Résumés*. Presented at the 7<sup>ème</sup> Congrès Français de Sédimentologie, Publi. ASF, Paris, pp. 157–158.
- Fu, W., Song, G., Wang, Y., Wang, Q., Duan, P., Liu, C., Zhang, X., Rao, Z., 2022. Advances in Research Into and Applications of Heterotrophic Nitrifying and Aerobic Denitrifying



## Références bibliographiques

- Microorganisms. Front. Environ. Sci. 10, 887093. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.887093>
- Fucikova, K., 2011. Monograph of the Genus *Bracteacoccus* (Sphaeropleales, Chlorophyceae), with Systematic Clarification of Taxonomically Related Genera. University of Connecticut.
- Fuentes, E., Carballeira, R., Prieto, B., 2021. Role of Exposure on the Microbial Consortia on Historical Rural Granite Buildings. *Applied Sciences* 11, 3786. <https://doi.org/10.3390/app11093786>
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Vöosmarty, C.J., 2004. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>
- Gambino, M., Lepri, G., Štovíček, A., Ghazayarn, L., Villa, F., Gillor, O., Cappitelli, F., 2021. The tombstones at the Monumental Cemetery of Milano select for a specialized microbial community. *International Biodeterioration & Biodegradation* 164, 105298. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105298>
- Gardner, C.M., Gerhard, W.A., Redfern, L.K., Gunsch, C.K., 2022. Evaluation of developing maize microbiomes and associations among nitrogen cyclers and key fungal taxa. *Microbiology* 168. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001155>
- Garnaud, S., Mouchel, J.-M., Chebbo, G., Thévenot, D.R., 1999. Heavy metal concentrations in dry and wet atmospheric deposits in Paris district: comparison with urban runoff. *Science of The Total Environment* 235, 235–245. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00199-0)
- Gaylarde, C., 2020. Influence of Environment on Microbial Colonization of Historic Stone Buildings with Emphasis on Cyanobacteria. *Heritage* 3, 1469–1482. <https://doi.org/10.3390/heritage3040081>
- Gaylarde, C., Baptista-Neto, J.A., Ogawa, A., Kowalski, M., Celikkol-Aydin, S., Beech, I., 2017. Epilithic and endolithic microorganisms and deterioration on stone church facades subject to urban pollution in a sub-tropical climate. *Biofouling* 33, 113–127. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1269893>
- 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 & Biodegradation* 55, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.10.001>
- Gaylarde, C.C., Rodríguez, C.H., Navarro-Noya, Y.E., Ortega-Morales, B.O., 2012. Microbial Biofilms on the Sandstone Monuments of the Angkor Wat Complex, Cambodia. *Curr Microbiol* 64, 85–92. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0034-y>
- Genderjahn, S., Lewin, S., Horn, F., Schleicher, A.M., Mangelsdorf, K., Wagner, D., 2021. Living Lithic and Sublithic Bacterial Communities in Namibian Drylands. *Microorganisms* 9, 235. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020235>
- Gibeaux, S., Thomachot-Schneider, C., Eyssautier-Chuine, S., Marin, B., Vazquez, P., 2018. Simulation of acid weathering on natural and artificial building stones according to the current atmospheric SO<sub>2</sub>/NO<sub>x</sub> rate. *Environ Earth Sci* 77, 327. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7467-6>
- Gomez-Heras, M., Fort, R., 2007. Patterns of halite (NaCl) crystallisation in building stone conditioned by laboratory heating regimes. *Environ Geol* 52, 259–267. <https://doi.org/10.1007/s00254-006-0538-0>
- Gorbushina, A.A., Krumbein, W.E., Hamman, C.H., Panina, L., Soukharjevski, S., Wollenzien, U., 1993. Role of black fungi in color change and biodeterioration of antique marbles. *Geomicrobiology Journal* 11, 205–221. <https://doi.org/10.1080/01490459309377952>
- Gottschalk, G., 1986. Regulation of Bacterial Metabolism, in: *Bacterial Metabolism*, Springer Series in Microbiology. Springer New York, New York, NY, pp. 178–207. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1072-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1072-6_7)

## Références bibliographiques

- Grbić Ljaljević, M., Subakov-Simić, G., Krizmanić, J., Ladić, V., 2009. Cyanobacterial, algal and fungal biofilm on sandstone substrata of Eiffel's Lock in Becej (Serbia). *Botanica Serbica*, vol 3, Issue 1 101–105.
- Grbić, M.L., Simić, G.S., Stupar, M., Jelikić, A., Sabovljević, M., Đorđević, M., Vukojević, J., 2017. Biodiversity's hidden treasure: biodeteriorated archaeological tombstones of Serbia. *Current Science* 112, 304–310.
- Green, P.N., 2015. *Methylobacterium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 1–8. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00830>
- Green, V.S., Stott, D.E., Diack, M., 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.020>
- Grossi, C.M., Esbert, R.M., Díaz-Pache, F., Alonso, F.J., 2003. Soiling of building stones in urban environments. *Building and Environment* 38, 147–159. [https://doi.org/10.1016/S0360-1323\(02\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0360-1323(02)00017-3)
- Guillitte, O., 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Science of The Total Environment* 167, 215–220. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04582-L](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04582-L)
- Hawkes, C.V., Kivlin, S.N., Rocca, J.D., Huguet, V., Thomsen, M.A., Suttle, K.B., 2011. Fungal community responses to precipitation: FUNGAL CLIMATE RESPONSE. *Global Change Biology* 17, 1637–1645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02327.x>
- Hodgetts, N., Lockhart, N., 2020. Checklist and country status of European bryophytes – update 2020. . National Parks and Wildlife Service, Department of Culture, Heritage and the Gaeltacht, Ireland, Irish Wildlife Manuals.
- Hoog, G.S. de, Figueras, M.J. (Eds.), 1996. Atlas of clinical fungi, 2. print. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures [u.a.], Baarn.
- Huang, Z., Wei, Z., Xiao, X., Tang, M., Li, B., Zhang, X., 2019. Nitrification/denitrification shaped the mercury-oxidizing microbial community for simultaneous Hg<sup>0</sup> and NO removal. *Bioresource Technology* 274, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.069>
- Hutchinson, A.J., Johnson, J.B., Thompson, G.E., Wood, G.C., Sage, P.W., Cooke, M.J., 1993. Stone degradation due to wet deposition of pollutants. *Corrosion Science* 34, 1881–1898. [https://doi.org/10.1016/0010-938X\(93\)90025-C](https://doi.org/10.1016/0010-938X(93)90025-C)
- Inkpen, R.J., Viles, H.A., Moses, C., Baily, B., Collier, P., Trudgill, S.T., Cooke, R.U., 2012. Thirty years of erosion and declining atmospheric pollution at St Paul's Cathedral, London. *Atmospheric Environment* 62, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.08.055>
- Isola, D., Bartoli, F., Meloni, P., Caneva, G., Zucconi, L., 2022. Black Fungi and Stone Heritage Conservation: Ecological and Metabolic Assays for Evaluating Colonization Potential and Responses to Traditional Biocides. *Applied Sciences* 12, 2038. <https://doi.org/10.3390/app12042038>
- Isola, D., Zucconi, L., Onofri, S., Caneva, G., De Hoog, G.S., Selbmann, L., 2016. Extremotolerant rock inhabiting black fungi from Italian monumental sites. *Fungal Diversity* 76, 75–96. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0342-9>
- Iwai, K., Aisaka, K., Suzuki, M., 2010. *Friedmanniella luteola* sp. nov., *Friedmanniella lucida* sp. nov., *Friedmanniella okinawensis* sp. nov. and *Friedmanniella sagamiharensis* sp. nov., isolated from spiders. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 113–120. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.007815-0>
- Jaccard, P., 1901. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura., in: *Bull Soc Vaudoise Sci Nat*. pp. 547–579.
- Jang, J., Anderson, E.L., Venterea, R.T., Sadowsky, M.J., Rosen, C.J., Feyereisen, G.W., Ishii, S., 2019. Denitrifying Bacteria Active in Woodchip Bioreactors at Low-Temperature Conditions. *Front. Microbiol.* 10, 635. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00635>

## Références bibliographiques

- Jang, K., Viles, H., 2022. Moisture Interactions Between Mosses and Their Underlying Stone Substrates. *Studies in Conservation* 67, 532–544. <https://doi.org/10.1080/00393630.2021.1892430>
- Jarvis, B., Wilrich, C., Wilrich, P.T., 2010. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1660–1667. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x>
- Jeannette, D., 1992a. Morphologie et nomenclature des altérations, in: *La Conservation de La Pierre Monumentale En France*, Les Presses Du CNRS. pp. 51–72.
- Jeannette, D., 1992b. L'altération des monuments, in: *Territoire et Monuments de France*. Editions du BRGM, pp. 355–364.
- Kauffman, J., 1952. Corrosion et protection des pierres calcaires des monuments. *Corrosion-Anti-corrosion* 87–88.
- Keene, W.C., Pszenny, A.A.P., Galloway, J.N., Hawley, M.E., 1986. Sea-salt corrections and interpretation of constituent ratios in marine precipitation. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 91, 6647–6658. <https://doi.org/10.1029/JD091ID06P06647>
- Keresztesi, Á., Birsan, M.V., Nita, I.A., Bodor, Z., Szép, R., 2019. Assessing the neutralisation, wet deposition and source contributions of the precipitation chemistry over Europe during 2000–2017. *Environmental Sciences Europe* 31, 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12302-019-0234-9/TABLES/2>
- Keshari, N., Adhikary, S.P., 2013. Characterization of cyanobacteria isolated from biofilms on stone monuments at Santiniketan, India. *Biofouling* 29, 525–536. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.794224>
- Khomutovska, N., Jerzak, M., Kostrzewska-Szlakowska, I., Kwiatowski, J., Suska-Malawska, M., Syczewski, M., Jasser, I., 2017. Life in Extreme Habitats: Diversity of Endolithic Microorganisms from Cold Desert Ecosystems of Eastern Pamir. *Polish Journal of Ecology* 65, 303–319. <https://doi.org/10.3161/15052249PJE2017.65.4.001>
- Kloppmann, W., Rolland, O., Proust, E., Montech, A.T., 2014. Soluble salt sources in medieval porous limestone sculptures: A multi-isotope (N, O, S) approach. *Science of The Total Environment* 470–471, 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.087>
- Kotowski, T., Motyka, J., Knap, W., Bielewski, J., 2020. 17-Year study on the chemical composition of rain, snow and sleet in very dusty air (Krakow, Poland). *Journal of Hydrology* 582, 124543. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.124543>
- Kramar, S., Urosevic, M., Pristacz, H., Mirtič, B., 2010. Assessment of limestone deterioration due to salt formation by micro-Raman spectroscopy: application to architectural heritage. *J Raman Spectroscopy* 41, 1441–1448. <https://doi.org/10.1002/jrs.2700>
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A., Nash, T.H., 2008. Desiccation-Tolerance in Lichens: A Review. *The Bryologist* 111, 576–593. <https://doi.org/10.1639/0007-2745-111.4.576>
- Kucera, V., Tidblad, J., Kreislova, K., Knotkova, D., Faller, M., Reiss, D., Snethlage, R., Yates, T., Henriksen, J., Schreiner, M., Melcher, M., Ferm, M., Lefèvre, R.-A., Kobus, J., 2007. UN/ECE ICP Materials Dose-response Functions for the Multi-pollutant Situation. *Water Air Soil Pollut: Focus* 7, 249–258. <https://doi.org/10.1007/s11267-006-9080-z>
- Kumar, R., Rani, A., Singh, S.P., Maharaj, K., Srivastava, S.S., 2002. A long term study on chemical composition of rainwater at Dayalbagh, a suburban site of semiarid region. *Journal of Atmospheric Chemistry* 41, 265–279. <https://doi.org/10.1023/A:1014955715633/METRICS>
- Lacap-Bugler, D.C., Lee, K.K., Archer, S., Gillman, L.N., Lau, M.C.Y., Leuzinger, S., Lee, C.K., Maki, T., McKay, C.P., Perrott, J.K., De Los Rios-Murillo, A., Warren-Rhodes, K.A., Hopkins, D.W., Pointing, S.B., 2017. Global Diversity of Desert Hypolithic Cyanobacteria. *Front. Microbiol.* 8, 867. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00867>

## Références bibliographiques

- Les monuments historiques et la pierre, 2012. , Duo. Direction régionale des affaires culturelles, DRAC, du Languedoc-Roussillon, Conservation régionale des monuments historiques, CRMH, Montpellier.
- Li, Q., Zhang, B., He, Z., Yang, X., 2016. Distribution and Diversity of Bacteria and Fungi Colonization in Stone Monuments Analyzed by High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 11, e0163287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163287>
- Li, Q., Zhang, B., Yang, X., Ge, Q., 2018. Deterioration-Associated Microbiome of Stone Monuments: Structure, Variation, and Assembly. *Appl Environ Microbiol* 84, e02680-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02680-17>
- Lipfert, F.W., 1989. Atmospheric damage to calcareous stones: Comparison and reconciliation of recent experimental findings. *Atmospheric Environment* (1967) 23, 415–429. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(89\)90587-8](https://doi.org/10.1016/0004-6981(89)90587-8)
- Liu, X., Meng, H., Wang, Y., Katayama, Y., Gu, J.-D., 2018. Water is a critical factor in evaluating and assessing microbial colonization and destruction of Angkor sandstone monuments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 133, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.05.011>
- Liu, X., Zarfel, G., Van Der Weijden, R., Loiskandl, W., Bitschnau, B., Dinkla, I.J.T., Fuchs, E.C., Paulitsch-Fuchs, A.H., 2021. Density-dependent microbial calcium carbonate precipitation by drinking water bacteria via amino acid metabolism and biosorption. *Water Research* 202, 117444. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117444>
- Lopez-Arce, P., Doehne, E., Martin, W., Pinchin, S., 2008. Sales de sulfato magnésico y materiales de edificios históricos: simulación experimental de laminaciones en calizas mediante ciclos de humedad relativa y cristalización de sales. *Mater. construcc.* 58, 125–142. <https://doi.org/10.3989/mc.2008.v58.i289-290.77>
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 71, 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Macedo, M.F., Miller, A.Z., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C., 2009. Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology* 155, 3476–3490. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032508-0>
- Magdy Abdullah, A., Adam, M., Marey Mahmoud, H., 2023. A Comparative Analytical Study of Some Deterioration Products Formed on the Sandstone Reliefs of Edfu and Kom Ombo Temples. *Advanced Research in Conservation Science* 4, 1–17. <https://doi.org/10.21608/arcs.2023.162922.1029>
- Makhalanyane, T.P., Valverde, A., Lacap, D.C., Pointing, S.B., Tuffin, M.I., Cowan, D.A., 2013. Evidence of species recruitment and development of hot desert hypolithic communities. *Environ Microbiol Rep* 5, 219–224. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12003>
- Mansch, R., Bock, E., 1998. Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation* 9, 47–64. <https://doi.org/10.1023/A:1008381525192>
- Mansch, R., Bock, E., 1996. Simulation of microbial attack on natural and artificial stone. *Microbiologically influenced corrosion of materials* 167–186.
- Marszałek, M., Dudek, K., Gaweł, A., Czerny, J., 2019. Mineralogical and geochemical studies of secondary mineral assemblages related to deterioration of building materials. *GQ* 63. <https://doi.org/10.7306/gq.1494>
- Martinet, G., Quénée, B., 2008. Pierres de construction - Natures et mécanismes d'altération. *Corrosion Vieillissement*. <https://doi.org/10.51257/a-v1-cor402>
- Massey, S.W., 1999. The effects of ozone and NO<sub>x</sub> on the deterioration of calcareous stone. *Science of The Total Environment* 227, 109–121. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00409-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00409-4)
- May, E., Papida, S., Abdulla, H., Tayler, S., Dewedar, A., 2000. Comparative Studies of Microbial Communities on Stone Monuments in Temperate and Semi-Arid Climates, in: Ciferri, O.,

## Références bibliographiques

- Tiano, P., Mastromei, G. (Eds.), *Of Microbes and Art*. Springer US, Boston, MA, pp. 49–62. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4239-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4239-1_4)
- McCabe, S., Smith, B., Adamson, C., Mullan, D., McAllister, D., 2011. The ‘Greening’ of Natural Stone Buildings: Quartz Sandstone Performance as a Secondary Indicator of Climate Change in the British Isles? *ACS* 01, 165–171. <https://doi.org/10.4236/acs.2011.14018>
- McIlroy De La Rosa, J.P., Warke, P.A., Smith, B.J., 2012. Microscale biopitting by the endolithic lichen *Verrucaria baldensis* and its proposed role in mesoscale solution basin development on limestone. *Earth Surf Processes Landf* 37, 374–384. <https://doi.org/10.1002/esp.2244>
- McNamara, C.J., Perry IV, T.D., Bearce, K.A., Hernandez-Duque, G., Mitchell, R., 2006. Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Microbial Ecology* 51, 51–64. <https://doi.org/10.1007/s00248-005-0200-5>
- Mihajlovski, A., Gabarre, A., Seyer, D., Bousta, F., Di Martino, P., 2017. Bacterial diversity on rock surface of the ruined part of a French historic monument: The Chaalis abbey. *International Biodeterioration & Biodegradation* 120, 161–169.
- Mihajlovski, A., Lepinay, C., Mirval, A.-L., Touron, S., Bousta, F., Di Martino, P., 2019. Characterization of the archaeal and fungal diversity associated with gypsum efflorescences on the walls of the decorated Sorcerer’s prehistoric cave. *Ann Microbiol* 69, 1071–1078. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01506-2>
- Miller, A.Z., Dionísio, A., Laiz, L., MacEdo, M.F., Saiz-Jimenez, C., 2009. The influence of inherent properties of building limestones on their bioreceptivity to phototrophic microorganisms. *Annals of Microbiology* 59, 705–713. <https://doi.org/10.1007/BF03179212>
- Miller, A.Z., Dionísio, A., Macedo, M.F., Sáiz-Jiménez, C., 2017. Primary bioreceptivity of limestones to phototrophic microorganisms: A laboratory-based stone colonization experiment. *Technoheritage* 2017 97.
- Miller, A.Z., Laiz, L., Gonzalez, J.M., Dionísio, A., Macedo, M.F., Saiz-Jimenez, C., 2008. Reproducing stone monument photosynthetic-based colonization under laboratory conditions. *Science of The Total Environment* 405, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.066>
- Miller, A.Z., Sanmartín, P., Pereira-Pardo, L., Dionísio, A., Sáiz-Jiménez, C., Macedo, M.F., Prieto, B., 2012. Bioreceptivity of building stones: A review. *Science of the total environment* 426, 1–12.
- Mitchell, R., Gu, J.-D., 2000. Changes in the biofilm microflora of limestone caused by atmospheric pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 299–303. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00105-0)
- Mizutani, E., Ogura, D., Ishizaki, T., Abuku, M., Sasaki, J., 2015. Influence of the infiltrated rainwater on the degradation of the inner wall in Hagia Sophia, Istanbul. *Energy Procedia* 78, 1353–1358. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.11.153>
- Moreau, C., 2008. Vieillissement naturel en milieu urbain de pierres calcaires hydrofugées: évaluation de la durabilité des traitements et de leur impact sur le nettoyage. Université de Reims, Champagne Ardenne.
- Moroni, B., Pitzurra, L., 2008. Biodegradation of atmospheric pollutants by fungi: a crucial point in the corrosion of carbonate building stone. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 391–396.
- Moroni, B., Pitzurra, L., Poli, G., 2004. Microbial growth and air pollutants in the corrosion of carbonate building stone: results of laboratory and outdoor experimental tests. *Env Geol* 46. <https://doi.org/10.1007/s00254-004-1045-9>
- Nagachandrabose, S., 2020. Management of Potato Cyst Nematodes Using Liquid Bioformulations of *Pseudomonas fluorescens*, *Purpureocillium lilacinum* and *Trichoderma viride*. *Potato Res.* 63, 479–496. <https://doi.org/10.1007/s11540-020-09452-2>
- Negi, A., Sarethy, I.P., 2019. Microbial Biodeterioration of Cultural Heritage: Events, Colonization, and Analyses. *Microb Ecol* 78, 1014–1029. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01366-y>

## Références bibliographiques

- Nir, I., Barak, H., Kramarsky-Winter, E., Kushmaro, A., 2019. Seasonal diversity of the bacterial communities associated with petroglyphs sites from the Negev Desert, Israel. *Ann Microbiol* 69, 1079–1086. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01509-z>
- Niu, Y., Li, X., Huang, Z., Zhu, C., 2017. Chemical characteristics and possible causes of acid rain at a regional atmospheric background site in eastern China. *Air Quality, Atmosphere and Health* 10, 971–980. <https://doi.org/10.1007/s11869-017-0486-8>
- Nonthijun, P., Mills, Natasha, Mills, Nantana, Yongsawas, R., Sansupa, C., Suwannarach, N., Jaikang, C., Motanated, K., Chayapakdee, P., Jongjitngam, S., Noirungsee, N., Disayathanoowat, T., 2023. Seasonal Variations in Fungal Communities on the Surfaces of Lan Na Sandstone Sculptures and Their Biodeterioration Capacities. *JoF* 9, 833. <https://doi.org/10.3390/jof9080833>
- Nováková, R., Neustupa, J., 2015. Microalgal biofilms on common yew needles in relation to anthropogenic air pollution in urban Prague, Czech Republic. *Science of The Total Environment* 508, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.031>
- Nuhoglu, Y., Oguz, E., Uslu, H., Ozbek, A., Ipekoglu, B., Ocak, I., Hasenekoglu, İ., 2006. The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey. *Science of The Total Environment* 364, 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.06.034>
- Ortega-Calvo, J.J., Hernandez-Marine, M., Sáiz-Jiménez, C., 1991. Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *International biodeterioration* 28, 165–185.
- Ortega-Morales, B.O., Gaylarde, C., Anaya-Hernandez, A., Chan-Bacab, M.J., De La Rosa-García, S.C., Arano-Recio, D., Montero-M, J., 2013. Orientation affects Trentepohlia-dominated biofilms on Mayan monuments of the Rio Bec style. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.014>
- Ortega-Morales, B.O., Narváez-Zapata, J., Reyes-Estebanez, M., Quintana, P., De La Rosa-García, S.D.C., Bullen, H., Gómez-Cornelio, S., Chan-Bacab, M.J., 2016. Bioweathering Potential of Cultivable Fungi Associated with Semi-Arid Surface Microhabitats of Mayan Buildings. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00201>
- Ortega-Morales, B.O., Narváez-Zapata, J.A., Schmalenberger, A., Sosa-López, A., Tebbe, C.C., 2004. Biofilms fouling ancient limestone Mayan monuments in Uxmal, Mexico: a cultivation-independent analysis. *Biofilms* 1, 79–90. <https://doi.org/10.1017/S1479050504001188>
- Ortega-Morales, O., Montero-Muñoz, J.L., Baptista Neto, J.A., Beech, I.B., Sunner, J., Gaylarde, C., 2019. Deterioration and microbial colonization of cultural heritage stone buildings in polluted and unpolluted tropical and subtropical climates: A meta-analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation* 143, 104734. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104734>
- Outram, Q., Fishman, N., 2006. Le roi Charbon et ses sujets turbulents : les industries et sociétés charbonnières en Grande-Bretagne aux XVIIIe et XIXe siècles, in: Daumalin, X., Daviet, S., Mioche, P. (Eds.), *Territoires européens du charbon*. Presses universitaires de Provence, pp. 15–35. <https://doi.org/10.4000/books.pup.6255>
- Owczarek-Kościelniak, M., 2020. Extremus adstrictus from a dolomite wall in Poland: the first report outside Mallorca. *Plant and Fungal Systematics* 65, 624–630. <https://doi.org/10.35535/pfsyst-2020-0034>
- Owczarek-Kościelniak, M., Krzewicka, B., Piątek, J., Kołodziejczyk, Ł.M., Kapusta, P., 2020. Is there a link between the biological colonization of the gravestone and its deterioration? *International Biodeterioration & Biodegradation* 148, 104879. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104879>

## Références bibliographiques

- Owczarek-Kościelniak, M., Sterflinger, K., 2018. First records of *Knufia marmoricola* from limestone outcrops in the Wyżyna Krakowsko-Częstochowska Upland, Poland. *Phytotaxa* 357, 94. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.357.2.2>
- Paiva, D.S., Fernandes, L., Trovão, J., Mesquita, N., Tiago, I., Portugal, A., 2022. Uncovering the Fungal Diversity Colonizing Limestone Walls of a Forgotten Monument in the Central Region of Portugal by High-Throughput Sequencing and Culture-Based Methods. *Applied Sciences* 12, 10650. <https://doi.org/10.3390/app122010650>
- Pinheiro, A.C., Mesquita, N., Trovão, J., Soares, F., Tiago, I., Coelho, C., de Carvalho, H.P., Gil, F., Catarino, L., Piñar, G., 2019. Limestone biodeterioration: A review on the Portuguese cultural heritage scenario. *Journal of cultural heritage* 36, 275–285.
- Pio, C.A., Lopes, D.A., 1998. Chlorine loss from marine aerosol in a coastal atmosphere. *Journal of Geophysical Research Atmospheres* 103, 25263–25272. <https://doi.org/10.1029/98JD02088>
- Pitzurra, L., Moroni, B., Nocentini, A., Sbaraglia, G., Poli, G., Bistoni, F., 2003. Microbial growth and air pollution in carbonate rock weathering. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52, 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00175-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00175-0)
- Pląskowska, E., Patejuk, K., Lorenc, M.W., Grzeszczuk, J., 2023. Lichens and Fungi on Sandstone Tombs at the Historical Jewish Cemetery in Wrocław (Poland). *Studies in Conservation* 1–9. <https://doi.org/10.1080/00393630.2023.2174396>
- Ponizovskaya, V.B., Rebrikova, N.L., Kachalkin, A.V., Antropova, A.B., Bilanenko, E.N., Mokeeva, V.L., 2019. Micromycetes as colonizers of mineral building materials in historic monuments and museums. *Fungal Biology* 123, 290–306. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.01.002>
- Popović, S., Stupar, M., Unković, N., Subakov Simić, G., Ljaljević Grbić, M., 2018. Diversity of Terrestrial Cyanobacteria Colonizing Selected Stone Monuments in Serbia. *Studies in Conservation* 63, 292–302. <https://doi.org/10.1080/00393630.2018.1438127>
- Proctor, M.C.F., 1990. The physiological basis of bryophyte production. *Botanical Journal of the Linnean Society* 104, 61–77. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1990.tb02211.x>
- Reboah, P., Bolou-Bi, C.B., Nowak, S., Verney-Carron, A., 2023. Influence of climatic factors on cyanobacteria and green algae development on building surface. *PLoS ONE* 18, e0282140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140>
- Reese Næsborg, R., Ekman, S., Tibell, L., 2007. Molecular phylogeny of the genus *Lecania* (Ramalinaceae, lichenized Ascomycota). *Mycological Research* 111, 581–591. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.001>
- Rodriguez-Sanchez, A., Muñoz-Palazon, B., Hurtado-Martinez, M., Mikola, A., Gonzalez-Lopez, J., Vahala, R., Gonzalez-Martinez, A., 2020. Analysis of microbial communities involved in organic matter and nitrogen removal in a full-scale moving bed biofilm reactor located near the Polar Arctic Circle. *International Biodeterioration & Biodegradation* 146, 104830. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104830>
- Rohwerder, T., Sand, W., 2003. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology* 149, 1699–1710. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26212-0>
- Rosado, T., Dias, L., Lança, M., Nogueira, C., Santos, R., Martins, M.R., Candeias, A., Mirão, J., Caldeira, A.T., 2020. Assessment of microbiota present on a Portuguese historical stone convent using high-throughput sequencing approaches. *MicrobiologyOpen* 9, 1067–1084. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1030>
- Rozenbaum, O., Barbanson, L., Muller, F., Bruand, A., 2008. Significance of a combined approach for replacement stones in the heritage buildings' conservation frame. *Comptes Rendus - Geoscience* 340, 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.crite.2008.04.005>
- Rudnick, R.L., Gao, S., 2014. Composition of the Continental Crust, in: Holland, H.D., Turekian, K.K. (Eds.), *Treatise on Geochemistry*. pp. 1–64.

## Références bibliographiques

- Saheb, M., Chabas, A., Mertz, J.-D., Colas, E., Rozenbaum, O., Sizun, J.-P., Nowak, S., Gentaz, L., Verney-Carron, A., 2016. Weathering of limestone after several decades in an urban environment. *Corrosion Science* 111, 742–752. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2016.06.015>
- Saiz-Jimenez, C., 1999. Biogeochemistry of Weathering Processes in Monuments. *Geomicrobiology Journal* 16, 27–37. <https://doi.org/10.1080/014904599270721>
- Saiz-Jimenez, C., 1984. Weathering and colonization of limestones in an urban environment. *Soil Biology and Conservation of the Biosphere 2*, *Soil Biology and Conservation of the Biosphere 2* 757–767.
- Salvadori, O., Municchia, A.C., 2016. The Role of Fungi and Lichens in the Biodeterioration of Stone Monuments. *Open Conf. Proceed. J.* 7, 39–54. <https://doi.org/10.2174/2210289201607020039>
- Salve, P.R., Maurya, A., Wate, S.R., Devotta, S., 2008. Chemical composition of major ions in rainwater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80, 242–246. <https://doi.org/10.1007/S00128-007-9353-X/TABLES/5>
- Sand, W., 1997. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates—A general mechanistic overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* 40, 183–190. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(97\)00048-6](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00048-6)
- Sand, W., Bock, E., 1991. Biodeterioration of mineral materials by microorganisms—biogenic sulfuric and nitric acid corrosion of concrete and natural stone. *Geomicrobiology Journal* 9, 129–138. <https://doi.org/10.1080/01490459109385994>
- Sazanova, K.V., Zelenskaya, M.S., Manurtdinova, V.V., Izatulina, A.R., Rusakov, A.V., Vlasov, D.Yu., Frank-Kamenetskaya, O.V., 2020. Accumulation of Elements in Biodeposits on the Stone Surface in Urban Environment. Case Studies from Saint Petersburg, Russia. *Microorganisms* 9, 36. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010036>
- Sazanova, K.V., Zelenskaya, M.S., Vlasov, A.D., Bobir, S.Yu., Yakkonen, K.L., Vlasov, D.Yu., 2022. Microorganisms in Superficial Deposits on the Stone Monuments in Saint Petersburg. *Microorganisms* 10, 316. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020316>
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O., Gaylarde, C., 2009. Chapter 5 Microbial Deterioration of Stone Monuments—An Updated Overview, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 97–139. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00805-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00805-8)
- Schiavon, N., 2002. Biodeterioration of calcareous and granitic building stones in urban environments. *SP 205*, 195–205. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2002.205.01.15>
- Schröer, L., De Kock, T., Cnudde, V., Boon, N., 2020. Differential colonization of microbial communities inhabiting Lede stone in the urban and rural environment. *Science of The Total Environment* 733, 139339. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139339>
- Seifert, K.A., Nickerson, N.L., Corlett, M., Jackson, E.D., Louis-Seize, G., Davies, R.J., 2004. *Devriesia*, a new hyphomycete genus to accommodate heat-resistant, cladosporium-like fungi. *Can. J. Bot.* 82, 914–926. <https://doi.org/10.1139/b04-070>
- Seinfeld, J.H., Pandis, S.N., 2016. *Atmospheric Chemistry and physics: From Air Pollution to climate Change*, 3rd Edition.
- Selbmann, L., Onofri, S., Coleine, C., Buzzini, P., Canini, F., Zucconi, L., 2017. Effect of environmental parameters on biodiversity of the fungal component in lithic Antarctic communities. *Extremophiles* 21, 1069–1080. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0967-6>
- Shannon, C.E., 1948. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal* 27, 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Sheir, D., Amer, O., Elkhateeb, W., Daba, G., 2020. Elucidation of myco-deterioration affecting calcareous construction materials of the Egyptian architectural heritage. *Boreal Environnement Reseach* 25, 27–56.
- Shi, S., Lin, Z., Zhou, Jiong, Fan, X., Huang, Y., Zhou, Jian, 2022. Enhanced thermophilic denitrification performance and potential microbial mechanism in denitrifying granular



## Références bibliographiques

- sludge system. *Bioresource Technology* 344, 126190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126190>
- Silva, N.C., Madureira, A.R., Pintado, M., Moreira, P.R., 2022. Biocontamination and diversity of epilithic bacteria and fungi colonising outdoor stone and mortar sculptures. *Appl Microbiol Biotechnol* 106, 3811–3828. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11957-4>
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of Diversity. *Nature* 163, 688–688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Smith, B.J., McCabe, S., McAllister, D., Adamson, C., Viles, H.A., Curran, J.M., 2011. A commentary on climate change, stone decay dynamics and the 'greening' of natural stone buildings: new perspectives on 'deep wetting.' *Environ Earth Sci* 63, 1691–1700. <https://doi.org/10.1007/s12665-010-0766-1>
- Steinfeld, J.I., Pandis, S.N., 1998. Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development* 40, 26–26. <https://doi.org/10.1080/00139157.1999.10544295>
- Sterflinger, K., 2010. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews* 24, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.03.003>
- Sterflinger, K., 2000. Fungi as Geologic Agents. *Geomicrobiology Journal* 17, 97–124. <https://doi.org/10.1080/01490450050023791>
- Sterflinger, K., 1995. Geomicrobiological investigations on the alteration of marble monuments by dematiaceous fungi. Oldenburg, Germany.
- Sterflinger, K., Krumbein, W.E., 1997. Dematiaceous fungi as a major agent for biopitting on Mediterranean marbles and limestones. *Geomicrobiology Journal* 14, 219–230. <https://doi.org/10.1080/01490459709378045>
- Sterflinger, K., Piñar, G., 2013. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills? *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 9637–9646. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5283-1>
- Sterflinger, K., Tesei, D., Zakharova, K., 2012. Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. *Fungal Ecology* 5, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.12.007>
- Suihko, M.-L., Alakomi, H.-L., Gorbushina, A., Fortune, I., Marquardt, J., Saarela, M., 2007. Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 494–508. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.05.001>
- Sun, X., Wang, Y., Li, H., Yang, X., Sun, L., Wang, X., Wang, T., Wang, W., 2016. Organic acids in cloud water and rainwater at a mountain site in acid rain areas of South China. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6038-1>
- Sutton, S., 2010. The most probable number method and its uses in enumeration, qualification, and validation. *Journal of validation technology* 8–41.
- Taylor, S., May, E., 1991. The seasonality of heterotrophic bacteria on sandstones of ancient monuments. *International Biodeterioration* 28, 49–64. [https://doi.org/10.1016/0265-3036\(91\)90033-N](https://doi.org/10.1016/0265-3036(91)90033-N)
- Thornton, J.A., Kercher, J.P., Riedel, T.P., Wagner, N.L., Cozic, J., Holloway, J.S., Duó, W.P., Wolfe, G.M., Quinn, P.K., Middlebrook, A.M., Alexander, B., Brown, S.S., 2010. A large atomic chlorine source inferred from mid-continental reactive nitrogen chemistry. *Nature* 2010 464:7286 464, 271–274. <https://doi.org/10.1038/nature08905>
- Thüs, H., Muggia, L., Pérez-Ortega, S., Favero-Longo, S.E., Joneson, S., O'Brien, H., Nelsen, M.P., Duque-Thüs, R., Grube, M., Friedl, T., Brodie, J., Andrew, C.J., Lücking, R., Lutzoni, F., Gueidan, C., 2011. Revisiting photobiont diversity in the lichen family verrucariaceae (ascomycota). *European Journal of Phycology* 46, 399–415. <https://doi.org/10.1080/09670262.2011.629788>

## Références bibliographiques

- Tian, L., Wang, L., 2021. Multi-omics analysis reveals structure and function of biofilm microbial communities in a pre-denitrification biofilter. *Science of The Total Environment* 757, 143908. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143908>
- Toreno, G., Zucconi, L., Caneva, G., Meloni, P., Isola, D., 2024. Recolonization dynamics of marble monuments after cleaning treatments: A nine-year follow-up study. *Science of The Total Environment* 912, 169350. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169350>
- Trovão, J., Gil, F., Catarino, L., Soares, F., Tiago, I., Portugal, A., 2020. Analysis of fungal deterioration phenomena in the first Portuguese King tomb using a multi-analytical approach. *International Biodeterioration & Biodegradation* 149, 104933. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.104933>
- Tsubouchi, T., Koyama, S., Mori, K., Shimane, Y., Usui, K., Tokuda, M., Tame, A., Uematsu, K., Maruyama, T., Hatada, Y., 2014. *Brevundimonas denitrificans* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from deep seafloor sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 3709–3716. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.067199-0>
- Vergès-Belmin, V., 2008. ICOMOS-ISCS: illustrated glossary on stone deterioration patterns, English-French version. ed, Monuments and sites. ICOMOS, Paris.
- Villa, F., Vasanthakumar, A., Mitchell, R., Cappitelli, F., 2015. RNA-based molecular survey of biodiversity of limestone tombstone microbiota in response to atmospheric sulphur pollution. *Lett Appl Microbiol* 60, 92–102. <https://doi.org/10.1111/lam.12345>
- Vlasov, D.Yu., Frank-Kamenetskaya, O.V., Manurtdinova, V.V., Zelenskaya, M.S., 2019. Decay of the Monuments, in: Frank-Kamenetskaya, O.V., Vlasov, D.Yu., Rytikova, V.V. (Eds.), *The Effect of the Environment on Saint Petersburg's Cultural Heritage, Geoheritage, Geoparks and Geotourism*. Springer International Publishing, Cham, pp. 75–95. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-79072-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-79072-5_4)
- Vlasov, D.Yu., G. Panova, E., S. Zelenskaya, M., A. Rodina, O., D. Vlasov, A., V. Sazanova, K., 2021. Changes of Granite Rapakivi under the Biofouling Influence, in: René, M., Aiello, G., El Bahariya, G. (Eds.), *Geochemistry*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92324>
- Wakefield, R.D., Jones, M.S., 1998. An introduction to stone colonizing micro-organisms and biodeterioration of building stone. *QJEGH* 31, 301–313. <https://doi.org/10.1144/GSL.QJEG.1998.031.P4.03>
- Wang, Y., Liu, X., 2021. Sulfur-oxidizing bacteria involved in the blackening of basalt sculptures of the Leizhou Stone Dog. *International Biodeterioration and Biodegradation* 159. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105207>
- Warren-Rhodes, K.A., Rhodes, K.L., Pointing, S.B., Ewing, S.A., Lacap, D.C., Gómez-Silva, B., Amundson, R., Friedmann, E.I., McKay, C.P., 2006. Hypolithic Cyanobacteria, Dry Limit of Photosynthesis, and Microbial Ecology in the Hyperarid Atacama Desert. *Microb Ecol* 52, 389–398. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9055-7>
- Warscheid, T., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46, 343–368. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8)
- Warscheid, Th., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 343–368. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8)
- Watt, J., Hamilton, R., 2003. The soiling of buildings by air pollution., in: *The Effects of Air Pollution on the Built Environment*. pp. 289–334.
- Whelpdale, D.M., Summers, P.W., Sanhueza, E., 1997. A global overview of atmospheric acid deposition fluxes. *Environmental Monitoring and Assessment* 48, 217–247. <https://doi.org/10.1023/A:1005708821454/METRICS>
- Wollenzien, U., De Hoog, G.S., Krumbein, W.E., Urzı, C., 1995. On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *Science of The Total Environment* 167, 287–294. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04589-S](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04589-S)

## Références bibliographiques

- Wood, E.E., Ross, M.E., Jubeau, S., Montalescot, V., MacKechnie, K., Marchington, R.E., Davey, M.P., McNeill, S., Hamilton, C., Stanley, M.S., 2023. From green to orange: The change in biochemical composition of phototrophic-mixotrophic *Chromochloris zofingiensis* in pilot-scale photobioreactors. *Algal Research* 75, 103238. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103238>
- Wu, F., Zhang, Y., He, D., Gu, J.-D., Guo, Q., Liu, X., Duan, Y., Zhao, J., Wang, W., Feng, H., 2021. Community structures of bacteria and archaea associated with the biodeterioration of sandstone sculptures at the Beishiku Temple. *International Biodeterioration & Biodegradation* 164, 105290. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105290>
- Xing, W., Li, J., Li, D., Hu, J., Deng, S., Cui, Y., Yao, H., 2018. Stable-Isotope Probing Reveals the Activity and Function of Autotrophic and Heterotrophic Denitrifiers in Nitrate Removal from Organic-Limited Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 52, 7867–7875. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01993>
- Yun, L., Yu, Z., Li, Y., Luo, P., Jiang, X., Tian, Y., Ding, X., 2019. Ammonia nitrogen and nitrite removal by a heterotrophic *Sphingomonas* sp. strain LPN080 and its potential application in aquaculture. *Aquaculture* 500, 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.054>
- Yung, C.C.M., Chan, Y., Lacap, D.C., Pérez-Ortega, S., De Los Rios-Murillo, A., Lee, C.K., Cary, S.C., Pointing, S.B., 2014. Characterization of Chasmoendolithic Community in Miers Valley, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Microb Ecol* 68, 351–359. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0412-7>
- Zanardini, E., May, E., Inkpen, R., Cappitelli, F., Murrell, J.C., Purdy, K.J., 2016. Diversity of archaeal and bacterial communities on exfoliated sandstone from Portchester Castle (UK). *International Biodeterioration & Biodegradation* 109, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.021>
- Zhang, G., Gong, C., Gu, J., Katayama, Y., Someya, T., Gu, J.-D., 2019. Biochemical reactions and mechanisms involved in the biodeterioration of stone world cultural heritage under the tropical climate conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 143, 104723. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104723>
- Zhang, H., Shu, D., Zhang, J., Liu, X., Wang, K., Jiang, R., 2024. Biodegradable Film Mulching Increases Soil Microbial Network Complexity and Decreases Nitrogen-Cycling Genes Abundances (preprint). SSRN. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4688923>
- Zhang, Y., Su, M., Wu, F., Gu, J.-D., Li, J., He, D., Guo, Q., Cui, H., Zhang, Q., Feng, H., 2023. Diversity and Composition of Culturable Microorganisms and Their Biodeterioration Potentials in the Sandstone of Beishiku Temple, China. *Microorganisms* 11, 429. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020429>
- Zhang, Y.-Q., Yu, L.-Y., Wang, D., Liu, H.-Y., Sun, C.-H., Jiang, W., Zhang, Y.-Q., Li, W.-J., 2008. *Roseomonas vinacea* sp. nov., a Gram-negative coccobacillus isolated from a soil sample. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 58, 2070–2074. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65789-0>
- Zhang, Z., Wang, J., Zhang, X., Chen, A., 2023. Aspartate as Sole Carbon and Nitrogen Source for Simultaneous Nitrification, Denitrification and Phosphorus Removal in a Sequencing Batch Reactor. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4615232>
- Zhao, H., Zhao, J., Li, F., Li, X., 2016. Performance of Denitrifying Microbial Fuel Cell with Biocathode over Nitrite. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00344>
- Zhao, L., Fu, G., Zeng, A., Cheng, B., Song, Z., Hu, Z., 2023. Effects of different aeration strategies and ammonia-nitrogen loads on nitrification performance and microbial community succession of mangrove constructed wetlands for saline wastewater treatment. *Chemosphere* 339, 139685. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139685>

## Liste des figures

Figure 1 : Le calcaire parisien.(A) Carte des carrières localisées dans Paris intramuros (Blanc et al. 2001) ; (B) Carte des carrières dans le bassin parisien (Benoit et al. 2000) ; (C) log sédimentaire (Benoit et al. 2000).	14
Figure 2 : Classification des faciès d'altération selon le glossaire ICOMOS.	18
Figure 3: Estimation de l'évolution des différents polluants atmosphériques à Paris (Brimblecombe and Lefèvre, 2021).	23
Figure 4 : Evolution de la concentration en SO <sub>2</sub> hivernal à Paris entre 1952 et 2014 (AIRPARIF, 2020)	24
Figure 5: Schéma du cycle de l'azote et des microorganismes impliqués.	25
Figure 6: Classification de Koppen-Geiger sur la période 1980-2016 (Beck et al., 2018).	31
Figure 7 : Plan du cimetière du Père Lachaise.	47
Figure 8 : Position des stèles échantillonnées au sein du cimetière de Père Lachaise.	48
Figure 9 : Schéma représentant les différents éléments d'une tombe	49
Figure 10 : Localisation des coupons au niveau du local technique Père Lachaise	49
Figure 11 : Schéma du dispositif expérimental d'exposition des coupons au cimetière du Père Lachaise.	51
Figure 12 : Schéma de dégradation de la fluorescéine di-acétate en fluorescéine en présence d'enzymes.	52
Figure 13 : Schéma des étapes du traitement bio-informatique des séquences ADN.	53
Figure 14 : Schéma de l'étape de clustering suivant l'approche Swarm	53
Figure 15 : Schéma de la démarche expérimentale suivie pour l'altération des calcaires en milieu contrôlé.	57
Figure 16 : Conditions d'exposition des calcaires au Minitron : 12h dans l'obscurité, 12h en présence de lumière, température 20°C et agitation 50 rpm.	60
Figure 17 : Sphère de la couleur CIELAB	63
Figure 18 : Arbre de décision des tests statistiques.	64
Figure 19: Site of the study.	71
Figure 20: Respective contribution (in %) of the volume-weighted mean concentrations of the main elements of the rain for the 2 series (Nov. 2015 and April 2016).	74
Figure 21: Microscopic observation of limestone specimens after 5 years exposure in Père-Lachaise cemetery	78
Figure 22: SEM observation of limestone specimens after 5 years of exposure at Père Lachaise.	79
Figure 23: XRD analysis of pristine (CS) and weathered conditions (SH, SV, UH, UV);	80
Figure 24: Concentrations (in ppm) in elution solution after immersion in mQ water for 24 hours of pristine (CS) and weathered (SH, SV, UH, UV) samples.	81
Figure 25: Enumeration of bacteria (A) and fungi (B) in cells.mL <sup>-1</sup> .	82
Figure 26: Relative abundance (in %) of phyla of bacterial (A) and fungal communities (B) for the different weathered samples (SH, SV, UH, UV)	83
Figure 27: Heat map representing the relative abundance (in %) of bacteria at genus level for each sample (SH, SV, UH, UV)	85
Figure 28: Heatmap showing the relative abundance of the most represented fungi in each position at genus level.	87
Figure 29: Heat map showing the Bray Curtis beta diversity index for bacterial communities (A) and fungi communities (B).	88

Figure 30 : Proportion massique (en %) des ions présents dans la fraction soluble des calcaires en fonction des saisons hivernale et estivale par échantillon	112
Figure 31 : Dénombrement bactérien et fongique.	115
Figure 32 : Activité enzymatique totale.	117
Figure 33: Carte de chaleur des indices de bêta-diversité représentant les communautés bactériennes des mêmes échantillons en saison hivernale et en saison estivale.	120
Figure 34: Cartes de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis des communautés bactériennes pour les différentes stèles	121
	123
Figure 36: Abondance relative des genre bactériens identifiés en saison hivernale.	125
Figure 37: Abondance relative des genres bactériens identifiés sur les tombes du Père-Lachaise en saison estivale (en %).	126
Figure 38 : Carte de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis des communautés fongiques	129
Figure 39 : Cartes de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis des communautés fongiques pour les différentes stèles en fonction des saisons étudiées	130
Figure 40: Abondance relative des phyla fongiques identifiés sur les stèles du Père-Lachaise (en %).	133
Figure 41: Abondance relative des genres fongiques identifiés sur les tombes du Père-Lachaise en saison hivernale (en %)	135
Figure 42 : Abondance relative des genres fongiques identifiés sur les stèles lors de la saison estivale (en %).	136
Figure 43: Cartes de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis des communautés algaires pour les différentes stèles en fonction des	139
Figure 44: Abondance relative des phyla algaires (en %).	141
Figure 45: Abondance relative des genres identifiés sur les tombes en saison hivernale (en %)	142
Figure 46: Abondance relative des genres algaires identifiés en saison estivale (en %).	142
Figure 47 : Analyse en composantes principales des phyla bactériens et des ions solubles en saison hivernale.	143
Figure 48 : Analyse en composantes principales des phyla bactériens et des ions solubles en saison estivale.	144
Figure 49 : Analyse en composantes principales représentant les classes des Ascomycota et les ions solubles des échantillons en saison hivernale.	145
Figure 50: Schéma récapitulatif des genres bactériens (en rouge) et fongiques (en bleu) retrouvés sur les coupons et les tombes du Père Lachaise.	148
Figure 51 : Schéma récapitulatif des différentes conditions étudiées et des sigles employés.	158
Figure 52 : Schéma récapitulatif des conditions expérimentales.	159
Figure 53 : Évolution du nombre de cellules intactes (ICC.mL <sup>-1</sup> ) dans les microcosmes au cours du temps.	160
Figure 54 : Évolution du pH au cours du temps.	161
Figure 56 : Évolution de la concentration (mg.L <sup>-1</sup> ) en ions présents en solution au cours du temps.	162
Figure 56 : Evolution de l'indice de saturation des phases formées au cours du temps.	164
Figure 57 : Photographies au microscope numérique	166
Figure 58 : Photographies au microscope numérique des échantillons altérés après 63 jours d'immersion.	167

## Listes des figures et tableaux

Figure 59 : Carte de chaleur représentant l'indice bactérien de bêta diversité de Bray-Curtis à l'échelle des espèces. _____	168
Figure 60 : Abondance relative des phyla bactériens (en %). _____	169
Figure 61: Abondance relative des genres bactériens (en %). _____	171
Figure 62 : Carte de chaleur représentant les indices fongiques de bêta diversité de Bray-Curtis. _____	173
Figure 63 : Abondance relative des phyla fongiques (en %). _____	174
Figure 64: Abondance relative des genres fongiques (en %). _____	175
Figure 65: Carte de chaleur des indices de beta-diversité de Bray-Curtis pour les communautés algaires. _____	176
Figure 66: Abondance relative des phyla algaires (en %). _____	177
Figure 67: Abondance relative des genres algaires (en %). _____	177
Figure 68: Analyses en composantes principales entre les compositions ioniques et les phyla bactériens (A) et entre les classes fongiques (B) après 63 jours d'incubation. _____	179
Figure 69 : Photographies au microscope numérique des calcaires avant et après un mois de vieillissement dans CIME. _____	180
Figure 70 : Schéma de la démarche expérimentale. _____	181
Figure 71 : Évolution du nombre de cellules intactes (ICC) par millilitre au cours du temps. _____	182
Figure 72 : Évolution du pH au cours du temps. _____	182
Figure 74 : Évolution des concentrations ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) des ions en solution au cours du temps. _____	184
Figure 74 : Evolution de l'indice de saturation des phases formées au sein des différents microcosmes au cours du temps. _____	185
Figure 75 : Photographies au microscope numérique du calcaire pollué _____	186
Figure 76 : Observations microscopiques des calcaires : (A-B) avant incubation ; (C-E) après incubation PCS ('pluie-calcaire pollué') ; (F-H) après incubation PCSMO ('pluie-calcaire pollué-microorganismes'). _____	187
Figure 77 : Carte de chaleur représentant les indices de Bêta diversité de Bray-Curtis pour les bactéries. _____	188
Figure 78 : Abondance relative des phyla bactériens (en %). _____	189
Figure 79: Abondance relative des genres bactériens (en %). _____	190
Figure 80 : Carte de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis des communautés fongiques. _____	191
Figure 81 : Abondance relative des phyla fongiques (en %). _____	192
Figure 82: Abondance relative de genres fongiques (en %). _____	193
Figure 83: Carte de chaleur des indices de bêta-diversité de Bray Curtis. _____	194
Figure 84: Abondance relative des phyla algaires identifiés dans les différentes conditions expérimentales. _____	195
Figure 85: Abondance relatives des genres algaires identifiés dans les différentes conditions expérimentales. _____	196
Figure 86: Analyses en composantes principales des ions solubles et des phyla bactériens (A) ainsi que des classes bactériennes (B). _____	197
Figure 87 : Carte de chaleur des indices de Bêta diversité de Bray-Curtis, (A) communautés bactériennes ; (B) communautés fongiques. _____	200
Figure 88 : Schéma de la démarche expérimentale. _____	201
Figure 89 : Dénombrement bactérien et fongique en $\text{UFC.mL}^{-1}$ en fonction des différentes pluies et des conditions expérimentales. _____	202

Figure 90 : Évolution de la concentration en algues vertes au cours du temps (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), en fonction des différentes pluies.	204
Figure 91 : Évolution du pH au cours du temps, en fonction des différentes pluies.	205
Figure 92: Évolution des concentrations en cations (en $\text{mg.L}^{-1}$ ) au cours du temps.	207
Figure 94 : Évolution de la concentration en anions inorganiques (en $\text{mg.L}^{-1}$ ) en fonction du milieu au cours du temps.	208
Figure 95 : Évolution des concentrations en anions organiques (en $\text{mg.L}^{-1}$ ) au cours du temps, en fonction du milieu et des conditions expérimentales.	209
Figure 95: Evolution de l'indice de saturation des différentes phases formées au cours du temps. La ligne rouge correspond l'équilibre.	211
Figure 96 : Photographies des flacons composés de pluie-calcaire-microorganismes à T63	212
Figure 97 : Représentation en 3D de l'évolution colorimétrique des pierres calcaires après 63 jours d'incubation dans l'espace de couleur CIELAB.	213
Figure 98 : Observation microscopique des échantillons pluie-calcaire-microorganismes, après 63 jours.	214
Figure 99 : Cartes de chaleur représentant les indices bactériens de Bray-Curtis en fonction de chaque pluie.	216
Figure 100 : Cartes de chaleur représentant les indices bactériens de Bray-Curtis correspondant à l'impact des différentes pollutions dans les mêmes conditions expérimentales.	217
Figure 101 : Abondance relative des phyla bactériens dans les conditions PXMO 'pluie-microorganismes' en fonction des différents milieux (en %).	218
Figure 102: Abondance relative des différents genres bactériens dans les conditions PXMO 'pluie-microorganismes' (en %).	220
Figure 103 : Abondance relative des phyla bactériens dans les microcosmes PXC MO 'pluie-calcaire-microorganismes' (en %).	221
Figure 104: Abondance relative des genres bactériens présents dans les microcosmes PXC MO 'pluie-calcaire-microorganismes' (en %).	222
Figure 105 : Abondance relative des phyla bactériens présents dans les microcosmes PXC 'pluie-calcaire' (en %).	223
Figure 106 : Abondance relative des genres bactériens des microcosmes PXC 'pluie-calcaire' (en %).	224
Figure 107 : Carte de chaleur représentant les indices fongiques de bêta-diversité de Bray-Curtis.	226
Figure 108 : Abondance relative des phyla fongiques des microcosmes PXC MO 'pluie-calcaire-microorganismes' en fonction des différentes compositions de milieux (en %).	227
Figure 109: Abondance relative des genres fongiques au sein des microcosmes PXC MO 'pluie-calcaire-microorganismes' (en %).	228
Figure 110 : Abondance relative des phyla fongiques des microcosmes PXMO 'pluie-microorganismes' (en %).	229
Figure 111: Abondance relative des genres bactériens des microcosmes PXMO 'pluie-microorganismes' (en %).	230
Figure 112 : Abondance relative des phyla fongiques des microcosmes PXC 'pluie-calcaire' (en %).	231
Figure 113: Abondance relative des genres fongiques au sein des microcosmes PXC 'pluie-calcaire' (en %).	232
Figure 114: Carte de chaleur des indices de bêta-diversité de Bray-Curtis en fonction du type de pluie.	234

## Listes des figures et tableaux

Figure 115: Carte de chaleur représentant les indices de bêta-diversité de Bray-Curtis en fonction des conditions expérimentales. _____	236
Figure 116: Abondance relative des différents phyla. _____	237
Figure 117: Abondance relative des genres algaires identifiés dans la condition 'pluie-calcaire-microorganismes' en fonction des différents milieux (en %) _____	238
Figure 118 : Abondance relative des genres algaires identifiés dans la condition 'pluie-calcaire' en fonction des différents milieux (en %). _____	238
Figure 119: Abondance relative des genres algaires identifiés dans la condition 'pluie-microorganismes' en fonction des différents milieux (en %) _____	239
Figure 120: Analyses en composantes principales entre les ions en solution et les phyla bactériens par composition de microcosmes. _____	241
Figure 121: Analyses en composante principale entre les ions en solution et les classes fongiques par composition de microcosmes. _____	243
Figure 122: Schéma récapitulatif des genres identifiés en fonction du type de pollution dans les conditions 'pluie-calcaire'. _____	245
Figure 123: Schéma récapitulatif des genres microbiens initiaux (inoculum) et après exposition aux différentes pollutions dans les conditions 'pluie-calcaire-microorganismes'. _____	247
Figure 124 : Scénario des altérations des calcaires au cimetière du Père-Lachaise. _____	255



## Liste des tableaux

Tableau 1: Calcaires du bassin Parisien, caractéristiques et utilisation dans les monuments historiques.	16
Tableau 2 : Échelle des altérations de la pierre, paramètres et sciences impliquées (Fitzner and Heinrichs, 2001a).	19
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents types trophiques.	24
Tableau 4: Principaux pigments identifiés dans la littérature, pour les algues et les cyanobactéries, fonctions biologiques et couleurs associées (d'après Gaylarde, 2020)	28
Tableau 5: Tableau récapitulatif des genres microbiens identifiés à la surface des monuments en pierre en fonction du climat	39
Tableau 6 : Différentes pierres de St Maximin et leurs préconisations d'emploi	50
Tableau 7 : Limites de quantification des cations en ppb.	56
Tableau 8 : Limite de quantification des anions organiques et inorganiques en ppb.	56
Tableau 9 : Tableau des concentrations en ions de l'eau de pluie récoltée au cimetière du Père Lachaise en 2016.	58
Tableau 10 : (A) Masse de sels utilisés dans la composition de l'eau de pluie synthétique. (B) Equivalence en concentration d'ions (mg. L-1) de l'eau de pluie synthétique.	59
Tableau 11: Tableau de la composition ionique des quatre pluies synthétiques utilisées dans les expériences	59
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des différents packages R utilisés	64
Tableau 13 : Proportions (en %) des différentes phases cristallines analysées (de manière semi-quantitative) par DRX pour les échantillons collectés en hiver.	110
Tableau 14 : p-valeur obtenues par test statistique de Kruskal-Wallis pour évaluer l'effet de l'orientation (Horizontal ou Vertical) et de la division (25, 62 ou 92)	113
Tableau 15 : Tableau des indices d'alpha-diversité des communautés bactériennes présentes sur les tombes du Père-Lachaise.	118
Tableau 16 : Indices d'alpha-diversité des communautés fongiques identifiées sur les stèles du Père-Lachaise durant deux saisons.	127
Tableau 17: Indices d'alpha-diversité des communautés algaires identifiées sur les stèles du Père-Lachaise durant deux saisons.	137
Tableau 18: Tableau récapitulatif des résultats principaux d'exposition de coupons de calcaire pendant cinq ans au cimetière du Père-Lachaise.	146
Tableau 19: Tableau récapitulatif des principaux résultats en fonction des trois paramètres étudiés : la division, l'orientation et la saison.	146
Tableau 20: Indice d'alpha-diversité à l'échelle des espèces bactériennes.	168
Tableau 21: Indice des alpha-diversité à l'échelle des espèces fongiques.	172
Tableau 22: Indice d'alpha-diversité des communautés bactériennes.	188
Tableau 23 : Indices d'alpha-diversité des communautés fongiques	191
Tableau 24: Indice d'alpha-diversité des communautés algaires	194
Tableau 25: p-valeur correspondant aux comparaisons entre les échantillons de calcaire sain et de calcaire pollué.	199
Tableau 26 : Tableau représentant la moyenne des indices bactériens d'alpha-diversité en fonction des différentes conditions expérimentales.	215
Tableau 27 : Indices d'alpha-diversité des communautés fongiques à l'échelle des espèces en fonction des différents milieux et conditions expérimentales.	225
Tableau 28: Indice d'alpha-diversité pour les différentes conditions expérimentales.	233



## **ANNEXES :**




Annexe 1 : Tableau des échantillons prélevés au cimetière du Père Lachaise.

Annexe 2 : Tableau de concentration des ions soluble issues des échantillons du Père Lachaise (en meq.L<sup>-1</sup>)

Annexe 3 : Article publié dans PloSOne : “Influence of climatic factors on cyanobacteria and green algae development on building surface.”

## Annexes

### Annexe 1 : Tableaux des échantillons

Echantillons	Division	Date de prélèvement	Localisation de la stèle	Description
<b>ST1V1</b> 	25	26/02/2020 23/09/2021	48.8608 N, 2.3946 E	Pas abrité par un arbre Position verticale Calcaire fin type lutétien, très altéré formation de croûte
<b>ST1V2</b> 	25	26/02/2020 23/09/2021	48.8608 N, 2.3946 E	Pas abrité par un arbre Position verticale Calcaire fin type lutétien Patine rougeâtre sur la partie supérieure de la stèle
<b>ST1H</b> 	25	26/02/2020 23/09/2021	48.8608 N, 2.3946 E	Pas abrité par un arbre Echantillon prélevé sur la partie horizontale de la stèle Stèle horizontale couverte de mousse
<b>ST2V1</b>	25	09/03/2020 23/09/2021	48.5140 N, 2.2342 E	Abrité par un arbre Calcaire fin très altéré Présence de faciès de dissolution Echantillon prélevé sur la partie arrière verticale de la stèle

## Annexes



Présence de mousse sur la  
partie supérieure de la stèle  
Surface du calcaire très  
friable

---

### ST2V2



25

09/03/2020  
23/09/2021

48.5140 N,  
2.2342 E

Abrité par un arbre  
Calcaire fin altéré avec  
présence de patine grise à  
verte  
Prélèvement sur le flanc S-E  
de la stèle en position  
verticale

---

### ST2P



25

10/03/2020  
23/09/2021

48.5140 N,  
2.2342 E

Abrité par un arbre  
Echantillon prélevé en  
position horizontale en  
dessous des premier faciès  
d'altération

---

### M1

25

09/03/2020

48.5139 N,  
2.2344 E

Abrité par un arbre

---

### ST7V1

25

26/01/2021  
23/09/2021

48.5142 N,  
2.2351 E

Abrité par un arbre  
Echantillon prélevé en  
position verticale sur une  
plaque de marbre ou calcaire  
très fin  
Présence d'une patine grise à  
verdâtre

## Annexes



---

### ST7H1



25

10/03/2020  
23/09/2021

48.5142 N,  
2.2351 E

Abrité par un arbre  
Calcaire fin  
Echantillon prélevé en  
position horizontale  
Présence importante de  
mousse en surface

---

### ST3V1



62

10/03/2020  
23/09/2021

48.5144 N,  
2.2322 E

Pas abrité par un arbre  
Calcaire fin  
Présence d'une patine  
sombre rougeâtre

---

### ST3V2



62

10/03/2020  
23/09/2021

48.5144 N,  
2.2322 E

Pas abrité par un arbre  
Calcaire fin  
Patine grisâtre

Annexes

**ST3H1**



62      10/03/2020      48.5144 N,  
23/09/2021      2.2322 E      Pas abrité par un arbre  
Patine très sombre allant vers  
le noir

**ST4V1**



62      11/03/2020      48.5146 N,  
23/09/2021      2.2321 E      Abrité par un arbre  
Calcaire grossier à entroque  
type Euville  
Présence d'une croûte  
grisâtre potentiellement dû à  
une recristallisation

**ST4V2**

62      11/03/2020      48.5146 N,  
23/09/2021      2.2321 E      Abrité par un arbre  
Calcaire grossier type Euville  
Pas de présence de croûte  
mais présence d'une patine  
grisatre

**ST4H1**



62      11/03/2020      48.5146 N,  
23/09/2021      2.2321 E      Abrité par un arbre  
Patine verdâtre

**ST5V1**

62      12/03/2020      48.5243 N,  
23/09/2021      2.2317 E      Abrité par un arbre  
Calcaire fin

## Annexes



Patine grise foncé, présence  
de très petit cristaux foncés  
en surface

---

### ST5V2



62

12/03/2020  
23/09/2021

48.5243 N,  
2.2317 E

Abrité par un arbre  
Calcaire fin  
Patine verdâtre

---

### ST5V3



62

12/03/2020  
23/09/2021

48.5243 N,  
2.2317 E

Abrité par un arbre  
Calcaire fin  
Présence de croûte grise à la  
surface, potentiellement dû à  
une recristallisation

---

### ST5P

62

12/03/2020

48.5243 N,  
2.2317 E

Abrité par un arbre  
Calcaire fin  
Récupéré un peu plus en  
profondeur, donc sans  
altération



## Annexes



---

### ST6V1



62

12/03/2020  
23/09/2021

48.5144 N,  
2.2316 E

Abrité par un arbre  
Calcaire fin,  
Patine grisâtre  
Côté face au boulevard  
Ménilmontant

---

### ST6V2



62

12/03/2020  
23/09/2021

48.5144 N,  
2.2316 E

Abrité par un arbre  
Calcaire fin très altéré,  
présence de desquamation  
Présence de coloration verte  
et orange

---

### ST6V3



62

12/03/2020  
23/09/2021

48.5144 N,  
2.2316 E

Abrité par un arbre  
Calcaire fin  
Patine très noir  
Présence d'un détachement

**ST8V1**



92	26/01/2021 24/09/2021	48.5137 N, 2.2353 E	Pas abrité par un arbre Calcaire grossier à entroque type Euville Présence d'un détachement et patine grisâtre
----	--------------------------	------------------------	--

**ST8V2**



92	26/01/2021 24/09/2021	48.5137 N, 2.2353 E	Pas abrité par un arbre Calcaire grossier à entroque Euville Sur ornementation de la stèle Très friable Présence de croûte potentiellement recristallisée couleur sombre
----	--------------------------	------------------------	---

**ST9V1**



92	26/01/2021 24/09/2021	48.5135 N, 2.2351 E	Pas abrité par un arbre Calcaire grossier type Euville Présence d'une croûte grisâtre sous laquelle présence d'organismes vivant (fourmies)
----	--------------------------	------------------------	--

**ST9V2**



92	26/01/2021 24/09/2021	48.5135 N, 2.2351 E	Pas abrité par un arbre Calcaire grossier à entroque type Euville Présence d'une patine grise à verte
----	--------------------------	------------------------	---

Annexes

**ST9V3**

92	01/02/2021 24/09/2021	48.5135 N, 2.2351 E	Pas abrité par un arbre Calcaire grossier à Entroque type Euville, Présence de croûte grise
----	--------------------------	------------------------	--

**ST9H1**



92	01/02/2021 24/09/2021	48.5135 N, 2.2351 E	Pas abrité par un arbre Calcaire grossier à entroque type Euville, Présence de mousse
----	--------------------------	------------------------	--

**ST10V1**



92	26/01/2021 24/09/2021	48.5137 N, 2.2350 E	Abrité par un arbre Calcaire fin, type Lutécien Très altéré et très friable Présence de patine verte à grise
----	--------------------------	------------------------	--

**ST10H1**



92	26/01/2021 24/09/2021	48.5137 N, 2.2350 E	Abrité par un arbre Calcaire fin type Lutécien Patine grise à verte
----	--------------------------	------------------------	---

**ST11H1**

92	26/01/2021 24/09/2021	48.5137 N, 2.2350 E	Pas abrité par un arbre Deux types d'échantillons : écouvillons et poudre de calcaire Calcaire très fin et très dur Présence d'une patine sombre grise à rouge
----	--------------------------	------------------------	--

Annexes



---

**ST12V1**



25

01/02/2021  
23/09/2021

48.5129 N,  
2.2337 E

Abrité par un arbre  
Deux types d'échantillons :  
poudre et écouvillon  
Calcaire très fin et très dur  
Présence de patine grise à  
verte

## Annexes

### Annexe 2 : Tableau de concentration des ions soluble issues des échantillons du Père Lachaise (en meq.L<sup>-1</sup>)

ÉTÉ

Concentration en meq.L<sup>-1</sup>

	Na+	NH4+	K+	Ca2+	Mg2+	F-	Cl-	NO3-	PO43-	SO42-	C2H3O2-	C3H5O2-	CHO2-	C2O42-	C2H3O3-	S cations	S anions	Différence
ST1V1C1	0.046	0.000	0.084	45.616	0.075	0.071	0.062	0.127	0.150	47.427	0.004	0.000	0.000	0.022	0.000	45.821	47.863	-4%
ST1V2C1	0.044	0.034	0.136	3.806	0.131	0.000	0.107	0.125	0.040	2.264	0.010	0.000	0.000	0.000	0.002	4.150	2.548	48%
ST1H1C1	0.042	0.177	0.251	2.011	0.069	0.000	0.036	0.045	0.044	0.151	0.012	0.000	0.004	0.000	0.002	2.549	0.294	159%
ST2V1C1	0.046	0.000	0.168	45.690	0.074	0.046	0.028	0.048	0.039	47.735	0.005	0.000	0.000	0.023	0.000	45.978	47.924	-4%
ST2V2C1	0.604	0.265	0.985	25.040	0.594	0.074	1.308	0.586	0.008	24.187	0.022	0.000	0.001	0.026	0.000	27.488	26.213	5%
ST2H1C1	0.151	1.284	2.072	5.768	0.541	0.012	0.305	0.082	0.867	0.651	0.299	0.005	0.025	0.053	0.021	9.815	2.320	124%
ST3V1C1	0.014	0.000	0.358	3.353	0.161	0.000	0.089	0.000	0.000	0.083	0.071	0.003	0.011	0.000	0.013	3.887	0.270	174%
ST3V2C1	0.000	0.100	0.390	2.770	0.081	0.000	0.042	0.036	0.008	0.078	0.011	0.000	0.005	0.003	0.000	3.341	0.184	179%
ST3H1C1	0.084	0.306	1.033	5.020	0.248	0.000	0.122	0.131	0.121	0.220	0.017	0.002	0.009	0.015	0.008	6.691	0.646	165%
ST4V1C1	0.040	0.007	0.105	38.038	0.032	0.054	0.026	0.052	0.124	39.765	0.004	0.000	0.000	0.019	0.000	38.222	40.045	-5%
ST4V2C1	0.123	0.069	0.359	2.397	0.146	0.000	0.214	0.216	0.031	0.592	0.013	0.000	0.004	0.040	0.003	3.094	1.114	94%
ST4H1C1	0.075	1.016	2.600	6.246	0.971	0.000	0.301	0.000	1.103	0.440	0.083	0.004	0.015	0.030	0.029	10.907	2.004	138%
ST5V1C1	0.724	0.118	0.619	49.597	1.294	0.106	2.514	1.936	0.049	49.718	0.013	0.000	0.018	0.038	0.005	52.352	54.396	-4%
ST5V2C1	0.048	0.057	0.212	46.644	0.085	0.075	0.067	0.127	0.027	47.968	0.008	0.000	0.005	0.041	0.000	47.047	48.318	-3%
ST5V3C1	0.312	0.062	0.744	46.130	0.220	0.105	0.453	0.357	0.030	47.270	0.005	0.000	0.000	0.045	0.000	47.468	48.264	-2%
ST6V1C1	0.058	0.364	0.569	0.000	0.175	0.000	0.055	0.045	0.153	0.151	0.015	0.000	0.005	0.000	0.002	1.167	0.426	93%
ST6V2C1	1.738	0.069	1.351	54.554	3.182	0.046	8.030	4.714	0.113	49.461	0.007	0.000	0.015	0.048	0.007	60.895	62.440	-3%
ST6V3C1	0.074	0.029	0.049	45.702	0.147	0.143	0.077	0.380	0.000	47.071	0.007	0.000	0.014	0.036	0.001	46.001	47.728	-4%
ST7V1C1	0.908	0.017	1.011	44.225	0.586	0.102	1.042	2.743	0.000	44.414	0.006	0.000	0.008	0.030	0.000	46.747	48.346	-3%
ST7H1C1	0.549	0.086	0.553	2.412	0.469	0.000	0.699	0.507	0.000	0.482	0.010	0.000	0.006	0.050	0.000	4.068	1.754	80%
ST8V1C1	0.123	0.006	0.050	2.083	0.126	0.000	0.322	0.503	0.000	1.162	0.010	0.000	0.001	0.036	0.000	2.389	2.034	16%
ST8V2C1	0.076	0.026	0.035	44.223	0.038	0.077	0.086	0.183	0.000	45.995	0.007	0.000	0.005	0.031	0.000	44.398	46.386	-4%
ST9V1C1	0.350	0.030	1.358	49.854	0.325	0.096	0.574	1.626	0.151	51.074	0.018	0.002	0.027	0.056	0.004	51.916	53.627	-3%
ST9V2C1	0.322	0.051	1.167	54.795	0.497	0.109	0.461	0.691	0.000	50.314	0.018	0.000	0.006	0.044	0.004	56.832	51.648	10%
ST9V3C1	0.013	0.287	0.501	3.648	0.121	0.000	0.066	0.018	0.121	0.128	0.059	0.003	0.011	0.000	0.014	4.570	0.421	166%
ST9H1C1	0.083	0.000	0.413	32.984	0.392	0.060	0.097	0.117	0.000	35.019	0.009	0.000	0.005	0.012	0.000	33.872	35.319	-4%
ST10V1C1	0.095	0.368	2.270	7.729	0.644	0.037	0.304	0.026	0.152	0.486	0.089	0.004	0.029	0.057	0.025	11.106	1.209	161%

Annexes

ST10H1C1	0.039	0.158	1.000	6.276	0.278	0.040	0.066	0.013	0.086	0.203	0.055	0.004	0.035	0.022	0.014	7.751	0.539	174%
ST11H1C1	0.233	0.578	1.390	45.285	0.421	0.105	0.759	0.534	0.074	43.884	0.050	0.005	0.036	0.050	0.009	47.907	45.505	5%

## Annexe 3 : Article "Influence of climatic factor on cyanobacteria and green algae development on building surface"

## RESEARCH ARTICLE

## Influence of climatic factors on cyanobacteria and green algae development on building surface

Paloma Reboah<sup>1,2</sup>\*, Clarisse Balland Bolou-Bi<sup>1</sup>, Sophie Nowak<sup>3,4</sup>, Aurélie Verney-Carron<sup>2</sup>**1** LEESU, Univ Paris Est Creteil, Ecole de ponts, Creteil, France, **2** Univ Paris Est Creteil and Université Paris Cité, CNRS, LISA, Créteil, France, **3** Université Paris Cité, CNRS, ITODYS, Paris, France, **4** Université Paris Cité and Univ Paris Est Créteil, CNRS, LISA, Paris, France

\* These authors contributed equally to this work.

\* preboah@lisa.lpsl.fr



## OPEN ACCESS

**Citation:** Reboah P, Bolou-Bi CB, Nowak S, Verney-Carron A (2023) Influence of climatic factors on cyanobacteria and green algae development on building surface. PLoS ONE 18(3): e0282140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140>**Editor:** Satheesh Sathianeson, King Abdulaziz University, SAUDI ARABIA**Received:** October 12, 2022**Accepted:** February 8, 2023**Published:** March 6, 2023**Copyright:** © 2023 Reboah et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.**Data Availability Statement:** \*\*\*\*\* PAAT ACCEPT: Please follow up with authors for data available at accopt \*\*\*\*\* DAS HERE\* All NGS files are available from the dryad database (<https://doi.org/10.5061/dryad.5t2rbp7g>). All relevant data are within the manuscript and its [Supporting information files](#).**Funding:** This study was financially supported by Agence Nationale de la recherche MIAM Project-ANR-19-CE22-0006). There was no additional external funding received for this study. The funders has no role in the study design, data

## Abstract

Buildings and monuments are often colonized by microorganisms that can result in colour change and aesthetical and physico-chemical damages. This bio-colonization is dependent of the material and on the environment. In order to better understand and correlate the microbial development at the surface of buildings with meteorological parameters, concentration of green algae and cyanobacteria have been measured using an *in situ* instrument on the wall of a private habitation in the Parisian region during two periods: spring and fall-winter. Different locations were also chosen to assess the influence of the position (horizontal or vertical) and of the situation (shaded vs. sunny microclimate). The results show that the microorganism development rapidly responds to rainfall events but the response is more intense in winter as temperature is lower and relative humidity (RH) higher. Cyanobacteria are less sensitive to this seasonal effect as they are more resistant to desiccation than green algae. Based on all the data, different dose-response functions have been established to correlate RH, rain and temperature to the green algae concentration. The influence of the microclimate is considered via specific fitting parameters. This approach has to be extended to new campaign measurements but could be very useful to anticipate the effect of climate change.

## Introduction

Building materials are affected by different biological and chemical processes that can induce their deterioration. Especially, different microorganisms are able to colonize building materials, like green algae and cyanobacteria in biofilm forms, bacteria, moss, lichen and fungi [1]. Cyanobacteria and algal presence is largely documented on monument surfaces [2–5] and are considered as first colonizers of stone monuments [6–8]. These microorganisms can induce discolorations (dark, green or reddish) on the building surfaces [9]. For example, cyanobacteria and green algae are frequently visible by the presence of colored biofilm

collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

development on building façades [10]. Microorganisms can also deteriorate monuments by biological, physical and chemical actions. Lichen and moss can weaken physically the substrate by hyphae and rhizoids extension in porous network [11]. Microorganisms are attached to the substrate by biofilm formation and its properties of water retention can induce mass expansion due to the volume change and deterioration [12]. A biofilm also increases long-term substrata moisture and can induce a breakdown of the pore network during freezing periods [13, 14]. In addition, cyanobacteria and algae secrete organic acids that can dissolve the minerals. They can also generate organic matter for heterotroph microorganisms and favor their growth [14].

Biological colonization on façade is controlled by extrinsic (environment) and intrinsic factors (building materials) [10]. The main environmental factors are: water availability, temperature, relative humidity and insolation. Water availability is the most important factor for all microorganisms development [2] and light is the key factor for phototrophic microorganisms growth. Algal communities that are associated to high humidity and water retention [12]. In the same way, sufficient water availability combined to medium temperature allow the growth of variety of cyanobacteria, despite to their great resistance to desiccation [2]. Colonization by phototrophic microorganisms, especially cyanobacteria, was correlated with air humidity and light intensity [15]. Other environmental factors, such as temperature, pH or light intensity influence the distribution of microorganisms [12].

Concerning intrinsic factors, biogeochemical deterioration processes are controlled by the chemistry of the substrate and biogeophysical deterioration processes by substrate properties, such as porosity and roughness [2, 16]. However, more and more modern buildings or monuments are covered with plaster on the façade and surrounded by composite materials on the floor, which also undergo deterioration with aesthetically unsightly colorations. Unfortunately, unlike natural stones, these damages are much less documented in the literature. However, even if chemical composition and physical properties (porosity, roughness) of coating or slab are different, they present similarities. For example, plaster is generally composed by a mix of gypsum powder, calcic or dolomitic chalk, sand and water, which is sprayed on walls. Thus, plaster is a cementitious material and has a capillary-porous structure, which can be responsible for many unfavorable phenomena, such as excessive dampness of the material, capillary rise, microbial colonization or crystallization of salts on material surfaces. The objective of this work is therefore to study the biological colonization of materials such as plaster-rendered façade and composite tiles, used for modern housing.

From a methodological point of view, most of the works dealing with microbial colonization used traditional techniques from cultivation in a rich medium until DNA extraction and amplified ribosomal DNA restriction analysis targeting the 16S rRNA genes. These techniques are effective in analyzing the presence of microorganisms at a given time, but unfortunately do not give an indication of their dynamics over time according to climatic factors. Especially, it is very important to know the key parameters controlling their presence and dynamics. Since several years, new non-destructive and fast techniques have been developed to measure the *in situ* concentration of microorganisms. The BenthosTorch (bbe Moldaenke®) is one of this *in situ* instrument allowing a fast benthic microorganism (green algae, cyanobacteria and diatoms) concentration measurement by chlorophyll a fluorescence. This instrument is generally used in river, freshwater or in caves, and recently on ceramic tiles [17].

The objective of our study is to improve our knowledge about the climatic influence on microbial development and their dynamic over time in order to understand the impact of climate change on plaster and tiles deteriorations under temperate climate. For that, two different contrasted seasons were chosen: spring and fall winter.



## Materials and methods

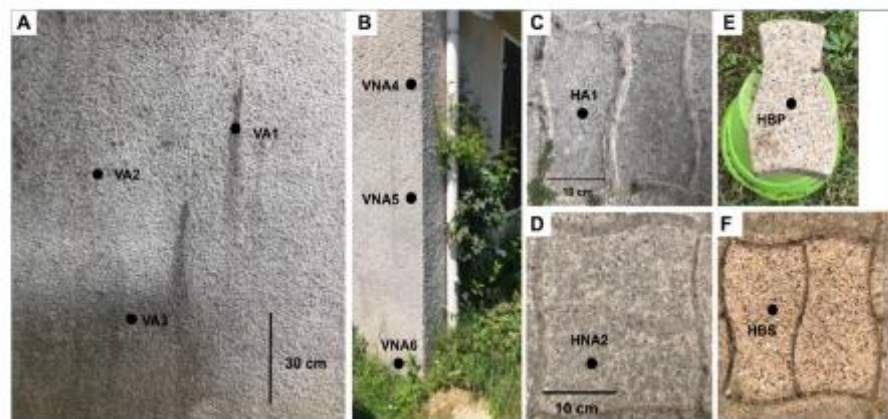
### Site and measurement zones

The studied site is a private habitation located in the Parisian suburb (4° 5' 0" N; 2° 47' 24" E). Access was permitted by the homeowner. In the Parisian region, the climate is described as hot temperate (Cf. Koppen and Geiger classification) with the presence of rainfall in driest months. The annual average temperature is 11.6 °C and annual average rainfall is 693.6 mm for 1981–2010 period (infoclimat.fr).

Two campaigns of measurement were carried out: the first one between May 7th 2020 and June 18th 2020 (spring) and the second campaign between November 5th 2020 and December 30th 2020 (fall-winter). During both campaigns, climatic data (daily mean relative humidity (%), daily mean temperature (°C) and precipitation (mm)) were collected from the Roissy-en-France meteorological station (infodimat.fr).

Different zones of measurements were selected (Fig 1) to assess the role of different parameters: the position, the orientation and the sheltered by a tree or not situation. Vertical zones (wall surfaces) are made out roughcast that is a mix between coarse sand (millimetric clasts) and concrete (Fig 1A and 1B). The horizontally surfaces are composite tiles composed by concrete, pebble clasts (millimetric to centimetric clast size) and bioclats like gastropods (Fig 1C and 1D). Even if the nature of materials is different, the comparison is interesting to assess the role of the position. Indeed, horizontal position can potentially retain more water than vertical position, which influences the microbial diversity [18].

For the vertical surface, two areas were selected: one close to a chestnut (sheltered situation), that limits the direct impact of rain fall (VA with 3 measurement zones, VA1-2-3, at 100, 143 and 182 cm high, respectively, Fig 1A) and favors a high humidity and one not sheltered by the tree (VNA with also 3 zones, VNA4-5-6, at 200, 150 and 15 cm high, respectively, Fig 1B). Vertical surfaces display some colour changes and weathering forms. On VA1, there are reddish runs compared to VA2. VA3 is located in a humid area due to the proximity of a waste bin. The non-sheltered vertical surfaces display less color change. VA2 did not show significant color change, unlike VA1 and VA3 with reddish and greyish coloration, respectively. VA position are located on north oriented facades and VNA on south oriented façade.



**Fig 1. Spring campaign measurement zones.** Vertical positions sheltered by tree (A) and not sheltered (B), horizontal positions sheltered by tree (C), not sheltered (D), horizontal bleach-washed tiles (E & F). E is not in contact with other tiles and soil contrary to F.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.g001>

For the horizontal position, two zones were also chosen, sheltered (HA1) and not sheltered (HNA2) by the tree. Moreover, in order to understand biological colonization behavior, two tiles were cleaned with bleach: one on the soil (HBS, Fig 1F) and one raised on a bucket to avoid lateral contamination (HBP Fig 1E). Measurements on HBP (Fig 1E) was realized only during spring season.

### Characterization of the materials: Plaster and tiles

The studied wall surface is made out of roughcast that is a mix between coarse sand (millimetric clasts) and concrete (Fig 1A and 1B). Presence of  $\text{CaCO}_3$  on surface was determined by HCl test. The mineralogy was determined by X-Ray Diffraction (XRD) using a Panalytical Empyrean powder diffractometer equipped with a PIXcel detector fitted with a Cu anode tube ( $K\alpha_1 = 1.5406 \text{ \AA}$ ) operating at 45 kV and 40 Ma. The crystalline phases were identifying and quantifying with HighScorePlus using ICSD and COD database.

### Biological analyses

Microorganism concentrations (green algae and cyanobacteria) were daily measured on each zone using a BenthosTorch (bbe Moldaenke®). This portable field instrument consists of *in situ* measurement of benthic microorganisms concentration (green algae and cyanobacteria in  $\mu\text{g chl-a/cm}^2$ ) using *in vivo* fluorescence of chlorophyll on various substrates such as stones and sediments. The BenthosTorch directly calculates the biomass based on the chlorophyll-a content and determines the distribution over the different categories of algae. All measurements were conducted in triplicate and realized each day evening (~9 pm).

### DNA extraction and NGS of 16S and ITS

As significant differences have been observed between vertical spots for spring and winter seasons, the sequencing was focused on these vertical positions. Sampling with sterile swab stick has been realized on each point of BenthosTorch measurement on July 23, 2021. Total genomic DNA was extracted from sampling swab with Fast DNA SpinKit for Soil (MPBio®) according to manufacturer's instructions. DNA extract was amplified and sequenced on Eurofins genomics platform for 16S on V3-V5 region for bacteria and ITS on ITS1 region for fungi. Green algae were not sequenced. Sequencing data analyses were performed on FROGS pipeline. FROGS allow to obtain abundance table of operational taxonomic unit (OTU) and their taxonomic affiliations. Databases used for taxonomic affiliation are Silva 138 for 16S and UNITE 8.0 for ITS. Alpha-diversity and Beta-diversity indices were calculated using Easy 16S, Migale platform to observe the richness of each sample and the phylogenetic difference between the samples, respectively.

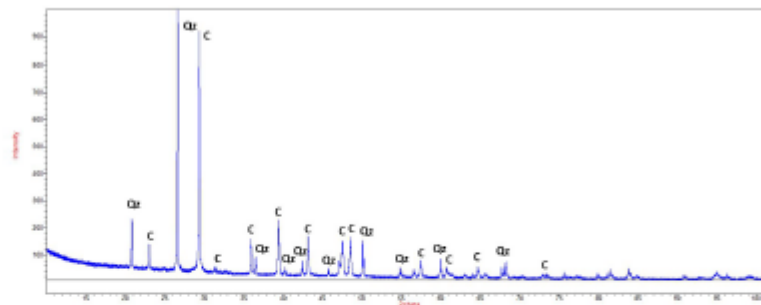
### Data treatment

Statistical analyses were carried out using Rstudio® for the Pearson correlation matrices. Data have been fitted using Matlab®.

## Results

### Mineralogical composition of materials

Wall surfaces are covered by a plaster roughcast that is a mix between coarse sand (millimetric clasts) and concrete (Fig 1A and 1B). XRD analyses on the surfaces indicate that the plaster is mainly composed by 45% of calcite and 55% of quartz (Fig 2). The horizontally surfaces are



**Fig 2.** XRD analysis of the wall vertical surfaces. Cis for calcite (00-900-9666) and Qz for quartz (00-900-0095) from COD 1906 database.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.g002>

composite tiles composed by concrete, pebble clasts (millimetric to centimetric clast size) and biodcasts like gastropods (Fig 1C and 1D).

### Climatic data

The climatic data are presented in Table 1. The total precipitation quantity is 57.8 mm for the spring period (from May 7th 2020 to June 18th 2020) and 133.4 mm for the fall-winter period (from November 5th 2020 to December 30th 2020). The average temperature is 16.4°C during the spring period and 7.9°C during the fall-winter one. During the studied spring season, daily temperature varies between 4.4°C and 15.9°C and during fall-winter season, between 2.1°C and 9.7°C. Relative humidity (RH) data also show significant differences for both periods. The percentage of time corresponding to the 3 categories RH < 40% (dry air), 40 < RH < 80% (medium air humidity), and RH > 80% (wet air) was calculated. During spring season, the major part of time (65%) air has a RH between 40% and 80%. Dry air period represents 15% of time and 20% of time for wet air. In the fall-winter season, no dry air (RH < 40%) was recorded. Air is considered wet with 78% of time of RH superior to 80%. In summary, the fall-winter period was cold, humid and rainy and the spring period was relatively hot and dry.

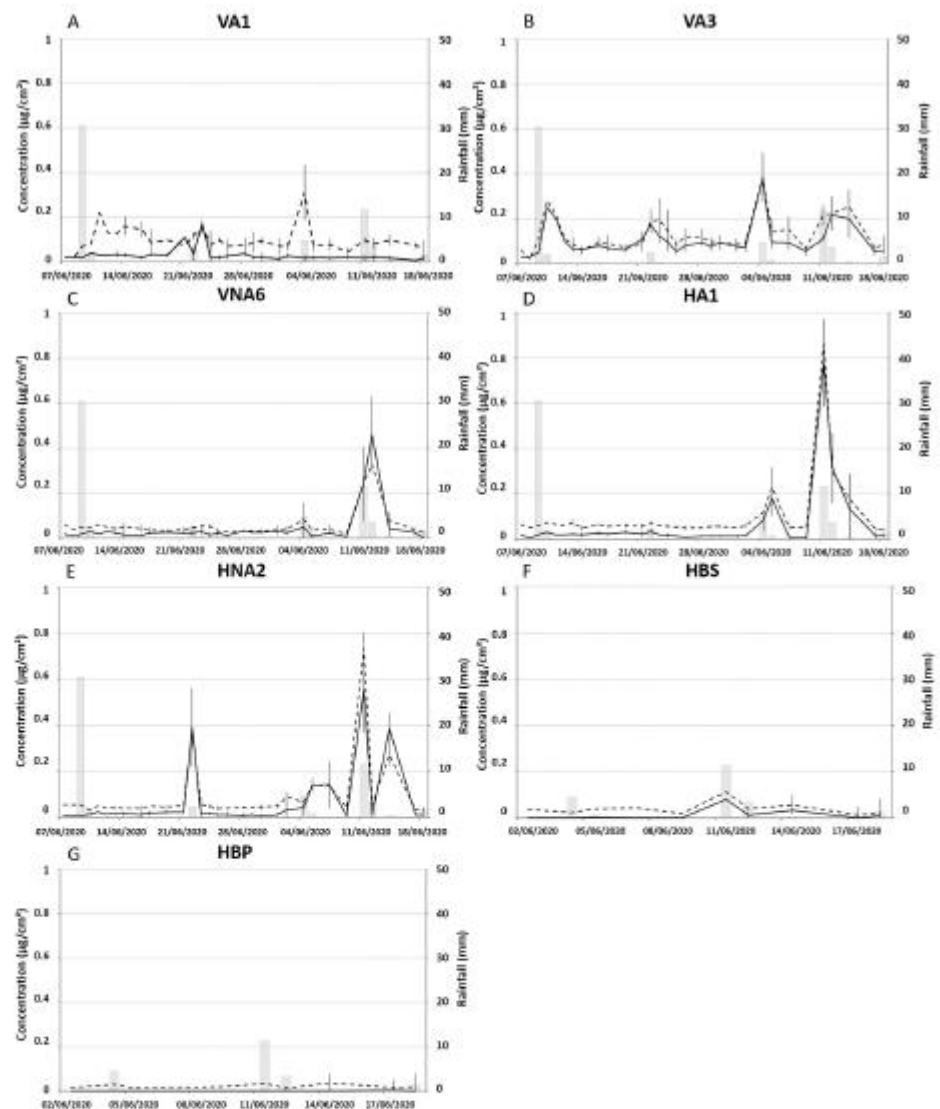
### Concentrations in cyanobacteria and green algae

**Spring period.** For VA2, VNA4 and VNA5, the concentrations remained always lower than limit of detection of the apparatus (0.02 µg/cm<sup>2</sup>, S1 Table). In the sheltered zones, for VA1 and VA3 (Fig 3A and 3B), the concentrations of green algae and cyanobacteria varied between 0.02 and 0.38 µg/cm<sup>2</sup> and the concentrations in cyanobacteria were systematically higher than green algae. Rainy events are followed by a strong increase in cyanobacteria

**Table 1.** Climatic data.

	Spring	Fall-winter
Monitoring period	05/07/2020–06/18/2020	11/05/2020–12/30/2022
Total precipitation (mm)	57.8	133.4
Average temperature (°C)	16.4	7.9
Temperature min-max	4.4–15.9	2.1–9.7
RH dry (<40%)	15	-
RH medium (40%<RH<80%)	65	22
RH wet (>80%)	20	78

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.t001>



**Fig 3.** Evolution of microbial concentration (cyanobacteria and green algae) associated with rainfall event for the spring season campaign: For vertical (VA1 (A), VA3 (B), VNA6 (C)), horizontal positions (HA1 (D) and HNA2 (E)) and bleach washed tiles (HBS (F) and HBP (G)). Each point and bar represent the mean and standard deviation based on three replicates.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.g003>

concentration for VA1, contrary to green algae concentration that seems to be less sensitive. For VA3, cyanobacteria and green algae displayed the same concentrations and have the same behavior with a proliferation more important during a rainy event.

In the unsheltered zone (Fig 3C), targeted microorganism concentrations remained low except after the 06/11 rainfall event, where a peak is observed for VNA6 (located near soil and plants (~10 cm)) that reached  $0.30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for cyanobacteria and  $0.42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for green algae.

On the other hand, there is no increase of microorganism concentrations after the 05/09 rain event due to the drying before the measurement. However, measurements were made at 9pm and the rain event took place between 11pm and 1am.

For HA1 and HNA2 (Fig 3D and 3E), cyanobacteria and green algae had the same concentration and the same behavior. Horizontal positions display similar results to VNA6 (Fig 3C) with an increase of microbe concentrations during rainy event until  $0.82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for HA1 and  $0.70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for HNA2. The absence of peak is also observed after the rainy event of 05/09 due to the drying before the measurement. Indeed, one of our hypothesis was that during a rain event, the increase of concentration observed was due to a contamination of the paving stones placed right next to each other. Initially, the concentration was lower than the detection limit indicating that algae were completely killed after washing. For HBP (Fig 3G), concentrations remain low or null. For HBS (Fig 3F), the concentrations are under the detection limit for green algae and around  $0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for cyanobacteria until the 11/06/2020, where the concentration increases until  $\sim 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for both types of algae just after a rain event, which confirms our hypothesis.

**Fall winter period.** During this period, the influence of the tree and its sheltering effect was less relevant than in spring (Fig 4). For vertical positions (VA and VNA) (Fig 4A–4F), the concentration evolution was similar for the 6 zones. However, variations are more pronounced for VA3 (like in spring) (Fig 4C) and especially for VNA6 (Fig 4E), where lichen formation is visible close to the soil (and vegetation) and sensitive to capillary rise (Fig 1B). For horizontal positions (Fig 4G and 4H), algae concentrations for HA1 were slightly higher than HNA2 and reached  $1.93 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for HA1 and  $1.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for HNA2. This can be explained by some preferential runoffs in the HA1 area. Whatever the position, the concentration of green algae and cyanobacteria are 5 to 50 times more important in winter than in spring and reached  $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

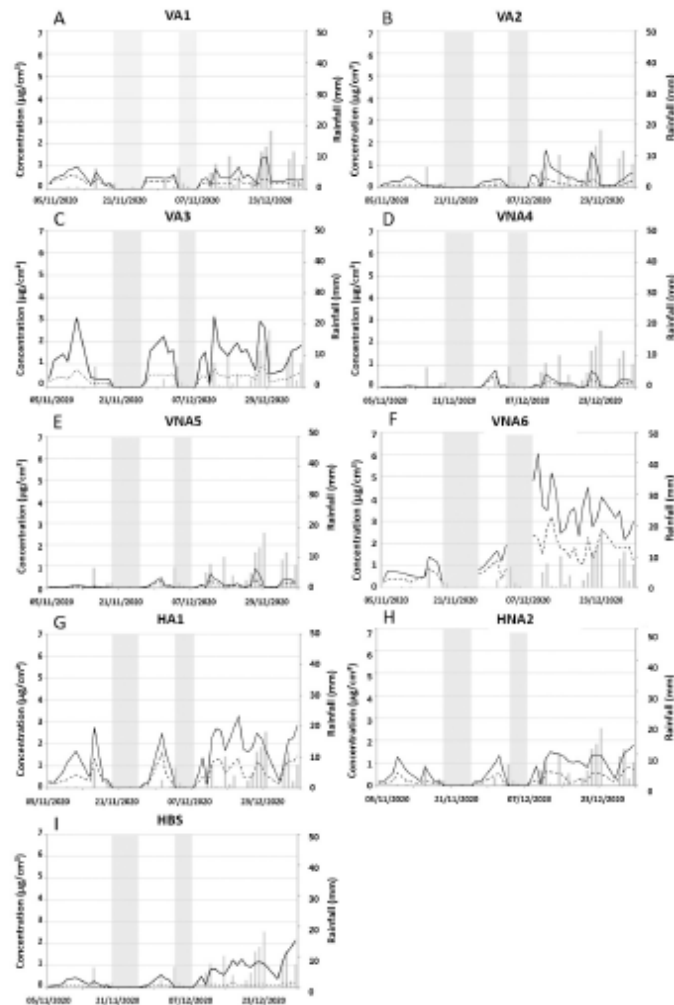
Microorganism cumulative concentrations (Fig 5) showed an important concentration in winter, up to  $\sim 47.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for cyanobacteria and  $87.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for green algae, than in summer with a maximum of  $4.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for cyanobacteria and  $3.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for green algae. The highest concentrations of microorganisms are observed at the end of the campaign during the rainiest period. Whatever the position, green algae concentrations were always higher than cyanobacteria.

### Microbial community on building surfaces

The investigation on microbial communities were carried out on vertical surfaces. Unfortunately, for VA2, VNA4 and VNA5 the genome sequencing was unsuccessful due to the low concentrations.

**Fungi.** Fungi identification is presented in Table 2. Fungal communities showed the same trend whatever the position with a predominance of Lecanoromycetes class (48.8% for VA1, 38.2% for VA3 and 67.7% for VNA6) followed by Dothiedomycetes class (24.6% for VA1, 14.8% for VA3 and 18.2% for VNA6). At VNA6 position, two other classes were significant: Eurotiomycetes with 3.3% and Sordariomycetes with 2.2%. Some fungal species were particularly well represented on all positions such as *Teloschistaceae sp.* (VA1: 4.4%, VA3 12.3% and VNA6 50.1%), *Vermiconia calcicola* (VA1 18.7% and VNA6 16.8%), *Solenospora sp.* (VA1 35.2% and VNA6 1.5%). Other species were present in significant proportions according to their position such as *Catillaria lenticularis*, *Pleosporales sp.* for VA1 position, *Lecanorales sp.* and *Cladosporium delicatulum* for VA3 position or *Verrucariaceae sp.* and *Stilbella sp.* for VNA6 position.

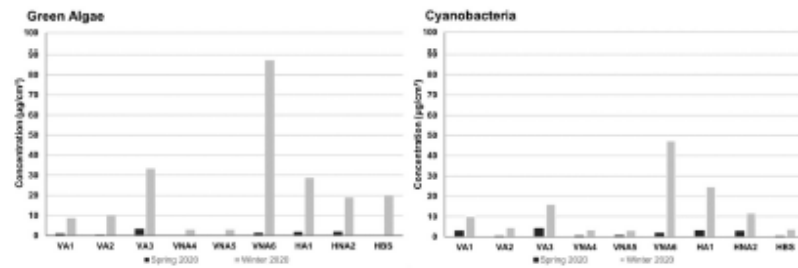
**Bacteria.** For bacteria (Table 3), as a function of their positions, more classes were represented on VA1 and VNA6 position with predominance of Alphaproteobacteria (54% and



**Fig 4. Evolution of microbial concentration (cyanobacteria and green algae) associated with rainfall event in the fall-winter season.** For vertical sheltered (VA1 (A), VA2 (B), VA3 (C)), vertical non-sheltered (VNA4 (D), VNA5 (E), VNA6 (F)), horizontal positions (HA1 (G) and HNA2 (H)) and bleach washed tiles (HBS (I)). Each point and bar represent the mean and standard deviation based on three replicates. Grey zones correspond to the absence of measurements.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.g004>

61.8%, respectively). In these positions, five other classes were represented: Deinococci, Actinobacteria, Cyanobacteria, Abditobacteria and Bacteroidia. By contrast, for VA3, the major class present is Gammaproteobacteria with 87.5% followed with Alphaproteobacteria with 8.1%. In VA1 and VNA6 positions, genera *Sphingomonas* and *Truepera* are well represented with 28.2% and 24.9%, respectively, for VA1 and 28.4% and 9.3% for VNA6 positions. Other genera are present with proportions below 10% such as *Rubellimicrobium*, MN 122.2a, *Acidiphilium*, *Abditobacterium*, *Aureimonas* and *Friedmanniella*. VA3 has three major genera *Pseudomonas* (83.4%), *Janthinobacterium* (2%) and *Sphingomonas* (2.5%). The Cyanobacteria identification at genera level was not possible on these samples.



**Fig 5. Cumulative microorganism concentrations (green algae and cyanobacteria) for different measurement areas and seasons: Spring and fall-winter.** (Sum of each concentration by day of measurement). HBP is not presented because measurements were realized only during the spring season.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.g005>

**Alpha-diversity.** Different indices relative to the Alpha-diversity have been calculated (Table 4). The three positions: VA1, VA3 and VNA6 showed similar Shannon's and Simpson's diversity index for fungi (3.05, 3.04 and 3.02, respectively, for Shannon's index and 0.87, 0.87 and 0.88 for Simpson's index). These values show that the microbial communities are relatively

**Table 2. Percent of fungi species identify for each sample.** 'Others' corresponds to non-identified species.

Sample	Phylum	Class	Species	Relative abundance	
VA1	Ascomycota	Dothiedomycetes		48.8	
			<i>Pleosporales sp.</i>	4.4	
			<i>Vermiconia calcicola</i>	35.2	
			<i>Candelariella aurella</i>	4.3	
			<i>Catillaria lenticularis</i>	2.3	
			<i>Others</i>	2.6	
		Lecanoromycetes		24.6	
			<i>Solenopsora sp.</i>	18.7	
			<i>Teloschisteeae sp.</i>	3.2	
			<i>Others</i>	2.7	
VA3	Ascomycota	Lecanoromycetes		38.2	
			<i>Lecanorales sp.</i>	21.8	
			<i>Teloschisteeae sp.</i>	12.8	
		<i>Others</i>	3.6		
		Dothiedomycetes		14.8	
			<i>Clasporium delicatulum</i>	5.9	
			<i>Others</i>	8.9	
			VNA6	Ascomycota	Lecanoromycetes
<i>Teloschisteeae sp.</i>	50.1				
<i>Solenopsora sp.</i>	1.5				
<i>Others</i>	16.1				
Dothiedomycetes		18.2			
	<i>Vermiconioa calcicola</i>	16.8			
	<i>Others</i>	1.4			
	Eurotiomycetes		3.3		
<i>Verrucariaceae sp.</i>		2.7			
<i>Others</i>		0.6			
Sordariomycetes			2.2		
		<i>Stilbella sp.</i>	2.2		

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.t002>

Table 3. Percent of bacteria genus identify for each sample. 'Others' corresponds to non-identified species.

Sample	Phylum	Class	Genus	Relative abundance
VA1	Proteobacteria	Alphaproteobacteria		54
			<i>Sphingomonas</i>	28.2
			<i>Rubellimicrobium</i>	6.5
			<i>MN 122.2a</i>	5.2
			<i>Acidiphilium</i>	3.6
			<i>Others</i>	10.5
		Actinobacteria		7.5
	Deinococcota	Deinococci		24.9
			<i>Truepera</i>	24.9
	Cyanobacteria	Cyanobacteria		7.3
Abditibacteriota	Abditibacteria		4.8	
		<i>Abditibacterium</i>	4.8	
VA3	Proteobacteria	Gammaproteobacteria		87.5
			<i>Pseudomonas</i>	83.4
			<i>Janthinobacterium</i>	2
			<i>Others</i>	2.1
		Alphaproteobacteria		8.1
			<i>Sphingomonas</i>	2.5
			<i>Others</i>	5.6
VNA6	Proteobacteria	Alphaproteobacteria		61.8
			<i>Sphingomonas</i>	28.4
			<i>Rubellimicrobium</i>	7
			<i>MN 122.2a</i>	3.2
			<i>Acidiphilium</i>	3.9
			<i>Aureimonas</i>	7.5
			<i>Others</i>	11.8
	Actinobacteriota	Actinobacteria		11.6
			<i>Fiedmaniella</i>	2
			<i>Actinoplanes</i>	2.2
			<i>Others</i>	7.4
	Deinococcota	Deinococci		9.3
			<i>Truepera</i>	9.3
	Cyanobacteria	Cyanobacteria		5.7
	Abditibacteriota	Abditibacteria		3.9
<i>Abditibacterium</i>			3.9	
Bacteroidota	Bacteroida		4.8	

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.t003>

similar for sheltered and non-sheltered samples. Unlike fungi, bacteria diversity differed according to their position. VA1 and VNA6 showed higher Shannon's and Simpson's index than VA3 (3.51, 4.39 and 2.24, respectively, for Shannon's index and 0.93, 0.97 and 0.71 for Simpson's index). Therefore, there is an influence of the sheltered or not situation on the bacteria diversity. To summarize, the fungal species diversity for these positions are equivalent and the bacterial species diversity is higher for VA1 and VNA6 positions compared to VA3.

**Beta-diversity.** Fungal Bray Curtis dissimilarity (Table 4) had high values, about 0.77 for VA1-VNA6 and 0.95 for VA1 and VA3, which indicated a different fungal composition on each position. For bacteria, Bray-Curtis dissimilarity was 0.54 for VA1-VNA6 and 0.94 for



Table 4. Microbial diversity index for VA1, VA3 and VNA6 positions.

Fungi							
Beta-diversity				Alpha-diversity			
	VA1	VA3	VNA6	Observed	Chao1	Shannon	Simpson
VA1	0	0.95	0.77	311	386.04	3.05	0.87
VA3		0	0.87	439	489.9	3.04	0.87
VNA6			0	313	366.47	3.02	0.88
Bacteria							
Beta-diversity				Alpha-diversity			
	VA1	VA3	VNA6	Observed	Chao1	Shannon	Simpson
VA1	0	0.94	0.54	260	300.83	3.51	0.93
VA3		0	0.89	312	369	2.24	0.71
VNA6			0	355	370	4.39	0.97

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.t004>

VA1-VA3. This shows that bacterial community were very different between VA1 and VA3, unlike VA1 and VNA6 that had intermediate similarity.

### Correlation between biological measurements and environmental parameters

Pearson correlation matrices (Table 5) were calculated between different independent meteorological parameters (daily mean temperature, daily mean relative humidity, daily cumulative rainfall) and green algae and cyanobacteria daily concentrations for vertical positions to determine which factors control the presence of algae and cyanobacteria. Results show that there is a good correlation between algae and cyanobacteria concentrations, which highlights that they have a similar evolution and relatively similar values. Concerning meteorological parameters, there is a good correlation of algae and cyanobacteria concentration with RH, especially for VA3, VNA6 that are the locations that remain the wettest. The correlation with rainfall is positive but less significant. On the contrary, the correlation with temperature is negative.

Table 5. Pearson correlation matrix realized on 6 samples of different meteorological parameters and benthic microorganisms concentration in vertical positions.

VA1-VA2						VNA4-VNA5					
	T°	RH	P	Algae	Cyano		T°	RH	P	Algae	Cyano
T°	1	-0.71	-0.02	-0.34	-0.42	T°	1	-0.71	-0.02	-0.32	-0.42
RH		1	0.29	0.57	0.55	RH		1	0.29	0.48	0.46
P			1	0.29	0.14	P			1	0.39	0.32
Algae				1	0.64	Algae				1	0.88
Cyano					1	Cyano					1
VA3-VNA6											
	T°	RH	P	Algae	Cyano		T°	RH	P	Algae	Cyano
T°	1	-0.71	-0.02	-0.54	-0.64						
RH		1	0.29	0.73	0.79						
P			1	0.19	0.22						
Algae				1	0.95						
Cyano					1						

T°: daily mean temperature in Celsius degree, RH: Daily mean relative humidity in percentage, P: daily cumulative rainfall in millimeter, Algae: green algae daily concentration in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  and Cyano: cyanobacteria daily concentration in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.t005>

**Table 6.** Fitting parameters of green algae concentration as a function of relative humidity (RH) for not-rainy days using a power law (Eq (1)): A, a-range for a 95% confidence interval, b, b-range for a 95% confidence interval, R<sup>2</sup>.

Position	a	a-range (95%)	b	b-range (95%)	R <sup>2</sup>
VA1-VA2	0.507	(0.376;0.639)	7.83	(5.73;9.94)	0.7056
VNA4-VNA5	0.096	(0.052;0.140)	10.00	(5.66;14.34)	0.4444
VA3	1.494	(1.017;1.971)	5.40	(3.33;7.48)	0.7111
VNA6	11.78	(9.52;14.04)	12.41	(10.38;14.44)	0.9364

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.t006>

Based on this correlation matrix, a dose-response function (DRF) that correlates meteorological parameters and the biological colonization on vertical surfaces was developed. On horizontal surfaces, contamination can occur. It was also decided to focus on green algae concentration as cyanobacteria concentration is relatively similar. The dataset is given in [S1 Table](#). Then, the green algae concentration as a function of RH (Fig 7) was fitted using a power law and only considering the data for days without rain:

$$[\text{green algae}] = a * RH^b \quad (1)$$

Four sets of data were used separately: VA1 and VA2; VA3; VNA4 and VNA5; VNA6. Parameters of Eq (1) are given in [Table 6](#).

As green algae concentration is generally higher for rainy days, the rain parameter was added in the DRF:

$$[\text{green algae}] = a * RH^b + \frac{\text{rain}}{c} \quad (2)$$

Different values of c were tested to fit the data. It was noted that c is around 20 in fall-winter and 40 for spring. This is consistent with previous observations that rain leads to higher biological development in winter. Thus, as there is approximately a factor 2 between average temperature (T) during the spring period (16.4 °C) and during the fall-winter (7.9 °C), c was estimated to be equal to 2.5 / T to take into account this seasonal effect:

$$[\text{green algae}] = a * RH^b + \frac{\text{rain}}{2.5 * T} \quad (3)$$

Therefore, 4 dose-response functions were established for the 4 situations: sheltered from tree but exposed to sun (VA1-VA2), sheltered from tree and few exposed to sun (VA3), not sheltered and exposed to sun (VNA4-VNA5), not sheltered and close to soil (VNA6), respectively:

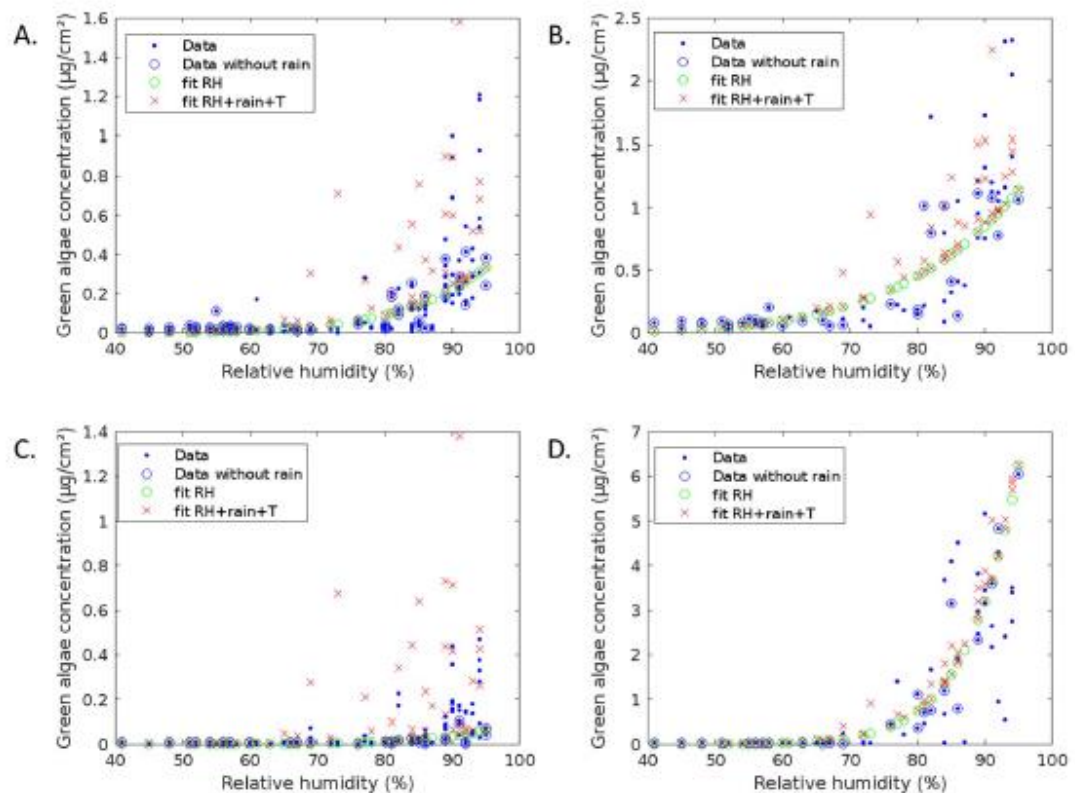
$$[\text{green algae}] = 0.5 * RH^{7.8} + \frac{\text{rain}}{2.5 * T} \quad (4)$$

$$[\text{green algae}] = 1.5 * RH^{6.4} + \frac{\text{rain}}{2.5 * T} \quad (5)$$

$$[\text{green algae}] = 0.1 * RH^{10.0} + \frac{\text{rain}}{2.5 * T} \quad (6)$$

$$[\text{green algae}] = 11.8 * RH^{12.4} + \frac{\text{rain}}{2.5 * T} \quad (7)$$

[Fig 6](#) shows that the results are the best for VNA6 and VA3. This can be explained by a higher and longer humidity of these zones (close to the ground), which leads to lower contrast



**Fig 6. Green algae concentration as a function of RH.** Measured data (blue points = all, blue circles = only data for day without rain) and data calculated using DRF by considering only RH (Eq (1), Table 6, green circles) or RH, rain and T (Eq (3), red crosses) for each situation: A. VA1 and VA2 (Eq (3) becomes Eq (4)); B. VA3 (Eq (5)); C. VNA4 and VNA5 (Eq (6)); D. VNA6 (Eq (7)).

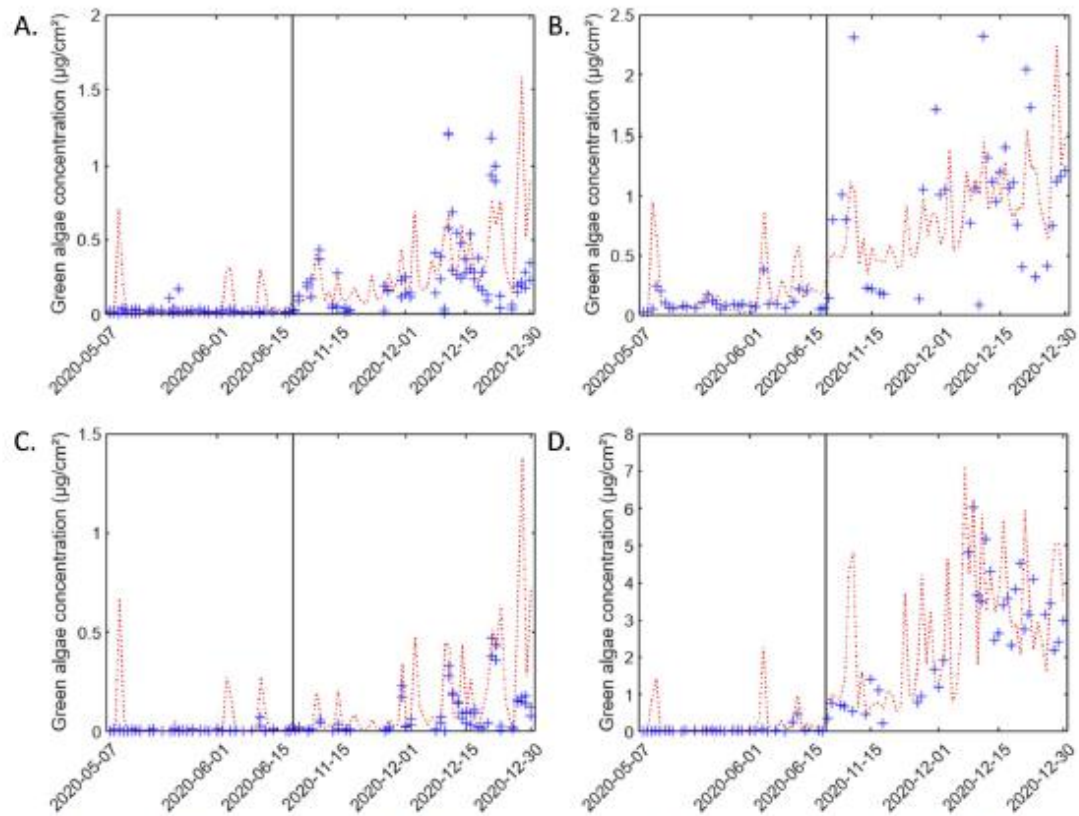
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.g006>

between wet and dry periods. This can be seen by the lower gap between data with and without rain. However, the fitting of the data is quite good.

Then, the calculated values have been compared to measured data as a function of time (Fig 7). Results are relatively consistent. For spring, some peaks of green algae can be explained by meteorological parameters, but some cannot. Generally, in spring some increases of the green algae concentration are predicted by the DRF and not measured by BenthosTorch. In some cases, this is because the measurement has been done before the rain event. For the fall-winter period, the general trend and the variations are well simulated by the DRF, sometimes with a slight shift.

## Discussion

The objective of this study was to improve the understanding about the climate influence on microbial development and their dynamic over time in order to understand the impact of climate (change) on plaster and tiles deteriorations under temperate climate during two contrasted seasons: spring and fall-winter.



**Fig 7. Temporal evolution of green algae concentration.** Measured data (blue points) and data calculated using DRF (red line) for each situation: A. VA1 and VA2 (Eq (4)); B. VA3 (Eq (5)); C. VNA4 and VNA5 (Eq (6)); D. VNA6 (Eq (7)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282140.g007>

### Influence of the climate on algae and cyanobacteria concentrations

The cumulative concentration in microorganisms (Fig 5) vary according to the season, to their location on the wall, to the orientation (vertical vs. horizontal) and to the sheltered or unsheltered from the tree situation. This can be explained by differences of time of wetness that is dependent on temperature, rain amount, relative humidity and insolation. The differences of behavior as a function of microorganisms gives also some clues.

Globally, for vertical samples, the microorganisms concentrations are systematically higher in winter than in spring. Regarding the environmental data registered for both periods (see §3.2), the temperature is lower in winter than in spring, whereas precipitation (133.4 mm after 55 days in fall-winter vs. 57.8 mm after 42 days in spring) and RH (78% of time where  $RH > 80\%$  in fall-winter vs. 19% of time in spring) are higher. This indicates that humidity favors the microbial development. These results are consistent with the literature [19].

For horizontal samples, after each rainfall event, a proliferation of microorganisms was observed whatever the season. However, it can result from the contamination of the paving stones close to the measured one. The comparison with a previously bleach-cleaned tile

confirmed that this proliferation is caused by the remobilization of microorganisms present on the stones.

For vertical samples, the results show also differences according to the sheltered from the tree or not situation. VA samples have generally higher values than VNA samples except for VNA6 that is close to the ground and can be affected by rising damp. This shows that the tree contributes to keep the surface humid. Beyond temperature, rain and humidity that are key parameters for the proliferation of microorganisms, local factors such as insolation must also be taken into account [20]. As it is a parameter difficult to quantify on cumulative time periods, we can qualitatively distinguish two microclimates. The first one the north façade under the tree (VA measurements) is associated to a "shaded microclimate" and is characterized by an important development of microorganisms. Locally, the temperature is lower and the wall surface remains wetter longer. The second microclimate corresponds to a "sunny microclimate" (VNA measurements) with the façade exposed at south and a lower development of microorganisms. A "sunny microclimate" can induce more thermal stress on the surface leading to a decrease in the concentrations of cyanobacteria and green algae because of direct solar exposition inducing higher rapid temperature variations, especially during sunny days [21]. Ortega-Morales et al. 2013 [22] have shown that solar irradiation could be the most important factor to microbial development due to a high radiation reducing the time of wetness and increasing the UV exposure.

Cyanobacteria concentrations are less sensitive to the season than green algae. Also, in spring, cyanobacteria concentrations were higher than green algae concentrations whatever the positions (horizontal and vertical), whereas in winter, green algae concentrations were higher than those in cyanobacteria excepted for some vertical positions. The difference between cyanobacteria and green algae can be explained by the ability of cyanobacteria to survive and recover faster from desiccation than algae [19]. Their predominance in spring can also be explained by their ability to resist to high temperature variations [8]. They are less sensitive to dryness and to intense solar radiation [20]. These results are in accordance with those of Quagliarini et al. 2019 [23] that have highlighted a good correlation between green algae concentration in low temperature and cyanobacteria concentration in higher temperature.

### Expected effects of the climate change on the microorganism development dynamics

Based on the examination of data and on statistical analyses, dose-response functions have been established (Eqs (4) to (7)) for green algae concentration. They take into account global parameters: RH, rain and temperature. However, the results show significant differences as a function of the microclimate (insolation that depends on potential shelter such as the tree, proximity to the ground that can be affected by rising damp, etc.). At this stage, these local effects that are difficult to quantify using general and averaged parameters are integrated using specific fitted parameters for each situation or microclimate.

These DRF have of course to be completed by new measurements campaigns and are at this stage relatively specific. However, they confirmed the influence of key parameters, they give a first estimation of the contribution of each of them and they could be used to assess the potential effects of climate change. For example, the Parisian climate during 1901–2000 period showed an increase of annual mean temperature of 1.6°C and precipitation of 13% with an acceleration on second part of the century (Parisian climate agency 2021). Short-duration extreme precipitations will be intensified for all scenarios [24]. The Volume 4 of the report "France's Climate in the 21st Century" [25] presents climate change scenarios in France up to 2100. By 2021–2050, the models predict an increase in average temperature between 0.6 and

1.3°C compared to the reference average calculated over the period 1976–2005 and a slight increase in average precipitation both in summer and winter (between 0 and 0.42 mm/day on average over France). Relative humidity previsions show that in winter, relative humidity will increase in December–February period [26]. As temperature and rain have contradictory effects, it is difficult to precisely anticipate the algal development. However, it is probable that the increase of rain and humidity will lead to an increase of the cumulative microorganisms concentration. This biological proliferation will add to other harmful effects, such as salt crystallization [27].

### The biodiversity on plaster and composite materials

In this paper, we focused on the monitoring of green algae and cyanobacteria concentration. However, literature data have shown the influence of a huge kind of microorganisms for the deterioration of buildings. Our analysis of the bacterial and fungal diversities using next generation technique permits to support the literature data. At our knowledge, no studies have reported NGS analysis on plaster of modern building and on the influence of microclimate on microbial diversity. The calculation of the Beta-diversity for each position have highlighted an effect on the microclimate on the microbial diversity whatever the kind of microorganisms (fungi and bacteria). VA1 and VA3 positions have very similar microbial community with Beta-diversity index of 0.95 for fungi and 0.94 for bacteria. The comparison of these positions with VNA6 shows lower dissimilarity index, which highlights the microbial communities difference between VA1, VA3 and VNA6. For fungi, two species are added on VNA6 in comparison with VA1 and VA3: *Verrucariaceae sp.* and *Stibella sp.* The first one is well known to be a lichenized-fungi, in symbiont often with green algae, and lives frequently on rock surface [28]. *Stibella sp.* belongs to Sordariomycetes that are essentially parasites and are involved in decomposition and nutrient cycling [29].

Moreover, bacteria present on building surface are common to microbial community observed on limestone around the world [30, 31]. Genera *Truepera* and *Rubellimicrobium* have been observed and are known to be alkanophilic and largely present on limestone surface [32]. *Sphingomonas* genus, dominant on vertical surfaces, has been identified on different rock type surfaces [15, 33]. *Abditobacterium* genus has been identified on stone surfaces of Chinese monuments [15] and on different cemetery locations [32]. Gammaproteobacteria is the most abundant phylum on VA3, representing 87.5%. Among this phylum, *Pseudomonas* genus is the most represented, followed by *Sphingomonas* and *Janthinobacterium* genera. *Pseudomonas* are ubiquitous. *Janthinobacterium* can produce blue-violet pigment, visible on the surface. Thus, the bacterial and fungal communities compositions analyses on plaster is very similar to what is observed on limestone that is a very common material of more ancient buildings.

### Conclusion

This study is a first attempt to monitor the biological development on building surfaces at the daily scale as a function of meteorological parameters to assess the reactivity and the dynamics of this development. The results show that BenthosTorch is a suitable tool to perform this fine monitoring as peaks of green algae and cyanobacteria occur a few hours after a rain event. The data also highlights that the colonization by these photolithotrophic microorganisms is more important in winter than in spring and is very dependent of water availability (relative humidity, rain and capillarity rise). From the data, it was possible to implement first dose-response functions that correlate the microbial development to the environmental parameters. They need to be improved to account for the microclimate effect.

## Supporting information

**S1 Table. Meteorological data and microbial concentration for each positions.** (temperature T in °C, relative humidity RH in %, rain quantity in mm) and concentrations of green algae ('algae') and cyanobacteria ('cyano') for each day of the 2 measurements campaigns. (DOCX)

## Acknowledgments

The authors acknowledge the INRA MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRA, 2018. Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing help and support.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Aurélie Verney-Carron.

**Formal analysis:** Sophie Nowak.

**Writing – original draft:** Paloma Reboah, Clarisse Balland Bolou-Bi, Aurélie Verney-Carron.

**Writing – review & editing:** Paloma Reboah, Clarisse Balland Bolou-Bi, Aurélie Verney-Carron.

## References

1. ICOMOS. Illustrated glossary on stone deterioration patterns. 2008. [http://www.icomos.org/publications/monuments\\_and\\_sites/15/pdf/Monuments\\_and\\_Sites\\_15\\_ISCS\\_Glossary\\_Stone.pdf](http://www.icomos.org/publications/monuments_and_sites/15/pdf/Monuments_and_Sites_15_ISCS_Glossary_Stone.pdf)
2. Macedo MF, Miller AZ, Dionísio A, Saiz-Jimenez C. Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: An overview. *Microbiology*. 2009; 155: 3476–3490. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032508-0> PMID: 19778966
3. Samad LK, Adhikary SP. Diversity of Micro-algae and Cyanobacteria on Building Facades and Monuments in India Lakshmi Kumari Samad and Siba Prasad Adhikary \*. 2008; 23: 91–114.
4. Soares F, Portugal A, Trovão J, Coelho C, Mesquita N, Pinheiro AC, et al. Structural diversity of photoautotrophic populations within the UNESCO site 'Old Cathedral of Coimbra' (Portugal), using a combined approach. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2019; 140: 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.03.009>
5. Rosado T, Dias L, Lança M, Nogueira C, Santos R, Martins MR, et al. Assessment of microbiota present on a Portuguese historical stone convent using high-throughput sequencing approaches. *Microbiol Open*. 2020; 9: 1067–1084. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1030> PMID: 32352657
6. Ortega-Calvo JJ, Hernandez-Marine M, Saiz-Jimenez C. Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *Int Biodeterior*. 1991; 28: 165–185. [https://doi.org/10.1016/0265-3036\(91\)90041-O](https://doi.org/10.1016/0265-3036(91)90041-O)
7. Ortega-Morales O, Montero-Muñoz JL, Baptista Neto JA, Beech IB, Sunner J, Gaylarde C. Deterioration and microbial colonization of cultural heritage stone buildings in polluted and unpolluted tropical and subtropical climates: A meta-analysis. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2019; 143: 104734. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104734>
8. 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: 69–77. <https://doi.org/10.1080/08927010600564712> PMID: 16581671
9. Crispin CA, Gaylarde PM, Gaylarde CC. Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings. *Curr Microbiol*. 2003; 46: 79–82. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3815-5> PMID: 12520359
10. Barberousse H, Ruot B, Yéprémian C, Boulon G. An assessment of façade coatings against colonisation by aerial algae and cyanobacteria. *Build Environ*. 2007; 42: 2555–2561. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2006.07.031>

11. Griffin PS, Indictor N, Koestler RJ. The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories, and treatment. *Int Biodeterior*. 1991; 28: 187–207. [https://doi.org/10.1016/0265-3036\(91\)90042-P](https://doi.org/10.1016/0265-3036(91)90042-P)
12. Ortega-Calvo JJ, Ariño X, Hernandez-Marine M, Saiz-Jimenez C. Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms. *Sci Total Environ*. 1995; 167: 329–341. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04593-P](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04593-P)
13. Saiz-Jimenez C. Biogeochemistry of Weathering Processes in Monuments *Biogeochemistry of Weathering*. *Geomicrobiol J*. 1999; 16: 1: 27–37. <https://doi.org/10.1080/014904599270721>
14. Negi A, Sarethy IP. Microbial Biodeterioration of Cultural Heritage: Events, Colonization, and Analyses. *Microb Ecol*. 2019; 78: 1014–1029. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01366-y> PMID: 31025063
15. Li Q, Zhang B, He Z, Yang X. Distribution and diversity of bacteria and fungi colonization in stone monuments analyzed by high-throughput sequencing. *PLoS One*. 2016; 11: 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163287> PMID: 27658256
16. Warscheid T, Braams J. Biodeterioration of stone: A review. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2000; 46: 343–368. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8)
17. Romani M, Adouane E, Carrion C, Veckerlé C, Boeuf D, Fernandez F, et al. Diversity and activities of pioneer bacteria, algae, and fungi colonizing ceramic roof tiles during the first year of outdoor exposure. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2021; 162. <https://doi.org/10.1016/j.biode.2021.105230>
18. Bailland-Bolou-Bi C, Saheb M, Bousserhine N, Abbad-Andaloussi S, Alphonse V, Nowak S, et al. Effect of microorganism activities in a polluted area on the alteration of limestone used in historical buildings. *ICDCS 2016 Science and Art: A Future for Stone\_vol1*. 2016. pp. 25–32.
19. Popović S, Krizmanić J, Vidaković D, Jakovljević O, Trbojević I, Predojević D, et al. Seasonal Dynamics of Cyanobacteria and Algae in Biofilm from the Entrances of Two Caves. *Geomicrobiol J*. 2020; 37: 315–326. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1700322>
20. Ariño X, Gómez-Bolea A, Llop E, Gomez-Bolea A, Saiz-Jimenez C. Effects of climatic change on microorganisms colonizing cultural heritage stone materials. *Clim Chang Cut Herit*. 2010; 193–198.
21. Huby E, Thomachot-Schneider C, Vázquez P, Fronteau G. Use of micro-climatic monitoring to assess potential stone weathering on a monument: example of the Saint-Remi Basilica (Reims, France). *Environ Monit Assess*. 2020; 192. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08753-w> PMID: 33247413
22. Ortega-Morales BO, Gaylarde C, Anaya-Hernandez A, Chan-Bacab MJ, De la Rosa-García SC, Arano-Rocio D, et al. Orientation affects Trentepohlia-dominated biofilms on Mayan monuments of the Rio Bec style. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2013; 84: 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.ibi.2012.07.014>
23. Quagliariini E, Gianangeli A, D'Orazio M, Gregorini B, Osimani A, Aquilanti L, et al. Effect of temperature and relative humidity on algae biofouling on different fired brick surfaces. *Constr Build Mater*. 2019; 199: 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.12.023>
24. Hosseinzadehtalaei P, Tabari H, Willems P. Climate change impact on short-duration extreme precipitation and intensity–duration–frequency curves over Europe. *J Hydrol*. 2020; 590: 125249. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.125249>
25. Ouzeau G, Déqué M, Jouini M, Planton S, Vautard R. Scénarios régionalisés: édition 2014 pour la métropole et les régions d'outre-mer. *Le Clim la Fra au XXIe siècle*. 2014.
26. Coffel ED, Horton RM, De Sherbinin A. Temperature and humidity based projections of a rapid rise in global heat stress exposure during the 21st century. *Environ Res Lett*. 2018; 13. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aaa00e> PMID: 32618039
27. Birnblecombe P. *Environment and Architectural Stone*. Stone in Architecture: Properties, Durability. Fifth Edition. 2014. pp. 317–347.
28. Thüs H, Muggia L, Pérez-Ortega S, Favero-Longo SE, Joneson S, O'Brien H, et al. Revisiting photobiont diversity in the lichen family varicariaceae (ascomycota). *Eur J Phycol*. 2011; 46: 399–415. <https://doi.org/10.1080/09670262.2011.629788>
29. Zhang N, Castebury LA, Miller AN, Huhndorf SM, Schoch CL, Seifert KA, et al. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*. 2006; 98: 1076–1087. <https://doi.org/10.3852/mycologia.98.6.1076> PMID: 17486982
30. Dyda M, Laudy A, Decewicz P, Romaniuk K, Cieczkowska M, Szajewska A, et al. Diversity of biodeteriorative bacterial and fungal consortia in winter and summer on historical sandstone of the northern Pergola, museum of King John II's palace at Wianow, Poland. *Appl Sci*. 2021; 11: 1–23. <https://doi.org/10.3390/app11020620>
31. Roldán C, Murcia-Mascarós S, López-Montalvo E, Vilanova C, Porcar M. Proteomic and metagenomic insights into prehistoric Spanish Levantine Rock Art. *Sci Rep*. 2018; 8: 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28121-6> PMID: 29968740



32. Brewer T, Fierer N. Tales from the tomb: the microbial ecology of exposed rock surfaces. *Environ Microbiol.* 2018; 20: 958–970. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14024> PMID: 29235707
33. Mihajlovski A, Gabarre A, Seyer D, Bousta F, Di Martino P. Bacterial diversity on rock surface of the ruined part of a French historic monument: The Chaalis abbey. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2017; 120: 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.019>