

Étude et compréhension de la dynamique de colonisation microbienne des matériaux : vers l'élaboration de nouveaux traitements préventifs adaptés aux environnements intérieurs

Responsable scientifique :

Stéphane MOULARAT
Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB)
Direction Santé Confort
Division Agents Biologiques et Aérocontaminants
84, avenue Jean Jaurès – Champs-sur-Marne
77447 Marne-la-Vallée Cedex 2
stephane.moulatat@cstb.fr

Équipes et chercheurs impliqués :

Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB) : Stéphane Moularat, Marjorie Draghi, Isabelle Lacaze, Marina Moletta-Denat, Enric Robine

Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques (LRMH) : Faisl Bousta, Geneviève Oriol

Mots clefs : moisissures, dynamique de colonisation microbienne, diversité microbienne, matériaux, traitements préventifs

CONTEXTE ET OBJECTIFS DU PROJET

Depuis les années 70, la politique d'économie d'énergie, notamment en France, a entraîné une réduction des débits d'air dans les bâtiments et augmenté le risque de condensation sur des surfaces sensibles au développement de micro-organismes. L'OQAI (Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur) a d'ailleurs pu le mesurer : **15% des foyers présentent des contaminations fongiques visibles**, des micro-organismes susceptibles d'induire chez les occupants diverses **pathologies respiratoires** comme des allergies, des infections ou des toxi-infections.

La contamination fongique est un problème majeur et récurrent touchant non seulement les habitations, mais **aussi les établissements patrimoniaux et les œuvres d'art**, avec une variété très large d'espèces fongiques incriminées selon les pays, sujet largement traité dans la littérature scientifique.

A contrario, il existe peu d'études relatives aux associations microbiennes. L'étude d'Andersson, en 1997, fut ainsi la première cherchant à mettre en évidence les espèces bactériennes et fongiques présentes sur divers matériaux de construction dans une crèche. Une grande diversité d'espèces bactériennes fut ainsi identifiée sur des panneaux de plâtre, avec une prédominance des bactéries mésophiles et de *Mycobacterium komossense*.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était :

- **d'étudier et de comprendre la dynamique de colonisation microbienne des supports ;**
- de proposer, à la lumière des résultats obtenus, une **stratégie destinée à protéger les matériaux de la prolifération fongique** avec la mise en œuvre d'un traitement adapté à la problématique des matériaux de construction et de décoration présents dans des logements et/ou des sites patrimoniaux.

PRÉSENTATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE

La colonisation des supports par les moisissures suit trois étapes successives :

- **l'adhésion** qui résulte de forces de diverses natures (forces de van der Waals, électrostatiques...) ;
- **le développement fongique** qui se traduit par la colonisation proprement dite du support et sa biodétérioration ;

- **la dissémination** durant laquelle les spores ou conidies produites par les structures conidiogènes du micro-organisme sont dispersées et peuvent infester d'autres supports de leur environnement.

La phase de **développement fongique*** suit elle-même trois étapes :

- la germination ;
- la croissance ;
- la sporulation.

* En 2001, Osheroev et May étudient et décrivent les différentes phases du cycle de vie asexuel d'*Aspergillus nidulans*. Les conidies sont produites par une structure spécialisée, le conidiophore. Après dispersion et contact avec un milieu adéquat, les conidies germent et donnent naissance à un hyphes. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification de cet hyphes dont l'accroissement s'effectue par le sommet (apex). Les parties terminales constituent les zones actives où se produit l'essentiel des activités de synthèse et de dégradation nécessaires à la croissance et à la reproduction. Ces zones sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules cytoplasmiques contenant les enzymes et les précurseurs de synthèse de la matière cellulaire.

	Matériaux colonisés	Espèces fongiques isolées
Murs et revêtements muraux	Murs	Cladosporium cladosporioides, Eurotium herboriorum, Paecilomyces variotii, Penicillium glabrum
	Peintures	Aspergillus penicillioides, Penicillium brevicompactum, P. chrysogenum , P. glabrum
	Papier peint	Alternaria alternata, Aspergillus penicillioides, A. versicolor , Cladosporium cladosporioides, Paecilomyces variotii, Penicillium brevicompactum, P. chrysogenum , P. glabrum , Trichoderma harzianum,
	Bois	Penicillium brevicompactum
	Colle	Aspergillus versicolor
	Caoutchouc des cadres de fenêtre	Cladosporium cladosporioides
Produits de décoration	Textiles	Aspergillus niger, A. sydowii , Cladosporium cladosporioides, C. herbarum , C. sphaerospermum , Emericella nidulans, Eurotium herboriorum, Penicillium brevicompactum, P. chrysogenum , Trichoderma harzianum, Wallemia sebi,
	Tapis	Emericella nidulans, Eurotium herboriorum, Paecilomyces variotii, Penicillium chrysogenum
	Cuir	Aspergillus niger, A. penicillioides , A. sydowii , Cladosporium sphaerospermum, Paecilomyces variotii
	Archives	Eurotium herboriorum
	Matériaux celluloseux	Aspergillus sydowii, Stachybotrys chartarum
	Caoutchouc vulcanisé	Cladosporium sphaerospermum, Penicillium brevicompactum
	Produits céramiques	Aspergillus versicolor
	Papier	Penicillium glabrum, Wallemia sebi
	Plastiques	Penicillium glabrum
Polyuréthane, tapisserie renfermant de l'arsenic	Aspergillus niger, Cladosporium sphaerospermum	
Systèmes de traitement d'air	Filtres et conduits	Aspergillus fumigatus
	Réservoir d'eau, humidificateur	Exophiala jeanselmei

Tableau 1 : Espèces fongiques isolées de divers matériaux.

La colonisation et le degré de biodétérioration qui en résulte éventuellement dépendent de divers facteurs liés au support (nature, propriétés physicochimiques, état de surface, teneur en eau, pH), au micro-organisme et aux conditions environnementales (humidité relative, température). **La présence de nutriments, une quantité d'eau suffisante et une température appropriée constituent, cependant, les principaux paramètres de germination et de développement des spores fongiques** [température optimale de croissance généralement comprise entre 22 et 35°C pour les espèces fongiques des environnements intérieurs].

Dans les logements, les espèces fongiques les plus couramment isolées appartiennent aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*. Ces **moisissures sont capables de coloniser la plupart des matériaux dès l'instant où le micro-organisme dispose d'une quantité d'eau suffisante** (tableau I).

Sur les sites patrimoniaux, les biens culturels tout comme les environnements intérieurs sont soumis à de nombreux facteurs d'altération, parmi lesquels la biodétérioration qui occupe une place non négligeable. **Les œuvres d'art, telles que les peintures ou fresques**, composées d'un matériau support (cellulose papier, toile, bois, soie tissée...) mais également de colles, glus, émulsifiants ou épaississants, autant de composés biodégradables par les micro-organismes, **peuvent subir de dommages esthétiques irréversibles***.

** La croissance des microflores et les produits de leur métabolisme peuvent causer sur les œuvres des dommages esthétiques. Les cyanobactéries et les algues sont capables de prospérer sur des fresques et les façades des bâtiments exposés à la lumière. Sur les fresques murales, les primocolonisateurs sont des bactéries nitrifiantes et des bactéries appartenant au cycle du soufre, qui jouent un rôle important dans la détérioration des pierres et des maçonneries (Pseudomonas, Arthrobacter, Streptomyces). La flore fongique est principalement constituée d'espèces appartenant aux genres Penicillium, Aspergillus, Cladosporium, Chaetomium et Alternaria. Cladosporium sphaerospermum est l'agent principal de la dégradation des fresques. Les peintures sur bois sont généralement dégradées par les espèces Aureobasidium et Pseudomonas. Sur les reproductions de peintures, on note la présence fréquente de Bacillus pumilus et Penicillium chrysogenum. On peut noter que la succession des espèces colonisatrices sur les œuvres dépend de la nature chimique du substrat.*

Les principaux **traitements antifongiques actuels** concernent le bois et le papier. Ils peuvent être :

• **Physiques :**

- chauffage du **bois** (180°C à 280°C) ;
- déshydratation, irradiation par rayonnement gamma, application d'un courant haute fréquence, usage

d'environnements pauvres en oxygène, radiations UV, ou encore températures extrêmes pour le **papier**.

• **Chimiques :**

- **modification chimique du bois** par la fixation de motifs chimiques (estérification, acétylation, alkylation...), **incorporation de composés chimiques doués de propriétés fongicides sur le bois** (produits organiques, sels métalliques, goudrons, huiles, silicones, résines, alcool...) ;
- **application de composés chimiques sur le papier** (alcools, phénols, acides, salicylanilides, sels d'ammonium quaternaire...).

Parmi ces procédés, nombreux sont ceux présentant des problématiques de **toxicité pour l'environnement**. Des **traitements biocides alternatifs**, utilisés dans divers domaines (agroalimentaire, thérapeutique...) en raison de leurs propriétés antifongiques, ont ainsi été identifiés. Parmi eux, **deux traitements potentiellement applicables à la présente étude**, à savoir la préservation des produits de construction et de décoration des environnements intérieurs, ont été jugés intéressants : **l'extrait de plantes du genre Allium (ail) et les huiles essentielles**.

Méthodologie

Pour les besoins de l'étude, des bancs et protocoles d'essai ont été développés afin d'assurer, selon deux scénarios de contamination, le suivi des flores fongiques et bactériennes sur différents matériaux choisis par le CSTB (Centre Scientifique et Technique du Bâtiment) et le LRMH (Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques) au vu de leur expertise.

Six supports vulnérables vis-à-vis de la prolifération microbienne ont été sélectionnés :

- la **toile de verre** et le **papier peint** pour la thématique « environnements intérieurs » ;
- le **lin** et le **bois** pour la thématique « patrimoine » ;
- la **plaque de plâtre** et la **dalle de plafond acoustique** étant communes aux deux types d'environnement.

Des analyses en microscopie électronique à balayage, culturelles et de biologie moléculaire, ont alors été effectuées sur une période de 23 jours.

Deux campagnes d'essais ont été réalisées :

- une **première campagne** avait pour but d'observer, dans des conditions réalistes, le **déroulement d'une contamination des supports par de l'air « tout-venant »**. Cette procédure, durant laquelle les conditions hydriques des matériaux variaient

Prélèvement d'air
4 L/min

Sonde température/
pression



Plateaux contenant
les matériaux d'étude

Figure 1 : Prélèvement en continu de la flore aéroportée au-dessus des supports testés.

(alternance journalière humidification/séchage), visait à **simuler des cas de contamination sur de longues durées avec une source d'eau discontinue, telles celles pouvant résulter de phénomènes intermittents** : condensations, capillarité ou encore défauts d'étanchéité.

Sur toute la durée de la Campagne I, la température et l'humidité relative de l'air ont été mesurées avec un thermohygromètre (Hygrolog-D, Rotronic) muni d'une sonde (Hygroclip-SC05, Rotronic). Ces paramètres ont été enregistrés durant les 23 jours de l'essai sur un pas de temps de 10 minutes. Parallèlement, la microflore aéroportée était collectée en continu durant l'essai, à l'aide d'un système de prélèvement muni d'un ventilateur et d'un média filtrant, mis au point au CSTB (figure 1).

- une **seconde campagne** a consisté en l'étude de la **dynamique de colonisation microbienne**

des deux supports les plus vulnérables identifiés lors de la première campagne (bois et toile de verre) (figures 2, 3 et 4), et dont la colonisation

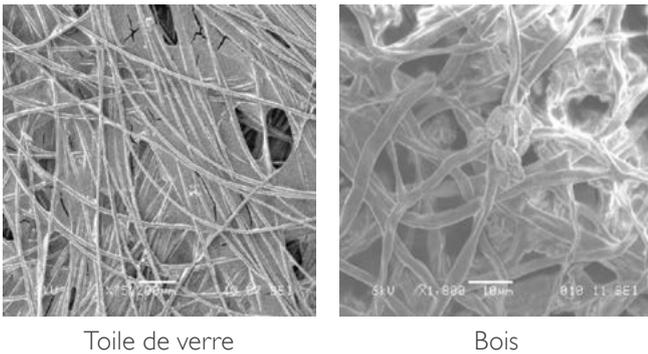
était accélérée en forçant la contamination, toujours par de l'« air tout-venant ». L'unique contamination forcée, réalisée en début d'essai avec une humidité des matériaux contaminés maintenue à saturation durant tout l'essai, s'apparente à des cas de **contamination avec une source en eau continue comme les fuites ou infiltrations**. Dans un premier temps, les supports étaient contaminés de manière forcée par l'intermédiaire d'un impacteur Andersen muni d'un crible permettant la collecte à la fois des particules fongiques et bactériennes. La contamination des supports était réalisée durant une heure à l'extérieur, puis pendant une heure dans un bureau occupé. Trois essais ont été réalisés afin de vérifier les scénarios de contamination communs. Au terme des deux heures d'impaction, les supports étaient placés dans des dessiccateurs



Figure 2 : Contamination sur toile de verre (salle de classe – école).



Figure 3 : Contamination sur chêne (plancher vue de dessous). Ancien couvent des Ursulines, XVII^e siècle. Ancenis (Loire-Atlantique).



Toile de verre

Bois

Figure 4: Images réalisées au microscope électronique des supports de l'étude après 23 jours (T23) d'exposition (Campagne 1).

saturés en humidité pour incubation. Un témoin n'ayant pas subi d'impaction, ainsi qu'un T0 contaminé, ont été analysés extemporanément. Les dessiccateurs étaient placés à l'étuve à 25° C et à l'abri de la lumière. À chaque temps de prélèvement (Ti), un échantillon de chaque matériau était récupéré puis analysé.

Dans les deux campagnes, afin de n'étudier que la contamination issue de l'air, l'eau utilisée était filtrée et stérilisée.

Enfin, les traitements biocides testés ont été fabriqués au laboratoire :

- un **extrait d'ail** à 30% a été élaboré à partir de gousses issues de l'agriculture biologique. L'extrait ainsi obtenu a été filtré au travers d'un média poreux (diamètre des pores : 0,45 µm). Le filtrat limpide ainsi obtenu a été dilué au dixième ;
- des **suspensions d'huiles essentielles** (thym et menthol) de dilution égale à 1/500 ont été préparées. Pour ce faire, un volume de 100 µL d'huile essentielle a été ajouté à 50 mL d'eau déionisée et filtrée.

L'application des différents traitements sur les matériaux a consisté à l'immersion individuelle, préalable à la contamination, de chaque échantillon dans chacune des suspensions.

Principaux résultats

Concernant la Campagne 1, les analyses ont montré une **croissance microbienne sur l'ensemble des matériaux avec une augmentation des charges bactérienne et fongique** durant les essais (figure 5).

Les analyses par culture ont permis de distinguer deux types de comportement des supports vis-à-vis de la croissance bactérienne :

- la **dalle de plafond**, la **plaque de plâtre** et la **toile de verre** présentaient une **biomasse bactérienne élevée** (supérieure à 3.10^5 UFC/cm²) à 23 jours ;

- le **lin**, le **bois** et le **papier peint** présentaient une **charge bactérienne moindre** (entre 4.10^3 et 10^4 UFC/cm²).

Concernant la contamination fongique, à l'exception du papier peint, tous les supports testés présentaient, à 23 jours, une forte augmentation de cette biomasse microbienne, le bois étant le support à la surface de laquelle a été récupéré le nombre le plus élevé de spores viables et fragments mycéliens, et ce quelle que soit la durée d'exposition (jusqu'à 2.10^3 UFC/cm²).

L'approche biomoléculaire a, quant à elle, conforté en partie ces résultats : **la toile de verre étant la plus vulnérable vis-à-vis de la croissance bactérienne, le bois étant de loin le plus sensible vis-à-vis de la contamination fongique**. Ces deux supports ont, de fait, été sélectionnés pour appréhender la dynamique de colonisation microbienne lors de la Campagne 2.

Ainsi, **la colonisation apparaît être un processus dynamique aussi bien au niveau bactérie qu'eucaryote**. Il a été mis en évidence une **succession de colonisateurs** et la présence **d'espèces majoritaires** qui se succèdent et **dépendent du support de colonisation, y compris avec une même contamination initiale** (Campagne 2). Cette dynamique, observée pour les bactéries et la flore fongique en quelques jours, peut être expliquée par des différences de vitesses de croissance, une variation des conditions de croissance (nutriment, humidité, espèces en compétition) ou encore la production de métabolites secondaires tels que les mycotoxines, endotoxines, ou encore COV.

À 23 jours de colonisation, la toile de verre est majoritairement colonisée par des **amibes** (*Amæbozoa*) avec 73% des séquences. Ceci souligne **l'impact potentiel de cette microflore, sur la qualité microbiologique**

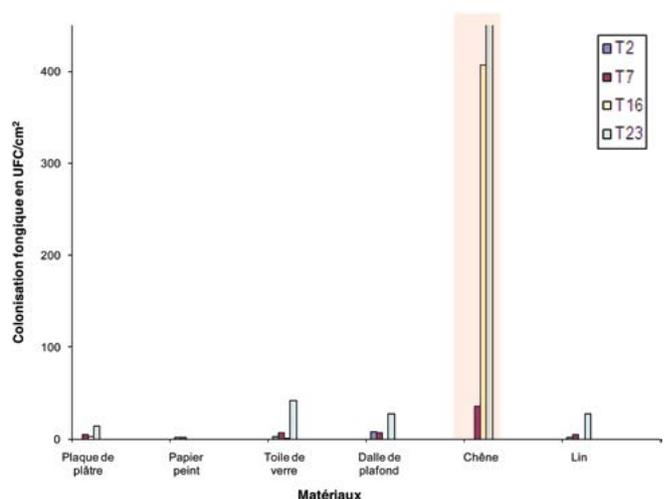


Figure 5: Campagne 1 : dénombrement de la flore fongique présente à la surface des matériaux à T2, T7, T16 et T23 (UFC/cm²).

Nature du matériau	Flore fongique (UFC/cm ³)			Flore bactérienne (UFC/cm ³)		
	Durée d'incubation (jours)			Durée d'incubation (jours)		
	T0	T7	T28	T0	T7	T28
	Bois			Bois		
Sans traitement	2,93E+02	4,49E+02		7	ND	
Extrait d'ail (1/10)		1,04E+02	0		0	0
Huile essentielle de menthe poivrée (1/500)		1,58E+05	1,60E+06		ND	ND
Huile essentielle de thym (1/500)		2,62E+01	0		3,94E+01	0
	Toile de verre			Toile de verre		
Sans traitement	62	1,53E+06		11	1,75E+03	
Extrait d'ail (1/10)		2,95E+05	2,99E+05		ND	4,45E+04
Huile essentielle de menthe poivrée (1/500)		7,28E+04	1,97E+05		2,97E+03	3,87E+06
Huile essentielle de thym (1/500)		4,96E+04	5,22E+04		ND	3,49E+06

Tableau 2 : Flores bactérienne et fongique évaluées par méthode culturale sur les différents matériaux testés après diverses durées d'incubation (ND : Non dénombrable).

des environnements intérieurs et la nécessité de développer des moyens de prévention et de gestion prenant en compte la diversité microbienne dans son ensemble (figure 5).

Bien que le mode de contamination forcée de la Campagne 2 ait permis une colonisation fongique rapide, la diversité microbienne est restée plus importante dans la Campagne 1. Ce résultat pourrait être expliqué par la variabilité de la microflore aéroportée.

L'ensemble des résultats obtenus lors des deux campagnes montre que **la dynamique microbienne présente une forte dépendance d'abord au support, puis au mode de contamination.** Dans tous les cas, cette contamination a été décrite par une ou deux espèces dominantes avec une évolution de ces espèces au cours du temps. Cette observation est vérifiée lors des deux campagnes de mesure, c'est-à-dire avec (campagne 1) Cet sans (Campagne 2) apport de nouvelles espèces et modification des conditions hydriques durant l'essai. Par conséquent, **l'inhibition d'une espèce a pour répercussion le développement d'une autre, que ce soit pour les bactéries ou pour les moisissures.**

Si la modification des espèces bactériennes et des espèces fongiques a lieu simultanément, en revanche, il n'a pas été mis en évidence de couple « bactérie-moisissure » commun à l'ensemble des essais. Par conséquent, la relation entre micro-organismes ne permet pas, à elle seule, d'expliquer cette modification qui semble également liée aux conditions environnementales.

Concernant les traitements alternatifs aux biocides existants et identifiés au travers de la littérature comme possédant des propriétés antimicrobiennes, **seuls l'huile essentielle de thym et l'extrait d'ail se sont révélés efficaces sur la prolifération fongique sur le bois** (tableau 2). En effet, l'huile essentielle de menthe poivrée, troisième traitement testé, n'a limité la croissance microbienne ni sur le bois, ni sur la toile de verre. L'inefficacité constatée des trois traitements sur la toile de verre est sans doute imputable à la faible teneur en solution traitante absorbée par ce support, par rapport à la charge microbienne impactée. **Les résultats obtenus sur le bois corroborent les conclusions d'études visant à développer des traitements du bois à base d'huiles essentielles. L'efficacité de ces traitements reste à être démontrée sur d'autres supports.**

ENSEIGNEMENTS DU PROJET

À la lumière de ces résultats et de l'existence d'une diversité microbienne abondante et variable constatée lors des Campagnes 1 et 2, **le recours à un traitement à spectre d'action large apparaît indispensable pour prévenir le développement microbien.** Notamment, **l'utilisation de mélanges d'huiles essentielles apparaît pertinente en favorisant la synergie entre molécules actives.** Cependant, **cette synergie reste à étudier pour éviter des effets antagonistes.** Les interactions entre ces composantes peuvent conduire à des effets anta-

gonistes, additifs ou synergiques. Ainsi, certaines études ont démontré qu'un mélange d'huiles essentielles présente généralement une activité antibactérienne plus élevée que les mélanges de leurs composantes principales, ce qui suggère que les composantes mineures sont essentielles à l'activité synergique, bien que des effets antagonistes et additifs aient également été observés.

L'étude des mécanismes de croissance fongique pourrait également constituer une approche pertinente pour affiner le choix des traitements préventifs. Aussi, la poursuite de ce travail consistera à étudier les mécanismes de colonisation et de dégradation des supports par les micromycètes. Pour cela, la technique d'amplification des ITS* pourra être sélectionnée afin d'être plus spécifique des micromycètes.

* ITS (Internal Transcribed Spacer) : région très polymorphe de l'ADN utilisée en biologie cellulaire pour déterminer les différences génétiques entre deux espèces.

VALORISATION

Publication en cours de rédaction :

Isabelle Lacaze, Stéphane Moularat, Marjorie Draghi, Marina Moletta-Denat, Faisl Boustia, Geneviève Orial, Enric Robine : *Étude de la dynamique microbienne sur les produits de décoration.*