

Caractérisation de biofilms formés à partir d'eaux destinées à la consommation humaine

F. HUI*, J.LÉDION*, G-P. HUSSON**

***ARTS ET MÉTIERS ParisTech**

LIM-UMR CNRS 8006 - 151, boulevard de l'Hôpital
75013 PARIS

**** Université Paris-Descartes**

Laboratoire d'hydrologie - 4, avenue de l'Observatoire
75013 PARIS

Tél 01.44.24.62.15 - Fax 01.44.24.62.90

Messagerie : franck.hui@paris.ensam.fr

ABSTRACT

The requirements of the European regulations concerning the drinking water supply have led the water treatment companies and the network operators to be interested more and more in the organic matters fixed on the wall of materials in contact with water. These organic matters are commonly called “biofilms”.

For most researchers, the biofilm is just considered under its “organic” aspect. They define the biofilm as a “structured organism of micro-organisms in a matrix of polysaccharides and proteins which are protective and nutritive, adherent to a surface”.

In the simplest case, the biofilm would be composed of bacteria cells and their metabolites. Such a biofilm would have generally a very porous structure (more than 80% of water) and would also contain a part more or less important of inorganic particles trapped in the exopolymers. Moreover, within the biofilm, more evolved organisms, such as algae and protozoans would cohabit with the bacteria.

The inorganic matters are just mentioned by the way, perhaps in the concern to be complete and to forget nothing in the enumeration and this for well underline the complexity of the biofilm. Nevertheless, some rare researchers are interested in the relations between minerals and bacteria in the biofilm. In spite of all, the contribution remains less important. That is why we propose to show how the use of the infrared absorption spectrometry allows to characterise, with a relatively simple way, the different inorganic compounds presented in the biofilms.

The infrared absorption spectrometry is now a very classical method which is largely used by numerous laboratories. Although it is an old method, it has gotten a great interest by using Fourier Transformed mode. Nevertheless, its applications are usually limited to organic compounds but not to the analysis of inorganic matters, even though some pioneers such J.

Lecomte, had described in detail, in the middle of the last century, the interest of the infrared absorption spectrometry to both the organic and inorganic compounds.

Nowadays, the obtaining of complete spectrums are more quickly by offering the information about the compounds hydration and the different types of organic and inorganic matters. Of course, the method has also its limits, but they are not restricting for the study of the mineral fraction of the films.

However, the interpretation of the obtained spectra can be difficult when there is interference among absorption picks of several compounds. This is why we usually regrind the pastille, after saving the spectrum, then calcine the pastille at a suitable temperature. This calcination is for objective of the transformation of a substance which has poor absorbance in IR into another one which gives a strong absorbance (e.g. the sulphide can be transformed into the sulphate). The re-calcination can be also used for the elimination of organic matters at 550 °C. After the re-calcination, a new pastille is made and it is analysed in the same conditions.

The obtained results after the calcinations have showed indisputably that the studied biofilms contained effectively mineral matters which are by far to be of a minority: on one of them, a proportion of 43% of mineral matters has been obtained after calcinations during 17 hours at 550 °C (the biofilm having been dried previously during 1 h at 60 °C). In addition, these mineral matters can be characterised and measured either directly by a characteristic absorbance or by comparison of absorbance before and after calcination. Moreover, during a study on the kinetics of biofilms formation, we can combine these analyses with the characterisation (by culture and/or PCR) of micro-organisms developed in the biofilms.

RÉSUMÉ

Les exigences de la réglementation européenne concernant la distribution des eaux destinées à la consommation humaine ont conduit les distributeurs d'eau, comme les exploitants de circuits d'eaux à usage domestique ou industriel, à s'intéresser de plus en plus à la matière organique fixée sur les parois des matériaux placés au contact de l'eau. Cette matière organique est placée dans le langage courant sous le vocable « biofilm ».

Pour la plupart des auteurs, le biofilm est considéré sous son aspect « organique ». Ils définissent le biofilm comme une « organisation structurée de microorganismes dans une matrice polysaccharidique et protéique, protectrice et nutritive, adhérant à une surface ».

Dans le cas le plus simple, ce biofilm serait composé de cellules bactériennes et de leurs métabolites. Un tel biofilm aurait généralement une structure très poreuse (plus de 80% d'eau) et comporterait également une part plus ou moins importante de particules inorganiques piégées dans des exopolymères. De plus, au sein d'un biofilm, des organismes plus évolués, comme des algues, des protozoaires, cohabiteraient avec les bactéries...

Les matières inorganiques ne sont citées qu'en passant, sans doute dans le souci d'être complet et de ne rien oublier dans l'énumération et, ceci, pour bien souligner la complexité du système. Cependant quelques rares auteurs se sont tout de même intéressés aux relations minéraux/bactéries. Ces contributions restent, malgré tout, peu nombreuses. C'est pourquoi nous nous proposons de montrer comment l'utilisation de la spectrométrie d'absorption infrarouge permet d'accéder, de manière relativement simple, aux différents composés inorganiques présents dans les biofilms.

La spectrométrie d'absorption infrarouge est une méthode aujourd'hui très classique et largement utilisée en routine par de nombreux laboratoires. Bien qu'elle soit ancienne, elle a connu un regain d'intérêt avec l'apparition d'appareils utilisant la transformée de Fourier. Cependant, les applications se cantonnent souvent à la chimie organique, alors qu'elle est nettement sous-utilisée pour l'analyse des produits inorganiques, même si certains pionniers comme J.Lecomte en avaient décrit, au milieu du siècle dernier, dans le détail, l'intérêt, pour les substances aussi bien organiques qu'inorganiques.

De nos jours, l'obtention de spectres complets est beaucoup plus rapide, fournissant des informations sur l'hydratation des produits, les différentes matières organiques et les divers types de composés inorganiques présents. Bien sûr, la méthode a aussi des limites, mais qui ne sont généralement pas contraignantes pour l'étude de la fraction minérale des biofilms.

Cependant, le dépouillement des spectres obtenus peut se heurter à des difficultés lorsqu'il y a interférence entre les bandes d'absorption de plusieurs produits. C'est pourquoi on peut, après enregistrement du spectre, rebroyer la pastille, puis la calciner à une température appropriée. Cette calcination peut avoir pour objet la transformation d'une substance peu visible en IR en une autre qui absorbe avec plus de netteté (par exemple les sulfures, qui peuvent être transformés en sulfates), ou bien l'élimination des matières organiques par calcination à 550°C en atmosphère oxydante. Après calcination on reconstitue une pastille, qui est analysée, dans les mêmes conditions.

Les analyses après calcination ont prouvé sans conteste que les biofilms étudiés contenaient bien des produits minéraux qui sont loin d'être minoritaires : sur l'un d'entre eux, une proportion de 43% de matière minérale a été obtenue après calcination pendant 17h à 550°C (le biofilm ayant au préalable séché 1h à 60°C). D'autre part ces produits minéraux sont caractérisables (formule, cristallinité) et mesurables, soit directement par une absorbance caractéristique, soit en comparant les absorbances avant et après calcination. Par ailleurs, lors d'une étude sur la cinétique de formation de biofilm, on peut coupler ces analyses avec la caractérisation (par culture et/ou PCR), au cours du temps, des microorganismes qui se développent dans le biofilm.

INTRODUCTION

Les exigences de la réglementation concernant la distribution des eaux destinées à la consommation humaine a conduit les distributeurs d'eau, comme les exploitants de circuits d'eaux à usage domestique ou industriel, à s'intéresser de plus en plus à la matière organique fixée sur les parois des matériaux placés au contact de l'eau. Cette matière organique est placée dans le langage courant sous le vocable « biofilm ».

Pour la plupart des auteurs, le biofilm est considéré sous son aspect « organique ». Par exemple, Costerton et al. [1] définissent le biofilm comme une « organisation structurée de microorganismes dans une matrice polysaccharidique et protéique, protectrice et nutritive, adhérant à une surface ».

Dans le cas le plus simple, ce biofilm serait composé de cellules bactériennes et de leurs métabolites. Un tel biofilm aurait généralement une structure très poreuse (plus de 80% d'eau) et

comporterait également une part importante de particules inorganiques piégées dans des exopolymères. De plus, au sein d'un biofilm, des organismes plus évolués, comme des algues, des protozoaires, cohabiteraient avec les bactéries...

Les matières inorganiques ne sont que rarement citées et, en général, ne sont pas analysées. On en parle dans le souci d'être complet, et de ne rien oublier dans l'énumération, pour bien souligner la complexité du système. Cependant d'autres auteurs se sont tout de même intéressés aux relations minéraux/bactéries [2] [3]. Ces contributions restent, malgré tout, peu nombreuses. C'est pourquoi nous nous proposons de montrer comment l'utilisation de la spectrométrie d'absorption infrarouge permet d'accéder, de manière relativement simple, aux différents composés inorganiques présents dans les biofilms.

Aujourd'hui, la spectrométrie d'absorption infrarouge est une méthode d'analyse très classique et largement utilisée en routine par de nombreux laboratoires. Bien qu'elle soit ancienne, elle a connu un regain d'intérêt avec l'apparition d'appareils utilisant la transformée de Fourier. Cependant, les applications se cantonnent souvent à la chimie organique, alors qu'elle est nettement sous-utilisée pour l'analyse des produits inorganiques, même si certains pionniers comme J.Lecomte [4] en avaient décrit, au milieu du siècle dernier, dans le détail, l'intérêt, pour les substances aussi bien organiques qu'inorganiques.

De nos jours, l'obtention de spectres complets est beaucoup plus rapide, fournissant des informations sur l'hydratation des produits, les différentes matières organiques et les divers types de composés inorganiques présents. Bien sûr, la méthode a aussi des limites, mais qui ne sont généralement pas contraignantes pour l'étude de la fraction minérale des biofilms.

I - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Principaux avantages de la méthode d'analyse

La spectrométrie infrarouge ne fait, elle, aucune différence entre composés organiques et inorganiques. Elle voit seulement les mouvements (vibrations par exemple) des atomes les uns par rapport aux autres. Sur la figure 1 on voit l'aspect d'un spectre qui montre à la fois de la matière organique et des produits minéraux. L'important est que les informations concernant les divers types de composés se trouvent être séparées, la fréquence dépendant de la masse des atomes aussi bien que de la longueur des liaisons. Ces informations peuvent être traitées indépendamment. De manière générale, la masse des groupements d'atomes à l'origine d'une

bande augmente de l'infrarouge proche à l'infrarouge lointain, c'est-à-dire de $\lambda = 2,5\mu\text{m}$ à $50\mu\text{m}$ en longueur d'onde, ou encore, en prenant $1/\lambda$, de $4\,000$ à 200 cm^{-1} en nombre d'ondes (ν^*).

Schématiquement, les groupements O-H sont les premiers à apparaître entre 4000 et 3000 cm^{-1} , suivis des liaisons organiques (surtout entre 3000 et 1000 cm^{-1}), puis les groupements CO_3 , SO_4 , SiO_4 , de 1550 à 600 cm^{-1} , et enfin les oxydes et oxyhydroxydes métalliques entre 600 et 200 cm^{-1} .

Par ailleurs, cette technique prend en compte la symétrie des groupements d'atomes et de la maille cristalline, ce qui permet de distinguer les variétés allotropiques d'un même composé chimique. Par exemple, le carbonate de calcium CaCO_3 donne des bandes d'absorption différentes selon qu'il est sous une forme amorphe et très hydratée ou, plus classiquement, sous forme de calcite, d'aragonite ou de vaterite.

Au-delà d'une approche qualitative, des mesures quantitatives sont possibles. C'est pourquoi il est intéressant de pouvoir mesurer les quantités de matière prélevées. L'information se trouve inscrite sur les documents sortant du spectromètre, mais il faut savoir l'en extraire avec certitude. Le principe est simple, car après broyage de l'échantillon dans du bromure de césium (transparent à l'infrarouge) servant de dispersant, on comprime l'ensemble sous forme d'une pastille dont l'aire présentée au spectromètre est constante. Dans ces conditions, les absorbances sont additives et, pour un groupement donné, l'absorbance A est proportionnelle à la masse m du groupement présent dans la pastille. La pratique est un peu plus complexe. Elle dépend notamment de la qualité des spectres obtenus. [5] [6]

1.2. Prélèvement et pastillage

Dans les biofilms formés en milieu aqueux ce sont sans doute les silicates, ou les aluminosilicates d'origine argileuse, qui jouent ce rôle de rigidification. Les résultats obtenus sur plus d'une centaine de biofilms, formés sur divers matériaux (verre, cuivre, aciers inoxydables, PVC, Caoutchouc) ont montré qu'avec une alimentation à base d'eaux industrielle, de rivière ou souterraine, on obtenait toujours des aluminosilicates, quelle que soit la turbidité de l'eau utilisée. Il semble bien que les développements bactériens, révélés en infrarouge par les bandes amides I et II, sont facilités par la présence de ces composés d'origine argileuse. En retour, les développements bactériens doivent contribuer au piégeage de ces aluminosilicates. Cette hypothèse est confortée par ce que l'on peut observer dans le domaine de l'assainissement. Il est bien connu [10] que l'adjonction de smectites colloïdales est utilisée pour améliorer le fonctionnement des fosses septiques en assainissement individuel. Par ailleurs, on a pu montrer récemment [11] que, dans les biofilms qui se forment au départ des évacuations de lavabos, les

aluminosilicates provenant des dentifrices sont l'élément structurant essentiel. La figure 8 permet de se rendre compte de la parfaite adéquation qui existe entre la partie minérale du biofilm et la charge inorganique du dentifrice utilisé.

Pour obtenir un spectre représentatif du biofilm étudié, il est nécessaire de faire le prélèvement de manière rigoureuse. La première opération consiste à procéder à un lavage du biofilm à l'eau déminéralisée, de manière à éliminer au maximum l'eau du réseau qui l'imbibe et les "sels" qu'elle contient. Un séchage modéré, par évaporation à la température ambiante (ou éventuellement à l'étuve jusqu'à 60°C maximum), suffit alors à éliminer l'excès d'humidité sans dénaturer le produit à analyser. La seconde opération est le prélèvement proprement dit. Lorsque le biofilm est abondant, on peut utiliser une technique de micro-abrasion à l'aide de petits outils en acier inoxydable. S'il est invisible à l'œil nu, on procède par contact : du bromure de césium en poudre fine est frotté sur la surface et se pollue par le biofilm. C'est ce bromure enrichi en biofilm qui sera analysé.

On procède alors au pesage (en routine, une pesée de 10 à 100 µg) à l'aide d'une balance automatique au µg. Le broyage doit être soigné, d'une durée standardisée (10 minutes par exemple). Il se fait en présence de bromure de césium (23 ± 2 mg pour une pastille de 5 mm de diamètre). Ce dernier est indispensable pour obtenir des spectres dans l'infrarouge lointain (jusqu'à 200 cm^{-1}). L'opération se fait dans un mini-mortier en alumine monocristalline ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), incolore, saphir ou rubis suivant la couleur de l'échantillon. Après broyage, on procède immédiatement au pastillage à l'aide d'un moule approprié (5 ou 3 mm de diamètre) placé sous une presse hydraulique.

1.3. Spectres infrarouges

Les pastilles sont analysées avec un spectromètre Perkin-Elmer à transformée de Fourier, avec une résolution de 4 ou 8 cm^{-1} , en accumulant 120 spectres (conditions de routine). Tous les spectres sont enregistrés en mode absorbance, donnant ainsi une échelle linéaire pour les mesures quantitatives. L'appareil est équipé d'un système de réduction du trajet optique dans l'air afin de minimiser les perturbations liées à l'air ambiant (humidité, CO_2). La figure 1 donne un exemple de spectre ainsi obtenu.

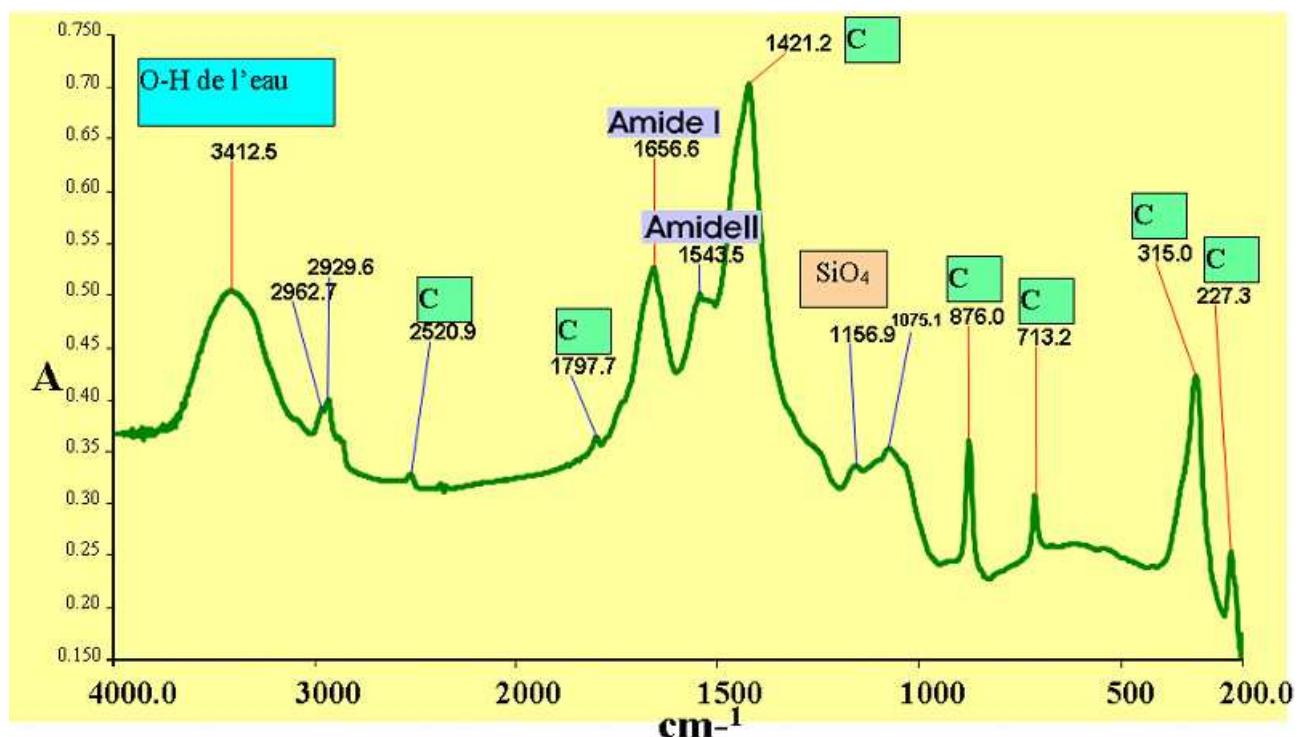


Figure 1 : Spectre d'un biofilm (sans précaution particulière de prélèvement)

Sur ce spectre, formé sur une surface en polyéthylène, on observe bien l'eau résiduelle d'hydratation du biofilm (O-H), les bandes (liaisons C-H, vers 2950cm^{-1}) des matières organiques des les bandes amide I et II des protéines, caractéristiques d'une activité biologique, ainsi que la présence de minéraux : carbonate de calcium sous forme de calcite (repérée C) et aluminosilicates (repérés SiO_4).

1.4. Opérations complémentaires

Le dépouillement des spectres obtenus peut se heurter à diverses difficultés lorsqu'il y a interférence entre les bandes d'absorption de plusieurs produits. C'est pourquoi on peut, après enregistrement du spectre, rebroyer la pastille, puis la calciner à une température appropriée. Cette calcination peut avoir pour objet la transformation d'une substance peu visible en IR en une autre qui absorbe avec plus de netteté (par exemple les sulfures, qui peuvent être transformés en sulfates), ou bien l'élimination des matières organiques par calcination à 550°C en atmosphère oxydante.

Après calcination on reconstitue une pastille, qui est passée dans les mêmes conditions dans le spectromètre. La perte de substance lors des transferts est limitée à 1 % si l'on prend soin de piéger les résidus sur les parois (de la coupelle par exemple), avec très peu de CsBr (pur, broyé) et les ajoutant à la pastille. On peut voir, sur la figure 2, le spectre du résidu minéral du biofilm

de la figure 1. On retrouve de l'eau en faible quantité (eau atmosphérique reprise par hygroscopie lors du pastillage) de la calcite (notée C) ainsi que des aluminosilicates (notés SiO_4)

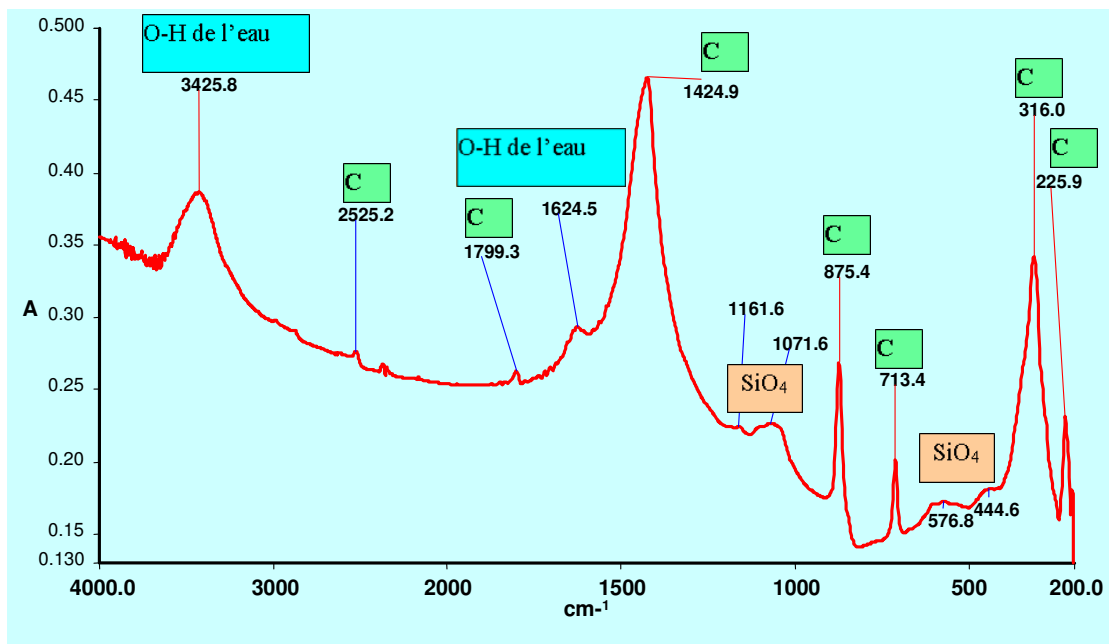


Figure 2 : Spectre du biofilm de la figure 1, après calcination à 550°C

1.5. Dispositif pour la formation des biofilms

Afin de disposer de biofilms formés dans des conditions hydrauliques identiques, on utilise, dans un bac de 15 L, un ensemble de 4 tubes de 10cm de long, montés en série, dans lesquels circule l'eau, en circuit semi-ouvert, avec appoint permanent et purge pour éviter de concentrer cette eau en sels minéraux. Les tubes sont immergés dans le bac de telle manière que l'on puisse former des biofilms en eau quasi stagnante à l'extérieur des tubes, et des biofilms en eau circulante à l'intérieur des tubes (figure 3).

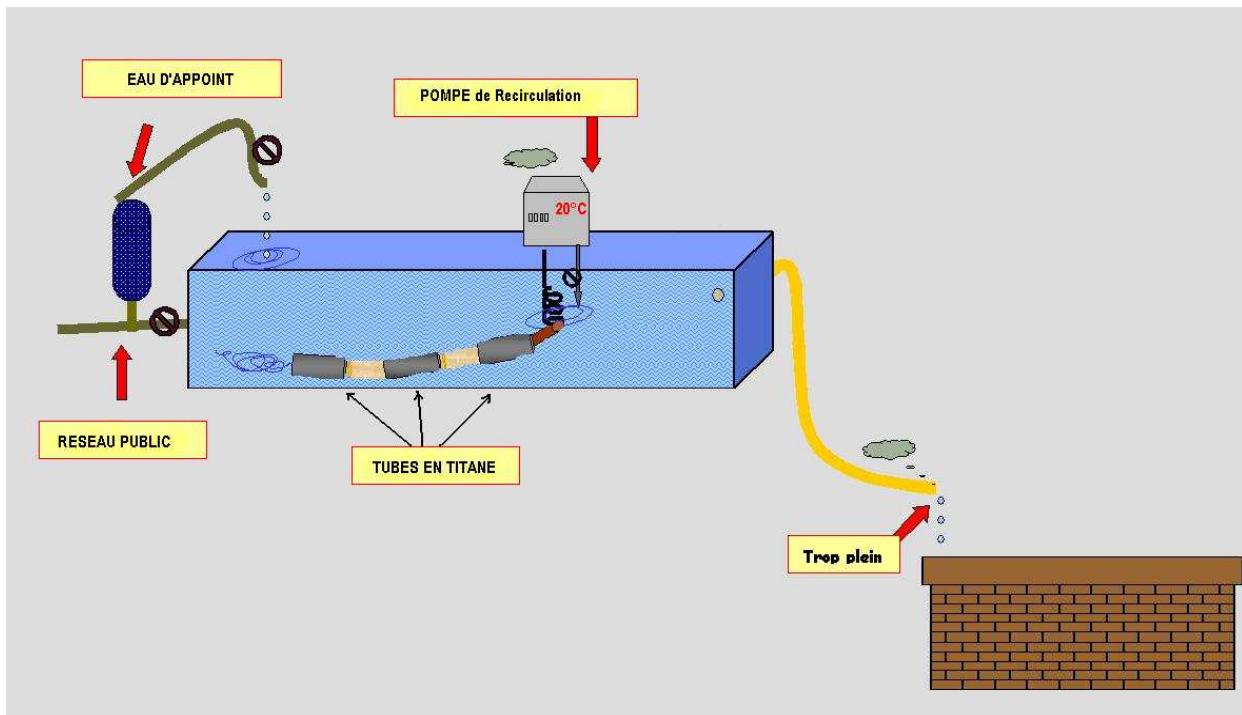


Figure 3 : Dispositif utilisé pour le développement de biofilms

Les tubes utilisés, d'un diamètre d'un demi-pouce, ont été choisis, lors d'essais préliminaires, en matériaux divers : cuivre, acier inoxydable austénitique, titane, verre et bicouche polyéthylène/caoutchouc. Par la suite, on n'a utilisé que des tubes en titane (pour avoir un matériau à la fois inerte en matière de corrosion, mais aussi non nutritif et non toxique pour les micro-organismes) et des tubes bicouche polyéthylène/caoutchouc (pour disposer de matériaux nutritifs). De cette manière, on n'est pas gêné, lors de l'analyse, par des interférences avec les produits de corrosion ou par un ralentissement des colonisations, provoqué par l'effet plus ou moins bactéricide de matériaux comme le cuivre et le verre.

1 6 Eau utilisée

Pour former des biofilms caractéristiques de circuits d'eaux destinées à la consommation humaine, on a choisi de travailler avec des eaux naturelles, utilisées pour l'alimentation de Paris (d'origine souterraine Aqueducs de la Vanne et du Loing, eau A) ou une eau (B) d'origine superficielle (eau de Seine destinée à l'alimentation de Paris) dont les compositions types sont données au tableau I.

Tableau 1 : Caractéristiques physico- chimiques moyennes des eaux étudiées
(A : eau souterraine - B : eau de surface)

Paramètre	Eau A	Eau B
Température (°C)	11,6	10,0
Conductivité (µS/cm)	506	448
pH	7,5	7,8
Dureté (degré F)	27,1	22,6
Titre Alc. Complet (degré F)	22,1	16,7
Calcium (mg/L)	106,4	85,0
Magnésium (mg/L)	2,4	3,3
Sodium (mg/L)	6,9	10,0
Potassium (mg/L)	1,8	2,9
<i>Total cations (méq/L)</i>	<i>5,86</i>	<i>5,03</i>
Hydrogénocarbonate (mg/L)	269,6	203,7
Sulfate (mg/L)	21,0	29,0
Chlorure (mg/L)	18,0	24,0
Nitrate (mg/L)	32,0	24,0
<i>Total anions (méq/L)</i>	<i>5,88</i>	<i>5,01</i>
Taux de saturation δ	1,16	1,32

1.7. Caractérisation des micro-organismes

De manière parallèle, des recherches systématiques de la nature de la flore bactérienne de ces mêmes biofilms ont été mises en œuvre. Le biofilm est décroché par grattage, écouvillonnage ou passage dans une cuve à ultrasons, d'une autre portion de tuyaux (Titane, Caoutchouc, PVC, et c....) étudiés conjointement par spectrométrie IR. Ce prélèvement est ensemencé par inclusion en gélose nutritive (gélose PCA) puis incubé à 36°C +/-2°C pendant 44 heures (+/-4 h), et à 22°C (+/- 2°C) pendant 68 heures (+/- 4h) de sorte que les micro-organismes revivifiants forment des colonies dans et sur le milieu. Cette première étape permet une estimation quantitative de la flore et une comparaison des techniques de décrochage. En même temps, dans le but d'identifier la flore, celle-ci est récupérée à la surface d'une membrane (0,45µm) par filtration puis cultivée sur une gélose PCA 48h à 36°C. Elle est par la suite repiquée, isolée puis identifiée par une combinaison d'observations microscopiques et de tests biochimiques. Les différents résultats des différents échantillons de tuyaux sont comparés entre eux. Les résultats sur des portions prélevées dans le temps du même tuyau sont comparés de la même façon.

II – RÉSULTATS OBTENUS SUR DIVERS BIOFILMS

Ces résultats sont relatifs à une campagne d'obtention de biofilms d'une durée de 100 jours. L'eau utilisée est l'eau B (eau de Seine). La température de l'essai est la température ambiante, de l'ordre de 20°C.

2.1. Biofilms observés sur matériau non nutritif (extérieur de tube en titane)

L'observation visuelle, après 100 jours d'essai, montre que, bien que le biofilm soit moins

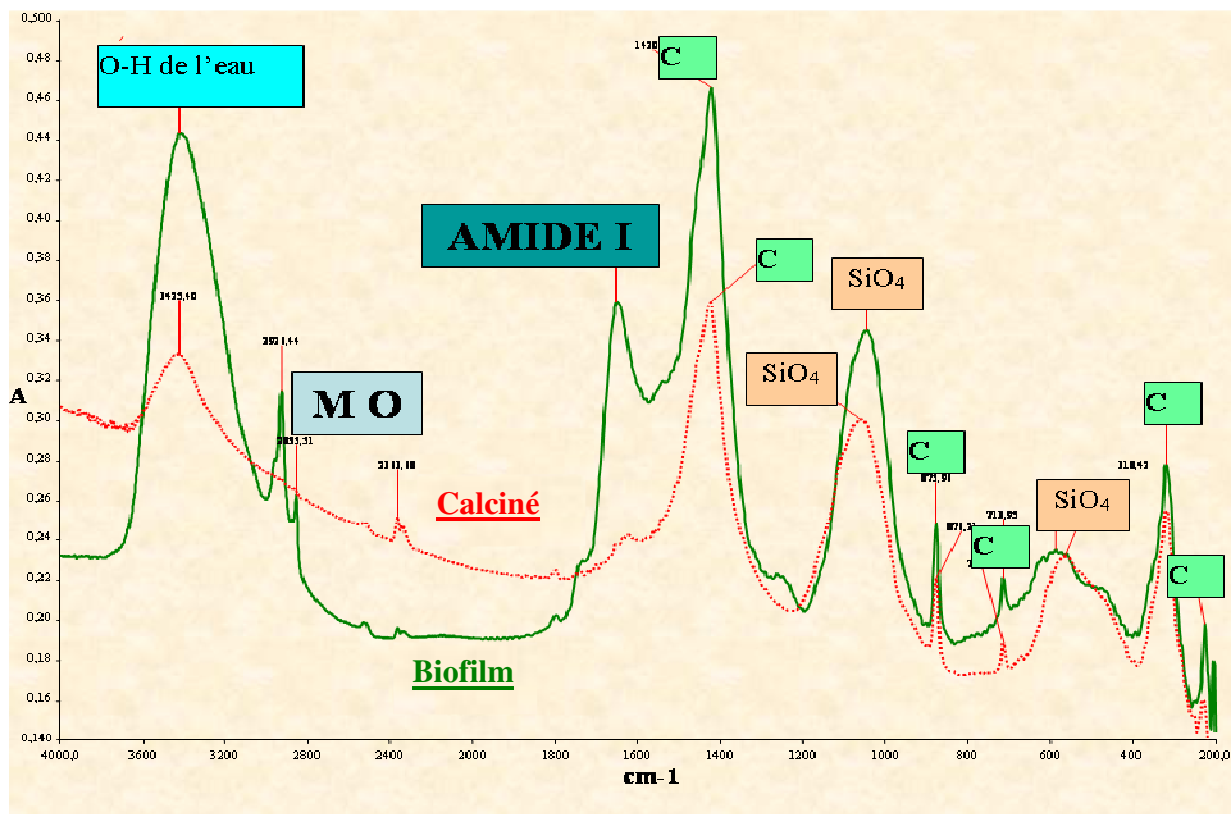


Figure 4 : Spectres IR, avant et après calcination, du biofilm formé sur la paroi extérieure d'un tube de titane (eau quasi stagnante)

abondants sur les tubes en titane (donc non nutritifs) que sur les tubes à base de polymères (donc nutritifs), il est néanmoins visible à l'œil nu, compte-tenu de la durée relativement longue de l'expérimentation. On a reporté, sur la figure 4, les spectres IR relatifs au biofilm formé en eau quasi stagnante sur l'extérieur du tube. C'est ce biofilm qui est le moins abondant. Cependant, on voit bien sur le spectre initial (en trait plein) la présence des bandes organiques relatives aux liaisons C-H et la bande amide I, caractéristique des biofilms. Les carbonates sont visibles ainsi que les silicates et/ou phosphates. Le spectre après calcination (trait pointillé) montre, sans ambiguïté, que le biofilm contient bien des aluminosilicates et du carbonate de calcium sous forme de calcite.

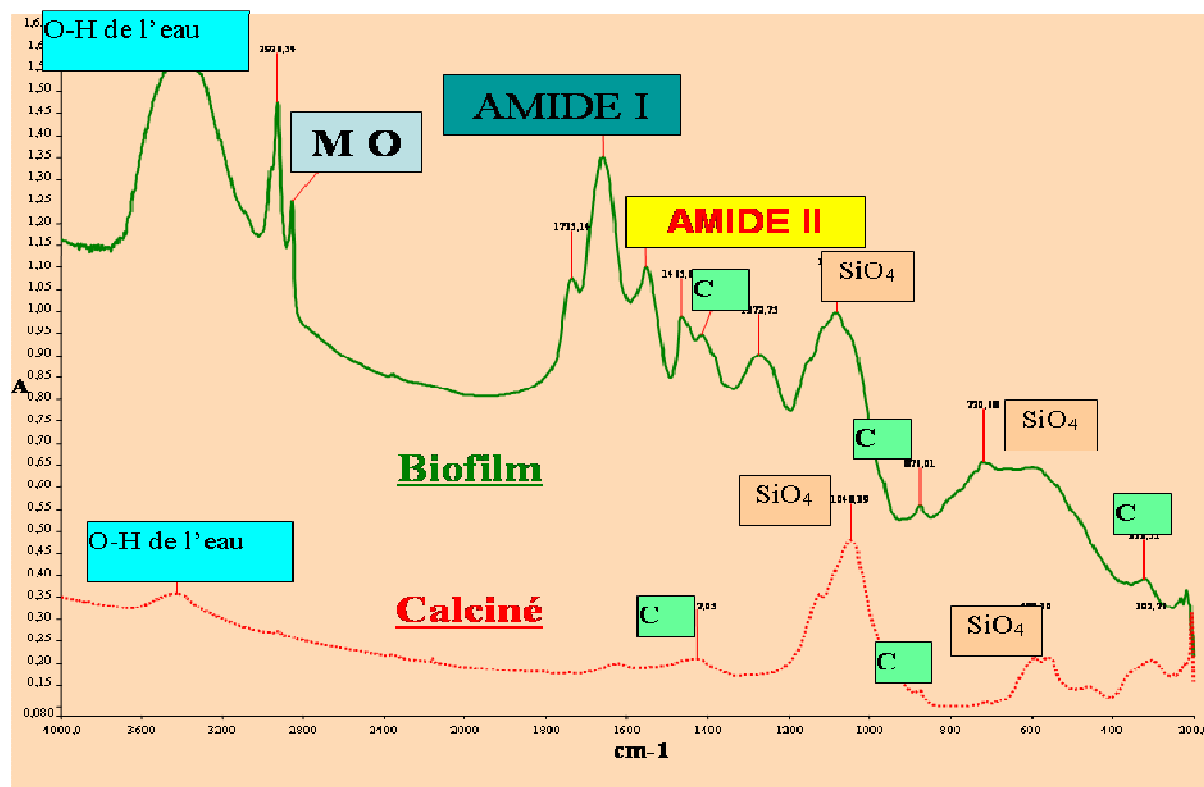


Figure 5 : Spectres IR, avant et après calcination, du biofilm formé sur la paroi intérieure d'un tube de titane (eau en circulation)

A l'intérieur des tubes de titane, où l'eau circule, le biofilm paraît plus abondant qu'à l'extérieur. Les spectres correspondants, avant et après calcination, sont sur la figure 5. La présence de biofilm est également confirmée. La quasi absence de carbonates permet, en plus de faire apparaître la bande amide II, également caractéristique des biofilms, à 1544cm^{-1} . Après calcination, le résidu minéral est essentiellement constitué d'aluminosilicates (bandes à 1054 et 561cm^{-1}). Il subsiste également des traces de calcite.

2.1. Biofilms observés sur matériaux nutritifs (extérieur en polyéthylène, intérieur en caoutchouc)

Comme on pouvait s'y attendre, les biofilms sont nettement plus abondants sur les tubes composites. Sur l'extérieur (eau quasi stagnante), en polyéthylène, les spectres obtenus sont reportés sur la figure 6. Les bandes des matières organiques (liaisons C-H) sont très nettement visibles autour de 2990cm^{-1} . De même les bandes amide I et II sont visibles. Après calcination, les matières organiques ayant disparu (spectre en pointillé), on observe un résidu minéral où

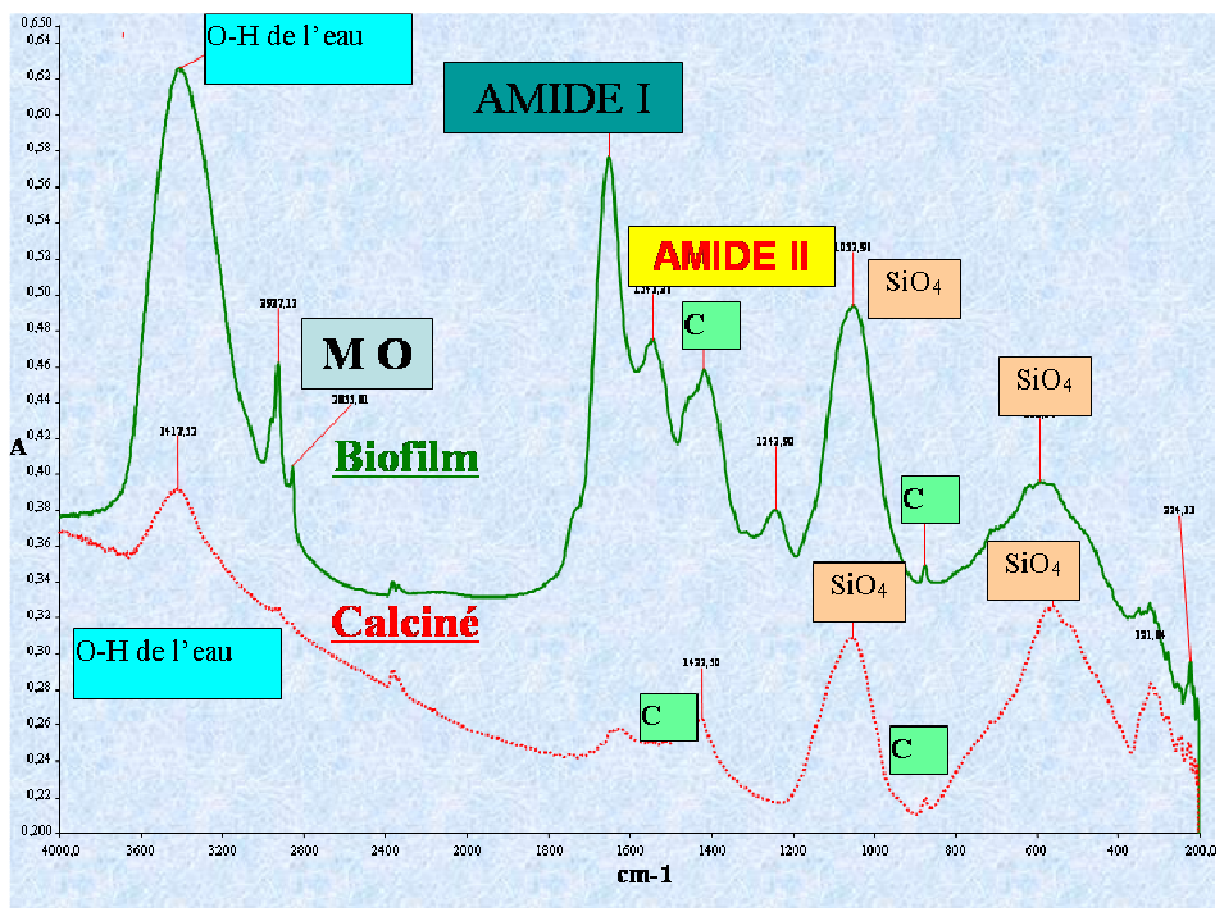


Figure 6 : Spectres IR, avant et après calcination, du biofilm formé sur la paroi extérieure d'un tube en polyéthylène (eau quasi stagnante)

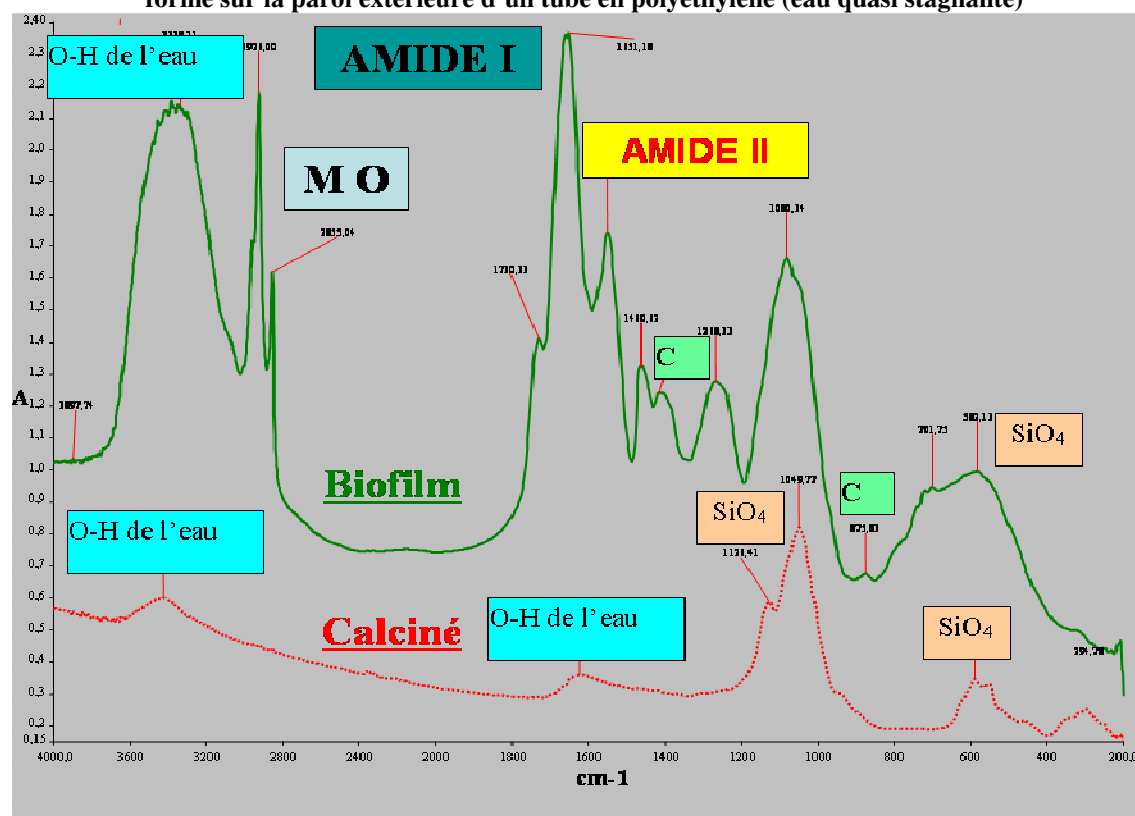


Figure 7 : Spectres IR, avant et après calcination, du biofilm formé sur la paroi extérieure d'un tube en caoutchouc (eau en circulation)

abondent les aluminosilicates. On note cependant des traces de calcite (pics à 1423, 877, 714 cm^{-1}). Quant à l'intérieur des tubes (eau en circulation), on observe les mêmes éléments présents. On voit, sur la figure 7 que le biofilm est abondant et que sa fraction minérale est exclusivement composée d'aluminosilicates.

III –DISCUSSION

À travers les exemples cités, on peut voir que la technique d'analyse par spectrométrie d'absorption infrarouge, sur des prélèvements de faible quantité, de l'ordre de 100 μg , en utilisant des micropastilles de 3 ou 5 mm de diamètre, donne des spectres IR d'excellente qualité.

Les analyses après calcination ont prouvé sans conteste que les biofilms étudiés contenaient bien des produits minéraux qui sont, d'une part loin d'être minoritaires, une proportion de 43% de matière minérale ayant été obtenue après calcination pendant 17h à 550°C (le biofilm ayant au préalable séché 1h à 60°C). D'autre part ces produits minéraux sont caractérisables (formule, cristallinité) et mesurables, soit directement par une absorbance caractéristique, soit en comparant les absorbances avant et après calcination. Ce genre d'étude n'enlève rien à toutes les recherches faites par ailleurs sur les biofilms, mais elle soulève une question importante : les substances minérales sont-elles des « impuretés » piégées par le biofilm lors de sa constitution ou, au contraire, sont-elles réellement constitutives de ce biofilm ? Dans le cas présent, nous avons déjà vu que les quantités des deux composés majoritaires (organique et minéral) sont comparables, tout comme pour le cas des produits laitiers.

En effet, dans une étude plus ancienne, en associant la spectrométrie infrarouge avec d'autres techniques telles que la spectrométrie de photo-électrons X, les auteurs avaient pu conclure à une interaction protéines-phosphates-calcium [7], ce matériau mixte (très variable suivant la nature de ces protéines) étant susceptible de se fixer sur la zircone [8] ou d'autres supports comme les aciers inoxydables [9]. Fondamentalement en effet, les protéines possèdent localement dans leur structure des charges résiduelles à plusieurs niveaux. Par exemple des charges positives sur les atomes de calcium disséminés sur un certain nombre de sites, mais également des charges négatives au niveau des groupements carboxylates. Elles peuvent donc amorcer une fixation sur des supports très divers, surtout si l'on s'éloigne de leur point isoélectrique. Les ions calcium extérieurs viennent de toute façon se complexer avec les protéines, les carboxylates constituant des sites privilégiés (analogie avec les carbonates, qui ont leur bande principale dans la même région voisine de 1 400 cm^{-1}). Les premières structures de

ces matériaux mixtes sont amorphes dans le cas des phosphates, et plus aisément visibles que les carbonates de calcium. Les hydroxy-apatites sont les composés thermodynamiquement stables dans ces conditions, mais avec une énergie d'activation plus élevée que pour CaCO_3 ; elles se forment au cours du temps, ou sont activées par élévation de la température. Il y a bel et bien dans ce cas une synergie entre la formation de « dépôts » et celle de biofilm. La rigidification de ces structures par un excès de composé inorganique cristallisé n'intervient pas dans les premières étapes, et dépend notamment des propriétés du composé inorganique engagé.

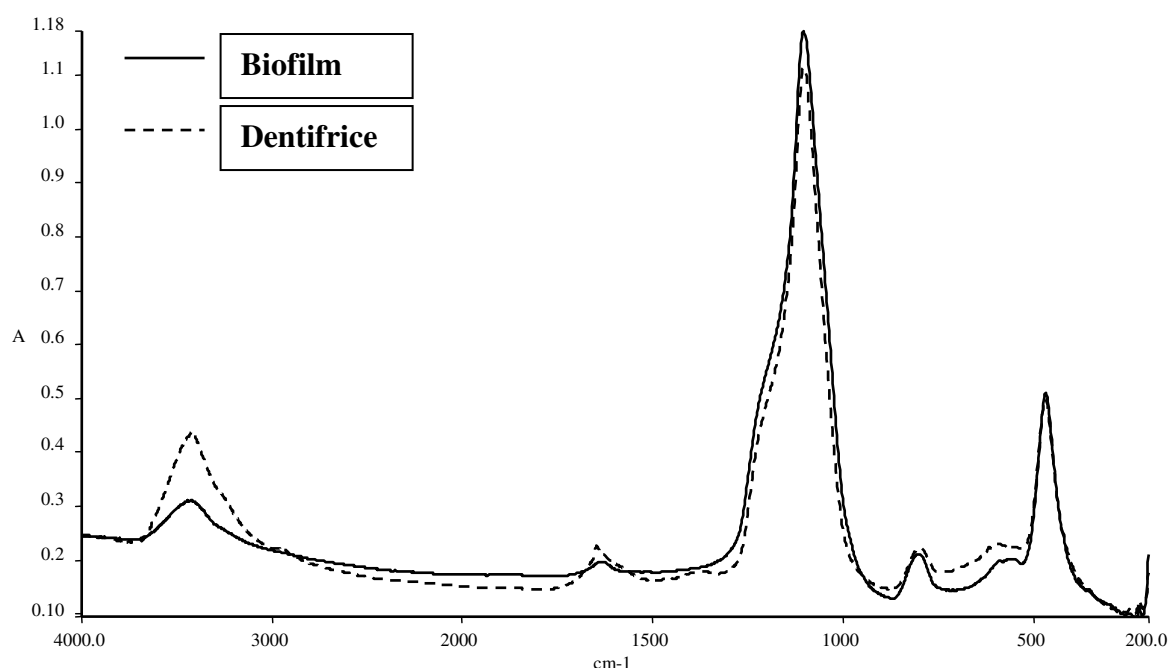


Figure 8 : Spectres, après calcination des résidus minéraux de biofilm et de dentifrice

Dans les biofilms formés en milieu aqueux ce sont sans doute les silicates, ou les aluminosilicates d'origine argileuse, qui jouent ce rôle de rigidification. Les résultats obtenus sur plus d'une centaine de biofilms, formés sur divers matériaux (verre, cuivre, aciers inoxydables, PVC, Caoutchouc) ont montré qu'avec une alimentation à base d'eaux industrielle, de rivière ou souterraine, on obtenait toujours des aluminosilicates, quelle que soit la turbidité de l'eau utilisée. Il semble bien que les développements bactériens, révélés en infrarouge par les bandes amides I et II, sont facilités par la présence de ces composés d'origine argileuse. En retour, les développements bactériens doivent contribuer au piégeage de ces aluminosilicates. Cette hypothèse est confortée par ce que l'on peut observer dans le domaine de l'assainissement. Il est bien connu [10] que l'adjonction de smectites colloïdales est utilisée pour améliorer le fonctionnement des fosses septiques en assainissement individuel. Par ailleurs, on a pu montrer récemment [11] que, dans les biofilms qui se forment au départ des évacuations de lavabos, les

aluminosilicates provenant des dentifrices sont l'élément structurant essentiel. La figure 8 permet de se rendre compte de la parfaite adéquation qui existe entre la partie minérale du biofilm et la charge inorganique du dentifrice utilisé.

CONCLUSION

L'analyse par spectrométrie infrarouge des biofilms est une méthode simple, rapide à mettre en œuvre (une demi-heure par spectre), à forte sensibilité, donnant des informations qualitatives et quantitatives concernant les composés, aussi bien organiques qu'inorganiques, qu'ils soient amorphes, bien ou mal cristallisés (dans ce cas, on peut évaluer un taux de cristallinité). Les renseignements que les chercheurs actuels en tirent restent encore largement en-dessous de ses possibilités. Nous avons tenté d'en montrer ici, par un bref aperçu, tout l'intérêt, dans le cas de biofilms formés à partir d'eau destinée à la consommation humaine, dont la teneur en composés inorganiques est loin d'être négligeable. Il est également démontré qu'utiliser des matériaux non corrodables, nutritifs ou non nutritifs, permet de mieux caractériser les différentes phases en présence. Bien entendu, ces études doivent être couplées avec des méthodes classiques de caractérisation des microorganismes présents.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Costerton, J.W., "[A Short History of the Development of the Biofilm Concept](#)," In : Microbial Biofilms, Ghannoum, M.A. and G. O'Toole (Eds.) ASM Press, Washington, DC, pp. 4-19 (2004).
- [2] J.H. Thomassin and N. Merlet, 2002, "Relation entre la composition des eaux et la structure des biofilms : associations minéraux/bactéries", JIE, vol 33, tome 2, p.63-1.
- [3] P. Hiernaux, Contribution de la fraction minérale des eaux au développement et à la structure des biofilms, Thèse de Doctorat de l'Université de Poitiers (2005)
- [4] J. Lecomte, Spectroscopie dans l'infrarouge, Handbuch der Physik, XXVI, Springer Verlag, Berlin (1958)
- [5] J.P. Labbé, J. Lédion, F.Hui, Infrared spectrometry for solid phase analysis : Corrosion rusts, Corrosion Science 50 (2008) 1228-1234
- [6] R.A. Nyquist, R.O. Kagel, IR Spectra of Inorganic Compounds, Academic Press, New-York, London, 1971.
- [7] G. Daufin, J.P. Labbé, "Equipment fouling in the dairy application : problem and pretreatment", in : Calcium phosphates in biological and industrial systems, Zahid Amjad (Ed.), Kluwer Academic Publishers, chapt. 19, pp. 437- 463 (1998).
- [8] J.P. Labbé, A. Quémerais, F. Michel, G. Daufin. "Fouling of inorganic membranes during whey ultrafiltration : an analytical methodology". J. Membr. Sci., vol. 51, pp 293-307 (1990).

[9] M. Dupeyrat, J.P. Labbé, F. Michel, F. Billoudet, G. Daufin. "Mouillabilité et interactions solide-liquide dans l'encrassement de divers matériaux par du lactosérum et du lait". Le Lait, vol.67, n°4, pp 465-486 (1987).

[10] R. Moletta, A. Rambaud., S. Maunoir, H. Philip. Les additifs à effet biologique dans le traitement des eaux : application à la digestion anaérobie et à la fosse septique, (T.S.M ; N°10,.2007, p 31),

[11] - F.Hui, E.Palayodan, B.Quilichini, J.Lédion, Analyse des composants inorganiques de biofilms par spectrométrie d'absorption infrarouge, J.I.E.2008, Poitiers (23-25 sept. 2008, tome 2, pp 70 - 1 à10).