Microsonde électronique et caractérisation de biofilms sur aciers

F. Feugeas, G. Ehret, A. Cornet

► To cite this version:

F. Feugeas, G. Ehret, A. Cornet. Microsonde électronique et caractérisation de biofilms sur aciers. Journal de Physique IV Proceedings, 1996, 06 (C4), pp.C4-931-C4-937. 10.1051/jp4:1996490 . jpa-00254373

HAL Id: jpa-00254373

<https://hal.science/jpa-00254373>

Submitted on 1 Jan 1996

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.

Microsonde électronique et caractérisation de biofilms sur aciers

F. Feugeas, G. Ehret* et A. Cornet

LMCM, ENSAIS, 24 boulevard de la Victoire, 67084 Strasbourg cedex, France

** IPCMS, 23 rue du Loess, 67037 Strasbourg cedex, France*

Résumé : La corrosion influencée par les micro-organismes (CIM) ou biocorrosion est un phénomène étudié depuis le début du siècle. Les bactéries de l'environnement peuvent former un biofilm sur des surfaces métalliques. Ce biofilm est complexe et présente une structure très hétérogène constituée d'un mélange de composés organiques et inorganiques. La présence du biofilm peut induire, à la surface du métal, des modifications physico-chimiques impliquées dans les processus de corrosion. L'association de la microscopie électronique à transmission avec les techniques d'analyses spectrométriques à dispersion d'énergie (EDX) permet de mettre en évidence différents composés d'un biofilm sur acier au carbone.

Abstract : Microbiologically influenced corrosion (MIC) is studied since the beginning of this century. Environmental bacteria are able to form a biofilm on metallic surfaces. This biofilm shows a complex and a very heterogeneous structure formed by an association of organic and inorganic compounds. The biofilm can influence the physico-chemical conditions involved in corrosion process on metallic surface. The association between transmission electronic microscopy and energy dispersive X-ray analysis (EDX) permits to underline different biofilm compounds on carbon steel.

1. INTRODUCTION

La corrosion influencée par les micro-organismes (CIM) ou biocorrosion est un phénomène étudié depuis le début du siècle. Des métaux tels que la fonte, les aciers au carbone, des alliages de cuivre, l'aluminium ainsi que des aciers inoxydables peuvent présenter des dégradations du type piqure ou caverne qui sont attribuées à la présence de micro-organismes fixés à la surface de ces matériaux [1].

Les bactéries de l'environnement, dans certaines conditions, peuvent former un biofilm sur des surfaces métalliques. Ce biofilm est complexe et présente une structure très hétérogène constituée de protéines adsorbées, de bactéries, de substances extra-polymériques (SEP), d'éléments de corrosion associés éventuellement à des dépôts calcaires, de champignons, d'algues et de coquillages. La présence du biofilm modifie les conditions physico-chimiques à la surface du métal et peut entraîner localement des modifications au niveau des vitesses et des types de réactions électrochimiques impliquées dans les processus de corrosion du substrat métallique. La connaissance de la composition du biofilm est indispensable à la maîtrise du phénomène de la CIM.

La composition bactériologique du fluide circulant ne permet pas de prévoir la composition du biofilm qui, par contre, dépend de la nature du métal, de sa toxicité propre et de son état de

surface et de facteurs environnementaux comme : le pH, la température et la vitesse d'écoulement du fluide, la concentration et la composition des nutriments, du temps,..... [2-9]. Le but de cette étude est l'analyse, par microsonde électronique, de biofilms formés sur des aciers plongés dans la nappe phréatique de Strasbourg. Des coupons métalliques (acier XC38) ont été plongés 26 jours dans un puits. Ces échantillons, après récupération, ont été immédiatement fixés et inclus dans une résine epoxy. Des coupes ultrafines du biofilm (50 nm) et du métal ont été observées par microscopie électronique à transmission (MET). Les composés identifiés visuellement sont étudiés par analyse spectrométrique à dispersion d'énergie (EDX). Cette méthode d'analyse permet de mettre en évidence l'hétérogénéité du biofilm et la présence d'éléments réputés agressifs pour les aciers.

2. MATERIEL ET METHODES

Des coupons métalliques de 2 mm d'épaisseur d'acier XC38 ont été découpés en carré de 1 cm de coté puis soigneusement polis (grain 600). Ces échantillons ont été immergés à 10 mètres de profondeur durant 26 jours dans un puits en contact avec la nappe phréatique de Strasbourg. Après ce délai ces échantillons sont fixés 1 heure dans un tampon de cacodylate de sodium 0.1M contenant 2% de glutaraldéhyde. Les échantillons sont ensuite déshydratés par 4 bains successifs d'éthanol (70, 80, 90, 100%) puis inclus dans une résine epoxy. Des coupes ultrafines ont ensuite été réalisées et étudiées en microscopie électronique à transmission à 100 kV (Topcon® 002B). Les éléments identifiés visuellement ont été analysés par spectrométrie à dispersion d'énergie (spot de 14 nm, analyseur Delta Plus® de Kevex).

3. RESULTATS

L'ensemble des échantillons analysés présentaient un biofilm d'une épaisseur voisine de 50 μm après 26 jours d'immersion.

Le substrat métallique (XC38) se présente sous forme de bandes, phénomène lié à la coupe ultrafine avec un couteau en diamant (figure 1).

Figure 1: coupe du substrat métallique (1 μm $\leftrightarrow$ 11 mm)
view of metallic substract

L'analyse spectrométrique du substrat métallique fait apparaître les trois pics du fer dont le premier, correspondant à la raie $L\alpha$, apparaît à l'énergie de 0,704 keV et sera comparé aux pics donnés par les autres éléments (figure 2). Les deux autres pics du fer correspondent aux raies $K\alpha$ et $K\beta$ (6,40 et 7,06 keV). Ces deux derniers pics du fer ne serviront pas d'éléments de comparaison du fait de leur grande intensité. Les pics apparaissant aux énergies de 8,04 keV et 8,90 keV correspondent aux raies $K\alpha$ et $K\beta$ du cuivre, composant principal des grilles sur lesquelles sont déposés sur une membrane support en carbone les échantillons analysés.

Figure 2 : analyse spectrométrique du substrat métallique (pics du fer : Fe)
EDX of metallic substrate

Sur le cliché d'ensemble du biofilm (figure 3) on observe 3 éléments : de la rouille qui apparaît sous formes sombres souvent géométriques (*a*), des petits cristaux formant des amalgames gris (*b*) et des bactéries (*c*).

Figure 3 : cliché d'ensemble d'une coupe du biofilm (1 μm $\leftrightarrow$ 5,5 mm)
general view of biofilm

L'analyse spectrométrique de la rouille (figure 4) permet d'observer un pic correspondant à l'oxygène plus important que le premier pic du fer (profil caractéristique du fer oxydé)

Figure 4 : analyse spectrométrique de la rouille (zone *a* de la figure 3)
EDX of rust

L'analyse spectrométrique de la zone (*b*) (figure 5) permet d'observer un pic correspondant à l'oxygène plus important que le premier pic-du fer et un pic de silicium (Si).

Figure 5 : analyse spectrométrique de la zone *b* de la figure 3
EDX of zone (*b*)

La figure 6 est un exemple d'une bactérie isolée au sein du biofilm. On remarque une paroi assez épaisse contenant des cristaux : l'analyse spectrométrique (figure 7) confirme le présence de fer mais aussi d'oxygène et de silicium en faible quantité. L'analyse de l'intérieur de la bactérie (figure 8), met en évidence la présence de chlore (Cl) en plus des éléments identifiés au niveau de la paroi.

figure 6 : cliché d'une bactérie (1 μm $\leftrightarrow$ 33 mm)
view of a bacteria

Figure 7 : analyse spectrométrique de la paroi bactérienne
EDX of bacterial wall

Figure 8 : analyse spectrométrique de la partie centrale d'une bactérie
EDX of a central region of a bacteria

4. DISCUSSION

Une analyse par fluorescence X de l'eau du puits a été effectuée. La présence des éléments suivants : Na, Mg, Al, Si, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, P y est détectée en faibles quantités (de 89 mg/l pour le chlore à 0,5 mg/l pour le phosphore). Ces différents éléments se retrouvent sur les analyses spectrométriques mais ils sont répartis de façon hétérogène à l'intérieur du biofilm. Sur les analyses EDX la présence d'arsenic s'explique par l'utilisation de tampon cacodylate pour la préparation des échantillons. L'oxydation de l'acier au carbone entraîne l'apparition de rouille et la présence de micro-organismes, tels que des bactéries, modifie localement les concentrations d'éléments comme le chlore (figure 8) qui sont agressifs pour le métal. Ces observations sont en accord avec les conclusions de Pope et coll. [10] : le biofilm peut induire des concentrations locales en ions chlorures attirés par les ions métalliques provenant de la dissolution anodique du métal.

Sur un certain nombre d'analyses effectuées près des bactéries on peut constater la présence de soufre. L'action des sulfures produits par des bactéries sulfato-réductrices (BSR) sur la corrosion des aciers a été largement étudiée [11-16]. Sur les aciers au carbone, la concentration de sulfure de fer peut entraîner une corrosion localisée. L'activité métabolique des BSR aboutit à la formation de sulfures qui peuvent être oxydés par des traces d'oxygène diffusant à travers le biofilm. Cette oxydation aboutit à la synthèse d'ions thiosulfates, qui par dismutation diminuent localement le pH et entraînent la formation d'une cellule galvanique avec une anode acidifiée d'après Crolet et coll. [17].

L'analyse spectrométrique à dispersion d'énergie de biofilms formés *in situ* sur aciers met en évidence l'hétérogénéité des biofilms. Ceux-ci contiennent des éléments organiques (bactéries) et inorganiques. La présence de concentrations d'éléments tels que le chlore et le soufre, liés à

l'existence d'éléments organiques, peut entraîner des phénomènes de corrosion localisée des aciers.

Références

- [1]H.C. Flemming, G.G. Geesey, eds., *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems* Proceeding of the International Workshop on Industrial Biofouling and Biocorrosion, Stuttgart, Sept. 13-14, 1990, (Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1991), p.1.
- [2]S.C. Dexter, G.Y. Gao, "Effect of Seawater Biofilms on Corrosion Potential and Oxygen Reduction of Stainless Steel ", *Corrosion* 44, (1988), p.717-723.
- [3]J.G. Stoecker, D.H. Pope, " Study of Biological Corrosion in High Temperature Demineralized Water ", *Materials Performance* 25, (1986), p.51.
- [4]B. Little, J. Depalma, " Marine Biofouling ", *Treatise on Materials Science and Technology* 28, (1988), p.89.
- [5]W.A. Hamilton, " Biofilms: Microbial Interactions and Metabolic Activities ", *Ecology of Microbial Communities*, (Cambridge University Press, 1987), p.361.
- [6]R.A. Agostini, R.D. Young, " A Case History: Investigations of Microbially Influenced Corrosion in a West Texas Waterflood ", *Corrosion Paper* 119, (1990), p.1-12.
- [7]D. Pope, " Discussion of Methods for the Detection of Microorganisms Involved in Microbiologically Influenced Corrosion ", *Biologically Induced corrosion*, S.C. Dexter Ed., *Proceedings of the International Conference on Biologically Induced Corrosion*, held June 1985, Gaithersburg, Maryland, NACE-8 (Houston, TX: NACE, 1986), p.275.
- [8]O.H. Tuovinen, G. Cragnolino, " A Review of Microbiological, Electrochemical Techniques in the Study of Corrosion Induced by Sulfate Reducing Bacteria ", *Corrosion Monitoring in Industrial Plants Using Nondestructive Testing and Electrochemical Methods*, G.C. Moran and P. Labine Eds, ASTM STP 908 (Philadelphia, 1986), p.413.
- [9]W.A. Hamilton and S. Maxwell, " Biological and Corrosion Activities of Sulphate Reducing Bacteria Within Natural Biofilms ", *Biologically Induced corrosion*, S.C. Dexter Ed., *Proceedings of the International Conference on Biologically Induced Corrosion*, held June 1985, Gaithersburg, Maryland, NACE-8 (Houston, TX: NACE, 1986), p.131.
- [10]D.H. Pope, R.T. Soracco, E.W. Wilde, "Studies on Biologically Induced Corrosion in Heat Exchanger Systems at the Savannah River Plant, Aiken, SC", *Materials Performance* 21, (1982), p.43-50.
- [11] W.P. Iverson and G.J. Olson, " Problems Related to Sulfate Reducing Bacteria in the Petroleum Industry ", *Atlas R.M. Petroleum Microbiology*, Mac Millan Ed, (New York, 1984), p. 619-641.
- [12]S. Daumas, J. Crousier, J.P. Crousier, "Influence de bactéries sulfato-réductrices actives sur le potentiel de corrosion d'un acier", *Métaux Corrosion Industrie* 1, (1988), p.1-13.
- [13]M.B. McNeil and B.J. Little, " Mackinawite Formation During Microbial Corrosion ", *Corrosion* 46, (1990), p. 599-600.
- [14]R.A. King, J.D.A. Miller, D.S. Wakerkey, " Corrosion of Mild steel in Cultures of Sulphate Reducing Bacteria : Effect of Changing the Soluble Iron Concentration During Growth ", *British Corrosion Journal* 8, (1973), p. 89-93.
- [15]C. Ringas, F.P.A. Robinson, " Corrosion of Stainless Steel by Sulphate Reducing Bacteria Electrochemical Techniques " *Corrosion* 44, (1988), p. 386-396.
- [16]C. Ringas, F.P.A. Robinson, " Corrosion of Stainless Steel by Sulphate Reducing Bacteria Total Immersion Test Results" *Corrosion* 44, (1988), p. 671-678.
- [17]J. L. Crolet, S. Daumas, M. Magot, " pH Regulation by Sulphate Reducing Bacteria ", *Corrosion Paper* 303, (1993), p. 1-15.