

# Analyse de la fraction minérale des biofilms par spectrométrie d'absorption infrarouge

■ F. HUI<sup>1</sup>, J.-P. LABBÉ<sup>2</sup>, J. LÉDION<sup>1</sup>

Mots-clés : spectrométrie infrarouge, eau potable, biofilms, composés inorganiques

## Introduction

Les exigences de la réglementation sur 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. Par exemple, COSTERTON *et al.* [1] définissent le biofilm comme une « organisation structurée de micro-organismes dans une matrice polysaccharidique et protéique, protectrice et nutritive, adhérent 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 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, 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.

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 [4] en avaient décrit dans le détail, au milieu du siècle dernier, 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.

## 1. Matériels et méthodes

### 1.1. Principaux avantages de la méthode

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.

<sup>1</sup> École Nationale Supérieure d'Arts et Métiers – LIM-UMR CNRS 8006 – 151, boulevard de l'Hôpital – 75013 Paris.  
<sup>2</sup> SERAM – 151, boulevard de l'Hôpital – 75013 Paris.

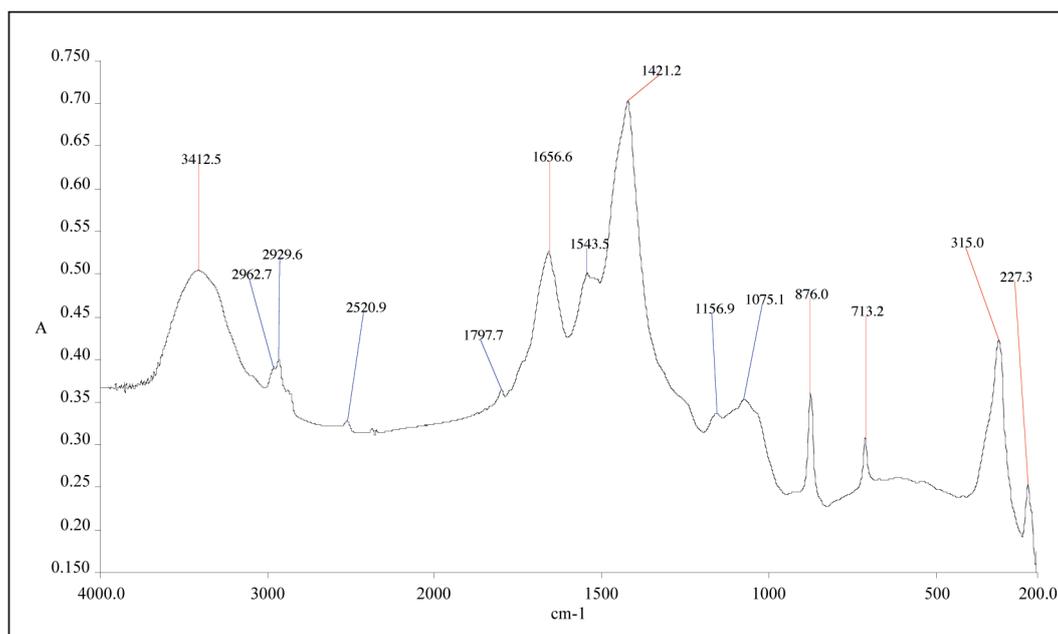


Figure 1. Spectre de biofilm (sans précaution particulière de prélèvement)

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 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  $\lambda = 2,5 \text{ mm}$  à  $50 \text{ mm}$  en longueur d'onde, ou encore, en prenant  $1/\lambda$ , de  $4\,000$  à  $200 \text{ cm}^{-1}$  en nombre d'ondes ( $n^*$ ).

Schématiquement, les groupements O-H sont les premiers à apparaître entre  $4\,000$  et  $3\,000 \text{ cm}^{-1}$ , suivis des liaisons organiques (surtout entre  $3\,000$  et  $1\,000 \text{ cm}^{-1}$ ), puis les groupements  $\text{CO}_3$ ,  $\text{SO}_4$ ,  $\text{SiO}_4$ , de  $1\,550$  à  $600 \text{ cm}^{-1}$ , et enfin les oxydes métalliques entre  $600$  et  $200 \text{ cm}^{-1}$ .

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  $\text{CaCO}_3$  donne des bandes d'absorption différentes selon qu'il est sous une forme amorphe et très hydratée ou, plus classi-

quement, 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

Pour obtenir un spectre représentatif du biofilm étudié, il est nécessaire de faire le prélèvement de manière rigoureuse. La première opération consiste à procéder au 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 am-

biante, suffit 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 est pollué 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 mg) à l'aide d'une balance automatique au mg. Le broyage doit être soigné, d'une durée standardisée (10 minutes par exemple). Il se fait en présence de bromure de césium ( $23 \pm 2$  mg pour une pastille de 5 mm de diamètre). Ce dernier est indispensable pour obtenir des spectres dans l'infrarouge lointain (jusqu'à  $200 \text{ cm}^{-1}$ ). 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  $8 \text{ cm}^{-1}$ , 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,  $\text{CO}_2$ ). La *figure 1* donne un exemple de spectre ainsi obtenu.

### 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  $550 \text{ }^\circ\text{C}$  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 % en piégeant les résidus sur les parois (de la coupelle par exemple), avec très peu de CsBr (pur, broyé) et en les ajoutant à la pastille.

## 2. Exemple d'analyse

### 2.1. Biofilm étudié

Pour montrer l'intérêt de la technique, on a examiné un biofilm naturel formé sur une cuvette en matière plastique, alimentée en eau par le réseau public (eau de Seine potabilisée par filière classique) et ayant connu une phase de stagnation prolongée. Le biofilm ainsi récupéré, peu adhérent, possède une couleur noirâtre et une texture gluante. Après rinçage à l'eau déminéralisée et séchage naturel pendant trois heures, ce biofilm a donné le spectre de la *figure 2*. L'examen sommaire de ce spectre permet d'y retrouver toutes les caractéristiques attendues. Il s'agit d'un produit fortement hydraté, comme en témoigne la bande large des liaisons d'élongation O-H de l'eau à  $3\,420 \text{ cm}^{-1}$ .

Les matières organiques sont mises en évidence au niveau des liaisons carbone-hydrogène autour de  $2\,900 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ ), puis par deux bandes d'absorbance importante vers  $1\,650$  et  $1\,550 \text{ cm}^{-1}$  (dites bandes « amide I » et « amide II » de la chaîne peptidique), dont l'absorbance correspond à environ  $44 \mu\text{g}$  de composés organiques [8]. Mais il faut aussi remarquer l'important massif pointant à  $1\,421 \text{ cm}^{-1}$  qui correspond au groupement carbonate ( $\text{CO}_3$ ), et dont la valeur précise est propre à la calcite (carbonate de calcium de structure rhomboédrique). Cette calcite est confirmée par un pic fin à  $875$  dont la mesure fournit  $14 \mu\text{g}$  de  $\text{CaCO}_3$ , puis d'autres à  $713$ ,  $315$ ,  $226$ ,  $1\,798 \text{ cm}^{-1}$ . La bande large, mal définie, située entre  $1\,100$  et  $1\,000 \text{ cm}^{-1}$ , peut correspondre à des silicates ou à des phosphates pour le domaine inorganique, et à des liaisons organiques du type C-O.

### 2.2. Spectre après élimination de la partie organique

Après calcination de 30 minutes à  $550 \text{ }^\circ\text{C}$ , le produit précédemment analysé a donné après repastillage le

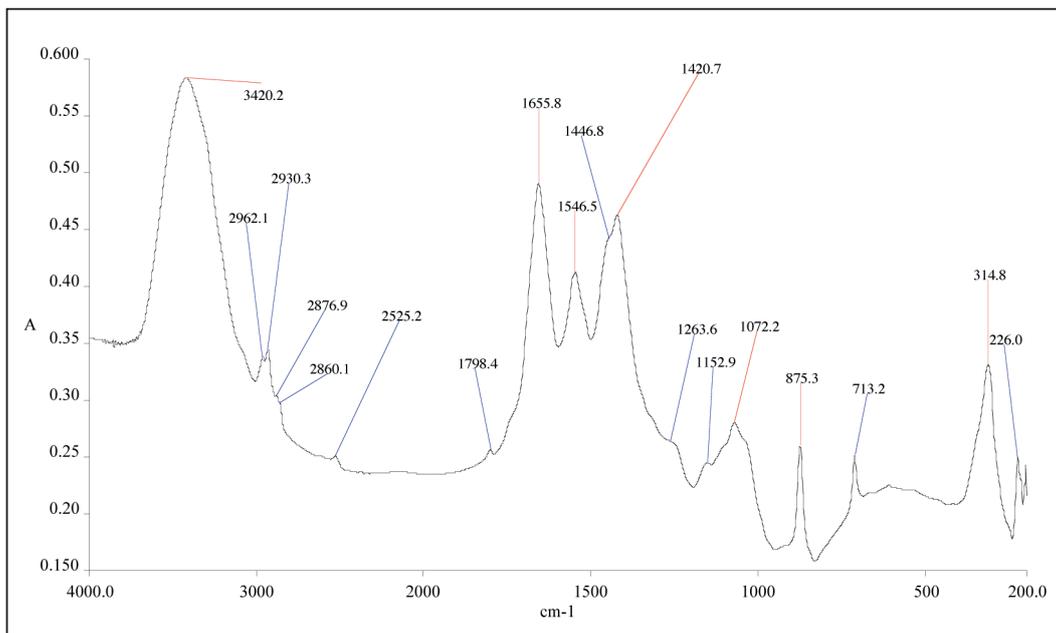


Figure 2. Spectre du biofilm après rinçage à l'eau déminéralisée et séchage de 3 h en atmosphère naturelle

spectre de la figure 3. Dans le domaine des matières organiques, les traces observées correspondent à la pollution naturelle propre à ce genre d'opération (pollution due à l'air du laboratoire, à l'opérateur et à l'outillage), pollution au demeurant totalement négligeable. La faible intensité à 3 426  $\text{cm}^{-1}$  correspond à une adsorption d'eau sur les surfaces. Les composants

minéraux sont, eux, toujours présents, en même quantité pour la calcite (à 5 % près), mais à 1 072  $\text{cm}^{-1}$ . L'absorbance a beaucoup diminué, passant de 0,096 à 0,049. Seule cette dernière valeur correspond à la véritable quantité d'aluminosilicates présents à température ambiante dans l'eau sous forme de colloïdes argileux (environ 5  $\mu\text{g}$  comptés en masse de  $\text{SiO}_2$ ).

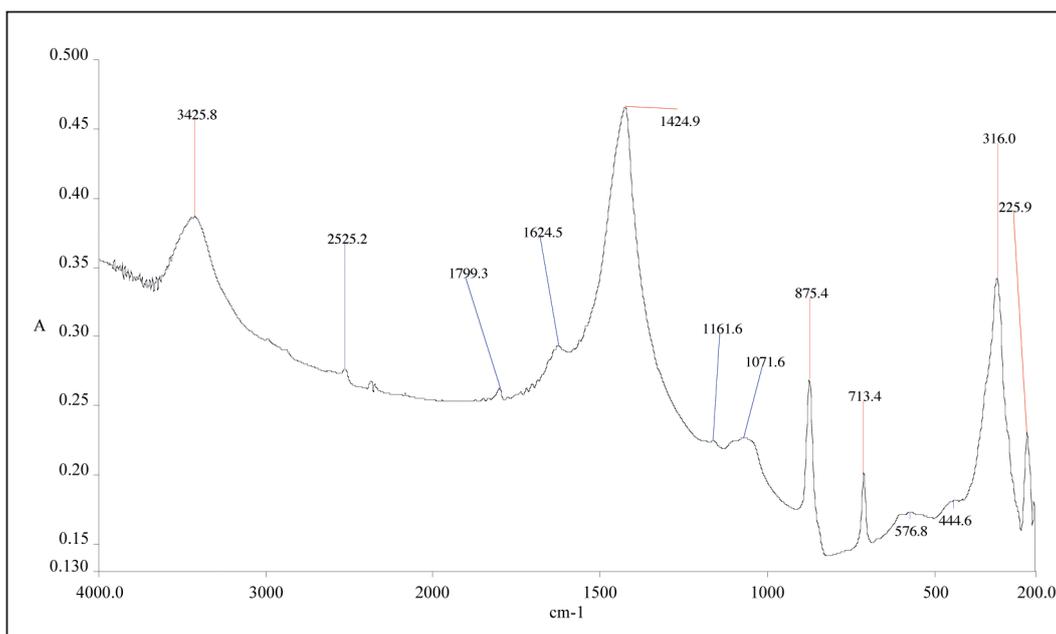


Figure 3. Spectre du biofilm après calcination de 30 minutes à 550 °C

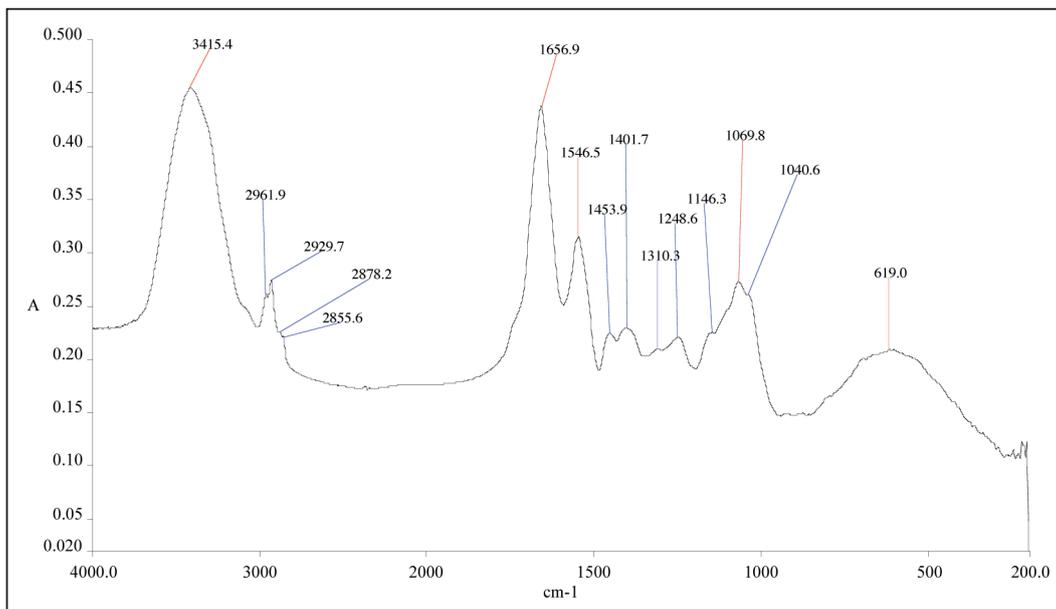


Figure 4. Spectre du biofilm après traitement à l'eau déminéralisée acidifiée et séchage

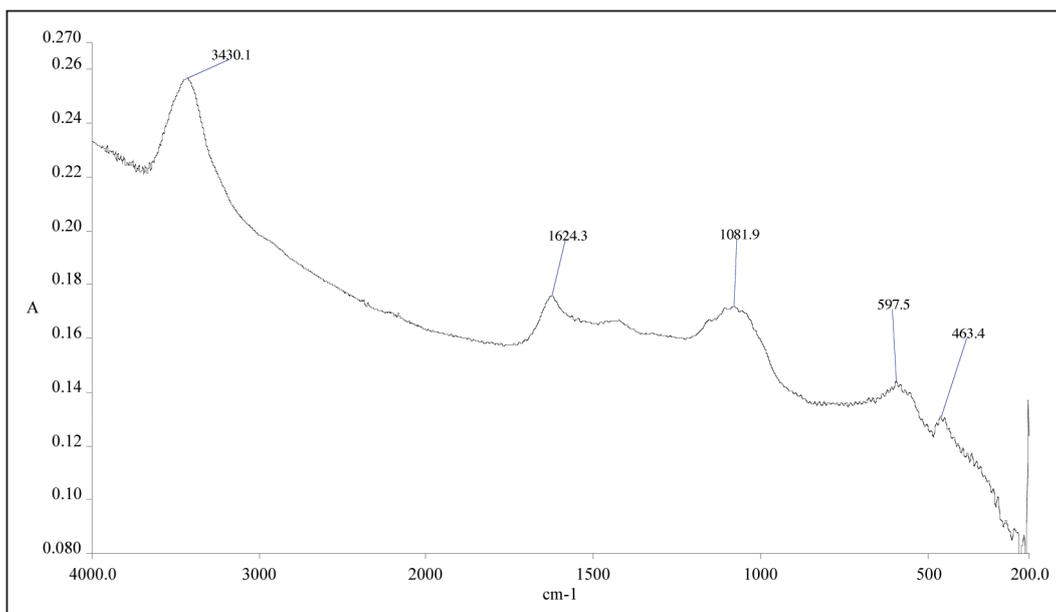


Figure 5. Spectre du biofilm décarbonaté après calcination de 30 min à 550 °C

### 2.3. Spectre après élimination du carbonate de calcium

Les analyses précédentes montrent que le carbonate de calcium sous forme de calcite est le produit inorganique le plus abondant dans le biofilm étudié. Pour pousser plus loin l'analyse, on a procédé à son élimination par attaque acide, dans de l'eau déminéralisée additionnée d'acide chlorhydrique, afin d'obtenir un pH de l'ordre de 2,5. Le résidu, après rinçage et cen-

trifugation, a été pastillé. Ceci a donné le spectre de la figure 4 : la part des aluminosilicates (pic large centré sur 1 070  $\text{cm}^{-1}$ ) n'est toujours pas mesurable en présence, ici, de 58 mg de matières organiques [8]. Et, même après calcination (30 minutes à 550 °C, figure 5) de la même pastille (même quantité de matière initiale), on constate que l'absorbance à 1 080  $\text{cm}^{-1}$  est passée de 0,11 à 0,03 environ, soit un équivalent de 3  $\mu\text{g}$   $\text{SiO}_2$ , pour 58 mg de matières orga-

niques initiales. La première conclusion reste inchangée : une quantité non négligeable de liaisons C-O, absorbant aussi  $1\ 070\ \text{cm}^{-1}$  environ, était présente dans le biofilm initial, leur proportion par rapport aux liaisons peptidiques étant moindre en raison de l'attaque acide. Un fait supplémentaire apparaît : la quantité de composés silicatés est également moins importante, toujours à cause de l'attaque acide. On vérifie ici l'importance d'une référence à un invariant lorsqu'on fait plusieurs traitements sur un même lot. La chaîne peptidique en a tenu lieu ici ; sinon, il faut travailler sur des parties aliquotes d'un même échantillon de base dûment pesé.

Il ne s'agit pas là d'un simple détail. Par exemple, un des produits valorisables de l'industrie laitière, que nous avons étudié, est le lactosérum. Il donne des bandes de protéines analogues à celles que nous avons observées dans les figures 1 à 5, mais contient aussi beaucoup de lactose avec des bandes intenses vers  $1\ 000\ \text{cm}^{-1}$ . Il est indispensable de savoir retrancher ce dernier si besoin est, ce qui peut précisément se faire par calcination à  $550\ ^\circ\text{C}$ . Les dépôts recueillis à partir de fluides modélisant le lactosérum donnent pour les phosphates des

profils variés, caractérisant des phosphates de calcium de pouvoirs encrassant très différents. On trouve des apatites avec deux pics non séparés à  $1\ 000$  et  $1\ 040\ \text{cm}^{-1}$ , dont les intensités relatives sont liées à la cristallinité, mesurable par un simple rapport de bandes voisines (figure 6-1), mais on peut aussi trouver des produits amorphes (figure 6-2). Parfois enfin, notamment à pH plus faible, les phosphates obtenus (figure 6-3) ont un profil original (deux bandes, d'intensité à peu près égale, vers  $1\ 000$  et  $1\ 100\ \text{cm}^{-1}$ ), traduisant leur adsorption sur le filtre en oxyde de zirconium, alors qu'à ces valeurs de pH, les phosphates de calcium ne peuvent plus précipiter [7]. L'important était d'observer qu'en l'absence de précautions particulières, les phosphates de calcium, même amorphes comme ils l'étaient souvent au début, sont liés aux protéines (le rapport phosphates/protéines n'ayant jamais varié dans de grandes proportions) et, bien sûr, au support. Nous avons là une forte analogie avec les biofilms à carbonates de calcium.

### 3. Discussion

À travers les exemples cités, on peut voir que la technique d'analyse par spectrométrie d'absorption infra-

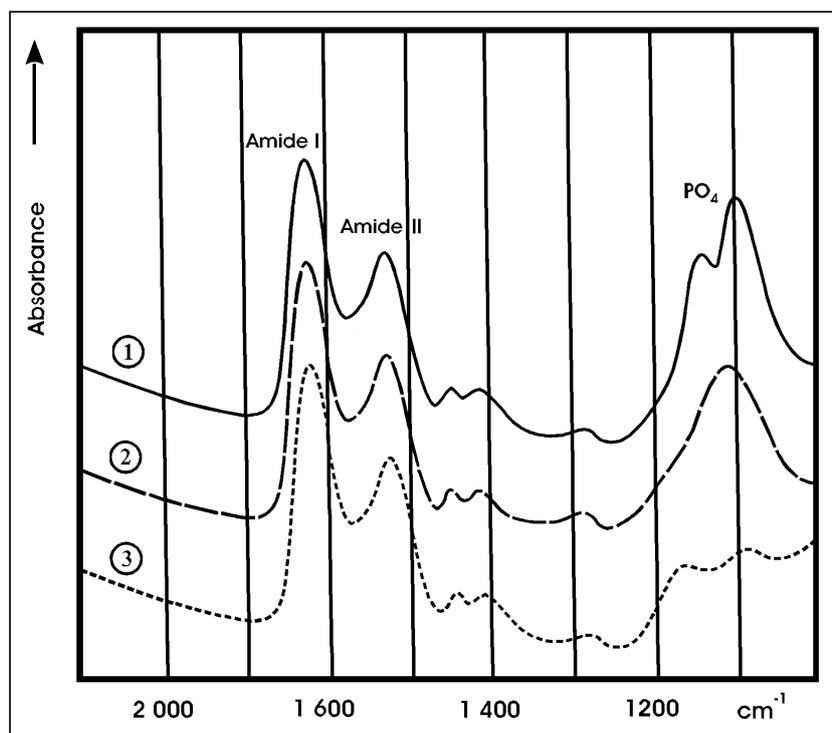


Figure 6. Protéines et phosphates obtenus avec des fluides de l'industrie laitière  
 1 - Dépôt sur acier inoxydable (présence d'apatite) à partir d'un ultrafiltrat artificiel [9]  
 2 - Dépôt sur membrane de zircon (présence de phosphate amorphe) à pH 6,9 [8]  
 3 - Dépôt sur membrane de zircon (présence de phosphate d'adsorption) à pH 5,6 [8]

rouge sur des prélèvements de faible quantité, de l'ordre de 100 mg, 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 le biofilm étudié contenait bien des produits minéraux qui sont, d'une part, loin d'être minoraux. Une proportion de 43 % de matière minérale a été obtenue après calcination pendant 17 h à 550 °C (le biofilm ayant au préalable séché 1 h 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 associant la spectrométrie infrarouge avec d'autres techniques, telles que la spectrométrie de photo-électrons X, on avait 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 zirconite [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. Les

protéines peuvent donc amorcer une fixation sur des supports très divers, surtout si l'on s'éloigne de leur point iso-électrique. 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  $\text{cm}^{-1}$ ). 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  $\text{CaCO}_3$ ; 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.

## Conclusion

La spectrométrie infrarouge 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 calculer un taux de cristallinité). Les renseignements que les chercheurs en tirent restent, aujourd'hui, largement en-dessous de ses possibilités. Nous avons tenté d'en montrer ici tout l'intérêt par un bref aperçu, à travers le cas d'un biofilm dont la teneur en composés inorganiques est loin d'être négligeable (plus de 40 %).

## Bibliographie

- [1] COSTERTON J.-W. : "A short history of the development of the biofilm concept". In GHANNOUM M., O'TOOLE G., *Microbial biofilms*, ASM Press, 2004, Washington DC, pp. 4-19.
- [2] MERLET N., THOMASSIN J.H. : "Relation entre la composition des eaux et la structure des biofilms : associations minéraux/bactéries", *JIE*, vol. 33, tome 2, 2002, p. 63-1.
- [3] HIERNAUX P. : "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] LECOMTE J. : "Spectroscopie dans l'infrarouge". *Handbuch der Physik*, XXVI, Springer Verlag, 1958, Berlin.
- [5] BÉDIANG B., LABBÉ J.-P., LÉDION J. : "Analyse qualitative et quantitative des mélanges solides calcite-aragonite par spectrophotométrie d'absorption infrarouge". *Analisis*, vol. 12 n°10, 1984, pp 514-522.
- [6] KAGEL R.-O., NYQUIST R.-A. : "IR spectra of inorganic compounds". Academic Press, 1971, New-York, London.
- [7] DAUFIN G., LABBÉ J.-P. : "Equipment fouling in the dairy application: problem and pretreatment". In ZAHID AMJAD, *Calcium phosphates in biological and industrial systems*, Kluwer Academic Publishers, chapt. 19, 1998, pp. 437- 463.
- [8] DAUFIN G., LABBÉ J.-P., QUÉMERAIS A., MICHEL F. : "Fouling of inorganic membranes during whey ultrafiltration: an analytical methodology". *J. Membr. Sci.*, vol. 51, 1990, pp. 293-307.
- [9] DUPEYRAT M., LABBÉ J.-P., MICHEL F., BILLOUDET F., DAUFIN G. : "Mouillabilité et interactions solide-liquide dans l'encrassement de divers matériaux par du lactosérum et du lait". *Le Lait*, vol. 67, n°4, 1987, pp. 465-486.

## Résumé

**F. HUI, J.-P. LABBÉ, J. LÉDION. Analyse de la fraction minérale des biofilms par spectrométrie d'absorption infrarouge**

Méthode déjà ancienne, la spectrométrie d'absorption infrarouge a connu un regain d'intérêt avec l'apparition des spectromètres à transformée de Fourier. Mais l'usage de cette technologie s'est souvent limité à l'étude des substances organiques. Cependant, la recherche de produits inorganiques peut se faire de manière très efficace, sur de faibles quantités par micro-prélèvement, à condition d'avoir des produits soigneusement broyés. Les pastilles de diamètre 5 mm analysent en

routine de 10 à 100 mg de produit. En deçà, on travaille en 3 mm (ou moins).

L'utilisation d'un support en bromure de césium et d'un spectromètre allant dans l'infrarouge lointain jusqu'à  $200\text{ cm}^{-1}$  permet d'identifier la plupart des produits inorganiques, que ceux-ci soient amorphes, mal ou bien cristallisés.

Cette technique est également applicable aux biofilms. On peut alors montrer que beaucoup de biofilms formés en eaux naturelles ou industrielles contiennent une forte proportion de substances inorganiques (carbonates, silicates, oxydes en général).