



HAL
open science

Caractérisations par microscopie, spectroscopie et électrochimie d'un biofilm à partir d'une eau potable sur acier inoxydable

Jean Gamby, Alain Pailleret, C. Boucher, Claire Marie Pradier, Bernard Tribollet

► **To cite this version:**

Jean Gamby, Alain Pailleret, C. Boucher, Claire Marie Pradier, Bernard Tribollet. Caractérisations par microscopie, spectroscopie et électrochimie d'un biofilm à partir d'une eau potable sur acier inoxydable. *Matériaux et Techniques*, 2006, 94, pp.441 - 454. 10.1051/mattech:2007019 . hal-01729027

HAL Id: hal-01729027

<https://hal.science/hal-01729027v1>

Submitted on 12 Mar 2018

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.

Caractérisations par microscopie, spectroscopie et électrochimie d'un biofilm à partir d'une eau potable sur acier inoxydable

J. Gamby¹, A. Pailleret¹, C. Boucher², C.-M. Pradier² et B. Tribollet¹

¹ Université Pierre et Marie Curie–Paris 6, CNRS-UPR 15, Laboratoire des Interfaces et Systèmes Electrochimiques, 4 place Jussieu, Case courrier 133, 75252 Paris Cedex 05, France

² Université Pierre et Marie Curie–Paris 6, CNRS-UMR 7609, Laboratoire de Réactivité de Surface, 4 place Jussieu, Case courrier 178, 75252 Paris Cedex 05, France
e-mail : gamby@ccr.jussieu.fr

Mots-clés :

Eau potable; biofilm; légionelle; acier inoxydable; biocorrosion

Résumé – Nous avons suivi la formation d'un biofilm sur l'acier inoxydable (AISI 316) immergé dans un circuit d'eau potable pour deux températures (20 °C et 37 °C à pH = 8,25 – 8,5), à l'aide de techniques de caractérisation par spectroscopies : PM-IRAS (infrarouge de surface), XPS (spectroscopie des photons électrons X); par une analyse élémentaire : EDX (les rayons X à dispersion d'énergie); par microscopies : MEB (microscopie électronique à balayage) et AFM (microscopie à force atomique); et enfin, par électrochimie : RDE (voltammétrie sur électrode à disque tournant). Une étape de conditionnement de la surface de l'acier inoxydable a été mise en évidence, que nous avons suivie en fonction de la durée d'immersion et de l'influence de la température, et ce jusqu'à l'adhésion des premières colonies de bactéries. En eau froide (20 °C), l'étape de conditionnement varie de 1 à 8 jours, durant lesquels on détecte la présence de fonctions acides organiques superficielles adsorbées et ensuite viennent les liaisons peptidiques. À partir d'une dizaine de jours, on dénote la présence de polymères à la surface, et enfin des bactéries dont les longueurs sont comprises entre 2–3 μm , au bout de 12 jours. En revanche, cette étape de conditionnement se réduit à 2 jours en eau tiède (37 °C), durant lesquels des carbonates, des fonctions acides superficielles et des fonctions peptidiques sont détectables. Une grande variété de bactéries a été imagée dans le biofilm, incluant vraisemblablement des légionelles. Une épaisseur limite de 4 μm a aussi été estimée pour une durée de 3 mois dans une eau froide. La combinaison de ces différentes techniques permet de mettre en évidence une succession d'étapes avant l'adhésion bactérienne sur l'acier en eau potable.

Key words:

Drinking water; biofilm; legionella; stainless steel; biocorrosion

Abstract – Microscopic, spectroscopic and electrochemical methods to investigate development of potable water biofilms on stainless substrate. We studied biofilm formation on stainless steel occurring in a drinking water distribution system which operated at two different temperature (20 °C and 37 °C at pH = 8.25 – 8.5), in order to isolate the effect of temperature from water quality and operational parameters. A surface conditioning step found to occur on this material was monitored as a function of time until adhesion of bacterial colonies using microscopic methods: SEM (scanning electron microscopy), AFM (atomic force microscopy); spectroscopic methods: PM-IRAS (polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy), XPS (X-ray photoelectron spectroscopy), EDX (Energy dispersive X-ray spectroscopy) and an electrochemical method: RDE (rotating disk electrode). Correlation between surface analyses, the age of the sample and the influence of temperature have been observed before bacterial adhesion. An initial conditioning step of surface has been observed in cold water. During a period varying from 1 to 8 days, superficial acidic functions are grafted on surface until proteins adsorption. After this period, independent microcolonies of bacteria were attached on the substrate, reaching a 2–3 μm in length which has been estimated after 12 days. On the other hand, the first step was reduced down to 2 days in tepid water, during which carbonates, acidic functions, proteins and polymers were detected. A greater richness of bacteria was imaged in the biofilm and a limited spatial variation was deduced from the determination of its thickness. This latter was found to be constant over a 3-month period and equals to 4 μm at 20 °C. The combination of these different techniques allows to describe the successive steps in biofilms formation on stainless steel in drinking water.

Texte reçu le 12 juin 2007
accepté le 21 juin 2007

De nombreux travaux, ces dernières années, ont contribué à caractériser les biofilms et à collecter un grand nombre d'informations par des techniques variées sur les biomasses fixées, ainsi que sur les étapes successives de formation d'un biofilm [1, 2]. Mais la complexité structurale et physiologique de la matrice ainsi que les interférences du milieu environnant rendent difficiles l'obtention de données globales et simples, surtout lorsqu'on choisit de se placer dans des conditions naturelles de formation du biofilm. Par conséquent, force est de reconnaître qu'actuellement subsiste un réel besoin d'outils de caractérisation du biofilm, d'une part pour approfondir les connaissances fondamentales sur les biomasses fixées, d'autre part pour optimiser l'efficacité de leur contrôle. Cette étude a permis d'allier les compétences en analyse de surface par spectroscopies électroniques ou vibrationnelles du Laboratoire de Réactivité de Surface et en microscopies et électrochimie du Laboratoire des Interfaces et Systèmes Electrochimiques, dans un même but : le suivi et la caractérisation de biofilms formés sur Acier inoxydable (AISI 316) et sur un substrat modèle (or) en eau potable, avec pour finalité d'aborder la problématique de détérioration des matériaux par des micro-organismes (biocorrosion). Les travaux sur les biofilms et leurs impacts présentent aussi un grand intérêt pour les questions d'environnement et de santé publique. Les plus courantes sont : pollutions des eaux [3, 4], maladies nosocomiales et légionellose [5–7]. Dans ce dernier cas, qui nous intéresse plus particulièrement, le biofilm intervient très en amont. Il est de ce fait souvent impliqué dans les troubles récurrents survenant dans les circuits de distribution d'eau potable. Il arrive que l'érosion suivie du détachement partiel d'un biofilm de la canalisation soit le point de départ d'une prolifération de micro-organismes indésirables, affectant la qualité de l'eau et conduisant à une contamination bactérienne plus ou moins sévère (Fig. 1). Parmi ces micro-organismes pathogènes dont un grand nombre n'est pas encore identifié, les plus récurrents dans la flore aquatique des eaux potables sont les espèces bactériennes « *Legionella Pneumophila* » et « *Pseudomonas Aeruginosa* » [8, 9] dont la présence dans le biofilm des circuits d'eau chaude et de refroidissement est à l'origine d'épisodes de légionellose. Cette contamination dépend de la température de l'eau et de la présence ou absence de nutriments indispensables

à la croissance des légionelles. L'eau potable n'étant pas contrôlée pour cette bactérie, sa croissance peut se faire dans toutes les installations pouvant aider au développement de ces micro-organismes : eau tiède entre 25 et 45 °C, présence d'éléments nutritifs (carbone assimilable, fer ferreux Fe^{2+} ou fer ferrique Fe^{3+} indispensable à la croissance, et la présence d'acides organiques) [10, 11], environnement aérobie (présence d'oxygène) [12, 13], et existence éventuelle d'hôtes (amibes...) [14, 15]. Les légionelles se développent préférentiellement dans des organismes hôtes au sein d'un dépôt biologique : biofilm susceptible de se fixer sur les matériaux. Cette adhésion est favorisée par : le matériau proprement dit (rugosité de sa surface, toxicité des ions relargués par le métal vis-à-vis du biofilm comme par exemple le cuivre), la corrosion du matériau et l'évolution rapide de la rugosité de la paroi. Cette corrosion peut aussi libérer des ions favorables au développement des légionelles (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} par exemple). Une forte rugosité va favoriser l'adhésion du biofilm et augmenter l'épaisseur de la zone à très faible turbulence et l'entartrage des parois [16–18]. Cet entartrage composé essentiellement de carbonates va aussi favoriser le développement du biofilm. Les recherches entamées portent sur une meilleure compréhension des premières étapes de formation du biofilm jusqu'à l'adhésion des micro-organismes sur l'acier inoxydable.

Procédures expérimentales

Des échantillons d'acier inoxydable AISI 316 et de coupons d'or ont été immergés pendant 3 mois dans un circuit de distribution d'eau potable au laboratoire (LRS, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6). Avant immersion, les coupons de 1 cm² sont décapés et polis avec du papier de polissage LAM PLAN grade P1200, puis rincés avec l'éthanol puis l'acétone. Après colonisation les coupons sont rincés à l'eau distillée. Les électrodes d'or et de platine ($\emptyset = 5$ mm) subissent un protocole de nettoyage identique à celui des coupons, avant et après colonisation.

Spectroscopie PM-IRAS

L'analyse des modes de vibration par spectrométrie infrarouge fournit des informations sur la structure moléculaire

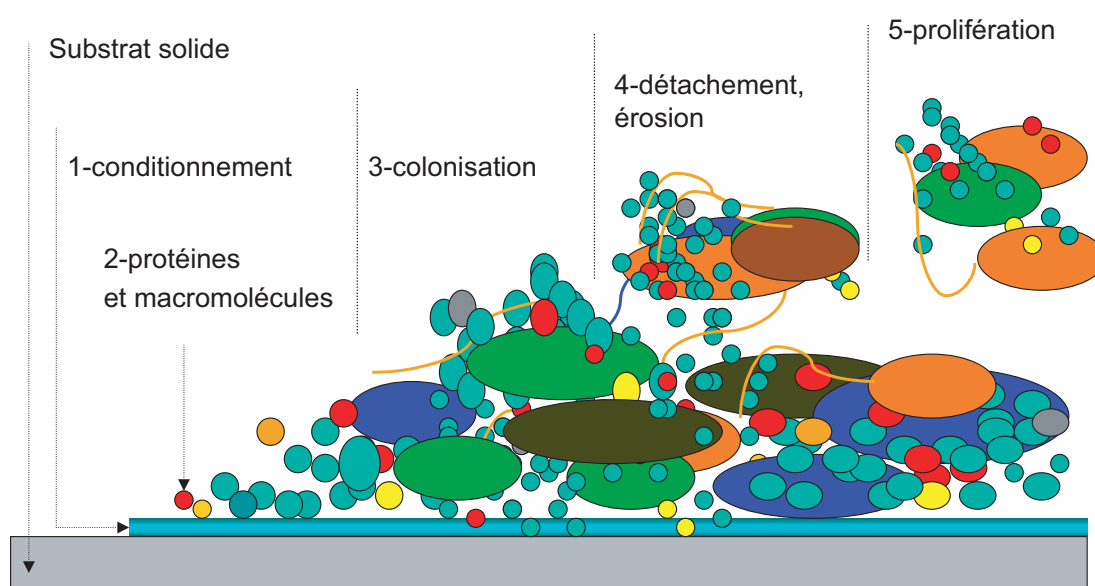


Fig. 1. Présentation schématique des étapes de la formation et de la croissance du biofilm sur une surface solide. (1) Conditionnement de la surface du substrat en minéraux et en fonctions acides superficielles. (2) Adhésion de protéines et macromolécules. (3) Colonisation de la surface par des bactéries. (4) Détachement par érosion du biofilm. (5) Prolifération et risque dans le milieu.

Fig. 1. Schematic representation of biofilm growth on a solid surface. (1) First conditioning step: deposition of minerals and acidic function grafted on surface. (2) Adsorption of proteins and macromolecules. (3) Colonization by various bacteria. (4) Biofilm detaching by erosion. (5) Proliferation and risk in the medium.

des matériaux et permet de caractériser certaines des propriétés de surface des matériaux des coupons d'acier inoxydable : acidité, caractères cationique et métallique, géométrie d'adsorption sur la surface. [24 b, c] Le spectromètre Nicolet (FT-IR 5700) fonctionne entre 4000 et 650 cm^{-1} en mode de réflexion spéculaire avec modulation de la polarisation (PM-IRRAS). Il permet l'analyse ex-situ à l'air de surfaces métalliques planes nues ou modifiées chimiquement.

Spectroscopie XPS

L'analyse par spectroscopie XPS permet, sous ultra-vide, une analyse chimique de la surface du substrat et des couches moléculaires adsorbées. Les analyses ont été réalisées sur un appareil SPECS (analyseur Phoibos MCD 150), utilisant une source $\text{MgK}\alpha$ à une puissance de 150 W. L'angle d'analyse était égal à 90° par rapport à la surface de l'échantillon et les spectres C 1 s, O 1 s, N 1 s enregistrés à une énergie de passage de 10 eV. Les décompositions spectrales ont été réalisées en utilisant le logiciel CASA. Les échantillons étaient rincés à l'eau ultra pure et séchés sous flux d'azote avant d'être introduits dans la chambre ultra vide.

Microscopie électronique à balayage, analyse EDX

Les coupons sont rincés et séchés à l'argon pour réaliser un dépôt conducteur d'or de 7 nm par évaporation plasma de façon à imager le biofilm. Le microscope électronique à balayage numérique utilisé est un LEICA avec filament de tungstène. Les analyses EDX sont réalisées suite à la microscopie avec un spectromètre à sélection en énergie de la marque PGT de type Spirit avec une diode en silicium dopé lithium.

Microscopie AFM

Les observations de la population bactérienne par AFM ont été réalisées à l'air en utilisant le mode acoustique résonnant (encore appelé mode tapping). Précisons ici que l'imagerie de bactérie requiert effectivement l'utilisation du mode tapping puisque ce dernier permet de minimiser les interactions pointe/bactéries grâce à l'utilisation d'un contact intermittent et donc d'épargner dans ce cas précis la déformation de la bactérie sous l'effet du contact. L'imagerie de bactéries par AFM est de surcroît plus facile à mettre en œuvre à l'air que dans l'eau. Ce second milieu nécessite effectivement de multiples précautions telles qu'une immobilisation efficace des bactéries sans conséquences

pour leur survie et leur morphologie sur les substrats retenus et une prise en compte du caractère très mou de leur enveloppe.

L'équipement AFM utilisé dans ce travail était un instrument fourni par Molecular Imaging composé d'une base Pico-LE équipée d'un dispositif de micro-positionnement destinée au positionnement précis de la pointe AFM dans le plan $x - y$ de l'échantillon, d'un scanner large zone ($100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$) comportant un photo-détecteur et le nez AFM adéquat pour des expériences d'AFM en mode tapping. Dans ce but, des cantilevers rectangulaires en silicium portant des pointes elles aussi en silicium furent utilisés. Leur fréquence de résonance varie de 280 à 365 kHz et leur constante de raideur se situe dans la gamme $25\text{--}50 \text{ N.m}^{-1}$. À l'inverse des images de phase, toutes les images de topographie montrées ont subi une procédure de correction d'horizontalité.

Mesures électrochimiques

Les électrodes sont transférées dans une cellule électrolytique à 3 électrodes pour des mesures à température ambiante. La procédure consiste à coloniser des électrodes ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) à différents intervalles temps, puis à les transférer dans une cellule électrolytique comprenant : un traceur rédox, ferricyanure/ferrocyanure $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ respectivement à 10 mM; l'électrolyte support : le chlorure de potassium, KCl à 0,5 M; l'électrode de référence : en calomel saturé et une contre-électrode : une grille de platine. Le potentiostat utilisé est un Autolab PGSTAT 30/FRA 2 (Eco Chemie). Les voltammogrammes courant/tension sont enregistrés à différentes vitesses de rotation de l'électrode (100 à 3000 tours/min) avec une vitesse de balayage du potentiel appliqué de 10 mV/s permettant de se placer en régime stationnaire.

Résultats et discussion

Analyse des surfaces par XPS après rinçage à l'eau ultra-pure et séchage sous azote

Des mesures en spectroscopie XPS espacées dans le temps ont été menées sur des coupons d'acier inoxydable. Le spectre de la figure 2a pour un coupon de 2 jours à 20°C , montre un pic 1 s qui peut être reconstitué en trois contributions à 289,0, 286,4

et 285,0 eV pour le carbone impliqué dans les liaisons C=O, COO^- ; C-O, C-N et C-C ou C-H respectivement. Sur le spectre C 1 s du coupon analysé après 25 jours dans l'eau à 20°C , on note la croissance du pic des groupements C-O et C-N, évolution qui met en évidence l'augmentation de la teneur en carbone organique caractéristique de la biomasse fixée sur les coupons d'acier inoxydable (Figs. 1a, d). Sur le pic 1 s de l'oxygène, (spectre de la Fig. 2b) à la surface d'un coupon après 2 jours à 20°C , apparaissent trois contributions. Les deux premières, aux plus fortes énergies de liaison, 533,2 eV et 531,8 eV, correspondent respectivement aux O-H seuls dans les molécules de H_2O , ou à de l'oxygène O^{2-} adsorbé sur le métal ($\text{Métal-O}_{\text{ads}}$), et aux liaisons présentes dans les hydroxydes ou les oxyhydroxydes; enfin, un pic à 530 eV est attribué aux atomes d'oxygène dans les couches superficielles de l'oxyde. Après 25 jours à 20°C , l'analyse XPS des échantillons montre que le pic correspondant aux oxydes à 530 eV diminue fortement au profit du pic à 533,2 eV qui lui croît (Figs. 2b, e). Enfin, très peu d'azote a été détecté à 2 heures tandis qu'après 25 jours un pic intense d'azote est observé (Figs. 2c, f). Les mesures en XPS sur les coupons d'acier inoxydable permettent de confirmer les résultats précédents. Sur les échantillons ayant séjourné 2 heures à 20°C et 25 jours à 20°C , les résultats démontrent la croissance d'un film de matière organique. En résumé, après 25 jours à 20°C , on note la croissance du pic des groupements C-O et C-N, et du pic de l'azote, évolution qui met en évidence l'augmentation de la teneur en matière organique caractéristique de la biomasse fixée sur les coupons d'acier inoxydable (Fig. 2d). On peut rappeler que l'acier inoxydable austénitique utilisé a pour base l'alliage de 18 % chrome et de 8% nickel, teneur présente sous forme d'oxydes, censée améliorer la résistance à la corrosion.

Spectrométrie infrarouge PM-IRRAS : suivi et conditionnement de la surface jusqu'à l'adhésion

La spectrométrie infrarouge en mode réflexion présente un intérêt particulier pour le suivi des premières étapes de la formation du biofilm, en particulier pour l'étape de conditionnement sur une surface métallique après immersion dans un milieu naturel. Les spectres obtenus sur Acier inoxydable AISI 316 (Figs. 3a, b), après immersion

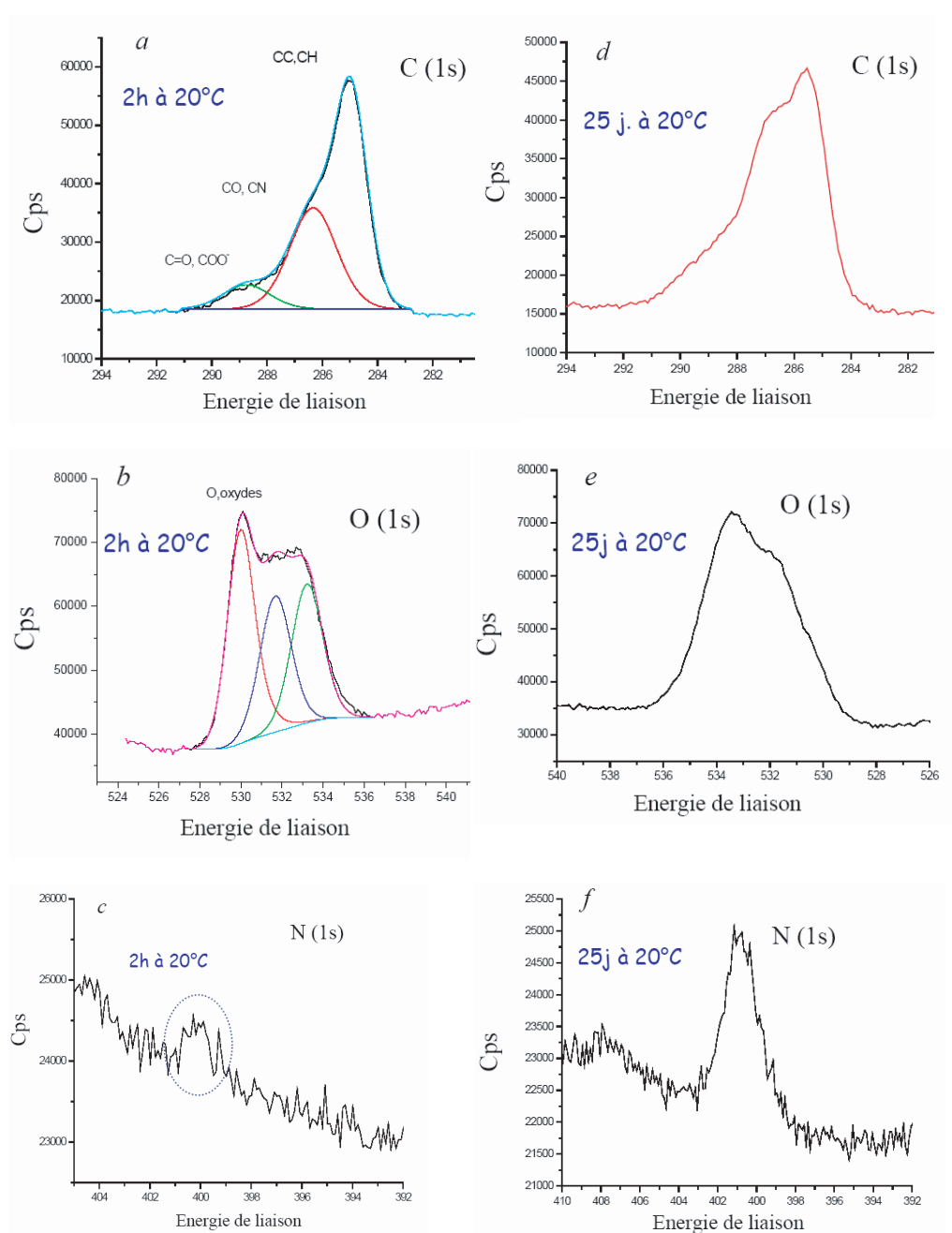


Fig. 2. Analyses XPS sur des coupons d'acier inoxydable à 2 heures puis à 25 jours dans l'eau du robinet à 20 °C. a) Spectre du niveau 1 s du carbone et déconvolution du signal pour un biofilm de 2 jours sur acier inoxydable. b) Spectre du niveau 1 s de l'oxygène et déconvolution du signal pour un biofilm de 2 jours sur acier inoxydable. c) Spectre du niveau 1 s de l'azote pour un biofilm de 2 jours sur acier inoxydable. d) Spectre du niveau 1 s du carbone pour un biofilm de 25 jours sur acier inoxydable. e) Spectre du niveau 1 s de l'oxygène pour un biofilm de 25 jours sur acier inoxydable. f) Spectre du niveau 1 s de l'azote organique détectable pour un biofilm de 25 jours sur acier inoxydable.

Fig. 2. XPS analysis of stainless steel samples after 2 hours then after 25 days of immersion in drinking water, 20 °C. a) C, 1 s signal and deconvolution spectrum after 2 hours. b) O, 1 s signal and deconvolution after 2 hours. c) N, 1 s signal after 2 hours. d) C, 1 s signal and deconvolution spectrum after 25 days. e) O, 1 s signal and deconvolution after 25 days. f) N, 1 s signal after 25 days.

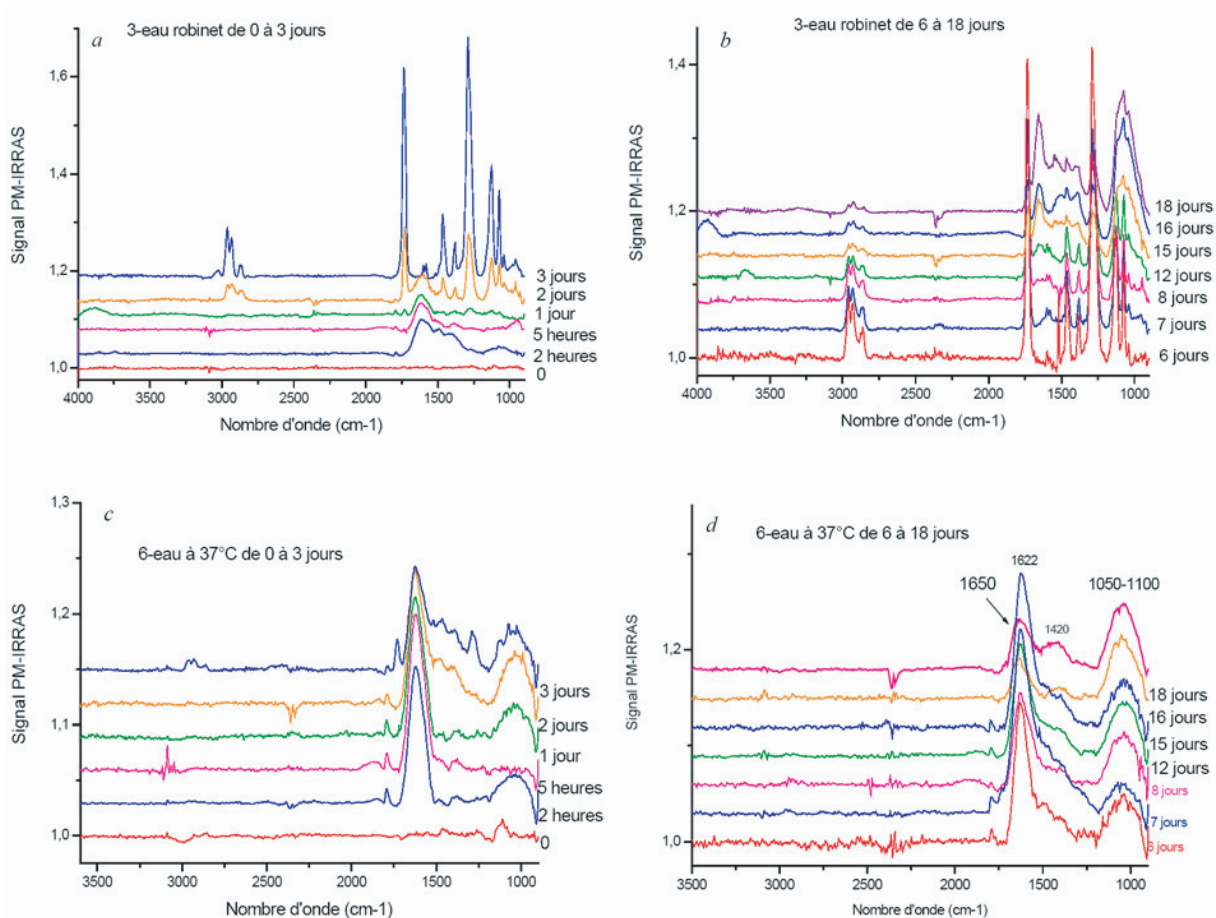


Fig. 3. Suivi en PM-IRRAS du conditionnement de la surface jusqu'à l'adhésion de cellules bactériennes à la surface de l'acier inoxydable AISI 316. a) Coupons ayant séjourné de 0 à 3 jours dans un circuit d'eau à 20 °C. b) Coupons ayant séjourné de 6 à 18 jours dans un circuit d'eau à 20 °C. c) Coupons ayant séjourné de 0 à 3 jours dans un circuit d'eau à 37 °C. d) Coupons ayant séjourné de 3 à 18 jours dans un circuit d'eau à 37 °C.

Fig. 3. PM-IRRAS spectra during the surface conditioning step until bacteria adsorption on stainless steel AISI 316 at different colonization times and water temperature distribution. a) Samples immersed during 0 to 3 days, 20 °C. b) Samples immersed during 6 to 18 days, 20 °C. c) Samples immersed during 0 to 3 days, 37 °C. d) Samples immersed during 3 to 18 days, 37 °C.

dans l'eau de robinet à 20 °C et rinçage en eau ultra-pure, indiquent dès les premières heures la présence de pics à 1400, 1494 et 1616 cm^{-1} . Ceux-ci correspondent aux vibrations d'élongation symétriques et antisymétriques des groupements COO^- de carbonates et carbohydrates. Puis, après immersion de 1 à 8 jours apparaissent des bandes à 1730, 1294, 1124 cm^{-1} , caractéristiques de fonctions acides superficielles. Enfin, à partir de 12 jours, une multitude de pics apparaît. Ils correspondent à la présence de protéines, de polymères et de bactéries comme le confirmeront les observations microscopiques. Les cellules bactériennes rencontrent alors un milieu facilitant leur croissance et forment des amas hétérogènes. On peut noter la relative décroissance des bandes ci-dessus identifiées comme celles de fonctions acides, probablement parce que

des composés de surfaces sont déplacés lors de l'adhésion cellulaire. En ce qui concerne les spectres obtenus sur un coupon d'acier inoxydable (Figs. 3c, d) après deux jours dans l'eau de robinet à 37 °C, ils sont dominés par une bande large et intense à 1500–1600 cm^{-1} ; cette bande croît à partir de 2 jours et apparaît alors une autre bande large à 100–1100 cm^{-1} . La combinaison des résultats des analyses PM-IRRAS et XPS nous amène à dire que la première étape de formation du biofilm est le dépôt d'une couche de minéraux (carbonates, carbohydrates, ...) et de molécules organiques à fonctions acides. Celles-ci conditionnent et favorisent l'adhésion de protéines. Cette première étape n'est pas discernable après immersion à 37 °C car la cinétique d'adhésion bactérienne est trop rapide. Ces résultats montrent clairement que l'interface

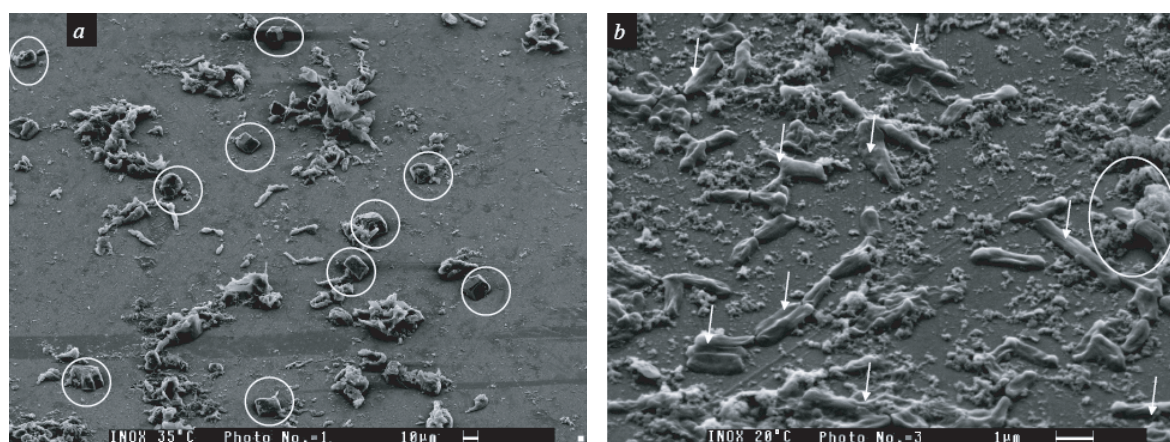


Fig. 4. Images MEB de coupons d'Acier inoxydables avec un dépôt d'or sous vide de 7 nm. a) Coupon ayant séjourné pendant 15 jours dans un circuit d'eau chaude, où l'on voit un dépôt mixte minéral/biologique composé de cristaux analysés correspondant à de la calcite, entourés de cercles. b) Coupon d'acier ayant séjourné pendant 90 jours dans un circuit d'eau froide, où l'on voit un dépôt mixte minéral/biologique entouré et composé de nombreuses bactéries longues de 2–3 μm , quelques-unes sont fléchées.

Fig. 4. SEM micrographs on stainless steel samples for different colonization times and water temperature distributions. a): Day 15 at 20 °C. b): Day 90 at 20 °C. c): Day 15 at 37 °C. d): Day 90 at 37 °C.

métal/milieu a été conditionnée pour l'adhésion des bactéries au bout de 12 jours à 20 °C et à peine quelques heures à 37 °C.

cristaux de calcites et d'aluminosilicates sur l'acier inox, les dépôts étant plus abondants sur des échantillons ayant séjourné dans le circuit d'eau chaude.

Microscopies MEB et AFM

MEB : complexité du biofilm en milieu naturel

Les techniques microscopiques : Microscope Électronique à Balayage MEB et Microscope à Force Atomique AFM, ont été employées pour une caractérisation et visualisation du biofilm formé à différents intervalles de temps sur des coupons d'or et d'acier inoxydable exposés dans des circuits alimentés en continu d'eau froide et chaude du robinet dont les températures mesurées sont respectivement autour de 20–21 °C et de 35–37 °C. Les premiers résultats montrent un dépôt mixte minéral/biologique sur les coupons (acier inoxydable : Figs. 4a, b). Le biofilm n'est pas composé uniquement de bactéries englobées dans une matrice, mais également d'un environnement complexe à l'intérieur duquel ont vraisemblablement lieu de nombreuses réactions physico-chimiques et un ensemble de processus métaboliques. Comme on peut le voir dans la figure 4a, une forte proportion de minéraux observée principalement à la surface de l'acier inox peut influencer le développement du biofilm et la corrosion de l'acier. Des mesures de caractérisation de surface XPS et d'analyse élémentaire EDX permettent d'identifier des

AFM : morphologie du biofilm en milieu naturel

Des bactéries s'adsorbant sur des substrats d'or en eau chaude sur une période de 15 jours ont été imagées par AFM en mode tapping à l'air. L'image de topographie représentée sur la figure 5A montre qu'une dizaine de bactéries est immobilisée sur une zone de 400 μm^2 . Il apparaît que certaines seulement présentent des flagelles (voir bactéries Y1 et Y2 sur la figure 5A, voir aussi figure 6B (focalisée sur la bactérie Y2 de la figure 5A, longueur : 1,55 μm , largeur : 760 nm, hauteur : 190 nm, longueur de la flagelle : 1,5 μm), indiquant ainsi que ces bactéries sont de divers types. Certaines apparaissent dans une phase de division (voir bactérie Y3 sur Fig. 5A et coupe verticale prise selon le trait, Fig. 5C) alors que d'autres sont éventuellement en cours de croissance (voir bactéries Y4 et Y5). Il est intéressant de constater que ces bactéries sont situées à proximité ou directement sur des crêtes linéaires clairement révélées sur l'image de topographie (voir Fig. 5A) et probablement constitutives du substrat de verre d'origine.

À l'inverse des images de topographie de bactéries qui sont fréquemment montrées dans la littérature, les images de phase de

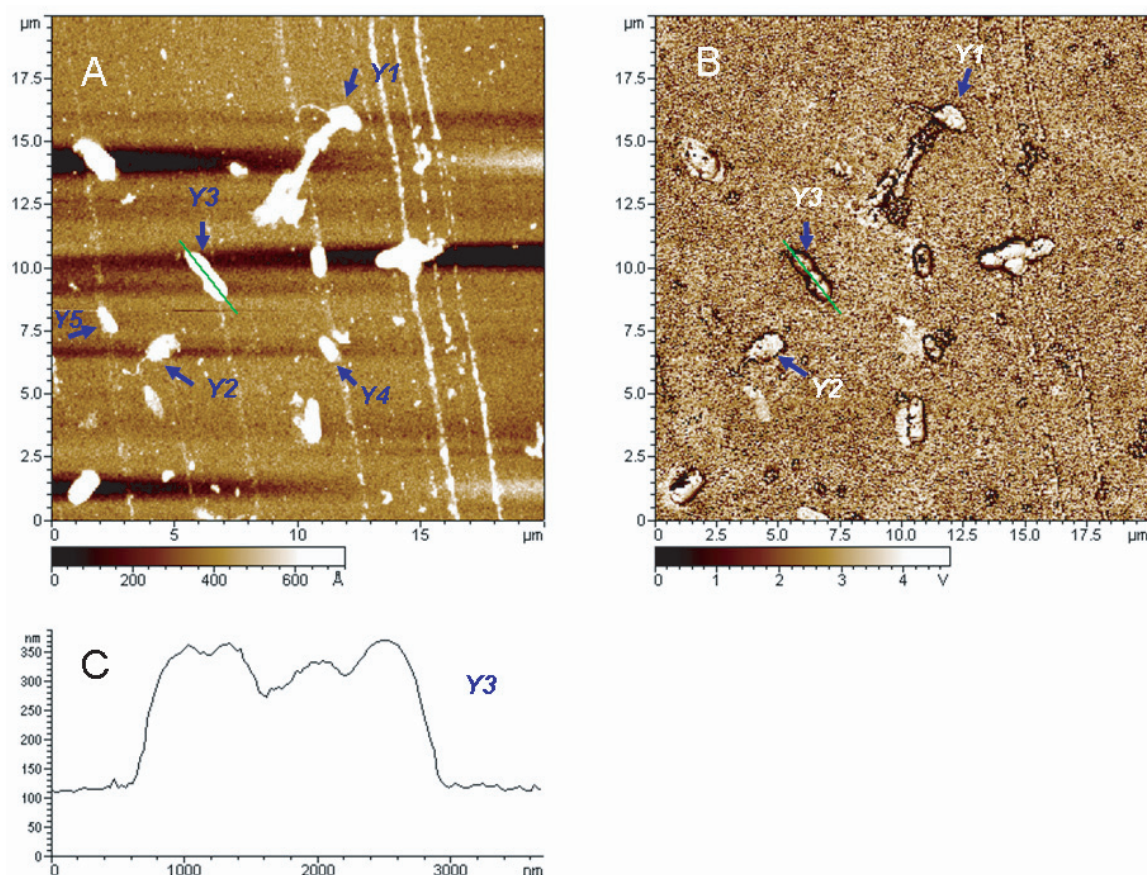


Fig. 5. Images AFM prises sur un substrat de verre recouvert d'or d'une population bactérienne : A) Topographie, B) Phase, C) Coupe verticale prise selon le trait apparaissant sur les figures 5A, B.

Fig. 5. AFM images obtained simultaneously on a gold coated glass substrate covered with a bacterial population resulting from an exposure to tap water: A) topography, B) Phase, C) vertical profile taken along the green line appearing in Figures 5A, B.

bactéries (Figs. 5B et 6B) résultant de l'utilisation du mode tapping ne sont que rarement commentées. Elles apportent pourtant une quantité importante d'informations supplémentaires. En effet, une image de phase résulte de la mesure en chaque pixel de l'image de la différence entre l'angle de phase de l'oscillateur de contrôle et celui caractérisant la réponse du cantilever. Lorsque la pointe est au contact de l'échantillon, cette différence d'angle de phase reflète notamment une contribution élastique issue d'effets topographiques et/ou des contributions inélastiques comme la dissipation d'énergie. Dans ce second cas, ce déphasage donne à l'AFM une sensibilité aux variations de l'interaction de la pointe AFM avec l'échantillon qui résultent de variations d'élasticité, de visco-élasticité, ou d'interactions adhésive/répulsive. Il apparaît donc que l'image de phase produite par le mode tapping est tout à fait complémentaire de l'image de topographie pour l'analyse d'hétérogénéités en surface comme en volume d'échantillons divers (polymères par exemple) et donc, en

particulier, de bactéries enfermées dans une enveloppe de substance extracellulaire polymérique (SEP).

Les images de phase des figures 5B et 6B ainsi que les images de topographies des figures 5A et 6A montrent des contours quasi-identiques résultant notamment de la déshydratation. De cela, il faut déduire que les bactéries imagées sont libérées de l'enveloppe à base de SEP dont elles sont généralement revêtues. En conséquence, ces images montrent des caractéristiques structurales plutôt relatives à la paroi bactérienne qu'à une enveloppe à base de SEP. Cette disparition de l'enveloppe de SEP est probablement le résultat du rinçage à l'eau réalisé avant le séchage à l'azote lors de la préparation des échantillons destinés à l'imagerie par AFM, en accord avec les observations révélées dans la littérature. Il est néanmoins probable que les auréoles noires observées au pied de pratiquement chacune des bactéries représentent des résidus de cette enveloppe de SEP plus ou moins fortement adsorbés sur la surface. Rappelons ici que ces

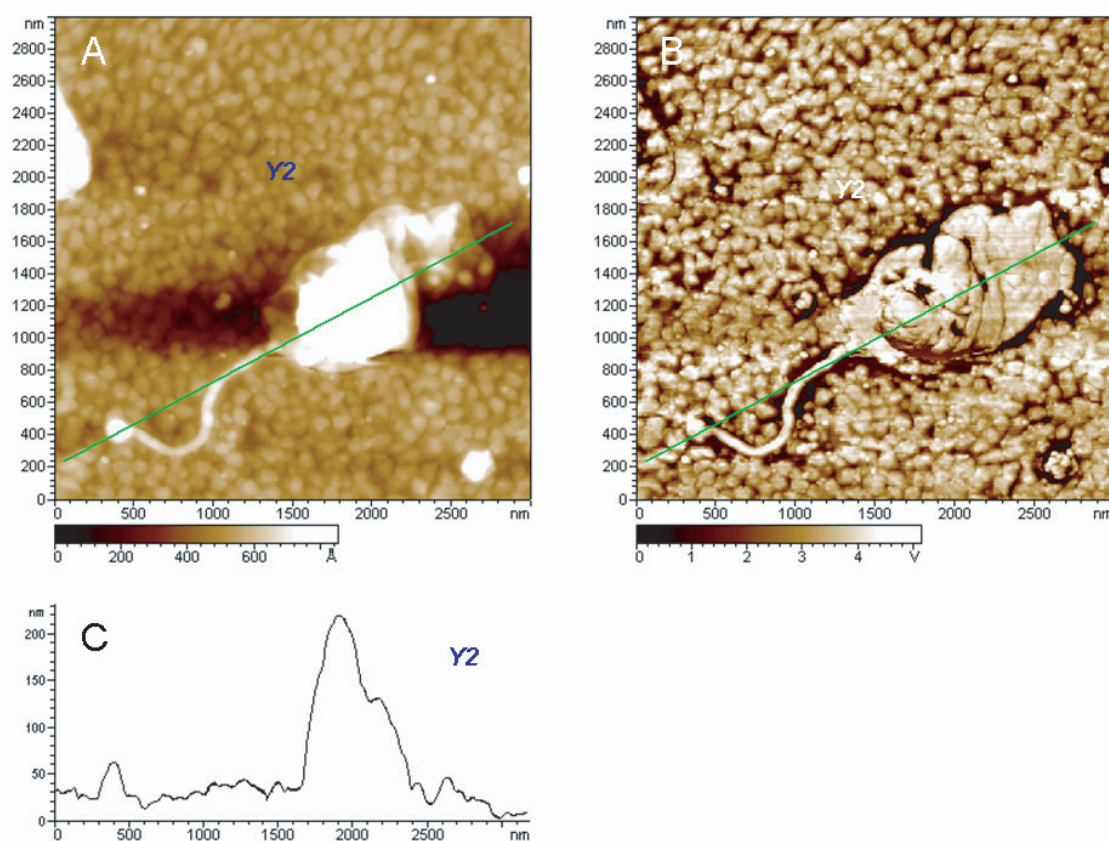


Fig. 6. Images AFM prises sur un substrat de verre recouvert d'or de la bactérie Y2 visible sur la figure 5 : A) Topographie, B) Phase, C) Coupe verticale prise selon le trait apparaissant sur les figures 6A, B.

Fig. 6. AFM images obtained simultaneously on a gold coated glass substrate and focused on the bacterium Y2 observed on Figure 5: A) topography, B) Phase, C) vertical profile taken along the green line appearing on Figures 6A, B.

SEP participent à l'immobilisation des bactéries sur la surface des substrats utilisés. Il est donc probable que la partie de l'enveloppe de SEP servant de tapis adhérent aux bactéries soit toujours présente sur les images représentées.

Analyse élémentaire par EDX

Les mesures en EDX permettent de compléter l'analyse spectroscopique et l'observation microscopique des dépôts de matières organiques et minérales dans les biofilms formés à partir de l'eau du robinet. Ces données confirment la présence de nombreux éléments tels que le calcium (sous forme carbohydre, Fig. 7b), le fer, le silicium présent sous forme de silicates et silice ou encore de l'aluminium (Fig. 7c), alors que ces éléments ne sont généralement présents dans l'eau du robinet qu'à l'état de traces (moins de 0,2 $\mu\text{g/L}$ pour le fer par exemple). La présence des éléments (C, N, O, P) est constatée lorsque l'analyse EDX cible les bactéries

(Fig. 7a), confirmant les observations précédentes en microscopie. En revanche, la présence d'aluminium sur certains cristaux participerait à la constitution de minéraux argileux au sein de la matrice, tels que les aluminosilicates (Fig. 7c).

Capteur électrochimique de mesure de l'épaisseur d'un biofilm

La structure du biofilm est complexe et hétérogène d'un point de vue microbiologique et chimique. Cependant, à l'échelle macroscopique, celui-ci peut être vu comme un dépôt uniforme et une épaisseur moyenne doit pouvoir être déterminée. Les estimations de l'épaisseur du biofilm sont faites et suivies par électrochimie en milieu aqueux à la surface d'une électrode. Le biofilm est assimilé à une couche poreuse très hydratée dont l'épaisseur sera égale à l'augmentation de la couche diffuse avant et après colonisation de l'électrode [19]. Le dispositif à électrode à disque tournant permet

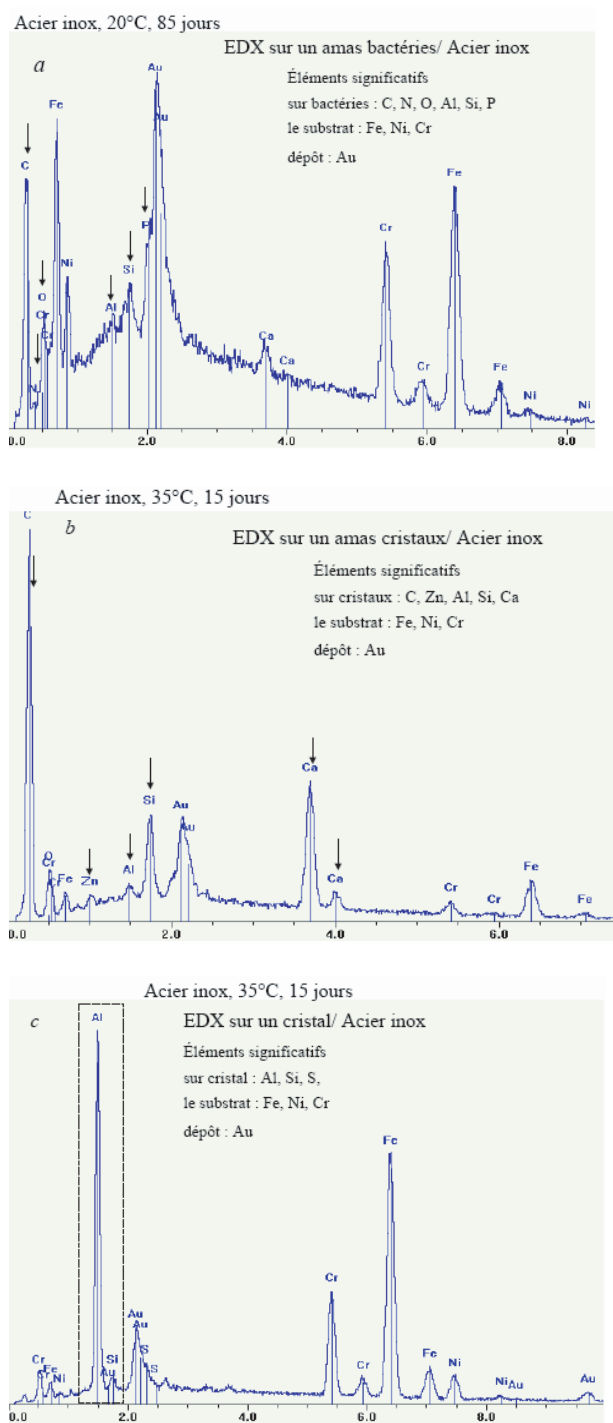


Fig. 7. a) EDX ciblant une colonie de bactéries sur l'acier inoxydable ayant séjourné pendant 90 jours dans une eau à 20 °C. On trouve plusieurs éléments analysés de la matrice organique et du support indiqués sur la figure. b) EDX ciblant un amas de cristaux de carbonates et silicates sur l'acier inoxydable ayant séjourné pendant 15 jours dans une eau à 35 °C. c) EDX ciblant un cristal d'aluminosilicate sur l'acier inoxydable ayant séjourné pendant 15 jours dans une eau à 35 °C.

Fig. 7. X-ray dispersive energy on stainless steel samples at different colonization times and water temperature distributions. a) Analysis focusing on a biological drift at day 90 and 20 °C. b) Analysis focusing on a mineral drift (carbonates and/or carbohydrates) at day 15 and 35 °C. c) Analysis focusing on a mineral drift (containing alumina) at 15 and 35 °C.

de mesurer le transport de matière au voisinage de l'électrode de travail (or et platine) dans lequel s'est développé le biofilm en eau à température ambiante et à 37 °C (Fig. 8). Compte tenu du rôle et de la nature du matériau d'électrode, les résultats ne seront pas directement corrélables avec ceux obtenus précédemment avec l'acier inoxydable. Cependant, les résultats obtenus sur un métal noble comme l'or où la colonisation est présente, montrent la possibilité de suivre l'évolution de l'épaisseur du film créé qui peut se révéler être un premier diagnostic pour la veille sanitaire. Des voltammogrammes courant/tension sont enregistrés à différentes vitesses de rotation de l'électrode (100 à 3000 tours/min) avec une vitesse de balayage du potentiel appliqué de 10 mV/s permettant de se placer en régime stationnaire. Comme on peut le voir dans la figure 9a, l'oxydation puis la réduction du traceur suivent un processus de transfert d'électron réversible, dont le potentiel d'équilibre $E_{eq} \approx E^0_{[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}} = 0,21$ V/ECS dépend des rapports des concentrations. On peut observer qu'il n'y a pas de blocage à la surface de l'électrode, même après des temps de colonisation longs où le potentiel d'équilibre reste identique à la valeur trouvée avant colonisation (Fig. 9b). La seule évolution observée pour une électrode donnée est la diminution de l'intensité du courant au plateau de diffusion. On peut donc affirmer en toute certitude que le biofilm ne constitue pas une barrière physique à l'électrode mais une barrière diffusionnelle. Ce résultat n'est guère surprenant puisque nous avons mis en évidence l'hétérogénéité du biofilm par la présence d'interstices laissant la surface accessible au traceur. En effet, à la surface de l'électrode, le passage du courant peut être limité par le transport du traceur à partir du cœur de la solution vers la surface de l'électrode (Fig. 8). Pour traduire mathématiquement cette observation et séparer les différents processus à l'électrode, nous extrayons la contribution du biofilm au courant de diffusion suivant une équation totale du courant dans la cellule électrochimique (Éq. (1)).

Le courant global mesuré i est une combinaison de trois contributions, suivant l'équation suivante :

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{i_k} + \frac{1}{i_d} + \frac{1}{i_{bf}} \quad (1)$$

avec i_k le courant cinétique, i_d le courant de diffusion dans l'électrolyte et i_{bf} le courant à

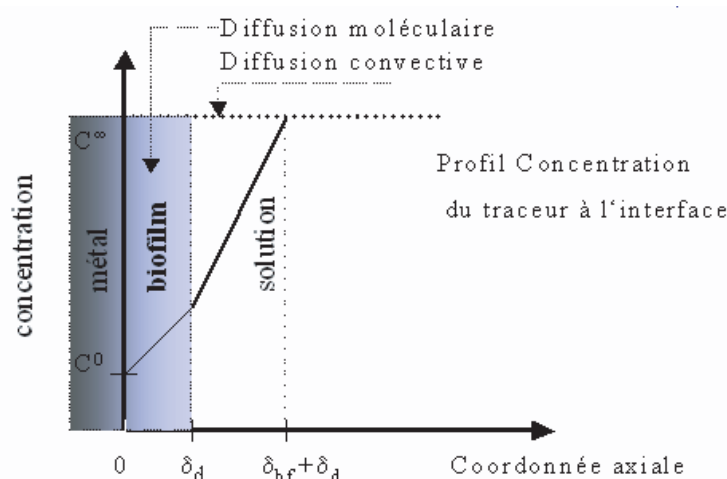


Fig. 8. Profil de concentration du traceur consommé à la surface d'une électrode recouverte d'un biofilm en fonction de la coordonnée axiale x (distance à l'électrode).

Fig. 8. Variation of tracer concentration versus axial coordinate, x (distance to electrode) which decreases from the bulk solution to the electrode/biofilm interface.

travers le biofilm. L'électrolyte support (KCl) étant en très grande concentration par rapport au traceur, la participation de ce dernier à la migration est négligeable. Dans ce cas, le transport de matière vers la surface est le résultat de la convection et de la diffusion. Dans la figure 8, on considère que la couche poreuse d'épaisseur δ_{bf} , représente le biofilm recouvrant la surface de l'électrode et agit comme une barrière de diffusion. δ_d , représente alors l'épaisseur de la couche de diffusion ; C_∞ : la concentration du traceur au cœur de la solution et C_0 : la concentration à l'interface biofilm/électrode. Brièvement, la calibration de l'électrode est faite avant colonisation c'est-à-dire à $t = 0$. On utilise l'équation de Levich [20] (Éqs. 2a-c) dans ce cas, le courant global est égal au courant limite de diffusion lorsque $C_0 = 0$, sur une électrode tournante :

$$i_d^{\text{lim}} = nFS \frac{D}{\sigma_d} C^\infty \quad (2a)$$

avec

$$\sigma_d = 1,61D^{\frac{1}{3}} \nu^{\frac{1}{6}} \Omega^{-\frac{1}{2}} \quad (2b)$$

$$i_d^{\text{lim}} = 0,62nFD^{\frac{2}{3}} \nu^{-\frac{1}{6}} C^\infty \Omega^{-\frac{1}{2}} = K \cdot C^\infty \Omega^{-\frac{1}{2}} \quad (2c)$$

avec n , le nombre d'électron, F la constante de Faraday, S la surface de l'électrode d'or ($\emptyset = 5$ mm), D le coefficient de diffusion de l'espèce, ν la viscosité cinématique de l'eau et Ω , la vitesse de rotation de l'électrode. En présence du biofilm, le courant de diffusion limite diminue alors que l'épaisseur de la couche de diffusion augmente (Éq. (2a)). Mathématiquement, on adapte l'équation

de Levich en tenant compte du terme supplémentaire introduit précédemment, i_{bf} , à $t \neq 0$, de façon à estimer par différence de courant la valeur de l'épaisseur de la couche poreuse, δ_{bf} . (Éq. 3a, b).

$$i_{bf}^{\text{lim}} = nFS \frac{D}{\sigma_{bf}} C^\infty \quad \sigma_{bf} = nFSDC^\infty \left(\frac{1}{i_{d,t}^{\text{lim}}} - \frac{1}{i_{d,t=0}^{\text{lim}}} \right) \quad (3a)$$

avec $i_{d,t}^{\text{lim}}$, le courant de diffusion limite après colonisation et $i_{d,t=0}^{\text{lim}}$ le courant de diffusion limite avant colonisation.

Les suivis courant-vitesse de rotation, tracés selon la représentation de Levich (Éq. (2c)) sont superposés sans et avec biofilm de 15 jours sur une électrode d'or. La suite de la procédure consiste à calculer à partir de la pente, un coefficient de diffusion de l'oxydant. On trouve : $D_{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}} \approx 0,7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Puis en utilisant la relation simplifiée ($i_{\text{reduction}}^{\text{lim}} = K \cdot C_{[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}}^\infty \times \Omega^{\frac{1}{2}}$), on trace l'écart entre les droites de Levich en oxydation et en réduction avant et après colonisation (Fig. 9c). On peut remarquer qu'il n'y a pas de différence significative en utilisant l'un ou l'autre des écarts (oxydation ou réduction du traceur) par rapport à la droite de référence « témoin ». L'estimation de l'épaisseur est ainsi déterminée par différence à la valeur de référence « témoin » pour chacune des vitesses de rotation (Tab. 1).

Comme on peut le voir dans le tableau 1, lorsque l'hydrodynamique augmente, ce qui se traduit par l'augmentation de la vitesse de rotation, l'épaisseur δ_{bf} diminue de manière

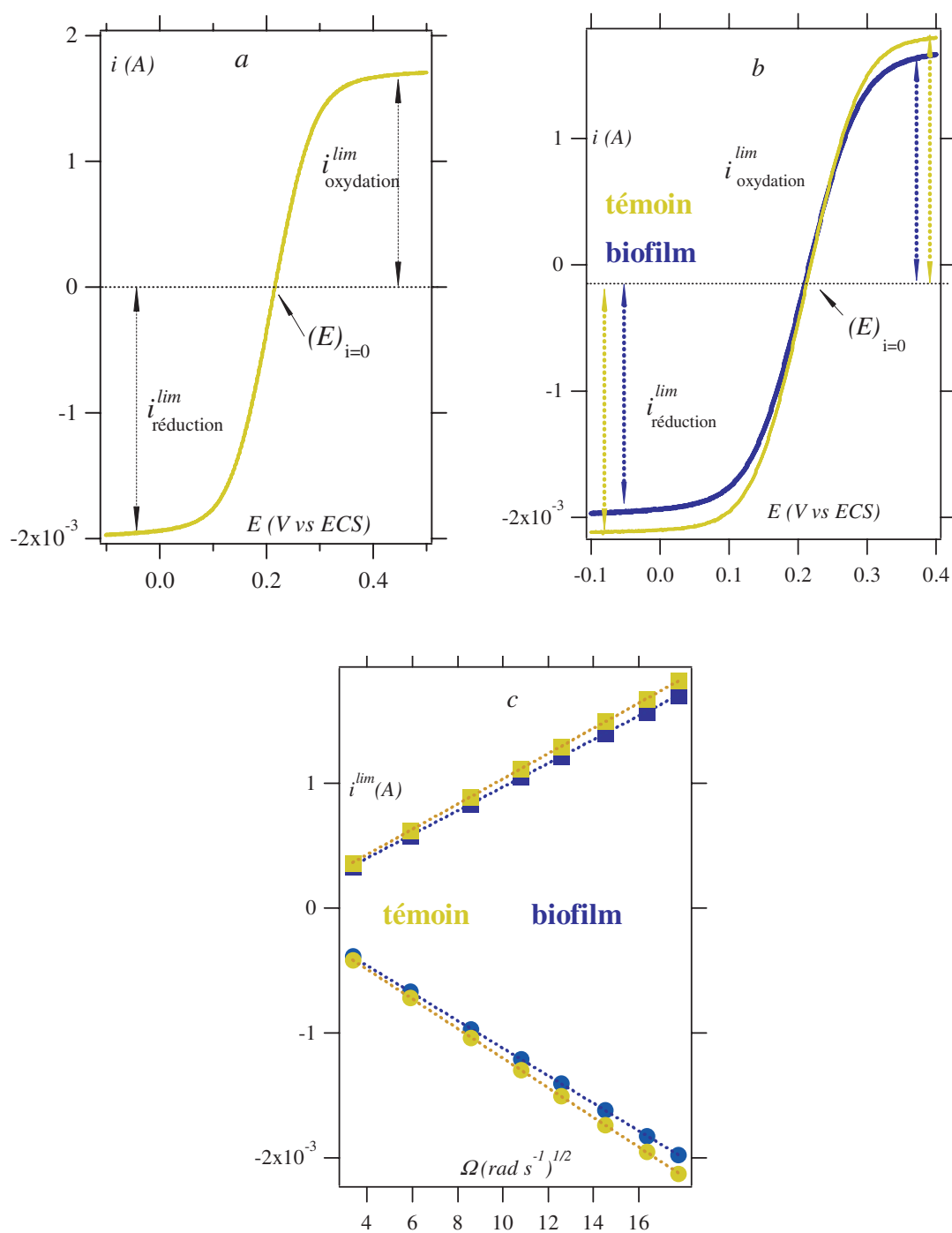


Fig. 9. a) Courbe voltampérométrique du traceur $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ à 10 mM dans l'électrolyte support KCl à 0,5 M à une vitesse de rotation $\Omega = 3000$ tours min^{-1} de l'électrode d'or ($\emptyset = 5$ mm) à température ambiante. b) Évolution du courant limite de diffusion du traceur avant colonisation (en clair) et après une colonisation de 15 jours sur la même électrode « témoin » en eau de robinet à 37 °C. c) Variation de type « Loi de Levich » du courant limite de réduction et d'oxydation en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode d'or (108, 331, 704, 1114, 1505, 2014, 2558, 3000 tours min^{-1}).

Fig. 9. a) Polarization curves taken at a gold disk electrode ($\emptyset = 5$ mm) at a rotation speed close to $\Omega = 3000$ rpm with $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10 mM) in KCl à 0.5 M at room temperature. b) Diffusion limited current for blank (before colonization, day 0) and biofilm (after colonization, day 15) samples. Evolution of the diffusion limited current, i_L with respect to the electrode speeds (108, 331, 704, 1114, 1505, 2014, 2558, 3000 rpm) according to Levich's law in the oxidation and reduction domains.

Tableau 1. Récapitulatif des épaisseurs du biofilm sur une électrode de platine et sur une électrode d'or pendant 15 et 35 jours de colonisation à 20 °C et 85 jours et 95 jours à 20 °C.Table 1. *Biofilm thickness on gold and platinum electrodes at day 15, 35, 85 and 95 at 20 °C.*

Ω (tours min^{-1})	108	331	704	1114	1505	2014	2558	3000
Pt, 37 °C, 15 jours, δ_{bf} (μm)	2,70	1,47	0,88	0,72	0,62	0,55	0,47	0,47
Or, 37 °C, 15 jours, δ_{bf} (μm)	2,80	2,20	1,27	1,04	0,94	0,83	0,80	0,75
Pt, 37 °C, 36 jours, δ_{bf} (μm)	3,55	2,05	1,44	1,17	1,05	0,95	0,77	0,82
Pt, 20 °C, 85 jours, δ_{bf} (μm)	3,95	3,20	2,70	2,45	2,35	2,30	2,15	2,00
Or, 20 °C, 85 jours, δ_{bf} (μm)	3,90	3,50	2,55	2,25	2,12	1,97	1,85	1,80
Pt, 20 °C, 95 jours, δ_{bf} (μm)	4,15	2,80	2,35	1,63	1,95	1,85	1,80	1,70

réversible sans décrochage de la biomasse fixée à l'électrode. L'électrode tournante met donc en évidence un caractère élastique du biofilm, qui s'écrase à la surface de l'électrode à très grande vitesse de rotation (passant respectivement de 2,8 à 0,75 μm pour des vitesses de 108 à 3000 tours min^{-1}). Par ailleurs, quand les temps d'immersion augmentent, la loi de Levich est toujours vérifiée, on peut donc suivre l'âge du biofilm, l'épaisseur ainsi que l'élasticité, confirmant que ce mode de détection est reproductible et vient en complément des observations spectroscopiques et microscopiques.

Conclusion, bilan et perspectives

Il a été mis en évidence que l'adhésion de micro-organismes, vraisemblablement du type légionelle, bactéries connues pour être majoritaires dans la flore des eaux de distribution, s'adsorbent sur les surfaces étudiées : or, acier inoxydable. Dans le cas d'une étude plus complète sur l'acier inoxydable (AISI 316), il a été observé une adhésion microbienne qui peut être l'amorce d'une biocorrosion ultérieure de l'acier. Le pH de l'eau du robinet étant de 8,25 - 8,5, la première étape est le conditionnement de la surface par un dépôt de carbonates et silicates surtout dans un milieu d'eau chaude, condition qui initie une corrosion plus rapide de la surface de l'acier, générant à la surface des éléments : fer et/ou nickel, assimilés par l'entremise de protéines dites « sidérophores » dans le cas de l'assimilation du fer. Les bactéries trouvent dans le conditionnement de la surface un lieu qui favorise leur adhésion et leur développement. Une concentration en minéraux serait surtout due à la capacité de la surface fortement hydratée et polyanionique pour l'acier dont la surface a été conditionnée, à favoriser la précipitation des cations métalliques. Les images

AFM montrent des caractéristiques structurales relatives aux parois bactériennes assez révélatrices. Les bactéries sèches présentent des résidus à leurs contours, il est probable que cela correspond à l'enveloppe de SEP plus ou moins fortement adsorbée sur la surface et participant à l'immobilisation des bactéries sur la surface des substrats utilisés. Une altération de l'enveloppe de SEP est probablement due aux effets du rinçage à l'eau réalisé avant le séchage à l'azote lors de la préparation des échantillons destinés à l'imagerie AFM, en accord avec les observations révélées dans la littérature. Des mesures d'épaisseur de la couche diffuse constituant le biofilm ont été estimées par RDE et corroborent le fait que la croissance du biofilm est rapide durant les premières semaines puis se stabilise. À une vitesse de rotation de 108 tours min^{-1} pour une électrode colonisée, une épaisseur moyenne de 2,8 μm est déterminée pour 15 jours en eau chaude, et 4 μm en 3 mois dans le cas d'une électrode colonisée en eau froide. Dans une évolution des études, il est envisagé de concevoir des sondes pour cibler principalement les bactéries légionelles présentes dans la flore aquatique, en fonctionnalisant la surface de l'acier inox comme peuvent l'être les surfaces d'or (puces à ADN, immunocapteurs). Les cas de légionellose répertoriés ne concernent que 20 espèces alors que la famille des légionelles comprend à peu près 43 espèces et 63 groupes sérologiques. Il est à noter que 80 % des cas d'infections l'ont été par *Legionella pneumophila* de sérogroup 1.

Remerciements

Les auteurs remercient le Pôle National à Implantation Régionale sur les biofilms (P.N.I.R), le Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S) et l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC-Paris 6) pour leur soutien financier.

Références

- [1] C.E. Zobell, *J. Bacteriol.* **46** (1943) 39-56
- [2] M.W. Dunne, *Crit. Rev. Microbiol.* **15** (2002) 155-166
- [3] M.W. Lechevallier, T.W. Babcock, R.G. Lee, *Appl. Environ. Microb.* **53** (1987) 2714-2724
- [4] I.B. Beech, J. Sunner, *Curr. Opin. Biotech.* **15** (2004) 181-186
- [5] R. Armon, J. Starosvetzky, T. Arbel, M. Green, *Water Sci. Tech.* **35** (1997) 293-300
- [6] M. Molmeret, D.M. Bitar, L. Han, Y.A. Kwaik, *Microbes Infec.* **6** (2004) 129-139
- [7] J.B. Wright, I. Ruseska, J.W. Costerton, *J. Appl. Bacteriol.* **71** (1991) 531-538
- [8] S.J. States, R.M. Wadowsky, J.M. Kuchta, R.S. Wolford, L.F. Conley, R.B. Yee, *Drinking Water Microbiol.*, Springer-Verlag (1990) 341-367
- [9] T. Schwartz, S. Hoffmann, U. Obst, *Water Res.* **32** (1998) 2787-2797
- [10] U. Brehm, A. Gorbushina, D. Mottershead, *Palaeogeogr. Palaeocl.* **219** (2005) 117-129
- [11] (a) P. Hiernaux, Contribution de la fraction minérale des eaux au développement et à la structure des biofilms : Apport des méthodes microscopiques et spectroscopiques, Thèse, Université de Poitiers, 2005. (b) C. Forêt, Maintien de la qualité des eaux dans les réseaux par des procédés innovants de traitement et de détection des biofilms, Thèse, Université de Poitiers, 2006
- [12] T. Gaul, S. Maerker, S. Kunst, *Water Sci. Tech.* **52** (2005) 127-133
- [13] J.N. Anderl, J. Zhaller, F. Roe, P.S. Stewart, *Antimicrob. Agents Ch.* **47** (2003) 1251-1256
- [14] V. Thomas, T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J.F. Loret, Y. Levi, *J. App. Microbiol.* **97** (2004) 950-963
- [15] S.G. Berk, J.H. Gunderson, A.L. Newsome, A.L. Farone, B.J. Hayes, K.S. Redding, N. Uddin, E.L. Williams, R.A. Johnson, M. Farsian, A. Reid, J. Skimmyhorn, M.B. Farone, *Environ. Sc. Tech.* **40** (2006) 7440-7444
- [16] C. Picioreanu, M.C.M. Van Loosdrecht, J.J. Heijnen, *Biotech. Bioeng.* **68** (2000) 355-369
- [17] M. Pasmore, P. Tood, B. Pfeifer, M. Rhodes, C. Bowman, *Biofouling* **18** (2002) 65-71
- [18] J.W. Moreau, R.I. Webb, J.F. Banfield. *Am. Mineral.* **89** (2004) 950-960
- [19] (a) D. Herbert-Guillou, B. Tribollet, D. Festy, L. Kiene, *Electrochim. Acta* **45** (1999) 1067-1075. (b) D. Herbert-Guillou, B. Tribollet, D. Festy, *Bioelectrochem.* **53** (2000) 119-125
- [20] V.G. Levich, *Physicochemical hydrodynamics*, Prentice-Hall, Scripta Technica, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1962