

Organisation structurale et caractérisation biochimique des biofilms sur alliages inoxydables

Stéphanie Salaün¹, Emmanuel Rinnert¹ et Chantal Compère¹

¹IFREMER, Département Ressources physiques et Ecosystèmes de fond de Mer, Unité Recherche et Développement Technologiques, Service Interfaces et Capteurs, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané stephanie.salaun@ifremer.fr

Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet REI n°2010 34 0010 intitulé « *Biofilms et corrosion d'alliages inoxydables en eau de mer* », et a pour objectif de caractériser le biofilm responsable de l'activation de la corrosion des alliages inoxydables en eau de mer par une approche pluridisciplinaire, dans le but d'identifier les composantes responsables de ce type de corrosion. Ce biofilm spécifique est ainsi en cours de caractérisation par des méthodes de microscopie Apotome et de spectroscopie Raman.

CONTEXTE

Alliages inoxydables en eau de mer :

Ces matériaux (alliages base nickel, aciers austéno-ferritiques de type duplex) ont une utilisation extensive depuis les années 80, notamment dans la construction navale, de par leur résistance à toutes formes de corrosion uniforme et leur haute durabilité sans démontage. Mais ils présentent toutefois des contraintes d'assemblages complexes et sont sensibles à la corrosion localisée et plus particulièrement à la corrosion cavernuse (Figure 1). Conséquences de ces problèmes de corrosion : manque de fiabilité des structures, mais surtout augmentation du nombre d'interventions et des coûts de maintenance.

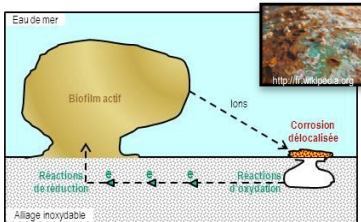


Figure 1 : Représentation schématisée de la corrosion sur alliage inoxydable colonisée par un biofilm en eau de mer

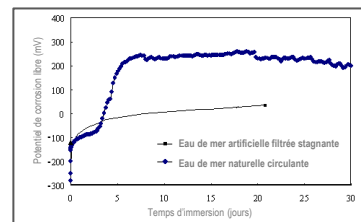


Figure 2 : Evolution du potentiel de corrosion d'alliages inoxydables immergés en eau de mer artificielle filtrée et en eau de mer naturelle circulante (D'après Compère et al 2001*)

Phénomène de corrosion des alliages inoxydables en eau de mer influencée par le biofilm :

La corrosion d'un matériau est régie essentiellement par des réactions d'oxydation et de réduction se produisant à l'interface métal/eau de mer. La présence de biofilm à l'interface métal/eau de mer peut jouer un rôle direct ou indirect sur ces réactions, notamment en créant des modifications locales des conditions physico-chimiques à l'interface. Le biofilm conduit ainsi à une accélération de l'élévation du potentiel de corrosion libre et du courant de corrosion de ces alliages, entraînant une augmentation de la vitesse de corrosion et une dégradation du matériau se produisant dans une zone délocalisée par rapport à celle où se situe le biofilm (Figures 1 & 2).

Caractérisation des biofilms conduisant à la corrosion des alliages inoxydables en eau de mer naturelle pour mieux comprendre les phénomènes de corrosion

METHODOLOGIE

Formation de 2 types de biofilm sur acier inoxydable en eau de mer naturelle (Corrodys, Cherbourg) :

Biofilm de référence dit « **Non Actif** » (noté 'NA') ne conduisant pas à des phénomènes de corrosion, et biofilm « **Actif** » (noté 'A') conduisant à la corrosion des alliages inoxydables.

SPECTROSCOPIE RAMAN

Objectif :

Identification de composés inorganiques (carbonates, phosphates, silicates, la plupart des oxydes, hydroxydes, sulfures métalliques et sulfates) et organiques (carbohydrates, lipides, acides nucléiques, caroténoïdes et protéines), présents au sein des biofilms fixés, directement sur les échantillons.

Méthode d'analyse :

Cartographie automatisée en 25 points d'analyse sur la totalité de la surface de l'acier inoxydable : Obj. x100/1.0 à immersion dans l'eau ; réseau dispersif 300 tr/mm (résolution spectrale 5 cm⁻¹) ; laser He/Ne émettant à 633 nm ; calibration sur la raie 520 cm⁻¹ du silicium (Figure 3).

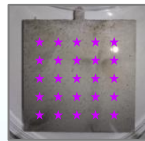


Figure 3 : Cartographie des points d'analyses (x 5µm) en spectroscopie Raman des biofilms formés sur acier inoxydable en eau de mer naturelle (Obj. x100 à immersion dans l'eau)

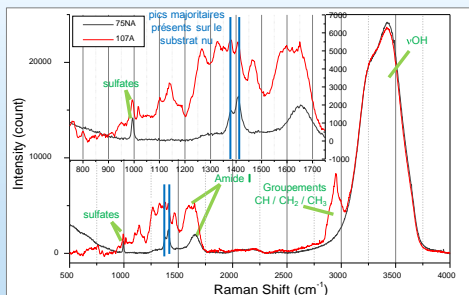


Figure 4 : Spectres Raman d'un biofilm Actif (—) et d'un biofilm Non Actif (---) formés en 2 semaines sur acier inoxydable en eau de mer naturelle

Les deux types de biofilm (Actif / Non Actif) présentent des différences spectrales, mettant en évidence un changement de composition moléculaire

MICROSCOPIE APOTOME

Objectif :

Identification de composés cibles au sein des biofilms formés (acides nucléiques, galactose, lipides, protéines, chlorophylle, α et β polysaccharides), directement sur les échantillons fixés à l'aide d'associations de fluorophores (Tableau 1).

Tableau 1: Caractéristiques des fluorophores utilisés (X = incompatibilité)

Fluoro	Ex.	En.	Filtre	Concen	Temps	Cibles	DAPI	Concolor	Syto	Byto 9	L3 FITC	Con A	Nile Red
DAPI	300	400/480	DAPI	2.5µg/ml	15min	ADN	X	X	X	X	X	X	X
Concolor	355	300/440	DAPI	100µg/ml	60min	β-1-4-D- galactose	X	X	X	X	X	X	X
Syto Orange	620/470	570	DAPI	1.0x	30min	polysaccharides protéiques / polysaccharides	X	X	X	X	X	X	X
Syto 9	400/500	470/550	GFP	3µM	15min	ADN	X	X	X	X	X	X	X
L3 FITC	488	500/550	GFP	100µg/ml	30min	N-acetyl galactose	X	X	X	X	X	X	X
Con A	590	617	Cy 3	100µg/ml	30min	α-polysaccharides	X	X	X	X	X	X	X
Nile Red	514	620/700	Cy 3	10µg/ml	20min	lipides	X	X	X	X	X	X	X



Figure 5 : Division en 6 zones de coloration (numérotées de 1 à 6) d'un biofilm actif formé sur un acier inoxydable en eau de mer naturelle (superficie: 25cm²)

Méthode d'analyse :

6 zones sont délimitées sur l'échantillon pour effectuer différentes associations de fluorophores (Figure 5) : 1- Nile Red, L2, DAPI ; 2- CW, ConA, Syto 9 ; 3- Nile Red, Syto Orange ; 4- CW, L2, ConA ; 5- ConA, Syto 9, DAPI ; 6- CW, Nile Red, Syto 9

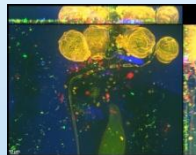


Figure 6 : Zone 4 de l'échantillon 206NA, Obj. x40/1.3 à immersion dans l'huile
Bleu: CW = β-polysaccharides ; Vert: L2 = galactose ; Jaune: Con A = α-polysaccharides ; Rouge: autofluorescence = chlorophylle

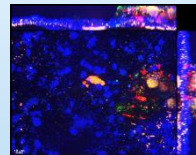


Figure 7 : Zone 5 de l'échantillon 174A, Obj. x40/1.3 à immersion dans l'huile
Bleu: DAPI = ADN ; Vert: Syto 9 = ADN ; Jaune: Con A = α-polysaccharides ; Rouge: autofluorescence = chlorophylle

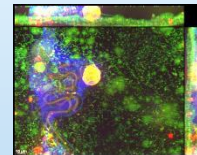


Figure 8 : Zone 6 de l'échantillon 174A, Obj. x40/1.3 à immersion dans l'huile
Bleu: CW = β-polysaccharides ; Vert: Syto 9 = ADN ; Jaune: Nile Red = lipides ; Rouge: autofluorescence = chlorophylle

Les deux types de biofilms (Actif / Non Actif) sont très hétérogènes dans leur composition, leur organisation et leur répartition

Conclusion :

Les biofilms de 3 semaines formés sur acier inoxydable en eau de mer naturelle sont hétérogènes. Quelques différences en terme de composition moléculaire, d'organisation et de répartition de ces 2 biofilms Actifs et Non Actifs sont déjà révélées par les premiers travaux réalisés en spectroscopie Raman et microscopie Apotome.

Une étude plus approfondie, avec notamment un suivi saisonnier, permettra de mieux caractériser et comprendre les biofilms responsables de la corrosion des aciers inoxydables en eau de mer, et ainsi d'améliorer les performances et la durabilité des matériaux, l'ouverture vers des alternatives dans le choix des matériaux et l'utilisation de traitements biocides spécifiques et écologiques.

(*) Compère C., Le Bozec N., L'Her M., Lauouenan A., Costa D. and Marcus P. (2001) Ageing of passivated materials in seawater : study of the oxygen reduction reaction EFC series 33, Chapter 14, 320pp. Marine Corrosion of Stainless Steels: Testing, Selection, Experience, Protection and Monitoring edited by D. Feron