

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

Thèse De Doctorat - ES Sciences

Spécialité : CHIMIE

Option : Chimie appliquée

Présentée par :

M^{me} AIMEUR Nacera épouse NEMMOUCHE

Sujet

Contribution à l'étude de la biocorrosion de l'acier au carbone en eau de mer naturelle, Influence de certaines bactéries genre Bacillus sur l'inhibition de cette corrosion.

Devant le jury d'examen composé de :

| | | | |
|----------------------------------|------------------------|---------------|--------------|
| M ^f SAHMOUNE Amar | Professeur | UMMTO | Président |
| M ^f KADRI Abdelaziz | Professeur | UMMTO | Rapporteur |
| M ^f KHELIFA Abdellah | Professeur | USD Blida | Examineur |
| M ^{me} BOUGHRARA Dalila | MCA | UMMTO | Examinatrice |
| M ^f BOUNOUGHAZ Moussa | Professeur | UMB Boumerdes | Examineur |
| M ^f ZAID Bachir | Directeur de recherche | CRN Draria | Examineur |

Remerciements

Ce travail, a été effectué au sein du Laboratoire de physique et chimie des matériaux de l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur Abdelaziz KADRI professeur à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ses nombreux conseils, ses remarques pertinentes et ses encouragements. Je le remercie sincèrement pour m'avoir confié un sujet de recherche aussi passionnant.

Je tiens également à remercier Monsieur le professeur SAHMOUNE Amar professeur à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour l'honneur qu'il m'a fait de présider le jury de cette thèse.

J'exprime aussi mes remerciements à Monsieur KHELIFA Abdellah professeur à USD de Blida, Monsieur BOUNOUGHAZE Moussa professeur à UMB de Boumerdes, Monsieur ZAIED Bachir Directeur de recherche au CRN de Draria et Madame MOHELLEBI Dalila Maitre de conférence classe A à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'examiner ce manuscrit.

Je remercie également Madame BENBRAHIM Nassima professeur à l'Université de Mouloud Mammeri pour ses conseils et encouragements.

J'exprime ma gratitude et ma reconnaissance à Madame MEZEGHRANE Lamia Maitre de conférence classe A à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour son aide et sa disponibilité.

Ma reconnaissance et mon profond respect vont également à Monsieur HOUALI Karim professeur à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour m'avoir initié et beaucoup aidé dans la partie microbiologique.

Un grand merci va également à Monsieur Saifi Amirouche Ingénieur et Responsable du MEB à l'Université de Tizi-Ouzou pour les nombreux travaux de caractérisation qu'il m'a réalisés dans le cadre de cette thèse.

Un merci à tous les membres du Laboratoire de Physique et Chimie des Matériaux (LPCM) et mes collègues : Baya, Lynda, Lamia, Dalila, Naima, Salem, Chabha, Naima, Tahar, Ali Chenna, Soraya, Lydia, Razika, Sabiha, Ouahiba, Zahra, Djedjega....

Je tiens à remercier mon très cher père, mes frères (Mamou, Boussad, Brahim et Lotfi) et ma très chère sœur en témoignage de tout mon amour. Vous avez su guider mes pas, m'aider à devenir ce que je suis. Ma joie de vivre, ma force et mes réussites c'est à vous que je les dois, merci d'être là dans les moments difficiles.

Mes vifs remerciements vont à mon mari Mohamed. Il faut reconnaître que je n'en serai pas arrivé à ce point sans son soutien constant et sa grande compréhension.

Hommage à tous ceux qui, par inattention j'ai omis de citer les noms me pardonnent.

A mon cher père et à ma sœur et mes frères

à mon époux Moh et mes deux anges

Samy et Massiva (Taous)

à ma belle famille

à la mémoire de ma très chère mère

à la mémoire de ma belle mère

Résumé : L'objectif de ce travail est l'étude de l'influence de bactéries genre *Bacillus* (*B.cereus*, *B. subtilis*) sur la corrosion de l'acier au carbone en eau de mer naturelle stérile. A cet effet, une analyse MEB ainsi que des mesures électrochimiques y compris des tracés de Tafel, spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) et la méthode de résistance de polarisation linéaire ont été effectuées pour suivre l'évolution du comportement à la corrosion de l'acier au carbone en milieu stérile avec et sans *Bacillus*. Les images MEB ont montré la formation d'un biofilm sur le métal en présence de *Bacillus*. Les résultats de l'SIE ont montré que la résistance de transfert de charge est plus élevée en milieu contenant la *Bacillus* et augmente avec le temps d'immersion. Les tracés de Tafel ont révélé une réduction significative du taux de corrosion en présence d'un biofilm bactérien produit par les souches bactériennes.

Summary : The aim of this work is to study the influence of bacteria genus *Bacillus* (*B.cereus*, *b. subtilis*) on the corrosion of carbon steel in natural sterile sea water. For this purpose, a SEM analysis and electrochemical measures including Tafel plot, electrochemical impedance spectroscopy (SIE) and the polarization resistance method were performed to follow the evolution of the corrosion behaviour of carbon steel in a sterile environment with and without *Bacillus*. The results of SEM showed the formation of a biofilm on metal in the presence of *Bacillus*. The EIS data showed that the charge transfer resistance is higher in medium containing *Bacillus* and increases with the immersion time. Tafel plot revealed a significant reduction of the corrosion rate in the presence of a bacterial biofilm produced by the bacterial strains.

Liste des communications

1. Effet du biofilm sur la corrosion marine de l'acier au carbone. N. Aimeur, L. Touafri A. Kadri, N. Benbrahim. Colloque international « Corrosion des matériaux et protection ». Tunisie 2008.
2. La biocorrosion d'un acier au carbone en eau de mer naturelle. N. Aimeur, L. Touafri A. Kadri, N. Benbrahim. La société algérienne de chimie (sac). Béjaia 2009.
3. Influence d'une souche de *Bacillus cereus* sur le comportement à la corrosion de l'acier au carbone en milieu marin. N. Aimeur, A. Kadri, K.Houali, N. Benbrahim. 2èmes journée scientifiques des sciences de la nature et de la vie. Bouira 2016.
4. Comportement à la corrosion de l'acier au carbone en milieu marin en présence de *Bacillus cereus*. N. Aimeur, A. Kadri, K.Houali, N. Benbrahim. La 1ère journée nationale de l'agro-alimentaire, engineering et environnement. Boumerdes 2017.
5. Effet d'un biofilm marin sur la corrosion de l'acier au carbone. N. Aimeur, A. Kadri, K.Houali, N. Benbrahim. Séminaire international « Environnement, agriculture et biotechnologie ». Bouira 2017.

Publication

- 1 - N. Aïmeur, K. Houali, L. Hamadou, N. Benbrahim, A. Kadri. Influence of strain *Bacillus cereus* bacterium on corrosion behaviour of carbon steel in natural seawater. Corrosion Engineering, Science and Technology, 2015.

| | |
|--|----|
| Introduction générale | 1 |
| Chapitre1. Analyse bibliographique | |
| I.1 Les biofilms marins et communauté microbienne..... | 4 |
| I.1.1. L'environnement marin..... | 4 |
| I.1.2. Diversité des micro-organismes en environnement marin..... | 4 |
| I.1.2.1. Les archées (Archea)..... | 4 |
| I.1.2.2. Les eucaryotes (Eucarya) | 4 |
| I.1.2.3. Les bactéries..... | 4 |
| I.1.2.3.1. Méthodes et techniques d'étude de la croissance..... | 5 |
| I.1.2.3.2. Le genre <i>Bacillus</i> | 6 |
| I.1.3 Biofilm marin..... | 10 |
| I.1.3.1 Formation du biofilm..... | 10 |
| I.1.3.2 Interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion microbienne..... | 12 |
| I.1.3.2.1. Les interactions de van der Waals..... | 12 |
| I.1.3.2.2. Les interactions électrostatiques..... | 13 |
| I.1.3.3 Les facteurs qui conditionnent le développement de biofilm..... | 15 |
| I.1.3.4 Propriétés physique- chimique de biofilm..... | 16 |
| I.1.3.5 Composition du biofilm..... | 17 |
| I.1.3.6 L'effet du biofilm sur la corrosion..... | 17 |
| I.2 Aspect théorique sur la corrosion..... | 19 |
| I.2.1 Introduction..... | 19 |
| I.2.2 Aspect Fondamental..... | 20 |
| I.2.3. Le contrôle électrochimique de la corrosion..... | 24 |
| I.2.4. Comportement du fer et des aciers en l'eau de mer | 24 |
| I.3 La biocorrosion..... | 24 |
| I.3.1. Les groupes de bactéries impliqués dans la corrosion..... | 25 |
| I.3.2. Protection contre corrosion..... | 26 |
| I.3.2.1. Inhibiteurs de corrosion..... | 26 |
| I.3.2.1.1. Les classes d'inhibiteurs..... | 27 |

| | |
|--|----|
| I.3.2.1.2. Inhibiteurs pour les environnements neutres..... | 29 |
| I.3.2.1.3. Bio-inhibiteurs | 30 |
| Chapitre II : Matériels et méthodes d'étude expérimentale | |
| II.1 Milieu d'étude..... | 34 |
| II.1.1. Recherche des micro-organismes anaérobies et aérobies | 34 |
| II.1.2. Préparation des boîtes de pétri avec le milieu de culture..... | 34 |
| II.1.3. Identification des bactéries..... | 35 |
| II.2. Matériau..... | 36 |
| II.3. Les souches bactériennes | 36 |
| II.4. Dispositif de mesure électrochimiques..... | 37 |
| II.5. Techniques expérimentales..... | 38 |
| II.5.1. Potentiel de corrosion | 39 |
| II.5.2. Courbe de polarisation (tracés des droites de tafel) | 39 |
| II.5.3. Résistance de polarisation | 41 |
| II.5.4. La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) | 42 |
| II.6. Analyse de surface | 46 |
| II.7. Analyse microbiologique | 47 |
| Chapitre III : comportement électrochimique de l'acier au carbone en eau de mer stérile contenant <i>B.cereus</i> | |
| III.1 analyse microbiologique de l'eau de mer | 48 |
| III.2. Analyse de surface..... | 49 |
| III.2.1. Analyse (MEB et EDS) | 49 |
| III.2.2. Analyse microbiologique | 51 |
| III.3. Mesures électrochimiques | 52 |
| III.3.1. Potentiel en circuit ouvert E_{OCP} | 52 |
| III.3.2. Résistance de polarisation | 53 |
| III.3.3. Tracés de Tafel | 54 |
| III.3.4. Mesures d'impédance électrochimique | 57 |

Chapitre IV : Comportement électrochimique de l'acier A60 en eau de mer naturelle et en eau de mer stérile contenant *B. Subtilis*

| | |
|---|----|
| IV.1. Etude électrochimique de l'acier A60 en eau de mer stérile contenant <i>B.subtilis</i> | 63 |
| IV.1. 1. Analyse morphologique..... | 63 |
| IV.1.2. Mesures électrochimiques | 64 |
| IV.1.2.1. Potentiel en circuit ouvert E_{PCO} | 64 |
| IV.1.2.2. Résistance de polarisation | 65 |
| IV.1.2.3. Tracés de Tafel | 66 |
| V.1.2.4. Impédance électrochimique | 67 |
| IV.2. Comportement électrochimique de l'acier au carbone en eau de mer naturelle | 70 |
| IV.2.1 Analyse de surface | 70 |
| IV.2.2 Mesures électrochimiques..... | 72 |
| IV.2.2.1. Tracés de Tafel | 72 |
| IV.2.2.2. Impédance électrochimique | 74 |
| Conclusions & perspectives | 76 |
| Références bibliographiques | 79 |

Introduction

Introduction

L'eau de mer couvre plus de 70% de la surface du globe. Elle renferme des micro-organismes tels que les bactéries, les champignons et de nombreux sels minéraux. L'agressivité du milieu marin résulte notamment de la présence de quelques micro-organismes et de ses propriétés physico-chimiques telles que la conductivité élevée due à une salinité importante, forte teneur en ions chlorure, dioxygène dissous.

L'utilisation fréquente des aciers dans les milieux marins pose de ce fait un problème important de corrosion. De nature électrochimique, cette dernière est régie par le dioxygène dissous dont la réduction sur la surface des aciers constitue le « moteur » déterminant de la réaction de corrosion.

Le milieu marin est un électrolyte contenant une concentration relativement forte en ions Cl^- . La salinité de ce milieu a un impact particulièrement important sur la corrosion du fer en raison de l'activité des ions chlorure (Cl^-), qui ont une mobilité élevée. Lorsque le fer se corrode en présence d'ions chlorure, le composé prédominant et initialement formé est le chlorure ferreux ($FeCl_2$). Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à l'effet catalytique des ions chlorure. Il faut signaler que ces ions forment des complexes solubles avec les ions de fer qui favorisent la dissolution de l'oxyde de fer.

Par ailleurs, la corrosion microbienne, également appelée corrosion influencée microbiologiquement (MIC) ou la corrosion biologique, est le résultat d'interactions le plus souvent synergiques, entre la surface métallique et les produits de corrosion abiotiques d'une part et les cellules bactériennes (associées en biofilm) et le produit de leur métabolisme d'autre part.

Presque toutes les surfaces immergées en milieu marin sont sujettes au développement d'un voile biologique ou biofilm. Ce dernier est une communauté microbienne adhérente à une surface et fréquemment incluse dans une matrice de polymères exocellulaires. Selon la nature des bactéries impliquées lors de la formation du biofilm, ce dernier peut provoquer l'accélération ou l'inhibition du processus de corrosion.

La réaction de corrosion est le résultat de l'action entre le métal ou l'alliage métallique d'une part, la solution électrolytique d'autre part. En matière de protection, il est possible d'agir sur la surface du matériau (revêtement, peinture, ...) ou sur l'environnement avec lequel le matériau est en contact (inhibiteur de corrosion). Les inhibiteurs constituent un moyen original

pour lutter contre la corrosion. Un inhibiteur est un composé chimique que l'on ajoute, en faible quantité, au milieu pour diminuer la vitesse de corrosion des matériaux.

Dans ce travail, nous nous proposons d'étudier le comportement à la corrosion de l'acier au carbone (A60) en eau de mer naturelle brute, stérile et stérile contenant une catégorie des bactéries Gram positives, appartenant aux genre *Bacillus* (*B. cereus* et *B. subtilis*). Ce genre correspond à des bactéries en forme de bâtonnets (1,2 à 10 μm de long), chimio-hétérotrophes, généralement mobiles (présence de flagelles péritriches),

Le manuscrit de thèse s'articule en 4 chapitres. Le premier chapitre présente une étude bibliographique qui établit l'état des connaissances sur les groupes de *Bacillus.cereus*, *Bacillus subtilis* ainsi que les biofilms. Il expose également des notions théoriques sur la corrosion et l'inhibition ainsi que les principes de différentes méthodes d'étude de la corrosion.

Le dispositif expérimental utilisé ainsi que les conditions expérimentales pour chacune des méthodes électrochimiques et analyse de surface utilisées dans le cadre de ce travail sont présentés au chapitre II.

Le chapitre trois est entièrement consacré à l'étude expérimentale de la corrosion de l'acier A60 en eau de mer naturelle en présence et en absence de *B. cereus*. Nous présentons d'une part, les mesure de l'impédance électrochimique et d'autre part les résultats de tracés de Tafel ainsi que la méthode de polarisation.

Le quatrième chapitre est consacré à la description des résultats de l'étude de comportement à la corrosion de l'acier A60 en eau de mer naturelle brute d'une part et en eau de mer stérile contenant *B. subtilis* d'autre part. Les courbes de polarisation potentiodynamique, la méthode de la résistance de polarisation et les mesures d'impédance nous a permis de mettre en évidence l'influence des temps d'immersion sur le processus de la corrosion.

Enfin, une conclusion générale avec des perspectives constitue la dernière partie de ce travail.

Chapitre I Analyse bibliographique

I.1 Les Biofilms marin et la communauté microbienne

I.1.1 L'environnement marin

L'eau de mer est un milieu approprié pour la croissance des micro-organismes, en raison de sa composition riche en nutriments ainsi que son effet tampon et favorable aux phénomènes de corrosion compte tenu de la teneur en oxygène dissous et en sels minéraux.

L'eau de mer est constituée à 96,5 % d'eau pure et à 3,5 % de composés dissous [1].

I. 1.2 Diversité des micro-organismes en environnement marin

Les groupes microbiens sont des unicellulaires de taille microscopique, à l'échelle du micromètre : les plus petits font quelques millièmes de millimètre (0.2µm) tandis que les plus grands peuvent atteindre quelques dixièmes de millimètre (200µm) [2]. Les organismes microbiens dans l'environnement marin se divisent en trois : les Archées, les Eucaryotes et les Bactéries [3, 4].

I.1.2.1 Les archées (Archea)

Les archées sont des organismes unicellulaires sans noyau eucaryote. La plupart d'entre eux vivent à des températures élevées, dans des solutions salines concentrées ou à des pH extrêmes et sont autotrophes (méthanogènes, halophiles, thermoacidophiles). Les Archaea partagent des caractéristiques biologiques et moléculaires avec les eucaryotes qui ne sont pas présentes dans les bactéries telles que la production d'ATP, la sécrétion de protéines et la division cellulaire [5].

I.1.2.2 Les eucaryotes (Eucarya)

Les eucaryotes représentent un domaine regroupant les organismes multicellulaires ou unicellulaires qui se caractérisent par la présence d'un noyau t dans leurs cellules. Il s'oppose aux domaines des Eubacteria et des Archea. Ce domaine inclut les micro-organismes classés comme champignons ou comme protistes. Les champignons sont un groupe varié de micro-organismes composé de levures, moisissures et champignons quant aux protistes ils sont divisés en protozoaires et en algues [6].

I.1.2.3 Les bactéries

Organismes unicellulaires à structure procaryote (leur matériel génétique, ADN circulaire, n'est pas enfermé dans un noyau) qui possèdent une paroi cellulaire constituée de peptidoglycane.

Il existe deux catégories de bactéries si on considère la méthode de coloration mise au point par le bactériologiste danois Hans Gram (1884) [6]. En effet, après coloration, les bactéries *Gram +* deviennent violettes alors que les bactéries *Gram –* apparaissent en rose. Ainsi, la répartition des bactéries en *Gram +* ou *Gram –* est un critère systématique important pour leur classification en permettant leur visualisation en plus des indications sur leur forme et tailles. Il existe une grande diversité, de bactéries qui poussent dans tous les environnements et diffèrent par leur forme, leur fonction et leur métabolisme [3]. La connaissance des caractéristiques énergétiques, composition de surface et métabolisme de ces micro-organismes, est essentielle pour comprendre les mécanismes d'adhésion et de formation du biofilm. Selon la morphologie microscopique, trois formes prédominantes sont distinguées dans la nature :

- Les bactéries sphériques ou coccoïdes
- Les bactéries cylindriques dites en bâtonnet
- Les bactéries spiralées.

Cependant, il peut y avoir d'autres variantes, telles que les bactéries pédonculées et les formes filamenteuses. La croissance et le métabolisme des bactéries sont propres à chaque genre bactérien, permettant ainsi de les différencier [3].

I.1.2.3.1 Méthodes et techniques d'étude de la croissance

La multiplication bactérienne se produit par scissiparité. Ce mode de duplication se traduit par une croissance exponentielle des populations et obéit à l'équation :

$$n_t = n_0 \times 2^{\mu t}$$

où n_t représente le nombre de bactéries dans une population donnée au temps t ; n_0 le nombre de bactéries dans la même population au moment de la première détermination; μ le taux de croissance, c'est à dire le nombre de doublement par unité de temps.

La mesure de la croissance bactérienne peut être effectuée selon plusieurs critères : la turbidimétrie (mesure d'une absorbance), le poids sec, le dénombrement des bactéries viables cultivables, le dénombrement de bactéries totales. Classiquement, la croissance comporte quatre phases principales [7] :

- a) la phase de Latence pendant laquelle la vitesse de division cellulaire est nulle. Cette phase correspond à une période d'adaptation des bactéries à leur nouveau milieu de croissance ;

- b) la phase exponentielle où le taux de développement caractéristique d'une souche est optimale dans les conditions de culture. il est donné par la pente de la courbe ;
- c) la phase stationnaire qui reflète un équilibre entre les cellules qui meurent et celles qui continuent à se multiplier ;
- d) la lyse ou phase de mort cellulaire. Parmi cette grande variété de bactérie, on trouve le genre *Bacillus*

I.1.2.3.2 Le genre *Bacillus*

Il appartient à la famille des *Bacillaceae* [8]. Ces bactéries sont des bacilles (3 à 5 µm) en forme de bâtonnets à *Gram*+, groupées en chaînettes, aérobie à anaérobie facultatif, formant des spores et mobiles sauf *Bacillus anthracis* [9]. Le genre *Bacillus* apparaît extrêmement hétérogène aussi bien sur le plan génétique que phénotypique notamment au niveau respiratoire, métabolique ainsi que dans sa répartition dans l'environnement [9]. Il comporte, pas moins de 74 espèces différentes. Les études phylogénétiques suggèrent cinq groupes d'espèces étroitement proches : *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. circulans* et groupe *B. brevis* [10, 7]. La grande majorité des recherches sur ces organismes a mis l'accent sur seulement deux *Bacillus* clades, *B. subtilis* et *B. cereus*. [11].

a) Le groupe *Bacillus subtilis*

Ce groupe est composé de *Bacillus subtilis*, *Bacillus lichenniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus mojaviensis*, et *Bacillus vallismortis*, *Bacillus siamensis* et *Bacillus sonorensis*[12].

Les cellules de *Bacillus subtilis* sont des bactéries *Gram*+ qu'on trouve dans la nature en forme de bâtonnet. *Bacillus subtilis* pousse dans une gamme de température mésophile. La température optimale est de 25-35°C[13]. En environnement défavorable à son développement, *B. subtilis* est capable de sporuler pour survivre dans des conditions difficiles.

Plusieurs secteurs industriels s'intéressent à *Bacillus subtilis*. Cette bactérie sécrète des enzymes d'intérêts industriels tels que les amylases utilisés pour la production de pain, les protéases et les cellulases employés dans les industries agroalimentaires et des détergents. L'industrie pharmaceutique exploite la capacité de *Bacillus subtilis* à produire des antibiotiques [14].

b) Le groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus sensu lato*) regroupe 6 souches: *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides*. Les bactéries de ce groupe appartiennent à la famille des *Bacillaceae* et au genre *Bacillus*. Ce sont des bacilles *Gram+*, sporogènes, aéro-anaérobies facultatives et possèdent une catalase.

(i) Description physiologique

- **La cellule végétative**

Bacillus cereus est un long bacille de forme régulière et souvent en courte chaîne (Figure 1). C'est un bacille *Gram+* qui est mobile, aéro-anaérobie facultatif capable de produire des spores non déformantes. Les *B. cereus* se développent sur des géloses ordinaires. Les colonies ainsi obtenues sont grisâtres, larges avec des contours irréguliers. En galerie Api 20 E les *B. cereus* possèdent les caractères suivants: *VP +*, *citrate +*, *gélatinase +*.

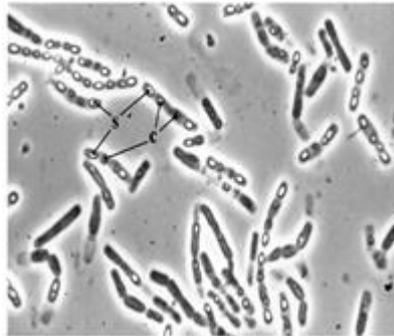


Figure 1 Photographie d'une culture de *Bacillus thuringiensis* au stade de sporulation [15]

Bacillus cereus peut se développer avec des valeurs d'activités de l'eau a_w supérieure à 0.912 [16]. La gamme de pH de sa croissance varie de 4,3 à 9,3 [16, 17]. Enfin, sa tolérance au sel est relativement élevée puisqu'il peut croître à des teneurs en NaCl atteignant 18 % [18].

- **Les spores**

La spore est une cellule métaboliquement inactive, possède une structure particulière. Elle se développe à l'intérieur d'une cellule végétative en croissance, sous forme d'une endospore (Figure 2).

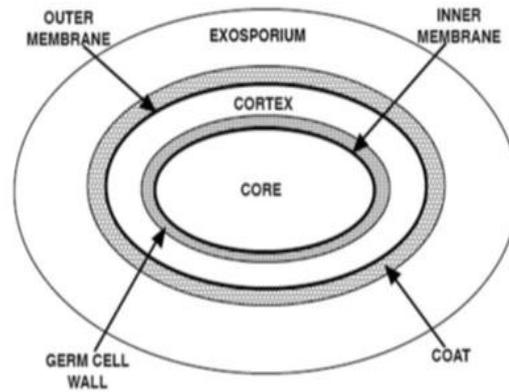


Figure 2 Structure de spore [19]

En conditions environnementales défavorable à leur croissance telles que l'appauvrissement du milieu en nutriment, une faible valeur de l'activité de l'eau a_w , traitement thermique, *Bacillus cereus* peut produire des spores afin de survivre (Figure.3). Les spores de *B.cereus* sont des cellules très résistantes et ont des capacités plus importantes d'adhésion aux matériaux inertes. Leur adhérence à la surface est notamment due à 3 caractéristiques : une grande hydrophobicité, une faible charge à la surface des spores et enfin leur morphologie avec la présence d'appendices [20].

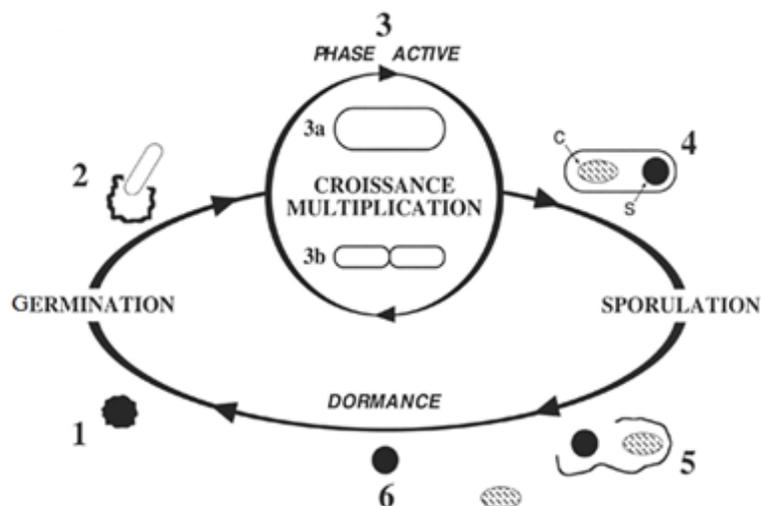


Figure 3 Schématisation du cycle vital d'un *Bacillus thurgiensis* [15]

ii) Classification des bactéries du groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *B. cereus* est composé d'une variété d'espèces proches génétiquement. Le classement d'espèces de ce genre a été fait selon les propriétés phénotypiques spécifiques ; la virulence, la physiologie et la morphologie [21] (Tableau 2). Toutefois, la répartition des membres du groupe est encore sujette à une controverse. Avec cette dernière, plusieurs catégories peuvent contenir différentes espèces car les caractéristiques phénotypiques sont instables [22].

Tableau 2 Classification des bactéries du groupe *Bacillus cereus* selon leurs caractères phénotypiques

| Espèce | Caractère phénotypique spécifique | Propriétés |
|------------------------------|-----------------------------------|--|
| <i>B. cereus</i> | Virulence | Responsable de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) |
| <i>B. anthracis</i> | | Responsable de l'anthrax |
| <i>B. thuringiensis</i> | | Pathogène des insectes par production de cristaux parasporals |
| <i>B. weihenstephanensis</i> | Physiologie | Peut se développer à des températures inférieures à 7°C |
| <i>B. mycoides</i> | Morphologie | Colonies rhizoïdes sur milieu nutritif solide |
| <i>B. pseudomycoides</i> | | Colonies rhizoïdes sur milieu nutritif solide |

Pour clarifier la répartition donnée auparavant, une étude menée par Guinebretière et al a permis la réalisation d'un nouveau classement. Ce dernier est basée sur les habitats, les limites de températures et les pouvoirs pathogènes [23] (Tableau 3).

Tableau 3: Nouvelle classification du groupe *Bacillus cereus* d'après Guinebretière et al [23]

| Groupes phylogénétiques | Espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i> | Profils thermiques de croissance | cytotoxicité |
|-------------------------|---|--|---|
| Groupe I | <i>B. pseudomycoides</i> | Mésophiles (10 à 43 °C) | Aucune observée |
| Groupe II | <i>B. thuringiensis II, B. cereus II</i> | Psychrotolérantes (7 à 40°C) | Toxines diarrhéiques |
| Groupe III | <i>B. thuringiensis III, B. cereus III</i> <i>B. anthracis</i> | Mésophiles (de 15 à 45 °C) | Toxines diarrhéiques et émétiques Anthrax |
| Groupe IV | <i>B. thuringiensis IV, B. cereus IV</i> | Mésophiles (de 10 à 45 °C) | Toxines diarrhéiques |
| Groupe V | <i>B. thuringiensis V</i> <i>B. cereus V</i> | Mésophiles intermédiaires (8 à 40 °C) | Toxines diarrhéiques |
| Groupe VI | <i>B. weihenstephanensis, B. mycoides</i> <i>B. thuringiensis IV</i> | Psychrotolérantes (5 à 37 °C) | Aucune observée |
| Groupe VII | <i>B. cereus VII</i> | Thermotolérantes modérées (20 à 50 °C) | Toxines diarrhéiques |

I.1.3 Biofilm marin

Un biofilm est une communauté multicellulaire plus ou moins complexe de micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires), adhérant entre eux et à une surface. Cette communauté est marquée par la sécrétion d'une matrice extra-cellulaire d'exopolymères, adhésive et protectrice composée essentiellement de protéines, de polysaccharides et de sels [24, 25]. Ce dernier fournit aux micro-organismes une résistance particulière vis-à-vis des agressions physiques et chimiques telles qu'un traitement désinfectant ou un changement brutal des conditions environnantes [26].

I.1.3.1 Formation du biofilm

Tout matériau immergé en eau de mer naturelle est couvert, après quelques semaines, d'un biofilm. Les différentes étapes (Figure 4) de la formation de ce dernier ont été mises en évidence dans divers travaux [27, 28].

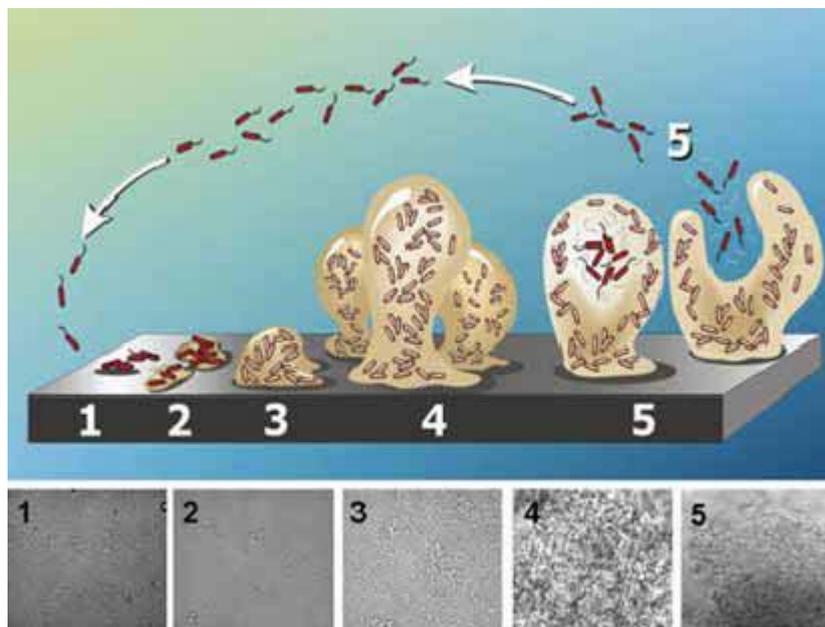


Figure 4 Différentes étapes de la formation d'un biofilm selon [27].

- **Film primaire**

La phase initiale concerne les premières minutes d'exposition : c'est l'adsorption de composés organiques macromoléculaire [29, 30] (exopolymères, protéines, glycoprotéines, acides humiques...) et/ou de particules minérales issues du milieu ou sécrétées par des microorganismes. Le film primaire ainsi formé est essentiel car les propriétés physicochimiques de surface (tension de surface, énergie de surface, mouillabilité) qui le caractérisent conditionnent l'adhésion ultérieure des bactéries.

- **Transport**

La deuxième étape correspond au transport des microorganismes à proximité de la surface. Le transport de bactéries dépend de la nature du milieu dans lequel celles-ci évoluent (viscosité, force ionique) ainsi que du mouvement de ce milieu (écoulement, flux, mouvement brownien, sédimentation). Le déplacement de la bactérie s'effectue via des appendices qui l'aident à se déplacer dans un milieu (pili, flagelles) [31].

- **Adsorption réversible et irréversible**

Les troisième et quatrième étapes de la formation du biofilm consistent en une adsorption réversible suivie d'une adsorption irréversible : une adhésion réversible est observée initialement, celle-ci s'effectue par des interactions faibles entre le support et les microorganismes; après la production des polymères extracellulaires par les micro-organismes fixés, l'attachement deviendra irréversible [31,32].

- **La maturation**

Si les conditions physico-chimiques de l'interface leurs sont favorables, les bactéries se multiplient et se regroupent pour former des micro-colonies entourées de polymères (adhésion irréversible). Cette matrice de polymère (ou glycocalix) va renforcer l'association des bactéries entre elles et avec la surface pour finalement constituer le voile bactérien ou biofilm. La maturation du biofilm corrélé avec la sécrétion d'exopolysaccharides même si certains microorganismes ne synthétisent pas ou peu de polymères ils peuvent tout de même adhérer et former des biofilms sur ces surfaces [33]

- **Décrochement ou détachement**

Les biofilms sont des structures en perpétuel équilibre dynamique qui évoluent en fonction du support, des micro-organismes et de l'environnement [34]. A tout moment, des cellules ou des

agrégats peuvent se détacher et retourner à l'état libre dans le liquide ou peuvent aller coloniser une autre région sur la surface. De même, d'autres bactéries de la phase liquide peuvent coloniser le biofilm qui constitue une source permanente de contaminants des liquides.

I.1.3.2 Interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion microbienne

Une fois les micro-organismes arrivés près des surfaces par des mécanismes de transport, leur adhérence initiale s'effectue par des interactions physico-chimiques. Ces interactions comprennent principalement [35, 36] les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions acido-basiques (donneur - accepteur d'électrons au sens de Lewis).

I.1.3.2.1 Les interactions de Van der Waals

Ces forces impliquent l'existence d'une interaction d'attraction de faible intensité entre atomes ou molécules. Les liaisons de Van der Waals proviennent de l'attraction entre dipôles électriques permanents (pour les molécules polaires) ou induits dans les atomes ou molécules non polaires [37]. Les interactions de Van der Waals recouvrent trois types de liaisons :

- **Interaction de Keesom (Forces d'orientation)**

Cette interaction, décrite par Willem Hendrik Keesom en 1912, s'établit entre deux dipôles permanents (effet d'orientation) [38]. L'énergie U produite par les forces de Keesom entre deux molécules 1 et 2 séparées par une distance l est définie selon:

$$U_{Keesom} = \frac{2\mu_1^2\mu_2^2}{3(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2 K_B T l^6}$$

μ : Moment dipolaire (C.m)

K_B : Constante de Boltzmann ($1.381 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)

T : Température absolue ($^{\circ}\text{K}$)

ϵ_0 : Permittivité du vide ($\epsilon_0 = 8.854187 \times 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$)

ϵ : Permittivité du milieu dans lequel les molécules évoluent F.m^{-1}

l : la distance intermoléculaire (m)

○ **Interaction de Debye (Forces d'induction)**

Décrites par Debye en 1920, elles impliquent des attractions entre molécules polaires et non polaires (un dipôle permanent et un dipôle induit) [37]. Un dipôle induit provient de l'interaction entre un atome ou une molécule non polaire avec un champ électrique externe créé par une molécule polaire. Ce moment dipolaire induit est proportionnel à la polarisabilité α de la molécule non polaire. L'énergie produite par les forces de Debye entre deux molécules séparées avec une distance l est donné par :

$$U_{Debye} = -\frac{4\alpha\mu^2}{(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2 l^6}$$

α : Polarisation (C.m². V⁻¹)

μ : Moment dipolaire (C.m)

○ **Forces de London**

Les forces d'attractions entre molécules non polaires, dues uniquement à la polarisabilité des molécules ou des atomes, introduites par London en 1930. L'interaction de London s'exerce entre atomes ou entre molécules non polaires. Dans ce type d'interaction, les dipôles induits existent à cause de la Polarisation des atomes ou des molécules, Cette polarisation vient de ce que le nuage électronique est déformable par influence électrique. Ainsi, deux molécules, même non polaires lorsqu'elles sont suffisamment proches, influencent mutuellement leurs distributions de charges, et les déforment, créant ainsi de petits dipôles instantanés qui vont s'attirer faiblement [37]. L'énergie produite par les forces de London pour deux molécules (1) et (2) séparées avec une distance l est:

$$U_{London} = -\frac{3\alpha_1\alpha_2 h\nu}{(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2 l^6}$$

h : constante de Planck (J.s)

α : Polarisation (C.m². V⁻¹)

ν : Fréquence de dispersion (Hz)

I.1. 3.2.2 Les interactions électrostatiques

Lorsqu'une particule (bactérie ou surface plane) est mise en contact avec un milieu aqueux, celle-ci acquiert une charge de surface. L'apparition de charges pouvant provenir des phénomènes d'ionisation des groupements de surface des particules ou d'adsorption d'ions.

Cette adsorption et cette ionisation dépendent du pH du milieu [39]. Pour des pH variant entre 5 et 7, la plupart des souches bactériennes sont chargées négativement car le nombre de groupes carboxyle et phosphate dépasse le nombre de groupes aminé [40]. La présence de charges de surface influence la distribution des ions contenus dans la solution. L'interaction entre les espèces chargées peut être répulsive si les charges d'ions sont de même signe (co- ions) ou attractive si elles sont de signes opposés (contre ions).

○ **Les interactions polaires**

Ce sont les interactions que l'on trouve en milieu aqueux et qui décroissent de façon exponentielle en fonction de la distance. Elles concernent notamment l'interaction entre donneur et accepteur d'électrons (ou entre donneur et accepteur d'hydrogène selon Bronsted) [41].

○ **Liaisons hydrogène**

La liaison hydrogène se produit entre un atome d'hydrogène déjà lié à un atome très électronégatif et un autre atome très électronégatif qui est, lui aussi, déjà engagé dans une molécule. En pratique, les atomes très électronégatifs susceptibles de participer à des liaisons hydrogène sont seulement F, O, N, et Cl. Ces atomes, bien que déjà liés, attirent également l'hydrogène des molécules voisines lorsqu'il est lui-même lié à un atome électronégatif. L'hydrogène a ainsi tendance à se partager entre les deux molécules et forme entre elles une liaison hydrogène. On dit aussi que les deux atomes électronégatifs (O, F, ...) sont reliés par un *pont hydrogène* : $F-H \cdots F$, $O-H \cdots O$, $O-H \cdots N$, $N-H \cdots N$, ... [42].

○ **Répulsion hydrophile et attractions hydrophobes**

Les interactions hydrophiles et hydrophobes sont toutes les deux dues à une restructuration des molécules d'eau au voisinage des surfaces respectivement hydrophiles ou hydrophobes. Les surfaces hydrophiles représentent celles ayant plus d'affinité pour l'eau qu'entre elles ; ce qui se traduit par l'existence d'une couche d'eau liée à la surface et organisée en réseau [43, 44]. Lorsque les deux surfaces hydratées s'approchent l'une de l'autre, la présence de cette eau liée induit une énergie de répulsion hydrophile (nommées également forces de solvation ou d'hydratation), ΔG_{AB} , positive. Cette répulsion hydrophile est fonction de la nature des particules et de leur distance de séparation d . Elle varie avec d selon une loi exponentielle et est effective à des distances de l'ordre de 3 à 5 nm.

Les surfaces ayant peu d'affinité pour l'eau sont dites hydrophobes. L'eau va tendre à se dissocier de ce type de surface, ce qui se traduit par une énergie d'attraction hydrophobe (due aux interactions de Van der Waals de type dipôle induit/dipôle induit : forces de London), ΔG_{AB} , négative.

I.1.3.3 Les facteurs qui conditionnent le développement du biofilm

L'adhésion des bactéries, la formation du biofilm et son développement sont conditionnés par différents facteurs [45] :

- La température de l'eau joue un rôle important dans le développement d'un biofilm. Elle exerce une influence significative sur le métabolisme des microorganismes puisqu'elle est impliquée dans le taux de croissance microbienne, la cinétique des réactions chimiques et enzymatiques, la concentration en dioxygène dissout dans l'eau de mer [46].
- Le pH a une influence sur l'adsorption des bactéries [47, 48] car ce paramètre chimique modifie les double-couches électrostatiques du support et des bactéries.
- Les bactéries ont besoin d'oxygène et des éléments nutritifs tels que le carbone et l'azote pour croître. Les substances organiques dissoutes dans l'eau de mer (acides organiques, acides aminés, oses, polysaccharides...) constituent donc une source nutritive indispensable. Ces substances ont également un effet sur la formation du film primaire.
- La vitesse de colonisation des bactéries est influencée par la nature du support et notamment sa toxicité. [49]. La rugosité des matériaux joue un rôle important dans l'adhésion des micro-organismes [50, 51].
- Les conditions hydrodynamiques ont un effet significatif sur le développement du biofilm. Elles déterminent les caractéristiques du transport de matière tel que les nutriments, les bactéries vers le biofilm ainsi que les forces de cisaillement [52], influençant de ce fait la morphologie et l'épaisseur du biofilm. Lewandowski et Walser [52] ont révélé que l'épaisseur d'un biofilm était maximale dans des conditions hydrodynamiques transitoires (entre les écoulements laminaires et turbulents). Lorsque la vitesse de l'écoulement est faible, la colonisation de la surface augmente et un état

stationnaire est rapidement atteint car l'apport d'éléments nutritifs est limité. Au contraire, si le flux est important, le transfert de matière n'est plus limitant et le développement des micro-organismes est très rapide bien que l'adhésion initiale de cellules sur des surfaces soit rendue plus difficile. Lorsque les forces de cisaillement sont élevées le biofilm est plus fin et plus dense [53, 54].

I.1.3.4 Propriétés physico-chimiques du biofilm

Le développement d'un biofilm dépend de différents paramètres, ce qui lui confère des caractéristiques structurales et chimiques variées.

➤ Physiologie et morphologie du biofilm

Les biofilms peuvent présenter des propriétés physicochimiques distinctes selon les conditions de développement. Au sein d'un biofilm, il y a une certaine hétérogénéité structurale et chimique suivant la surface du biofilm considéré. En effet, il existe à l'intérieur du biofilm un gradient de la disponibilité des éléments nutritifs et la facilité d'élimination des métabolites. En outre, la vitesse de croissance des microorganismes qui se trouvent dans la partie externe du biofilm (à l'interface biofilm/liquide) diffère de celle des cellules microbiennes se trouvant plus au centre du biofilm [55, 56]. Les cellules se trouvant dans la couche interne du biofilm ont une faible accessibilité aux éléments nutritifs, ce qui entraîne un taux de croissance plus faible que celui des cellules périphériques. Ce gradient s'intensifie au fur et à mesure que le biofilm atteint la maturité [57] et s'explique même par une différence de phénotype au sein de la même communauté biofilmique. Ce phénomène engendre une différence dans la sensibilité vis-à-vis des agents biocides selon la zone du biofilm considéré. La structure de biofilm est également influencée par les conditions physicochimiques du milieu dans lequel se développe ce dernier. En présence des forces de cisaillement, le biofilm présente une structure compacte et la matrice d'exopolysaccharides montre une texture filiforme [52]. En revanche, dans les conditions statiques ou les forces de cisaillement sont faibles, les biofilms sont confrontés à une insuffisance de nutriments puisque le milieu de culture n'est pas renouvelé. Ceci entraîne les biofilms à présenter une structure qui optimise le contact avec le substrat pour palier à la carence d'éléments nutritifs rencontrée dans les milieux statiques [58, 59]. La morphologie des biofilms montre que ces derniers adoptent des structures complexes composées de cellules et d'amas de bactéries (micro-colonies) formant de simples tours ou des champignons entrecoupés par un vaste réseau de canaux d'eau. Celui-ci sert très probablement au transport des nutriments au sein du biofilm et au rejet des produits métaboliques indésirables ou toxiques. De ce fait, ces

canaux constituent une partie essentielle de la structure et de la fonction du biofilm et, jouent un rôle capital dans la formation et le maintien de ces structures [42, 58].

La structure d'un biofilm est hétérogène ce qui indique que l'épaisseur de ce dernier est très variable. Selon les conditions de développement, le support, la nature de bactérie et leur âge, l'épaisseur des biofilms peut s'étendre de quelques micromètres à plusieurs centimètres.[60, 61]

I.1.3.5 Composition du biofilm

Un biofilm est composé principalement de cellules bactériennes et de polysaccharides extracellulaires [60]. Ces derniers sont majoritairement composés de sucres courants comme le glucose, le galactose, le mannose, le rhamnose ou encore de l'acide glucuronique [62, 63].

- Substances Polymériques Extracellulaires (SPE)

Les EPS sont des polymères biologiques et constituent le matériau de construction des biofilms. Ils contribuent à certaines de leurs propriétés biologiques, biochimiques et physicochimiques [60]. Les EPS sont majoritairement constituées de polysaccharides et de protéines mais peuvent contenir, en faible quantité, d'autres macromolécules telles que l'ADN et des lipides [64, 65]. Les polysaccharides des EPS sont majoritairement composés d'exopolysaccharides contenant 5 (D-ribose) ou 6 atomes de carbone (D-glucose, D-galactose et D-mannose) ainsi que des acides uroniques. Les propriétés physicochimiques de la matrice des EPS sont d'une importance capitale du fait qu'elles sont responsables de la cohésion des microorganismes au sein du biofilm ainsi que de l'adhésion des biofilms sur une surface solide. La force d'adhésion dépend de la composition chimique ainsi que de la structure tertiaire des EPS [66]. La stabilité qu'ils confèrent au biofilm est le résultat de diverses interactions, parmi lesquelles on trouve les forces de London, des liens hydrogène ainsi que des interactions électrostatiques.

La présence de cations divalents dans les biofilms contribue à l'amélioration de leur cohésion en servant de ponts entre des charges négatives de molécules des EPS et participent à la stabilité des biofilms. Il a été proposé que les cations divalents favorisent la formation de gels et augmentent la rigidité de ces matrices [67]. Les principaux cations divalents qui contribuent à assurer la structure des biofilms sont : Cu^{2+} , Ca^{2+} et Fe^{2+} .

I.1.3.6 L'effet du biofilm sur la corrosion

Selon la nature des bactéries impliquées lors de la formation du biofilm, ce dernier peut provoquer l'accélération ou l'inhibition du processus de corrosion. L'analyse bibliographique

consacrée à l'étude des phénomènes de corrosion a montré que la corrosion microbienne a fait l'objet d'un nombre important de travaux. De nombreuses études ont révélé l'accélération de processus de corrosion en présence de différents microorganismes. Des recherches approfondies ont montré des taux accrus de corrosion en présence de bactéries réductrices de sulfate (BSR) [68 -70]. En plus de la BSR, plusieurs autres microorganismes affectent les processus de corrosion. Rajasekar et al [71] ont étudié le comportement à la corrosion de l'acier API5LX dans le système diesel-eau contenant le *Bacillus cereus*. Ils ont révélé une augmentation de la vitesse de corrosion. Yuan et le Pehkonen ont également observé une augmentation de la corrosion de l'acier inoxydable en eau de mer artificielle riche en nutriments en présence de *Pseudomonas* [72]. L'influence de l'activité des isolats bactériens (*Serratia marcescens* ACE2, *B. cereus* ACE4) sur la dégradation de l'inhibiteur de corrosion et la dissolution de l'acier API5LX a été évaluée par Muthukumar et al [73]. Ils ont prouvé que les deux souches bactériennes ont la capacité de dégrader l'hydrocarbure aromatique et aliphatique présent en inhibiteur de corrosion et augmentent le taux de dissolution du métal. Bien que la majorité des études de la corrosion influencée par les microorganismes ait porté sur la biocorrosion, l'inhibition de la corrosion due à l'activité bactérienne à l'intérieur de biofilm a également été rapportée dans la littérature [74 -76]. Afin d'expliquer le mécanisme d'inhibition, certains chercheurs ont montré que les couches protectrices pourraient être les produits de corrosion (oxydes passifs) formés et piégés par le biofilm ou le biofilm lui-même [76]. Il a été montré que des biofilms formés par les bactéries aérobies réduisent le taux de corrosion [77, 78]. Perez et al. [79] ont révélé que la forte adhérence du biofilm pourrait inhiber les dommages causés à l'acier pendant un certain temps. Cependant, à de plus longues heures, le même environnement chimique, dû au métabolisme microbien, peut mener à un environnement tout à fait corrosif pour l'acier. Les microorganismes peuvent induire l'inhibition de corrosion selon deux mécanismes généraux [80] :

- (i) la neutralisation de l'action des substances corrosives présentes dans l'environnement ;
- (ii) formation des films protecteurs ou stabilisation des films protecteurs préexistants sur le métal.

Par ailleurs, d'autres travaux révèlent [81-83] que les biofilms formés par les bactéries aérobies telles que *Pseudomonas* et anaérobie facultative comme *Escherichia coli* inhibent la corrosion de l'acier au carbone. Ces auteurs ont suggéré que le biofilm assure la protection du métal en réduisant la concentration en oxygène sur sa surface. Ils ont montré aussi que l'épaisseur du

biofilm engendre une réduction importante de la vitesse de corrosion [84]. Il a été également montré qu'en présence de *Pseudomonas flava*, une réduction significative de la vitesse de corrosion de l'acier doux a été remarquée [85]. Ils ont suggéré que cette souche bactérienne a pour effet d'améliorer les propriétés inhibitrices du film de phosphates. L'inhibition de la corrosion causée par les bactéries réductrices du fer, (*S. algae* or *S. ana*) a été également observée pour l'aluminium, l'acier doux et le laiton, exposés à l'eau de mer artificielle contenant le milieu de culture [86]. La corrosion par piqûres de l'aluminium dans le milieu de culture Luria Bertani a été réduite de manière significative par la sécrétion de peptides anioniques par *Bacillus* [87]. Chongdar et al. [88] ont étudié le comportement de l'acier doux, immergé dans une solution de phosphate saline tamponnée contenant deux bactéries aérobies, *Pseudomonas alcaligenes* et *Pseudomonas cichorii*. Ils ont montré que dans le milieu contenant *P. cichorii*, une diminution significative de la vitesse de corrosion a été observée. Le comportement à la corrosion de l'acier et le cuivre en milieu de Baar (Bacilles acido-alcool-résistants) modifiés contenant des bactéries aérobies, *Bacillus brevis* ou *Pseudomonas fragi* a été également étudiée. Les résultats rapportés révèlent que les biofilms sécrétés par les deux bactéries réduisent la vitesse de corrosion de ces deux métaux en raison de l'élimination de l'oxygène [63]. L'étude de l'activité de l'échantillon abiotique avec celui de l'échantillon colonisé avec *Bacillus mycoides* a révélé l'inhibition de l'aluminium [89]. Mansfield et al. ont montré que *B. subtilis* et *B. licheniformis* peuvent inhiber la corrosion du laiton de la cartouche, de l'aluminium 2024 et l'acier au carbone immergé dans l'eau de mer artificielle [90]. Bolton et al. [91] ont montré que *B. pumilus* accélère la corrosion de coupons galvanisés mais n'a pas augmenté la corrosion de l'acier.

I.2 Aspects théoriques sur la corrosion

I.2.1 Introduction

La corrosion est une interaction physicochimique entre un métal et son milieu entraînant des modifications dans les propriétés du métal et souvent une dégradation fonctionnelle du métal lui-même, de son environnement ou du système composé par les deux facteurs [92, 93]. Il est admis que les différents phénomènes de corrosion des matériaux a été et demeure à l'heure actuelle un problème industriel majeur qui, malgré de nombreuses études à caractère fondamentales et appliquées lors de ces dernières décades, causent encore de grands dommages dans de nombreux domaines. De ce fait, la corrosion des matériaux en général et des métaux en particulier constitue un domaine qui attire toujours la communauté scientifique.

Les processus de la corrosion touchent tous les domaines de l'industrie et n'épargnent pas les installations, sites industriels, machines ou tout autre équipement de production. Le coût des dommages causés par cette dernière est énormément élevé. Selon l'Organisation Mondiale de la Corrosion l'OMC, 3 à 4% du PIB des pays industrialisés. On estime, par exemple, que chaque année le quart de la production d'acier est détruit par la corrosion, ce qui correspond environ à 150 millions de tonnes/an ou encore 5 tonnes/seconde.

En France, par exemple, son coût est estimé à 1 euro par jour et par personne. Par ailleurs, une étude, détaillée, réalisée en 2002 par l'association nationale des ingénieurs de corrosion (NACE), sur les coûts directs associés à la corrosion métallique dans tous les secteurs de l'économie aux USA, montre que le coût annuel total est de 276 milliard de dollars soit 3.1% du PIB. 17.6 Milliard de dollars reviennent aux secteurs productifs [94].

La corrosion en atmosphère marine apparaît encore plus tenace, et c'est bien naturel compte tenu de la présence permanente d'humidité et de sel [95]. L'eau de mer est l'électrolyte le plus répandu sur notre globe et son action sur les différents matériaux qui lui sont soumis a fait l'objet de nombreuses études, aussi bien en laboratoire que sur site. Les propriétés physiques, chimiques et biologiques de l'eau de mer, doivent, a priori, être considérées comme capables de provoquer ou conditionner la dégradation des matériaux. Des études économiques révèlent une estimation sur le coût total annuel de la corrosion marine dans le monde qui se situe entre 50 et 80 milliards de dollars [96].

En plus des conséquences sérieuses engendrées par la corrosion, sur le plan économique, cette dernière touche également le domaine sécuritaire. La corrosion des structures métalliques peut engendrer des catastrophes pouvant entraîner des pertes humaines (ponts, avion, automobiles, canalisations de gaz, ...) [97]. La corrosion constitue également une menace majeure pour le patrimoine culturel. En effet, les atmosphères corrosives accélèrent la dégradation d'objets telles que les sculptures et autres œuvres d'art [98-100].

I.2.2 Aspect fondamental

Un phénomène de corrosion peut être défini comme une réaction interfaciale irréversible d'un matériau avec son environnement par action chimique, biochimique ou électrochimique conduisant à la destruction partielle ou totale du matériau ou à la modification de certaines de ses propriétés [101]. La corrosion obéit aux principes de la thermodynamique et de la cinétique électrochimique. L'approche thermodynamique prévoit la possibilité ou non de la réaction de

corrosion tandis que l'approche cinétique peut permettre l'évaluation des vitesses des deux réactions élémentaires et par conséquent la vitesse globale de la réaction de corrosion.

Différents types de corrosion sont répertoriés dans la littérature selon leur faciès. On se limitera, dans le cadre de cette thèse, à présenter ceux rencontrés dans un environnement aqueux et atmosphérique : la corrosion électrochimique. En effet, la corrosion électrochimique ou humide fait intervenir l'eau ou l'humidité ou bien un acide [102]. En milieu aqueux ou atmosphérique (le matériau est en contact d'une couche mince de solution), la corrosion est un processus électrochimique puisqu'il y a un transfert d'électrons entre la surface métallique et la solution électrolytique.

D'un point de vue pratique, le couplage d'une ou plusieurs réactions d'oxydation d'un métal ou alliage, avec une ou plusieurs réactions de réduction d'espèces en solution, conduit à l'obtention d'un potentiel « mixte » de corrosion situé dans un domaine du diagramme potentiel-pH où le métal est actif [103,104]. La totalité de la surface du métal prend cette valeur de potentiel et est le siège d'une corrosion généralisée selon la réaction :



où :

M : désigne le métal; M^{n+} : l'ion correspondant ; Red : l'espèce réduite et Ox^{z+} : l'oxydant associé.

La figure 5, présente, à titre d'exemple, le diagramme potentiel-pH de Pourbaix [101] relatif à l'élément fer.

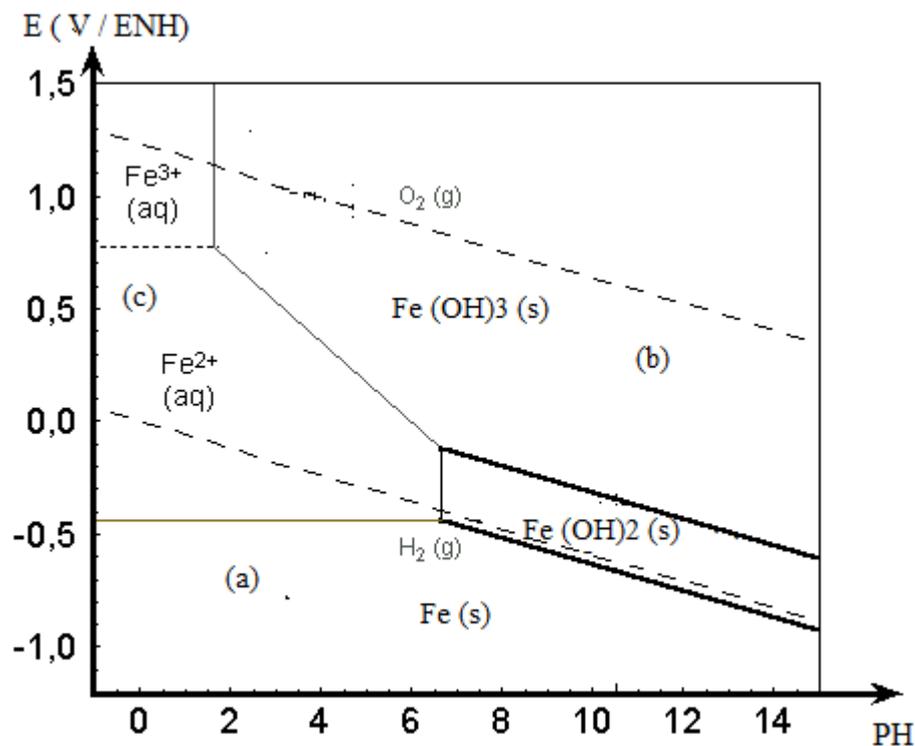


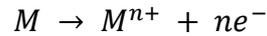
Figure.5 Diagramme potentiel-pH du système $Fe - H_2O$ à $25^\circ C$ [101]

On peut remarquer sur ce diagramme que le fer apparaît comme non noble, instable en présence de l'eau. Il va donc s'y corroder. Ce diagramme présente trois domaines essentiels [105]:

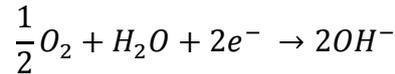
- Domaine d'immunité** : le métal est exempt de toute transformation chimique lorsqu'il est en contact avec la solution. Une réduction des cations métalliques ainsi que celle de l'eau se produisent.
- Domaine de passivation** : le métal est thermodynamiquement attaqué. Dans ce domaine, il se forme à la surface un film de composés solides plus ou moins adhérent et donc plus ou moins protecteur (oxyde ou hydroxyde)
- Domaine de corrosion** : dans ce domaine, la corrosion est thermodynamiquement possible. La présence d'hétérogénéité engendre la formation de micro piles en surface (oxydation sur l'anode et réduction sur la cathode). Les produits de corrosion passent en solution.

Quand les sites de réaction sont très voisins les uns des autres et répartis au hasard sur la surface métallique et dans le temps, il se produit une corrosion généralisée [106] qui s'interprète par

une dissolution uniforme du matériau. La réaction anodique correspond à la dissolution du métal selon:

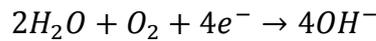


La réaction cathodique, quant à elle, varie selon la nature des espèces oxydantes qui se trouvent dans la solution. Dans les solutions aqueuses aérées peu acides, neutres ou basiques, la réaction cathodique la plus importante, sur le plan cinétique, est la réduction du dioxygène dissous selon:

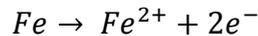


L'étude des processus de corrosion du fer et des aciers dans les solutions aqueuses neutres et aérées en général, et dans l'eau de mer en particulier, met en évidence deux processus essentiels [107] :

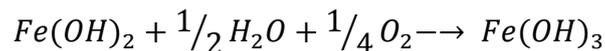
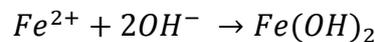
- une réaction cathodique prépondérante, en l'occurrence, la réduction du dioxygène dissous selon :



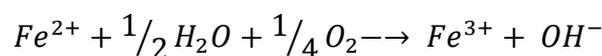
- une réaction anodique qui est la dissolution du fer selon:



Les ions Fe^{2+} formés, suite à la réaction de dissolution anodique, sont alors susceptibles de réagir avec les ions OH^{-} pour former de l'hydroxyde ferreux $Fe(OH)_2$ (lorsque le produit de solubilité est atteint), qui peut ensuite évoluer vers la précipitation de l'hydroxyde ferrique $Fe(OH)_3$ selon:



L'oxydation des ions $Fe(II)$ en ions $Fe(III)$ par action du dioxygène dissous peut être également décrite sous la forme ionique si les produits de solubilité ne sont pas atteints:



I.2.3 Le contrôle électrochimique de la corrosion

Les processus de corrosion comportent au moins une réaction partielle anodique et une réaction partielle cathodique, impliquant chacune plusieurs étapes. Chaque étape élémentaire a sa vitesse propre. La régulation de la réaction en chaîne est assurée par l'étape élémentaire qui a la vitesse la plus faible (étape lente limitant) [108]. La réaction d'oxydo-réduction peut être régie, soit par le transfert de charge anodique ou cathodique à l'interface métal/électrolyte soit par le transfert de masse, au sein de l'électrolyte, de l'oxydant ou de l'ion métallique, ou bien des produits de la réaction de réduction de l'oxydant. Le transport peut se faire par diffusion due à un gradient de concentration, par migration sous l'effet d'un champ électrique, ou par convection sous l'effet d'une agitation mécanique forcée.

I.2.4 Comportement du fer et des aciers en eau de mer

L'eau de mer est un électrolyte contenant une concentration relativement forte en ions Cl^- . La salinité de ce milieu a un impact particulièrement important sur la corrosion du fer en raison de l'activité des ions chlorure (Cl^-), qui ont une mobilité élevée et sont attirés par des ions $Fe(II)$ formés dans les zones anodiques. L'utilisation des aciers, dans les milieux marins, pose de ce fait un problème important de corrosion. Lorsque le fer se corrode en présence d'ions chlorure, le composé prédominant initialement formé est le chlorure ferreux ($FeCl_2$) [109]. Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à l'effet catalytique des ions chlorure. Il faut signaler que les ions chlorure forment des complexes solubles avec les ions de fer qui favorisent la dissolution de l'oxyde de fer [110, 111]. La formation des complexes de chlorure peut cependant consommer les ions libres de fer en solution, et changer l'équilibre qui provoquerait la dissolution de l'oxyde de fer. La présence des ions chlorure augmente également la solubilité de la couche passive qui accélère plus loin sa dissolution.

La présence de sel augmente le taux de corrosion. Le sel dissous augmente la conductivité de la solution aqueuse à la surface du métal ce qui engendre l'augmentation la vitesse de corrosion électrochimique. Autrement dit, le fer et l'acier se corrodent plus rapidement lorsqu'ils sont en contact de solution chlorurée [112].

I.3 La biocorrosion

La corrosion microbienne est également appelée corrosion influencée microbiologiquement (MIC) ou la corrosion biologique est le résultat d'interactions le plus souvent synergiques, entre

la surface métallique et les produits de corrosion abiotiques d'une part et les cellules bactériennes (associées en biofilm) et le produit de leur métabolisme d'autre part. Ce dernier inclut les acides organiques et inorganiques et les composés volatils comme l'ammoniac et l'hydrogène sulfuré [113].

Le rôle du biofilm dans l'augmentation de la corrosion à l'interface métal-solution biologiquement conditionnée peut-être diversifié et peut provenir de mécanismes simultanés ou successifs, notamment :

- l'élimination des films protecteurs par détachement du biofilm,
- induisant des effets d'aération différentielle par suite d'une répartition inégale du biofilm. E. Hamzah et *al.*[114]ont montré l'effet agressif de la bactérie *P. aeruginosa* vis-à-vis de l'acier au carbone. En effet, la formation d'un biofilm hétérogène par cette bactérie à la surface de l'acier a entraîné une aération différentielle qui a provoqué l'augmentation la vitesse de corrosion.

La colonisation non uniforme ou inégale par les biofilms microbiens entraîne la formation de cellules d'aération différentielle où les zones sous des colonies respirantes sont appauvries en dioxygène par rapport aux zones non colonisées. Dans ces conditions, une corrosion par piqûre est observée dans la zone de surface recouverte par le voile biologique.

Sur des surfaces d'acier au carbone immergées dans un milieu salin, une attaque localisée se produit de manière préférentielle en raison de l'aération différentielle entre les zones couvertes et non couvertes des colonies microbiennes [115, 116].

I.3.1 Les groupes de bactéries impliqués dans la corrosion

Parmi les principaux types de bactéries qui sont associés à la détérioration des métaux et plus spécifiquement l'acier au carbone, on trouve les bactéries sulfato-réductrices (SRB) qui sont des anaérobies, utilisent le sulfate comme accepteur d'électrons terminal et produisent du sulfure d'hydrogène (H_2S) comme sous-produit métabolique qui favorise l'acidification de l'environnement; cette acidité élevée engendre une grande agressivité à l'environnement [113]. Les bactéries nitrato-réductrices, les bactéries *Thiosulfato-Réductrices* (TSRB), les bactéries précipitant du fer et celles qui sécrètent des acides organiques tels que les acides: acétique, formique, lactique, propionique et butyrique comme produits de leur métabolisme à partir du métabolisme fermentatif des matières organiques [117]. Tous ces microorganismes cohabitent

dans les biofilms naturels, formant fréquemment des communautés symbiotiques qui affectent les processus de corrosion électrochimique, à travers un métabolisme coopératif intégral.

I.3.2 Protection contre corrosion

Les processus de corrosion sont responsables d'endommagement de nombreuses structures notamment celles qui sont constituées de matériaux métalliques. En effet, les matériaux métalliques, et plus particulièrement les aciers qui constituent les matériaux de base dans la construction de nombreuses structures, sont fortement sujets à la corrosion lorsqu'ils sont au contact d'atmosphères humides, immergés en eau douce ou saline. Pour limiter ces problèmes; la prévention est le meilleur atout.

La protection contre la corrosion comprend un assemblage de traitements [107]. En effet, pour protéger les matériaux, il est possible d'agir sur ces derniers (choix judicieux, formes adaptées, contraintes en fonction des applications, ...), sur leurs surfaces (tout type de traitement de surface tels que, revêtement, peinture ...) ou sur le milieu avec lequel ces matériaux sont en contact (inhibiteurs de corrosion).

Généralement, le choix de la technique porte sur une combinaison de nombreux procédés qui prennent en compte les caractéristiques du matériau, celles de milieu et le coût de l'opération. Les inhibiteurs de corrosion constituent un moyen de lutte original contre la corrosion des métaux. L'originalité vient du fait que le traitement anticorrosion ne se fait pas sur le métal lui-même mais par l'intermédiaire du milieu corrosif.

I.3.2.1 Inhibiteurs de corrosion

Un inhibiteur de corrosion est une substance chimique qui, ajoutée à faible concentration au milieu corrosif, ralentit ou stoppe le processus de corrosion d'un métal placé au contact de ce milieu [101]. L'efficacité de ce dernier est donnée par la relation suivante :

$$E_I = \frac{v_o - v}{v_o}$$

où: E_I est l'efficacité de l'inhibiteur, v_o est la vitesse de corrosion initiale et v la vitesse de corrosion après addition de l'inhibiteur..

Un inhibiteur de corrosion doit vérifier un certain nombre de propriétés fondamentales [101]:

i) abaisser la vitesse de corrosion du métal tout en conservant les caractéristiques physico-chimiques de ce dernier ;

- ii) être stable en présence d'autres constituants en particulier vis-à-vis de certains biocides ;
- iii) être stable dans le domaine de température utilisé ;
- iv) être efficace à faible concentration ; peu onéreux par rapport aux économies qu'il permet de réaliser et finalement, être compatible avec les normes en vigueur de non-toxicité et de protection de l'environnement.

Les inhibiteurs ont plusieurs domaines traditionnels d'application [118]:

- le traitement des eaux (eaux sanitaires, eaux de procédés industriels, etc.) ;
- l'industrie du pétrole: forage, extraction, raffinage, stockage et transport ;
- l'industrie des peintures sur métaux où les inhibiteurs sont des additifs assurant la protection anticorrosion des métaux.

I.3.2.1.1 Les classes d'inhibiteurs

Il existe plusieurs façons de classer les inhibiteurs de corrosion. Généralement, ils sont classés en fonction de la formulation des produits [119] (inhibiteur organique, inhibiteur inorganique), de la réaction électrochimique inhibée (inhibiteur cathodique, inhibiteur anodique ou mixte), de leur domaine d'application ou du mécanisme réactionnel mis en jeu (adsorption et/ou formation d'un film).

a) Classification selon la nature des molécules de l'inhibiteur

▪ Inhibiteurs inorganiques

Les composés inorganiques sont utilisés généralement en milieu voisin de la neutralité ou en milieu alcalin, et plus rarement en milieu acide. La quasi-totalité de ces molécules contiennent de l'oxygène dans leur formule. Les inhibiteurs minéraux sont de moins en moins utilisés en raison de leur toxicité. Leur emploi se limite à certains systèmes en circuit fermé [120].

▪ Inhibiteurs organiques

Les molécules organiques sont promises à un développement plus que certain en termes d'inhibiteurs de corrosion : leur utilisation est actuellement préférée à celle des inhibiteurs inorganiques pour des raisons d'écotoxicité essentiellement. L'action inhibitrice de ces composés organiques, qui est généralement indépendante des processus anodiques et cathodiques de corrosion est liée à la formation par adsorption d'une barrière plus ou moins

continue, mais d'épaisseur finie, qui empêche l'accès de la solution au métal. Les inhibiteurs organiques sont généralement constitués de sous-produits de l'industrie pétrolière [121].

Ils possèdent au moins un centre actif (les atomes N, S, P, O) susceptible d'échanger des électrons avec le métal.

b) Classification selon les mécanismes d'action électrochimique

Dans la classification relative au mécanisme d'action électrochimique, on peut distinguer les inhibiteurs cathodiques, anodiques ou mixtes [122].

• Inhibiteurs cathodiques

Les inhibiteurs cathodiques ralentissent le rythme de la réaction cathodique ou, sélectivement, précipitent dans les zones cathodiques où le pH augmente en raison de la libération d'ions hydroxyle, augmentant l'impédance locale et empêchant la diffusion d'espèces réductibles dans ces zones. Ces inhibiteurs fonctionnent par différents mécanismes qui comprennent :

- la diminution la vitesse de la réaction de réduction qui conduit au déplacement du potentiel de corrosion vers des valeurs plus électronégatives;
- la précipitation sélective sur les zones cathodiques. Ces inhibiteurs affectent les réactions cathodiques.

• Inhibiteurs anodiques

Les inhibiteurs anodiques (également classés comme inhibiteurs de passivation) sont, en général, des substances oxydantes qui, au-dessus d'une certaine valeur critique, fournissent une protection contre la corrosion par l'un (ou plusieurs) des mécanismes :

- (i) La capacité de déplacer le potentiel de corrosion du matériau vers des valeurs plus nobles (formation d'un film passif protecteur sur l'anode);
- (ii) stabilisation des couches d'oxyde passives;
- (iii) réparation de couches protectrices endommagées;
- (iv) amélioration de la capacité passive par incorporation d'espèces dans la couche passive ;
- (v) diminution de la probabilité d'absorption d'ions agressifs, tels que les ions chlorure.

Ces inhibiteurs réduisent la vitesse des réactions anodiques sans affecter les réactions cathodiques.

- **Inhibiteurs mixtes**

Les inhibiteurs de corrosion mixtes sont principalement des composés organiques qui ne peuvent être ni classifiés comme cathodiques ni comme inhibiteurs anodiques, car ils affectent les deux processus. L'efficacité des inhibiteurs de corrosion mixtes est contrôlée par leur capacité à adsorber sur la surface du métal et par le degré de couverture. Ce processus dépend fortement d'une part de la composition chimique et de la structure de l'inhibiteur et d'autre part de la morphologie, de la rugosité et de la composition de la surface métallique.

c) **Classification selon les mécanismes d'action interfaciale [123]**

- ***La formation de couches moléculaires adsorbées***

Ces inhibiteurs sont principalement des molécules organiques, qu'ils soient naturels ou synthétiques. Ils possèdent au moins un atome susceptible d'échanger des électrons avec l'atome métallique, tels que N, O, P ou S: amines, phosphonates, benzoates, carboxylates, phosphates, dérivés constitués par une chaîne hydrocarbonée, dérivés benzéniques. L'effet inhibiteur de ces composés organiques dépend de leur capacité à s'adsorber sur la surface des métaux, ainsi que de l'orientation de la molécule à la surface [124].

- **La formation d'une couche tridimensionnelle ou d'un film par précipitation**

Ces inhibiteurs agissent généralement par des réactions dites de conversion. Le métal est oxydé par l'oxygène dissous ou un autre oxydant, et un composé insoluble précipite ensuite au contact du composé inhibiteur, qui est généralement un anion. C'est notamment le cas des phosphates [125].

I.3.2.1.2 Inhibiteurs pour les environnements neutres

- **Adsorption des inhibiteurs**

Les inhibiteurs des environnements neutres peuvent fournir une protection contre la corrosion avec le mécanisme d'adsorption [124]. Cette dernière pourrait résulter de l'interaction électrostatique entre les charges ioniques ou les dipôles et la surface métallique chargée électriquement à l'interface métal / électrolyte. En outre, l'adsorption peut être due à la formation de liens entre l'inhibiteur et la surface métallique par transfert d'électrons au métal, habituellement dans le cas de molécules organiques avec des doublets libres, des liaisons covalentes, multiples (double ou triple) et des cycles aromatiques.

➤ **Précipitation de films de sel protecteurs**

Les inhibiteurs agissant par précipitation engendrent la formation d'une couche superficielle composée de sels ou des complexes organiques peu solubles formés lors de la précipitation des produits de réaction cathodique tout en bloquant la dissolution du métal [122].

➤ **Précipitation du film ou polymérisation**

L'inhibition des processus de corrosion dans des environnements neutres peut être obtenue par précipitation du film. Ce mécanisme d'inhibition est basé sur la formation de couches de surface par précipitation ou polymérisation. La couche formée sur le substrat métallique agit comme une barrière pour les espèces impliquées dans la réaction cathodique (le dioxygène dissous) abaissant la densité du courant de corrosion. Les polyphosphates et les organophosphates sont des inhibiteurs typiques conduisant à une précipitation de films. Ces inhibiteurs forment des films minces adhérents sur des sites cathodiques empêchant l'accès du dioxygène à ces endroits.

➤ **Passivation**

La passivation est un mécanisme typique pour les inhibiteurs de corrosion dans des solutions neutres. Dans ce cas, la passivation de la surface métallique peut être induite par des espèces oxydantes comme les chromates, les nitrites, les nitrates et les molybdates. [126]

I.3.2.1.3 Bio-inhibiteurs

La majorité des inhibiteurs synthétiques présentent un bon effet protecteur mais la plupart d'entre eux sont hautement toxiques et nocifs pour les êtres humains et l'environnement. De ce fait, les bio – inhibiteurs (inhibiteurs biologiques) sont des substances qui sont présentes dans les tissus biologiques et sont sondées et évalués comme inhibiteurs de corrosion [127].

a. Chitosane

Le chitosane (CS), dérivé de la chitine polysaccharidique, est bien connu comme un polymère marin renouvelable à faible coût. La principale source de chitine est la composante structurelle des coquilles de crustacés, comme la crevette, le homard et le crabe. Le chitosane est l'un des polymères naturels les plus abondants à côté de la cellulose. [124]

b. Acides aminés

Les acides aminés sont une classe de molécules qui peuvent être classées soit comme biologiques, soit naturelles. Les acides aminés sont abondants, non chers et faciles à produire avec une pureté près de 100 %. Ils contiennent des hétéroatomes et des électrons de type π qui

font de ces molécules des inhibiteurs de corrosion potentiels [124]. Abdel-Fatah et *al.*[128] ont révélé la protection d'un acier faiblement allié immergé dans une solution ammoniacale d'acide citrique par trois acides aminés, le tryptophane, la tyrosine et la sérine. Maryam [129], Touafri et *al.*[130] ont également mis en évidence l'efficacité inhibitrice des acides aminés vis-à-vis de la corrosion de l'acier au carbone en milieu acide

c. Bactéries et champignon

L'inhibition microbiologique de la corrosion représente la contrepartie de la corrosion ou de la biocorrosion. Alors que, dans ce dernier cas, les matériaux sont endommagés en raison d'effets néfastes exercés par les microorganismes ou leurs produits métaboliques, le premier décrit le phénomène d'atténuation de la corrosion par action directe ou indirecte des microorganismes [131].

Les mécanismes impliqués dans la diminution de la corrosion par des microorganismes (ou leurs biofilms) sont sensiblement plus complexes que ceux impliqués dans la protection contre la corrosion par des agents inhibiteurs « classiques ». Pour comprendre les processus d'inhibition engendrés par les micro-organismes, plusieurs mécanismes ont été proposés dans la littérature [131] a proposé trois principaux types de mécanisme :

- (a) l'élimination des agents corrosifs,
- (b) l'inhibition de l'adhésion cellulaire ou la croissance du biofilm des microbes nuisibles,
- (c) la formation de couches protectrices.

Videla et Herrera [116] quant à eux, ont suggéré de classer les mécanismes selon deux groupes majeurs :

- (a) la neutralisation des effets néfastes des agents corrosifs et
- (b) la formation ou la stabilisation de films protecteurs sur le matériau, ce dernier comprenant la formation de couches passives protégeant le matériau de la dissolution ainsi que des biofilms protecteurs inhibant l'adhérence microbienne.

➤ **L'inhibition de la corrosion par l'élimination de l'oxygène**

La respiration aérobie des biofilms diminue la concentration d'oxygène à la surface métallique. L'élimination de l'oxygène pourrait être à l'origine de l'inhibition de la corrosion dans des conditions aérobies [132]. Une étude a révélé une réduction significative des taux de corrosion

de l'acier SAE 1018 en présence des bactéries *Pseudomonas fragi* et *Escherichia coli*. La respiration de ces bactéries a été l'origine de cette inhibition. Il a été montré également que les deux espèces bactérienne *Pseudomonas sp* aérobic et *serratia marcescents* facultativement anaérobies ont entraîné une diminution significative du taux de corrosion de l'acier doux en milieu salin. Cette observation a été expliquée par la consommation de l'oxygène par ces souches microbiennes [133]. Les biofilms peuvent servir également de barrières de diffusion contre les agents corrosifs tels que les ions chlorure et l'oxygène.

➤ **Inhibition de la MIC par des bactéries sécrétant des antibiotiques**

Les antibiotiques générés par des biofilms (tels que le biofilm formé par *Bacillus brevis*) éliminent les bactéries qui provoquent la corrosion. Les bactéries chimioorganotrophiques inhibent la corrosion sous un état anaérobie en éliminant les produits de corrosion et en détruisant l'environnement écologique pour bactéries sulfato-réductrices (BSR). [134]. *Bacillus subtilis* réduit les taux de corrosion en sécrétant des antibiotiques (indolicidine, bactenecin et probactenecin) qui peut inhiber la croissance du BSR (*Desulfovibrio vulgaris* et *D. gigas*) qui causent la corrosion [135]. Les peptides antimicrobiens Gramicidine. S sécrétés naturellement par *Bacillus brevis* a également inhibé la colonisation SRB et a entraîné une réduction de la corrosion sur l'acier doux et l'acier inoxydable [136].

➤ **Sécrétion des inhibiteurs de corrosion**

Les couches protectrices peuvent être des produits d'oxyde passifs formés et piégés dans la matrice de biofilm ou la matrice de biofilm elle-même. Ces dernières diminuent le contact des agents corrosifs avec une surface métallique Certaines bactéries sont capables de produire des inhibiteurs de corrosion tels que les siderophores, les polyaspartats ou les polyglutamates gamma. Les siderophores sont des chélateurs de fer formés par des microorganismes au pH neutre. Il a été révélé que les siderophores entraînaient l'ennoblissement de l'acier inoxydable en milieu marin [137]. Il a été montré également que la vitesse de corrosion de l'alliage d'aluminium 2024 a été réduite de 90% par γ -polyglutamate sécrété par *Bacillus licheniformis* [138]. Ignatova-Ivanova Tsvetelava et al. [139] ont révélé que les polysaccharides Produits par *Lactobacillus fermentum* ont montré des résultats intéressants pour la protection de l'acier.

Chapitre II Matériels et méthodes d'étude expérimentale

II.1. Milieu d'étude

Tous les tests ont été réalisés en eau de mer naturelle. Ce milieu a été stérilisé par autoclavage pendant 20 min à 120 ° C sous une pression de 1,3 bar. Le milieu stérile a été utilisé comme contrôle pour toutes les expériences.

L'analyse microbiologique effectuée dans le cadre de cette thèse a été effectuée à partir de prélèvements d'eau de mer de la côte est d'Alger au lieu-dit (plage de Boumerdes). La démarche expérimentale adoptée consiste en des prélèvements effectués de manière aseptique dans des flacons en verre stérile de 250 mL. Les flacons sont ensuite acheminés, dans une glacière, vers le laboratoire pour y être conservés à +4°C [140].

II.1.1 Recherche de micro-organismes anaérobies et aérobies

La recherche des micro-organismes anaérobies est réalisée à partir de d'un prélèvement de 1mL d'eau de mer (solution mère) introduite dans un tube à essai stérile auquel est ajouté 2 mL de milieu de culture gélose TGEA favorables aux développements des bactéries (*Gélose Glucose Tryptonée* à l'extrait de Levure et Agar). Une fois le milieu solidifié, nous ajoutons 1mL de paraffine stérile afin d'assurer des conditions d'anaérobiose. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures dans une étuve.

En ce qui concerne la recherche des germes aérobies, on a préparé d'abord des dilutions décimales jusqu'à 10^{-2} (avec un rapport: 1/10) c.-à-d. 1mL dans 9mL d'eau physiologique. A partir de la solution mère, on a prélevé 1mL avec une pipette pasteur stérile graduée qu'on a versé dans 9 mL d'eau physiologique (dilution 10^{-1}). A l'aide d'une autre pipette stérile graduée, on a versé 1mL de la dilution 10^{-1} dans 9 mL d'eau physiologique dans un autre tube à essai (dilution 10^{-2}).

II.1.2 Préparation des boîtes de pétri avec le milieu de culture

Le développement de ces germes est réalisé à l'aide d'un milieu de culture constitué de la gélose T.G.E.A (gélose glucosée tryptonée à l'extrait de levure). Ce dernier est porté au bain marie, après liquéfaction, on verse aseptiquement 15 mL de ce milieu dans 3 boîtes de pétri. Les boîtes de pétri sont agitées doucement afin de répartir la gélose et assurer l'homogénéisation.

Après la préparation des dilutions et les boîtes de pétri, on verse 200 µL de chacune des dilutions dans une boîte de pétri et à l'aide d'une anse Pasteur à fil bouclé, on réalise des stries. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures dans une étuve.

II.1.3 Identification des bactéries

a. L'enrichissement

L'enrichissement des colonies obtenues a nécessité l'utilisation de 10 mL du bouillon BHIB (bouillon cœur cerveau, milieu liquide particulièrement adapté à la croissance des germes aérobies et anaérobies) dans lequel nous avons repiqué une colonie de l'analyse de l'eau de mer. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 18 à 24 heures dans une étuve.

b. Coloration de Gram

La technique est basée sur la différence de structure de la paroi. Elle permet de diviser les bactéries en deux grand groupes : les bactéries *Gram -* et les bactéries *Gram +*.

Un frottis est réalisé en déposant sur une lame de verre une goutte d'eau physiologique stérile puis on prélève un fragment de colonie à partir de milieu d'enrichissement avec une anse ou une pipette pasteur et on étale la goutte d'eau de façon à obtenir un étalement mince et homogène. Le frottis est fixé à la chaleur par séchage à la flamme. La lame est ensuite plongée dans une solution de violet de gentiane (30 secondes) afin de colorer les cellules. Le frottis est ensuite recouvert de réactif lugol (mordant) pendant 30 secondes ce qui permet de fixer la coloration. Une décoloration à l'éthanol est ensuite réalisée. La dernière étape consiste à colorer avec de la fushine pendant 30 secondes. On procède ensuite à l'observation microscopique sous huile à immersion avec un objectif 100 (grossissement× 1000). Les bactéries à *Gram-* sont décolorées sous l'action de l'alcool et prennent la nouvelle couleur rose de la fushine tandis que les bactéries *Gram+* gardent le violet de gentiane et ne se décolorent pas sous l'action de l'alcool et apparaissent donc violettes au microscope [6].

L'identification est complétée par la recherche de caractères biochimiques :

c. Etude biochimique

- **Test de catalase**

C'est une enzyme capable de catalyser l'hydrolyse de l'eau oxygénée en libérant l'oxygène. Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame de verre stérile. La détection d'une bactérie "catalase positive" se manifeste par un dégagement d'oxygène [141].

- **Recherche d'autres caractères biochimiques par la Galerie API 20E**

L'API 20E utilise 21 tests biochimiques standardisés et miniaturisés et une base de données. Il se compose de 21 microtubes contenant des substrats déshydratés. Ces tubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne. La galerie a été incubée à 30°C pendant 24 à 48 heures. Les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs. La lecture est effectuée selon un tableau fourni et l'identification est obtenue en utilisant le logiciel fourni par le fabricant [142].

II.2 Matériau

Le matériau d'électrode utilisé pour la réalisation de l'étude électrochimique est un acier A60 dont la composition chimique est reportée dans le tableau II.1.

Tableau II.1 Composition chimique de l'acier A60

| élément | C | N | P | S | Fe |
|---------|-----|-------|-------|-------|-------|
| % | 0,4 | 0,009 | 0,045 | 0,045 | 0.501 |

L'électrode de travail est un disque tournant (EDT) en acier A60 de 8 mm de diamètre, animé d'un mouvement de rotation uniforme à une vitesse angulaire, Ω , autour de son axe vertical. L'EDT est la section droite du cylindre dont la surface latérale est recouverte de peinture cataphor étique isolante de manière à éviter l'infiltration du liquide, avant d'être enrobée dans une résine époxy. L'électrode ainsi réalisée constitue un embout compatible avec l'électrode tournante RADIOMETER, type EDI 101.

II.3 Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont de genre Bacillus, l'une (*B. cereus*) qui a été isolée de l'eau de mer naturelle et l'autre, (*B. subtilis*) obtenue du laboratoire de microbiologie de la Faculté des sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, de l'Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou.

Afin d'obtenir des résultats fiables et reproductibles, les échantillons en acier au carbone subissent, avant chaque essai, un prétraitement qui consiste en un polissage de la surface de l'électrode à l'aide de papier abrasif de granulométrie de plus en plus fine 600, 800, 1000 et 1200 SiC, suivi d'un rinçage à l'eau distillée puis stérilisé par immersion dans l'éthanol, lavé

encore une fois avec d'eau distillée stérile et séché de façon aseptique à l'air. On les plonge ensuite dans des Erlen Meyer comportant 200 mL d'eau de mer à savoir eau de mer brute, stérile ou stérile contenant un 1 mL d'inoculum de *Bacillus (cereus ou subtilis)* à différents temps d'immersion. Après les avoir fermé avec du coton, les Erlen Meyers sont ensuite disposées sur un agitateur (figure II.1) afin de maintenir l'homogénéité des solutions. Le milieu est renouvelé tous les deux jours.

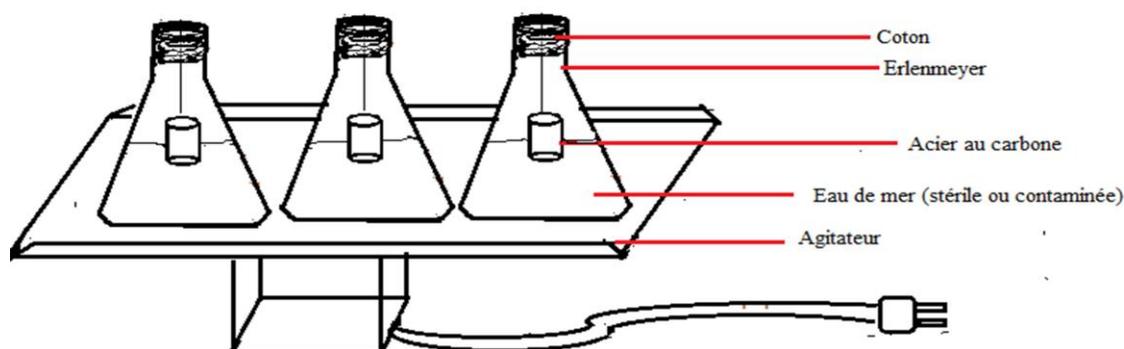


Figure II.1 Schéma du dispositif utilisé pour homogénéiser le milieu

II.4 Dispositif de mesures électrochimiques

La cellule de mesures électrochimiques utilisée dans le cadre de cette thèse est constituée d'une cellule classique à trois électrodes où l'électrode de travail est un acier au carbone A60. La contre électrode est un fil de platine; l'électrode de référence au calomel saturé ($Hg/Hg_2Cl_2/Cl^-, K^+$) (ECS) est utilisée comme sonde de potentiel de référence.

L'acquisition des données est réalisée grâce à un potentiostat/galvanostat d'Ecochemie Ltd de type Autolab 30 équipé d'un analyseur de fonction de transfert (AFT) intégré. Il est constitué d'un générateur qui envoie une perturbation sinusoïdale via le potentiostat et d'un analyseur qui calcule la fonction de transfert $\Delta E/\Delta I$; d'un ordinateur qui pilote l'ensemble et, qui permet l'acquisition et le traitement des données, grâce au logiciel GPES pour les mesures de la caractéristique $I = f(E)$ et FRA pour la SIE.

La figure (II.2) présente le dispositif expérimental mis en œuvre pour les mesures électrochimiques. La cellule électrochimique est reliée à un potentiostat/galvanostat par l'intermédiaire d'un électromètre.

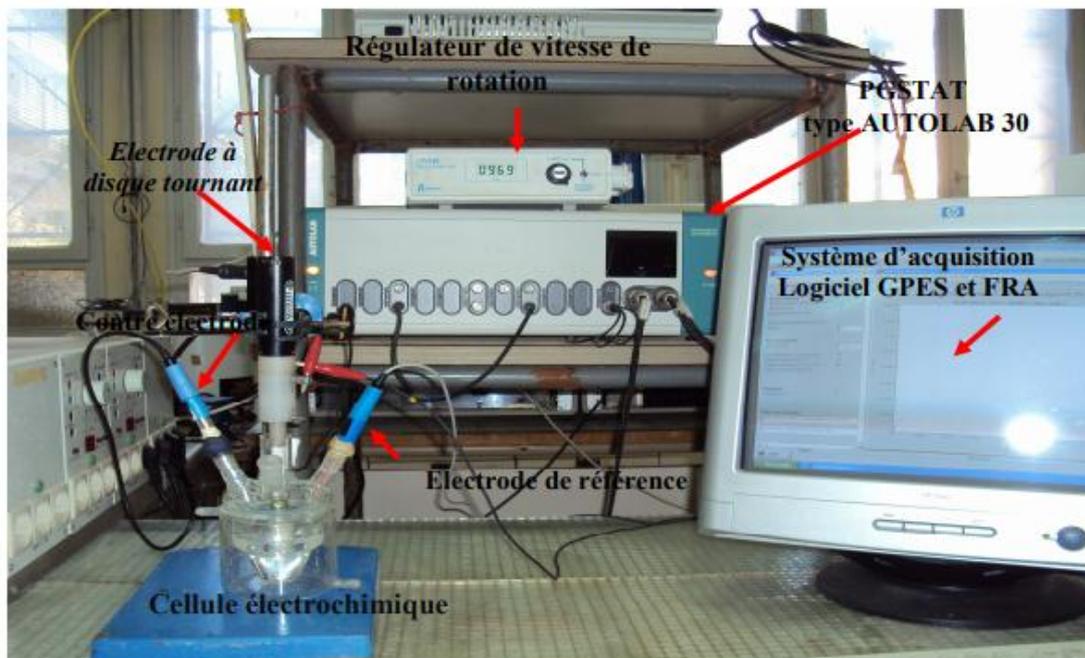


Figure II.2 le dispositif expérimental pour les mesures électrochimiques

II. 5 Techniques expérimentales

Les techniques électrochimiques ont permis d'appréhender l'étude selon deux points de vue. D'un point de vue phénoménologique, l'adsorption peut se caractériser par suivi dans le temps du potentiel à circuit ouvert. Quant à l'aspect quantitatif (courbes de polarisation à vitesse de balayage modérée, spectroscopie d'impédance, ...) donne les valeurs de paramètres physiques décrivant l'état du système (capacité de double-couche, résistance de transfert, capacité du film, ...) et les des vitesses de réaction [143].

Afin d'étudier le phénomène de corrosion, des méthodes électrochimiques classiques ont été mises en œuvre : suivi du potentiel de corrosion libre, mesure de la résistance de polarisation, le tracé des courbes de Tafel et la spectroscopie d'impédance électrochimique. Tous les essais ont été réalisés dans une eau de mer naturelle prélevée sur la plage de Boumerdes à l'est d'Alger.

II.5.1 Potentiel de corrosion

Le potentiel réversible d'une électrode est un paramètre thermodynamique correspondant au transfert de n électrons [122]. Ce potentiel décrit un équilibre entre le métal et la solution et ne représente pas la véritable corrosion du matériau. En effet, dans un milieu aqueux, un métal peut être le siège de nombreuses réactions électrochimiques. Dans ce cas, le potentiel de

l'électrode prend une valeur comprise entre les potentiels d'équilibre des différentes réactions: c'est le potentiel mixte ou potentiel de corrosion (E_{corr}). Cette technique simple fournit des informations préliminaires sur la nature des phénomènes qui se déroulent à l'interface métal/électrolyte : corrosion, passivation.

Les mesures du potentiel à circuit ouvert ont été enregistrées de façon continue à l'aide d'un millivoltmètre électronique à haute impédance d'entrée.

II.5.2 Courbes de polarisations (tracés des droites de Tafel)

Il s'agit d'une méthode d'extrapolation basée sur l'équation $E = f(I)$ de Butler- Volmer [122] (Eq.II.1). Cette technique utilise des portions de la courbe de polarisation placées loin de l'équilibre où le système est fortement polarisé, à savoir les portions anodiques pour lesquelles les surtensions sont supérieures à 100 mV et les zones cathodiques où les surtensions sont inférieures à -100 mV.

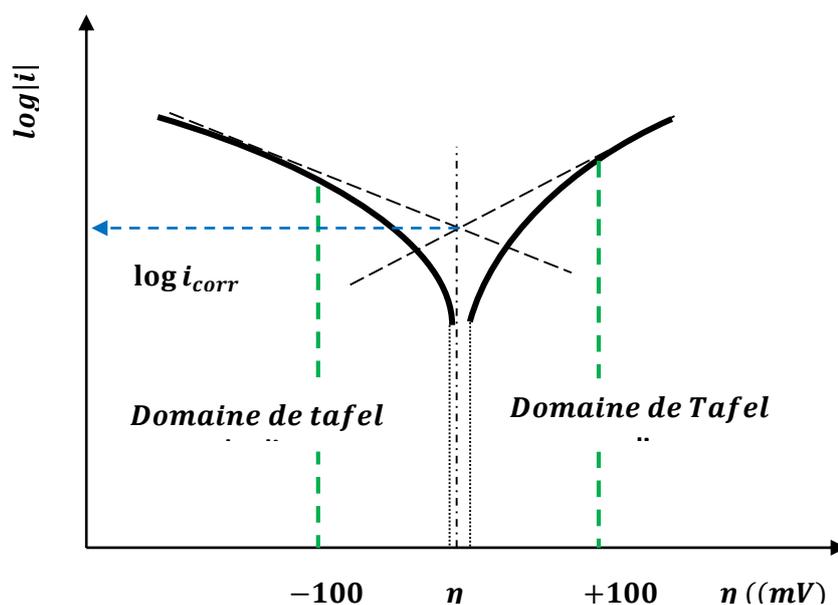


Figure II. 3 Tracé de Tafel

La figure II.3 illustre une représentation schématique d'une courbe de polarisation en coordonnées $E = f(\text{Log } i)$. L'intersection des droites anodique et cathodique extrapolées au potentiel de corrosion, donne la densité de courant de corrosion i_{corr} . Cette technique permet de séparer les deux processus anodique et cathodique donnés par la loi de Butler Volmer (Eq II.1).

$$i = i_0 \left[\exp \frac{\alpha n F}{RT} (E - E_{eq}) \right] - \exp - \frac{(1-\alpha)nF}{RT} (E - E_{eq}) \dots \dots \dots (II.1)$$

avec :

i : densité de courant ($A \cdot cm^{-2}$),

E : potentiel de l'électrode,

E_{eq} : potentiel d'équilibre,

$E - E_{eq} = \eta$,

i_0 courant d'échange,

α : coefficient de transfert de charge,

R : constante des gaz parfaits (en $J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$),

T : température (en °K),

F : constante de Faraday (96500 coulombs)

n : nombre d'électrons intervenant dans le processus à l'électrode.

Pour une surtension η suffisamment élevée, l'une ou l'autre des termes anodique ou cathodique de la relation (II.1) devient négligeable.

Dans le cas d'une surtension cathodique, η_c , l'équation de Butler Volmer peut se mettre sous la forme (II.2) :

$$|i| = |i_c| = i_0 \exp - \frac{(1-\alpha)nF}{RT} \eta_c \quad (II.2)$$

Soit :

$$\ln|i_c| = \ln i_0 - \frac{(1-\alpha)nF}{RT} \eta_c \quad (II.3)$$

On peut exprimer aussi η_c selon l'équation II.4):

$$\eta_c = \frac{RT}{(1-\alpha)nF} (\log i_0 - \log|i_c|) \quad (II.4)$$

L'équation (II.4) représente l'équation d'une droite de Tafel cathodique. Elle exprime la linéarité entre la surtension et le logarithme du courant

$$\eta_c = a + b_c \log|i_c|$$

La pente cathodique de la droite de Tafel déduite peut s'écrire selon :

$$\frac{\Delta \eta_c}{\Delta \log|i_c|} = b_c = -\frac{2.303RT}{(1-\alpha)nF}$$

Pour une surtension anodique :

$$i_a = i_0 \exp \frac{\alpha n F}{RT} \eta_a$$

La pente anodique de Tafel est donnée par la relation :

$$b_a = \frac{2.303RT}{\alpha n F}$$

L'enregistrement des courbes de polarisation est réalisé, avec une vitesse de balayage de 0.5 mV/s, dans le domaine de potentiel (± 250 mV) par rapport au potentiel de corrosion. Le balayage est effectué depuis le domaine cathodique jusqu'au domaine anodique.

II.5.3 Résistance de polarisation

Cette technique permet l'obtention rapide des mesures. En effet, une polarisation de quelques millivolts autour du potentiel de corrosion permet la linéarité des expressions des courbes partielles anodique et cathodique et d'assimiler la courbe courant-tension à une droite dont l'inverse de la pente a la dimension d'une résistance, appelée résistance de polarisation [144].

Pour des réactions de transfert de charge, et pour des surtensions ΔE faible, la densité de courant de corrosion i_{corr} est obtenue à l'aide de la relation classique de Stern et Geary :

$$i_{corr} = \frac{b_a b_c}{2.3 (b_a + b_c)} \frac{\Delta i}{\Delta E}$$

Expression dans laquelle b_a et b_c représentent respectivement les pentes anodiques et cathodique des droites de Tafel. ($\Delta i / \Delta E = 1/R_p$) étant la pente de la courbe $i = f(E)$ au potentiel de corrosion.

Pour obtenir les valeurs de la résistance de polarisation, nous avons effectué le tracé des courbes de variation du courant en fonction du potentiel pour de faibles variations de ce dernier autour du potentiel de corrosion. ($\Delta E = \pm 10$ mV). Le sens du balayage a été fait du domaine cathodique vers l'anodique à une vitesse de balayage du potentiel de 0.5 mV/s.

II.5.4 La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) [145, 146]

L'étude des processus électrochimiques (transport de matière, réactions chimiques et électrochimiques) nécessite l'utilisation de techniques de régulation et d'analyse dynamique des grandeurs fixant l'état d'une interface électrode-solution. Après l'étude préalable du système électrochimique en régime stationnaire si celui-ci est simple, le recours à des techniques non stationnaires dont la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) constitue un recours incontournable pour identifier les processus interfaciaux.

La SIE est en effet, une méthode transitoire qui permet de séparer théoriquement les contributions des différents phénomènes électrochimiques se déroulant à l'interface métal/solution. C'est une technique très largement utilisée dans les études des phénomènes de corrosion. Notamment pour l'étude des mécanismes réactionnels, la caractérisation des couches superficielles et la mesure de la vitesse de corrosion.

La SIE repose sur la mesure d'une fonction de transfert suite à la perturbation volontaire du système électrochimique étudié. Ainsi pour tout système linéaire et stationnaire de réponse impulsionnelle $h(t)$ on peut faire correspondre à tout signal d'entrée $x(t)$ un signal de sortie $y(t)$ tel que :

$$y(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} h(\theta) \times (\theta - t) d\theta$$

Si le signal d'entrée $x(t)$ est tel que :

$$x(t) = A \sin(\omega t)$$

la sortie $y(t)$ prendra la forme

$$y(t) = B \sin(\omega t + \varphi)$$

Les deux signaux $x(t)$ et $y(t)$ sont alors reliés par une fonction de transfert $H(\omega)$ telle que

$$Y(\omega) = H(\omega)X(\omega)$$

où $X(\omega)$ et $Y(\omega)$ représentent respectivement les transformées de Fourier de $x(t)$ et $y(t)$.

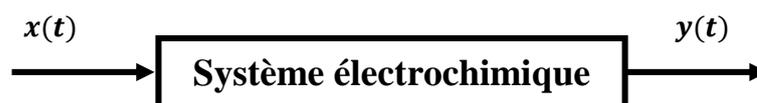


Figure II.4 Schéma d'une fonction de transfert

Il faut noter que $H(\omega)$ du système qui est la transformée de Fourier de la réponse impulsionnelle est un nombre complexe qui peut être présenté sous la forme suivante :

$$H(\omega) = |H(\omega)| \exp(j\varphi)$$

avec : $|H(\omega)| = \frac{B}{A}$ représente le module, φ étant la phase.

En coordonnées cartésiennes, $H(\omega)$ peut être écrite sous la forme suivante :

$$H(\omega) = \text{Réal}[H(\omega)] + j \text{Imag}[H(\omega)]$$

Sachant que :

$$|H|^2 = (\text{Réal}[H])^2 + (\text{Imag}[H])^2$$

Et :

$$\varphi = \text{Arctan} \frac{\text{Imag}[H]}{\text{Réal}[H]}$$

d'une part et d'autre part

$$\text{Réal}[H] = |H| \cos \varphi$$

$$\text{Imag}[H] = |H| \sin \varphi$$

La fonction de transfert peut être représentée dans le plan de Nyquist ($\text{Imag}[H]$, $\text{Réal}[H]$) ou dans le plan de Bode ($\log|H|$ et φ en fonction de $\log f$).

Considérons, par exemple, une interface électrochimique identifiée par le circuit équivalent présenté sur la figure II.5; si on impose une perturbation en courant ΔI , la tension ΔE est recueillie en réponse, la fonction de transfert:

$$H(\omega) = \frac{\Delta E}{\Delta I}$$

est une impédance $Z(\omega)$ telle que

$$Z(\omega) = R_s + \frac{1}{\frac{1}{R_t} + j\omega C}$$

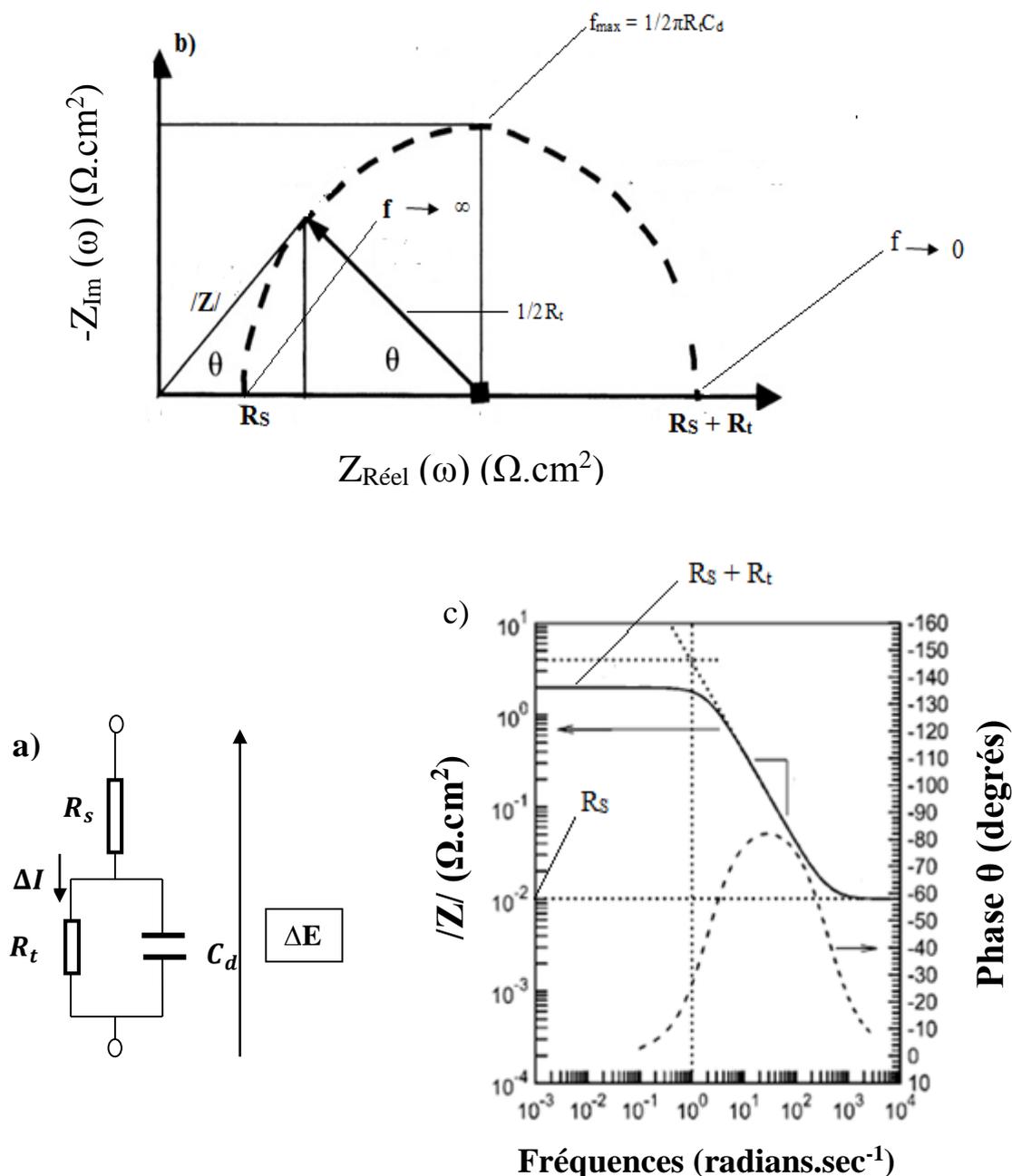


Figure II.5 Circuit équivalent et tracés de l'impédance d'une cellule électrochimique
 (a) Circuit équivalent $R_s - R/C$; (b) tracé dans le plan complexe (plan de Nyquist)
 (c) tracé dans le plan de Bode

La représentation graphique de l'impédance d'une électrode peut être réalisée en coordonnées cartésiennes dans le plan complexe de Nyquist en plaçant les valeurs Réel $Z(\omega)$ en abscisse et $-Imag Z(\omega)$ en ordonnée. La représentation de Bode est l'autre représentation classique pour visualiser les diagrammes. Dans ce cas, le module de l'impédance $|Z|$ (représenté en échelle

logarithmique) et le déphasage sont tracés en fonction de la fréquence, elle aussi représentée en échelle logarithmique. Ces deux visions différentes d'un même résultat ne sont pas en compétition, elles sont complémentaires ; chacune d'entre-elles montre un aspect particulier du diagramme d'impédance. La représentation de Nyquist permet de voir les différentes « boucles et droites » du diagramme mais masque les résultats à haute fréquence alors que la représentation de Bode offre une vision complète du domaine de fréquence. Cette technique d'étude permet l'estimation de la résistance de polarisation et l'étude des mécanismes élémentaires de corrosion.

Les différents processus se déroulant à l'interface électrode/électrolyte peuvent être modélisés par la construction d'un circuit électrique équivalent. Chacun des composants utilisés, branchés en série ou en parallèle, représente un phénomène physique particulier. Ces modèles sont ensuite utilisés pour ajuster les diagrammes expérimentaux afin d'extraire les paramètres nécessaires à la compréhension du système étudié. Il existe plusieurs types de circuits équivalents, chacun d'entre eux décrivant un système particulier. La manière dont est branché chaque composant ainsi que l'ordre de leur apparition sont importants, à la fois pour le calcul de l'impédance et pour la lisibilité du modèle. Il faut suivre la logique physique du système : les processus successifs sont branchés en série alors que les processus simultanés sont branchés en parallèle.

Pour mieux caractériser la cinétique du processus de corrosion de l'acier au carbone A60 en eau de mer stérile avec et sans la présence de *Bacillus* ainsi au milieu brute, nous avons enregistré les diagrammes d'impédances électrochimiques dans les plans de Nyquist et Bode. Notons qu'une tension d'amplitude de 5 mV et une fréquence appliquée variant de 1 kHz à 0,01 Hz ont été utilisées.

Pour la modélisation des données EIS et l'ajustement des courbes, un logiciel de circuit équivalent (Equivert) est utilisé.

II.6 Analyse de surface

II.6.1 Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est basée sur le principe des interactions électrons-matière, capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon. Son principe consiste à balayer la surface d'un échantillon par un faisceau d'électrons finement localisé. L'interaction du faisceau d'électrons avec l'échantillon engendre

des émissions électroniques et électromagnétiques (électrons Auger, électrons secondaires, électrons rétrodiffusés et photons X). Les électrons secondaires sont sensibles à la topographie de la surface de l'échantillon alors que les électrons rétrodiffusés sont sensibles aux contrastes chimiques. Les MEB sont généralement équipés d'un spectromètre X qui permet leur utilisation en analyse chimique [147].

La figure II.6 illustre une représentation schématique de l'ensemble des radiations pouvant être émises lors de l'interaction entre le faisceau d'électrons et l'échantillon. Toutes ces radiations sont produites simultanément et rendent possibles à la fois l'observation et l'analyse d'un objet choisi.

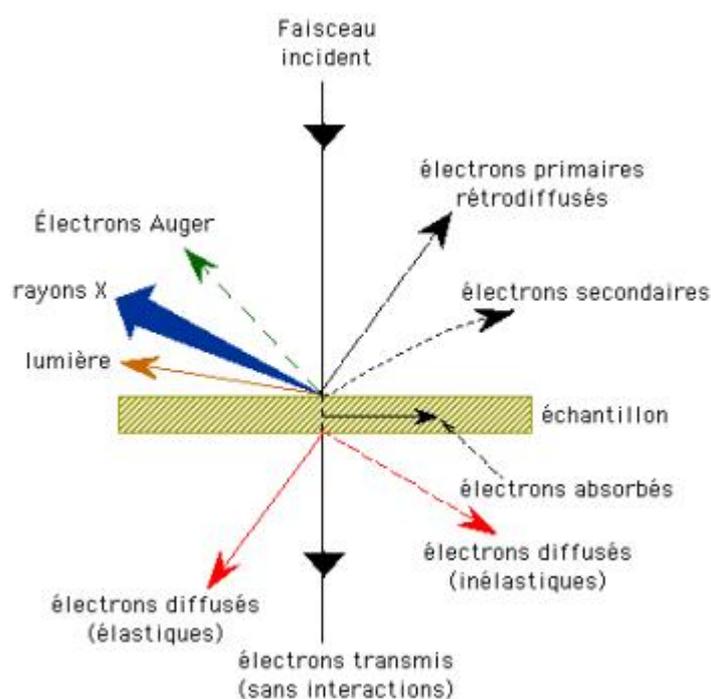


Figure II.6 Radiations pouvant être émises lors de l'interaction faisceau d'électrons-matière

Afin d'examiner la surface et le phénomène de corrosion caractéristique des échantillons d'acier A60 après 6 jours d'exposition au milieu stérile avec et sans la présence de la bactérie genre Bacillus (*B. subtilis* et *B. cereus*), ainsi qu'au milieu brut, une analyse par microscopie électronique de balayage environnemental (XL30 ESEM) couplée à l'EDX a été réalisée.

II.7 Analyse microbiologique

Pour mettre en évidence la présence de biofilm et son évolution au fil du temps à la surface de l'électrode immergée dans le milieu contaminé, une analyse microbiologique est réalisée sur

une période de 6 jours. Cette analyse est basée sur le transfert du biofilm formé sur les surfaces des échantillons en acier A60. Ceci est effectué selon un protocole qui consiste à empreindre la surface de l'acier sur une boîte de pétri remplie de gélose TGEA. Après une journée d'immersion, nous empreignons la surface du disque qui contient le biofilm sur la gélose TGEA. La même procédure est répétée pour le troisième et le sixième jour d'immersion. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées dans une étuve à 37 ° C pendant 48 h.

La recherche des micro-organismes qui ont diffusé dans le biofilm et qui sont responsable de sa formation sur la surface de l'acier immergée dans l'eau de mer naturelle brute s'effectue selon la démarche suivante. On verse 10 *mL* d'eau physiologique dans un tube à essai en verre stérile et on ajoute le biofilm (solide) qu'on a gratté de la surface de métal avec une pince stérile. Le mélange est ensuite bien agité afin de faire détacher les micro-organismes de biofilm. La solution obtenue est considérée comme la solution mère. Aseptiquement (en présence d'un bec bunsen) on a versé une goutte de cette dernière dans deux boîtes de pétri, qui contiennent le milieu TGEA (milieu de culture qui permet le développement des micro-organismes). L'incubation est effectuée à 37°C, dans une étuve, pendant 48 heures et 96 heures.

**Chapitre III comportement électrochimique de
l'acier au carbone en eau de mer stérile
contenant *B.cereus***

Cette partie décrit le comportement électrochimique de l'acier A60 lorsqu'il est en contact d'une eau de mer stérile. Après une description de la composition de l'eau de mer prélevée sur la plage de Boumerdes, nous avons développé une démarche expérimentale qui nous a permis de mettre en évidence le rôle de *Bacillus cereus* dans le processus de corrosion qui se produit à la surface de l'A60.

III.1. Analyse microbiologique de l'eau de mer

La recherche de microorganismes aérobies a révélé la présence de levures ainsi que les chlamydospores. La flore dominante est constituée de bactéries formant une colonie volumineuse, grisâtre et ronde avec des contours irréguliers. Pour la recherche de microorganismes anaérobies, les résultats sont négatifs.

La technique de la coloration de *gram* a montré que les bactéries sont des longs bacilles à *gram+* de forme régulière isolée ou en courtes chaînes. La technique a révélé également l'existence des endospores.

Les tests biochimiques réalisés se sont révélés positifs en ce qui concerne la recherche de la catalase. Pour l'analyse avec la Galerie API 20E; les tests mettent en évidence les propriétés positives suivantes:

- VP (Voges-Proskauer) : la réaction de Voges-Proskauer pour mettre en évidence la production de l'acétoïne par les micro-organismes. Le test est réalisé en ajoutant de l'alpha-naphtol et de l'hydroxyde de potassium au bouillon de Voges-Proskauer inoculé avec des bactéries. Une couleur rouge indique un résultat positif tandis qu'une couleur jaune-brun indique un résultat négatif. Autrement dit, la souche bactérienne produit l'acétoïne.
- Citrate : ce test permet de mettre en évidence l'utilisation de citrate comme seule source de carbone. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'une couleur bleue plus une alcalinisation de milieu. Dans le cas contraire la couleur est verte.
- Nitrate réductase (c'est à dire que la souche bactérienne produit cette enzyme). Cette dernière est capable de réduire les nitrates en nitrites.

- Gélatinase : les bactéries produisent l'enzyme gélatinase donc elles sont capables de se développer sur la gélatine qui est une protéine.

L'étude microbiologique a montré que les bactéries sont des *Bacillus cereus*, elles sont aérobies, génératrices de spores, majoritairement mésophiles et se développent à un $pH \geq 7$ et peuvent supporter de fortes concentrations en sel.

III.2 Analyse de surface

III.2.1 Analyse MEB et EDS

Tableau III.1 Analyse EDX du système abiotique et biotique

| Elément | O | C | N | P | K | Na | Cl | Mg | Ca | Si | Fe |
|--|-------|------|-----|------|------|------|-----|------|------|-----|-------|
| Eau de mer stérile (W%) | 39.39 | / | / | 4.77 | / | 1.51 | 4.4 | 0.92 | 1.52 | 0.4 | 48.6 |
| Eau de mer stérile + <i>B. cereus</i> (W%) | 12.91 | 4.46 | 2.2 | 4.77 | 7.67 | / | / | / | / | / | 69.27 |

Les figures III.1 et III.2 présentent des images de la surface d'électrode immergée pendant 6 jours en milieu stérile en absence et en présence de *Bacillus cereus* respectivement.

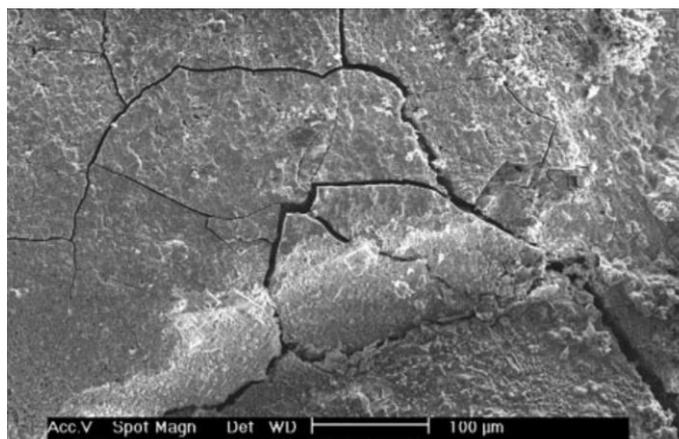


Figure III.1 Image MEB de l'acier A60 après 6 jours d'immersion en eau de mer stérile

En milieu stérile (Figure III.1), une couche duplex épaisse est formée à la surface de l'acier. Elle est composée d'une couche interne compacte et d'une couche externe poreuse. Notons aussi que la couche poreuse présente une faible adhérence et une instabilité. Il y a de nombreuses fissures à la surface qui peuvent avoir pour origine le développement des contraintes physiques intrinsèques [148].

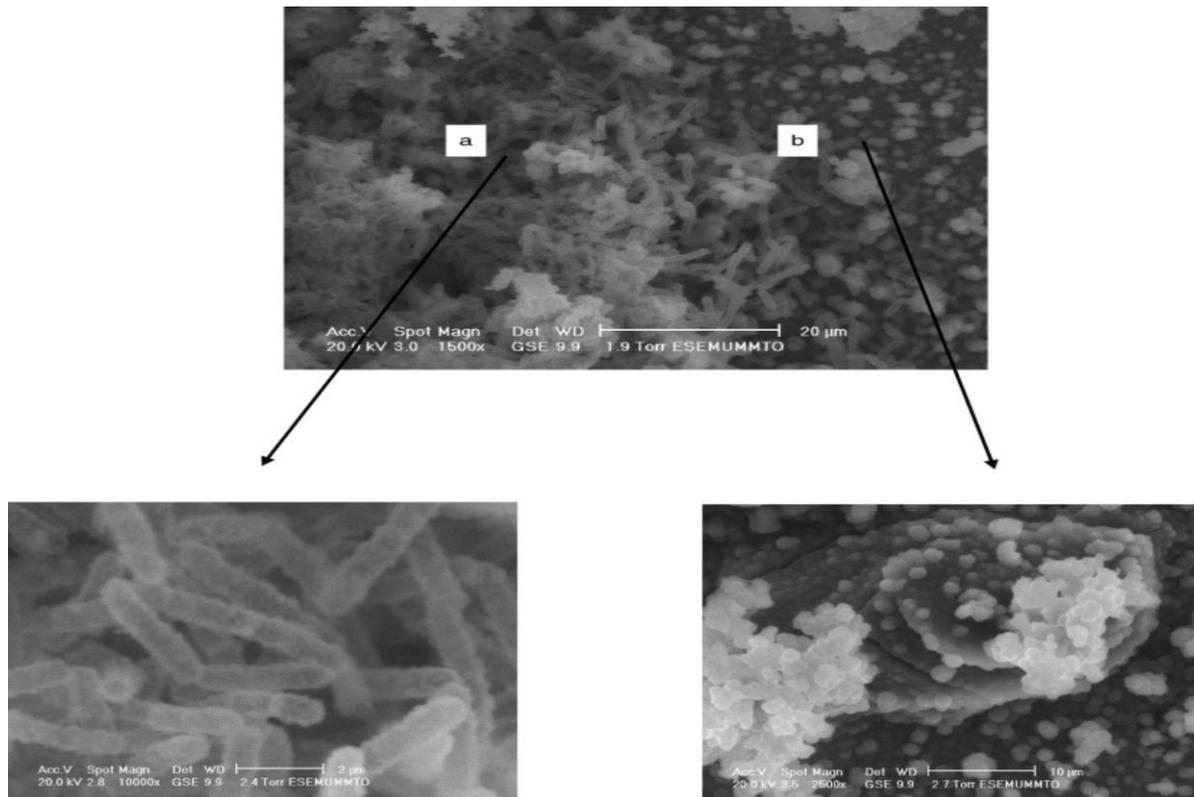


Figure III.2 Images MEB d'acier A60 après 6 jours d'immersion en eau de mer stérile en présence de *B. cereus* a: communauté bactérienne; b: biofilm

L'ajout de *B. cereus* dans la solution conduit à la formation d'une couche supplémentaire avec des caractéristiques structurales différentes (Figure III.2). On distingue deux zones : une zone sombre (la couche interne), dans laquelle le fer est l'espèce répandue, et des composés contenant du phosphore peuvent également être présents. Une zone claire (couche externe) poreuse est due à la formation d'un biofilm hétérogène. On remarque, Figure III.2a, que les cellules de *B. cereus* sont denses et regroupées pour former des communautés bactériennes ou un biofilm irrégulier. Ces dernières sont des bacilles généralement de la même taille et présentent la même morphologie, mesurant $3.55 \mu\text{m}$ de longueur et $0.96 \mu\text{m}$ de largeur. Le Tableau III.1 présente

les résultats de l'analyse EDX effectuée sur la couche formée à la surface de l'acier au carbone immergé dans l'eau de mer stérile avec et sans *B. cereus*. En absence de *B. cereus*, le chlorure de sodium est présent à la surface, tandis que la présence de phosphore indique des produits de corrosion à base des phosphates. En présence de la bactérie, le spectre EDX révèle la présence de Ca, S, P et Fe. Des traces de C et N sont également identifiées, ce qui suggère la présence de biofilm et l'EPS. C et N peuvent former des liaisons amides, ce qui peut suggérer la présence de protéines. Ainsi, on peut suggérer que l'acier A60 immergé en milieu contaminé peut être constitué d'une couche d'oxyde, de phosphate de fer recouverte de bactéries et d'EPS.

III.2.2 Analyse microbiologique

La Figure III.3 présente l'évolution du biofilm formé à la surface de l'acier en fonction du temps d'immersion. Après une journée d'immersion, on peut remarquer la présence de quelques cellules bactériennes agrégées sur la surface. L'extension et l'accumulation de bactéries en colonies visibles sont bien révélées après 3 jours d'exposition. Avec l'augmentation du temps d'immersion (6 jours), le biofilm devient de plus en plus dense et compact.

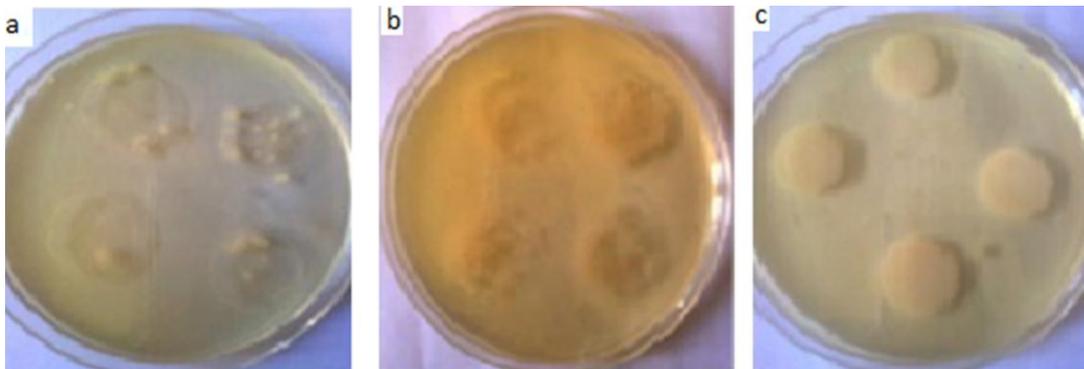


Figure III.3 Développement de biofilm sur la surface de l'acier en eau de mer stérile contenant *B.cereus* après un temps d'immersion de a) 1 jour ; b) Après 3 jours ; c) 6 jours

III.3. Mesures électrochimiques

III.3.1 Potentiel en circuit ouvert (E_{OCP})

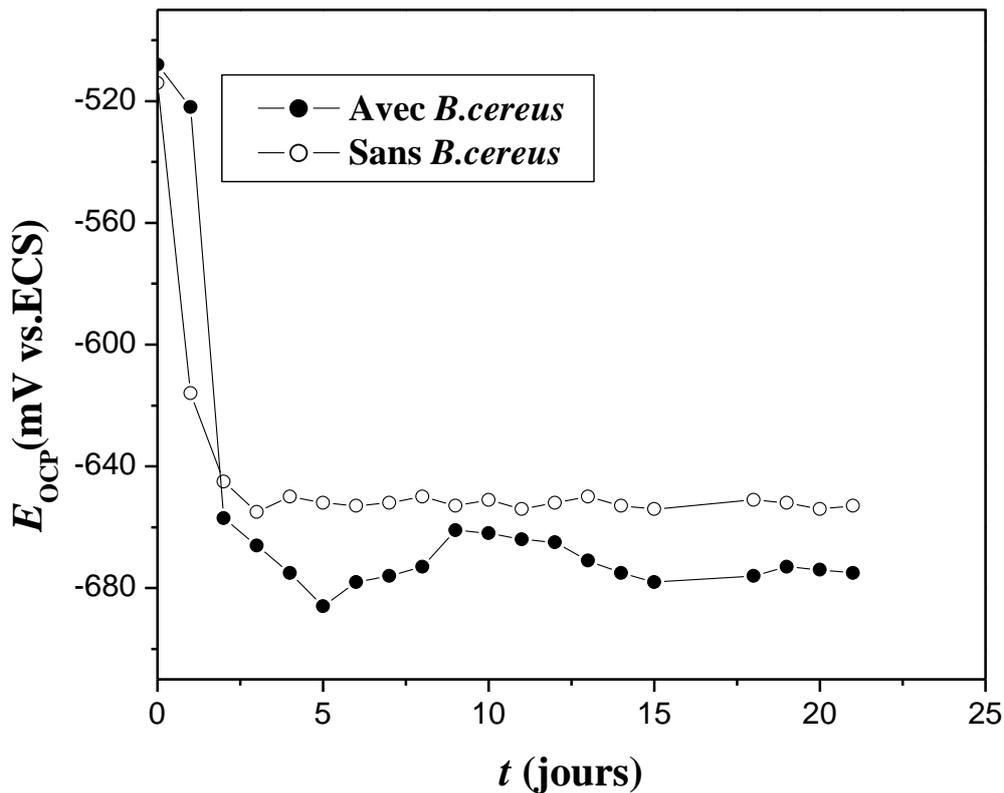


Figure III.4 Evolution du potentiel (E_{OCP}), en fonction du temps, de l'acier A60 immergé dans l'eau de mer stérile avec et sans *B. cereus*

La variation temporelle de E_{OCP} de l'acier A60 en eau de mer stérile aérée avec et sans *B. cereus* est présentée sur la Figure III.4. En eau de mer stérile, le potentiel E_{OCP} diminue brutalement pendant les 25 premières heures d'immersion avant de se stabiliser pour atteindre -0.65V/ECS après 20 jours d'immersion. En présence de bactéries, l'évolution du potentiel en fonction du temps montrent une évolution vers des valeurs négatives atteignant -0,68 V/ECS après 5 jours d'immersion avant d'augmenter pour atteindre -0,66V/ECS après 9 jours. On note ensuite une diminution avant de se stabiliser à -0.67 V après 20 jours d'immersion. Le déplacement du potentiel vers des valeurs négatives en présence de bactéries, peut s'expliquer par une réduction de la vitesse de processus cathodique provoquée par une diminution significative de la

concentration de dioxygène dissous à l'interface métal/solution. Il est bien connu que la respiration des bactéries dans un biofilm génère des zones présentant des caractéristiques différentes. En milieu aéré, les bactéries de la couche superficielle du biofilm utiliseront l'oxygène pour la production d'énergie. À une certaine profondeur du biofilm, tout l'oxygène aura disparu. Il y aura de moins en moins d'oxygène parce que les bactéries ci-dessus utilisent l'oxygène plus rapidement qu'il ne peut diffuser de l'eau dans le film [149].

III.3.2 Résistance de polarisation (R_p)

Le principal avantage de la technique de mesure de la résistance de polarisation est la possibilité de surveiller en continu la vitesse de corrosion instantanée d'un métal exposé à un environnement corrosif. La figure III.5 présente la variation de R_p avec le temps d'immersion de l'acier A60 en milieu stérile en présence et en absence de *B. cereus*. En milieu contaminé, on note qu'au début de l'immersion, R_p augmente avec le temps avant de se stabiliser à une valeur proche de 10 K Ω . Ce comportement suggère que la surface de l'électrode infectée évolue rapidement durant les 5 premiers jours d'immersion. En milieu stérile, R_p augmente pendant les 2 premiers jours d'exposition et se poursuit jusqu'à une valeur maximale proche de 1.3 k Ω avant de diminuer. Les valeurs de R_p estimées sont plus élevées en présence de bactéries par rapport à celles obtenues en milieu stérile. Autrement dit, *B. cereus* a un effet inhibiteur sur la corrosion de l'acier A60. Le développement de biofilms est une combinaison de l'adhérence des macromolécules organiques et/ou inorganiques, la production d'EPS et la croissance microbienne. Les principaux composants de EPS sont les protéines et les polysaccharides. Une fonction fréquemment attribuée à EPS est leur effet protecteur sur les microorganismes de biofilm contre l'environnement externe. Il a été montré que les exopolysaccharides produites par les souches bactériennes ont réduit l'activité corrosive. Ces sécrétions bactériennes empêchent l'interaction de la surface métallique avec l'environnement externe [150]. *B. cereus* pourrait produire des EPS qui jouent un rôle important autant qu'un inhibiteur de corrosion. Selon Bragadeeswaran et al. [151] les microorganismes qui forment le biofilm produisent EPS, qui peut servir d'inhibiteur de corrosion pour l'acier inoxydable. L'EPS produit par *B. cereus* est un hétéropolysaccharide qui influe sur la corrosion. Une relation directe entre le taux de corrosion et la concentration en EPS a également été révélé.

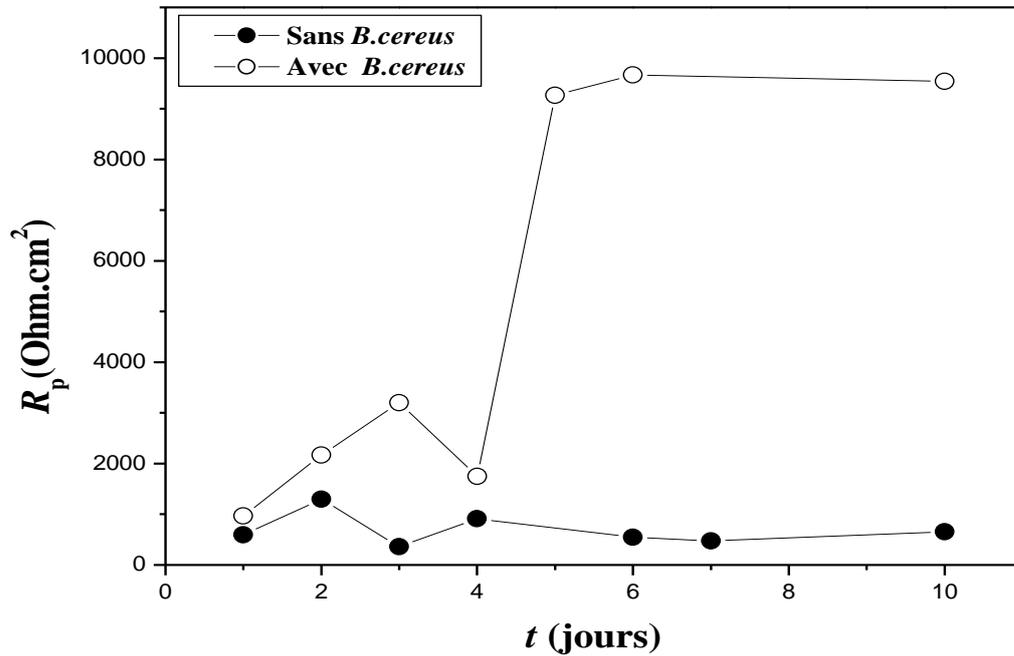


Figure III.5 Evolution de la résistance de polarisation en fonction du temps d'immersion de l'acier A60 en milieu stérile avec et sans *B.cereus*

III.3.3 Tracés de Tafel

La figure III.6 présente les courbes de polarisation potentiodynamique de l'acier A60 en contact avec l'eau de mer en l'absence et en présence de *B. cereus* pour différents temps d'immersion. On note, sur cette figure, une influence remarquable de *B. cereus* sur les courbes de polarisation de l'acier au carbone après 1 jour d'immersion. En milieu stérile, la densité de courant anodique augmente considérablement et des valeurs de densité de courant élevées sont obtenues. En présence de *B. cereus*, en revanche, on observe en plus d'un déplacement du potentiel vers des valeurs plus nobles, un palier de passivation avec les densités de courant nettement plus faibles, ce qui confirme le rôle inhibiteur de *B. cereus*.

Il est généralement admis [152, 153] que si le déplacement du potentiel de corrosion est plus de ± 85 mV par rapport au potentiel de corrosion de l'essai à blanc (sans inhibiteur), l'inhibiteur peut être considéré comme de type cathodique ou anodique selon le sens de variation de E_{corr} . Dans notre cas, on remarque que l'addition de *B. cereus* se traduit par un déplacement anodique du potentiel de corrosion (> 100 mV). Autrement dit, *B. cereus* peut être classé comme un inhibiteur anodique.

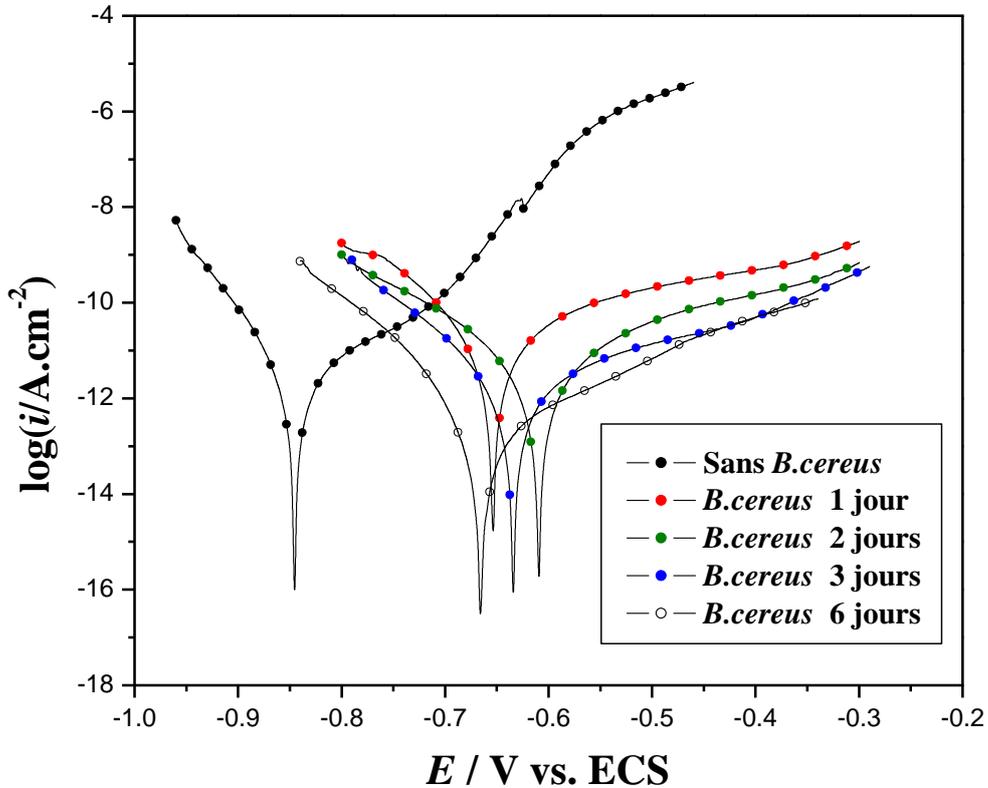


Figure III.6 Tracés de Tafel de l'acier A60 en eau de mer stérile avec et sans *B. cereus*,
 $v_b = 0.5 \text{ mV.s}^{-1}$

En milieu contaminé, on peut remarquer que l'allure des courbes ne varie pas avec le temps, ce qui indique que le mécanisme des processus anodique et cathodique qui se déroulent à la surface de l'électrode ne change pas. De plus, on note, Figure III.7, une diminution brutale de la densité de courant de corrosion lorsque le temps d'immersion augmente. En effet, i_{corr} passe de $18.43 \mu A.cm^{-2}$ après 1 jour d'exposition pour atteindre $3,14 \mu A.cm^{-2}$ au bout de 6 jours. La diminution de la vitesse de corrosion de l'électrode avec le temps d'immersion est due au renforcement du film protecteur à sa surface. Durant les 6 premiers jours d'exposition, *B. cereus* pourrait produire de plus en plus d'EPS. Les substances polymériques extracellulaires (EPS) ont un bon effet inhibiteur sur la corrosion de l'acier.

En ce qui concerne l'environnement marin, le processus de corrosion se produit généralement sous contrôle de la diffusion. Cependant, la non-apparition du courant limite de diffusion de la réduction de l'oxygène dissous sur les tracés de Tafel peut s'expliquer par le fait que la diffusion est souvent limitée par d'autres facteurs. L'un de ces facteurs est la formation progressive de la couche de produit de corrosion qui retarde progressivement la diffusion de l'oxygène de

l'environnement externe. On rapporte par ailleurs [154] que le processus de réduction de O_2 sur l'acier au carbone est complexe car il dépend de l'état du film d'oxyde, y compris la présence d'ions métalliques (Fe (II), Fe (III)).

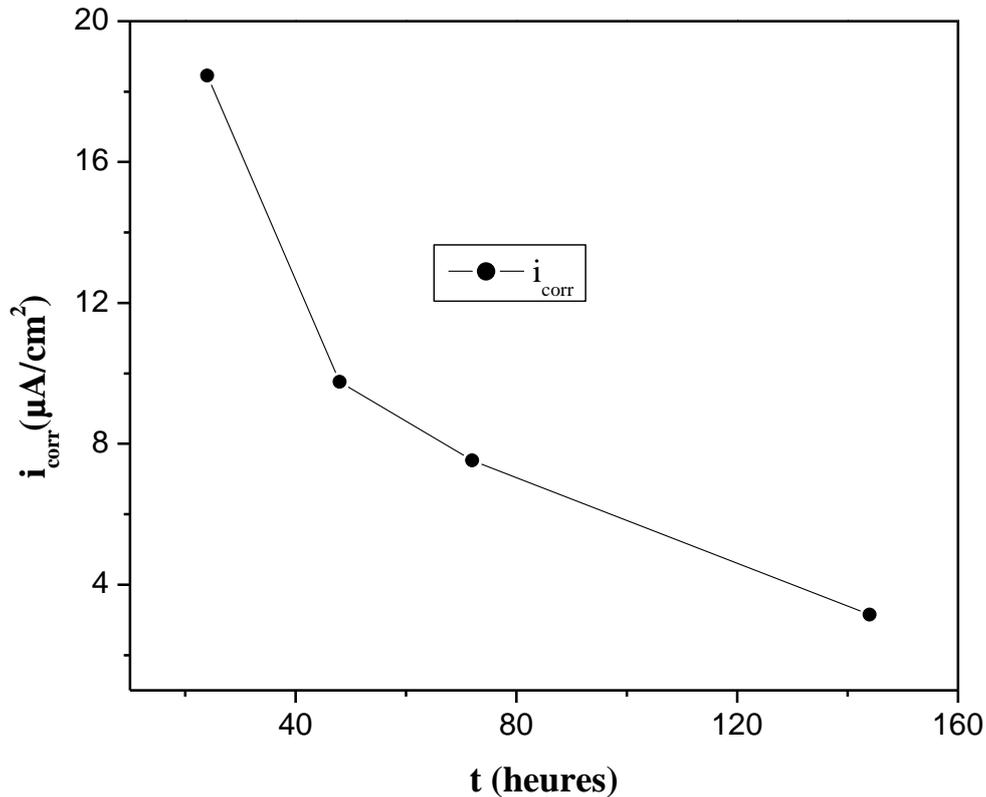


Figure III.7 Variation temporelle de la densité du courant de corrosion de l'acier A60 en eau de mer stérile en présence de *B. cereus*

De plus, l'eau de mer est naturellement aérée, la demi-réaction cathodique prédominante est :



Pour des potentiels plus importants, la pente de Tafel de la courbe cathodique change en raison de la réaction de réduction de l'eau selon :



Il faut noter que les courbes de polarisation ont été enregistrées à partir de potentiels cathodiques élevés, de sorte que la deuxième réaction se produit en premier et peut donc masquer le courant limite de la réduction de l'oxygène dissous.

III.3.4 Mesures d'impédance électrochimique

Des mesures EIS ont été effectuées afin d'évaluer et comprendre comment le biofilm influence la vitesse de corrosion de l'acier au carbone en eau de mer stérile. La Figure III.8 présente les spectres d'impédance de l'acier A60, enregistrés au potentiel à circuit ouvert, en eau de mer stérile, avec et sans *B. cereus*. On note sur ces diagrammes, l'influence du temps d'immersion. Les diagrammes d'impédances ont été présentés dans les deux plans (Nyquist et Bode) pour mieux apprécier les caractéristiques pouvant être déduites notamment dans le domaine des hautes fréquences.

Les figures III.8 (a et b) présentent, respectivement, les diagrammes de Nyquist et de Bode (module) de l'acier A60 immergé en eau de mer stérile sans *B. cereus* pour différents temps d'immersion. On note sur ces diagrammes la présence de deux constantes de temps ce qui permet la détermination de deux contributions capacitives différentes impliquées dans l'impédance mesurée. On constate différents comportements à la corrosion dans l'environnement concerné comme le montre l'évolution des diamètres des boucles capacitives, en fonction du temps d'immersion, observée.

Au cours des 2 premiers jours d'immersion, on remarque une augmentation rapide des diamètres des boucles capacitives ainsi que le module de l'impédance (Z) après quoi on observe des fluctuations et une diminution de ces diamètres. Sur la base de l'analyse de surface, qui a montré la présence de phosphore, la fluctuation observée en fonction du temps d'immersion est probablement due à la réponse des composés phosphorés à base de phosphate de fer qui se forment. La réduction du diamètre du tracé de Nyquist pour le temps d'immersion supérieur à deux jours suggère une dégradation localisée du film inhibiteur à base de phosphate.

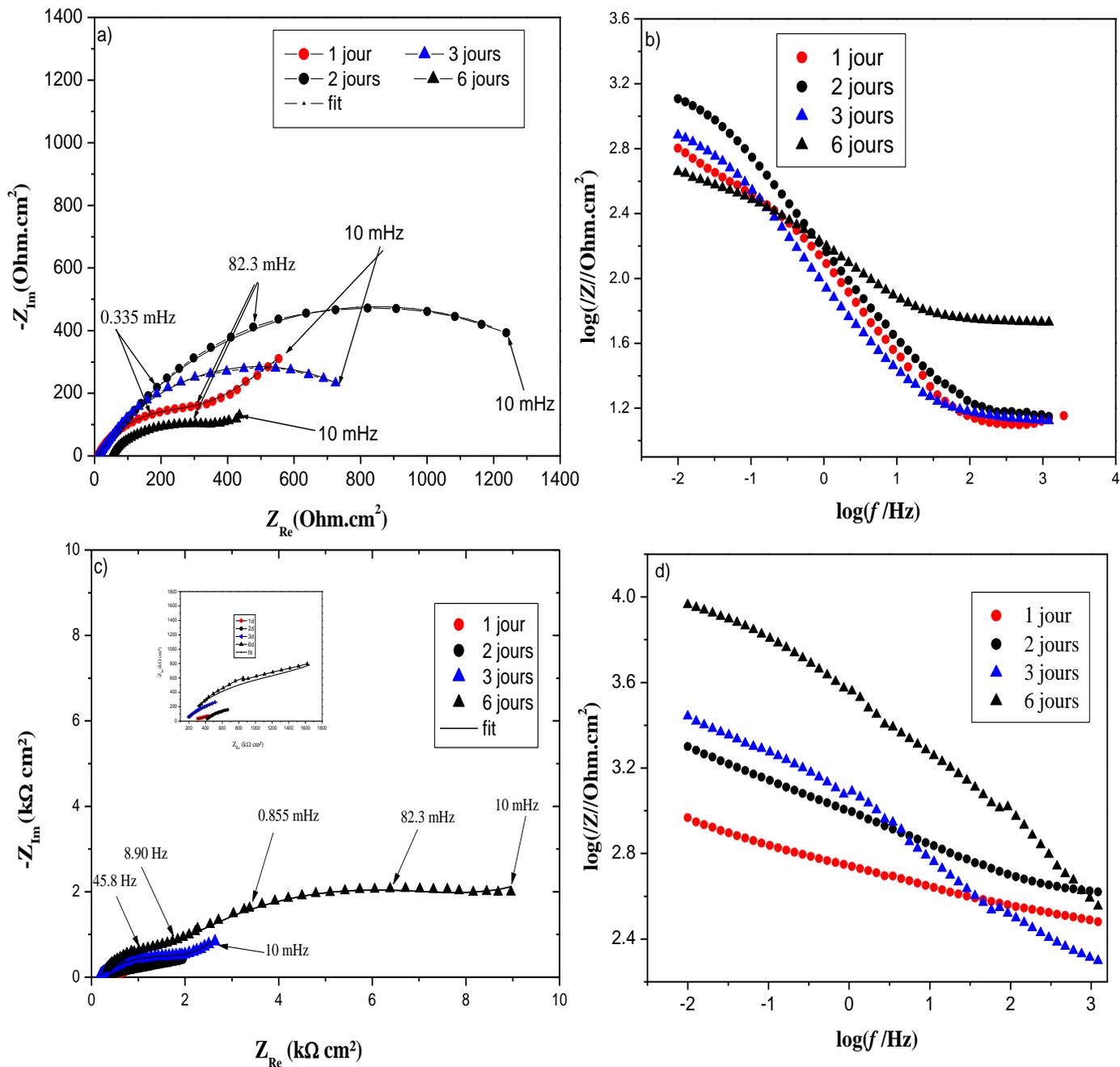
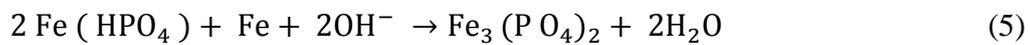
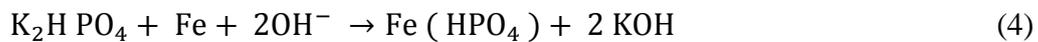


Figure III.8 Diagrammes d'impédance de l'acier A60 immergé dans l'eau de mer stérile (a, b sans *B. cereus*, c, d avec *B. cereus*) pour différents temps d'exposition (a, c Plan de Nyquist ; b, d plan de Bode)

Pour Castaneda et *al.* [155], la présence de KH_2PO_4 et K_2HPO_4 dans le milieu peut conduire à la précipitation de composé à base de phosphore à la surface de l'électrode. On note, sur la base de travaux antérieurs [155,156], que diverses espèces telles que les chlorures, les phosphates et les composés organiques existants dans l'eau de mer peuvent aussi précipiter à la surface de l'échantillon. La précipitation du phosphate de fer / phosphonates de fer se produit à l'interface selon les étapes suivantes [157,158] :



Les figures III.8(c et d) présentent les diagrammes d'impédance en représentation de Nyquist et de Bode de l'acier A60 immergé en eau de mer stérile contaminée par *B. cereus* pour différents temps d'immersion. Dans la gamme de fréquences de mesures, tous les spectres d'impédance ont presque les mêmes caractéristiques. L'impédance du système dépend du temps d'exposition. Avec l'augmentation de temps d'immersion, les amplitudes de l'impédance totale de l'acier augmentent à toutes les fréquences.

Pour l'interprétation et l'exploitation des diagrammes d'impédance, les différents spectres ont été ajustés par un circuit électrique équivalent. Plusieurs circuits équivalents ont été proposés dans la littérature pour modéliser la réponse des biofilms. Un circuit équivalent peut être développé sur la base d'une connaissance générale des processus physiques qui se produisent à l'interface. Plusieurs modèles de circuits étaient testés pour ajuster les données expérimentales. La Figure III.9 illustre le circuit équivalent pour lequel le meilleur accord entre l'expérience et la modélisation a été obtenu. Les valeurs de χ^2 sont toutes $< 10^{-3}$ et ont montré un bon ajustement.

Pour prendre en compte le comportement non idéal des éléments capacitifs, le CPE (constant phase element) a été introduit. Le comportement CPE peut avoir pour origine différents phénomènes. Parmi lesquels on peut citer l'irrégularité de la surface ou l'hétérogénéité du biofilm qui se produit à la surface de l'échantillon [159]. Une matière insoluble peut également influencer les propriétés diélectriques du biofilm.

L'impédance d'un CPE est définie selon :

$$Z_{CPE} = [Q(j\omega)^n]^{-1} \quad (6)$$

où Q et n sont les paramètres du CPE.

Les résultats des mesures d'impédance électrochimique de l'acier A60 immergé dans l'eau de mer stérile en absence et présence de *B. cereus* peuvent être interprétées en termes de circuit équivalent à 2 constantes de temps présenté sur la Figure III.9. R_s est la résistance de l'électrolyte, R_t et Q_{dl} représentent respectivement la résistance de transfert de charge et la pseudo capacité de la double couche, R_f et Q_f caractérisent la résistance et la pseudo capacité du film poreux externe respectivement et W représente l'impédance de diffusion à travers le film poreux. W a été introduit pour obtenir un ajustement optimal entre l'impédance mesurée et le modèle de simulation. Tous les paramètres cinétiques déduits lors du « fit » sont reportés dans les Tableaux III (2 et 3).

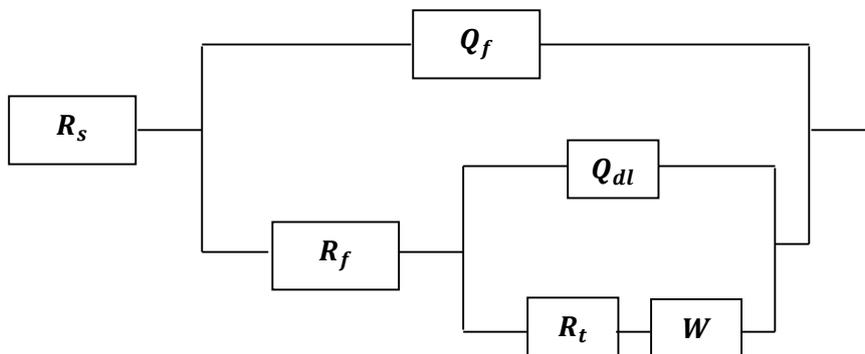


Figure III.9 Circuit équivalent proposé pour les mesures d'impédance

En milieu stérile, R_t et R_f ont augmenté au cours des 2 premiers jours d'exposition avant de diminuer lorsque le temps d'exposition augmente. La valeur élevée de R_t (près de $1 K\Omega cm^2$) observée après 2 jours d'exposition peut caractériser le caractère résistif de la couche de phosphate de fer pour des durées temps d'exposition relativement courtes. Alors qu'après 2 jours d'immersion, R_t et R_f ont diminué, ce qui correspond à un changement de l'état de surface de l'acier. Deux suggestions peuvent être proposées pour expliquer ce comportement : (i) après une certaine durée d'immersion, la couche poreuse externe de produits de corrosion, contenant des phosphates, devient moins stable et moins adhérente et peut donc perdre le rôle protecteur.

Les valeurs plus élevées de n_f indiquent que la couche externe, poreuse, est presque homogène lors des 2 premiers jours d'immersion. La valeur plus basse de n_f après 6 jours d'immersion indique l'inhomogénéité de la surface. Ceci est en bonne corrélation avec l'analyse MEB. Dans avons évoqué, dans les paragraphes précédents, les nombreuses fissures observées à la surface de l'acier après 6 jours d'exposition.

(ii) après 2 jours d'immersion, la dissolution de la couche métallique interne est plus marquée en raison de la corrosion par piqûres plus prononcée à ce stade. Le paramètre n_{dl} peut caractériser la non-homogénéité de la surface, sa diminution étant liée à une certaine augmentation de la rugosité de la surface du métal. Ainsi, il ressort du tableau III.2, que les valeurs de n_{dl} après 2 jours d'immersion sont inférieures à celle obtenues au début de l'exposition, révélant la grande hétérogénéité de la couche interne.

Tableau III.2 Paramètres cinétiques déduits des spectres d'impédance de l'acier au carbone immergé dans l'eau de mer stérile après différents temps d'exposition.

| Temps immersion | R_s $\Omega.cm^2$ | Q_f $s^n.\Omega^{-1} cm^{-2}$ | n_f | R_f $\Omega.cm^2$ | Q_{dl} $s^n.\Omega^{-1} cm^{-1}$ | n_{dl} | R_t $\Omega.cm^2$ | W |
|-----------------|------------------------|------------------------------------|-------|------------------------|---------------------------------------|----------|------------------------|--------|
| 24 heures | 11.97 | 6.48×10^{-4} | 0.88 | 45 | 12.35×10^{-4} | 0.74 | 280 | 0.0098 |
| 48 heures | 13.42 | 15.01×10^{-4} | 0.70 | 361 | 7.57×10^{-4} | 0.80 | 1145 | - |
| 72 heures | 12.58 | 30.44×10^{-4} | 0.67 | 110 | 1.1×10^{-4} | 0.67 | 850 | - |
| 144 heures | 53.80 | 8.80×10^{-4} | 0.61 | 93.9 | 29.45×10^{-4} | 0.55 | 280 | 0.0297 |

Tableau III.3 Paramètres cinétiques déduits des spectres d'impédance de l'acier au carbone immergé dans l'eau de mer stérile contenant *B.cereus* après différents temps d'exposition.

| Temps immersion (heures) | R_s $\Omega.cm^2$ | Q_f $s^n.\Omega^{-1} cm^{-2}$ | n_f | R_f $\Omega.cm^2$ | Q_{dl} $s^n.\Omega^{-1} cm^{-2}$ | n_{dl} | R_t $\Omega.cm^2$ | W |
|--------------------------|------------------------|------------------------------------|-------|------------------------|---------------------------------------|----------|------------------------|------|
| 24 | 155.4 | 0.39×10^{-5} | 0.62 | 129.2 | 10.1×10^{-4} | 0.34 | 527 | 0.94 |
| 48 | 387 | 17.5×10^{-5} | 0.54 | 519 | 10.4×10^{-4} | 0.34 | 2840 | / |
| 72 | 122.3 | 27.5×10^{-5} | 0.43 | 2714 | 2.2310^{-4} | 0.87 | 2150 | / |
| 144 | 114 | 3.05×10^{-5} | 0.53 | 3019 | 1.0110^{-4} | 0.72 | 5110 | 16.5 |

En ce qui concerne l'acier A60 immergé dans l'eau de mer stérile contenant *B. cereus*, les valeurs des paramètres déduits du circuit électrique sont reportées dans le tableau III.3. Il est intéressant de noter que les valeurs de R_t relevées pour le milieu stérile contenant *B. cereus* sont plus élevées que celles relevées pour le milieu stérile. Ce résultat confirme le comportement inhibiteur de *B. cereus* sur la corrosion de l'acier A60. De plus, l'augmentation de R_t avec le temps d'immersion, confirme l'inhibition de cette corrosion. Le biofilm agit comme une barrière au transport d'ions, ce qui pourrait atténuer la corrosion de l'acier A60.

Par ailleurs, on peut également remarquer l'augmentation de R_f avec le temps d'immersion. Il est prouvé que la production d'EPS est nécessaire pour la formation de biofilm et son développement [160]. L'EPS est composé de macromolécules en particulier les protéines, les polysaccharides, les acides nucléiques et les phospholipides. L'EPS a la capacité de se lier avec des ions métalliques. Ainsi, l'augmentation de R_f peut s'expliquer par la formation d'un film homogène de complexe organométalliques (Fe EPS) formé après l'interaction du fer dissous (Fe^{2+}) avec EPS sécrétées par les bactéries au cours de leur croissance. Ce film renforce la couche poreuse formée par les phosphates. Selon Jin et al [161], les EPS extraites de différentes étapes de culture contiennent des proportions différentes de protéines et de polysaccharides, mais avec des groupes fonctionnels similaires. Tous les types d'EPS pourraient inhiber la corrosion du fer et l'EPS de la phase stationnaire a l'efficacité d'inhibition la plus élevée.

Chapitre IV Comportement électrochimique de l'acier A60 en eau de mer naturelle et en eau de mer stérile contenant *B. Subtilis*

Dans la continuité du chapitre trois, nous développons dans les paragraphes suivants le comportement électrochimique de l'acier A60 lorsqu'il est en contact d'une eau de mer naturelle et en eau de mer stérile contaminée par une autre bactérie, en l'occurrence le *Bacillus subtilis*. Dans un premier stade, nous avons analysé le rôle de *B. subtilis* vis-à-vis du comportement du matériau lorsqu'il est en contact d'une eau de mer stérile.

IV.1 Etude électrochimique de l'acier A60 en eau de mer stérile contenant *B. subtilis*

IV.1.1 Analyse morphologique

Les figures IV.1(a et b) illustrent l'aspect de l'acier A60 immergé durant 6 jours dans une eau de mer stérile en présence de *B. subtilis*.

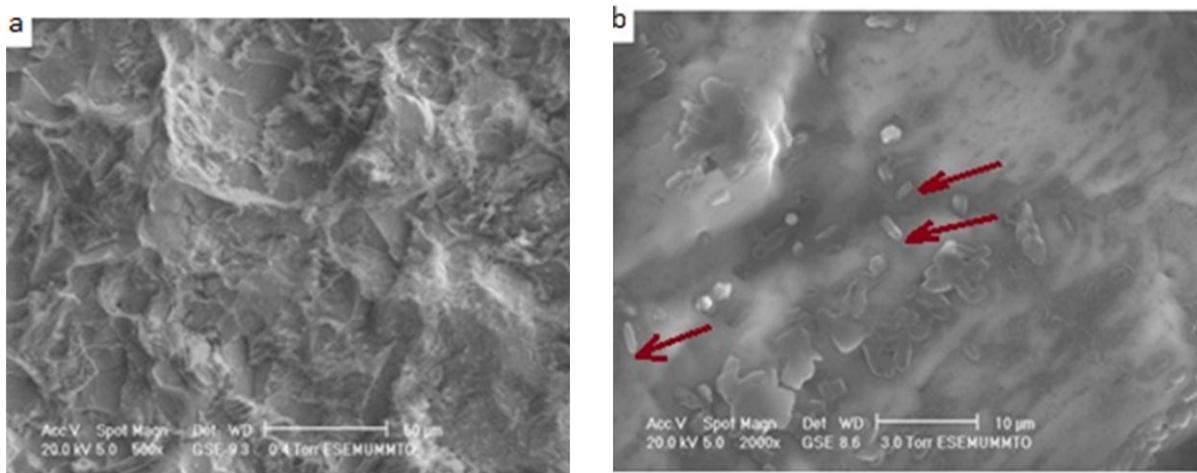


Figure IV.1 Images MEB de l'acier A60 immergé durant 6 jours dans l'eau de mer stérile contenant *B. subtilis* a) 50 µm b) 10 µm

La microscopie électronique à balayage MEB est une technique puissante pour révéler la structure fine des systèmes vivants notamment les biofilms marins. Elle permet de définir les morphologies observées et leur attribuer une identification probable selon la géométrie et la taille des structures.

Sur l'image (1a) de la Figure IV.1, on observe une surface plus épaisse et plus compacte avec un dépôt bactérien. Cette couche est vraisemblablement formée par suite à l'accumulation de produits de corrosion, des composés à base de phosphore et de produits métaboliques de *B. subtilis*. On peut remarquer, en effet, sur l'image agrandie du film formé (Figure IV.1b) une couche externe composée de nombreux microorganismes (repérés par des flèches rouges) avec des substances polymères extracellulaires abondantes.

IV.1. 2 Mesures électrochimiques

IV.1.2.1 Potentiel en circuit ouvert E_{PCO}

La Figure IV.2 présente la variation temporelle du potentiel à circuit ouvert (E_{PCO}) de l'acier au carbone A60 en contact d'une eau de mer naturelle stérile aérée en présence et en absence de *B. subtilis*. En milieu stérile, nous avons repris l'évolution temporelle de E_{PCO} présenté dans le chapitre III. E_{OCP} diminue rapidement durant le premier jour d'immersion avant de se stabiliser durant la période d'exposition pour atteindre à -0.65 V/ECS après 20 jours d'immersion.

En présence de *B. subtilis*, on remarque une évolution notable du potentiel E_{PCO} vers des valeurs plus négatives pour atteindre -0.857 V/ECS après 09 jours d'exposition, ce qui caractérise un comportement actif du matériau. Au-delà, E_{OCP} reste à une valeur relativement stationnaire pour atteindre -0.864 V après 22 jours d'immersion.

Les potentiels nettement plus négatifs relevés dans le milieu contaminé peuvent être attribué à la formation du biofilm. Ce dernier peut ralentir la diffusion du dioxygène, entraînant la diminution du potentiel de réduction cathodique [162]. D'autres travaux mettent en évidence le même phénomène sur l'acier au carbone [163]. Pour ces auteurs, la diminution de E_{PCO} a pour origine la formation du biofilm et la colonisation de l'électrode en présence de *Bacillus sp.*

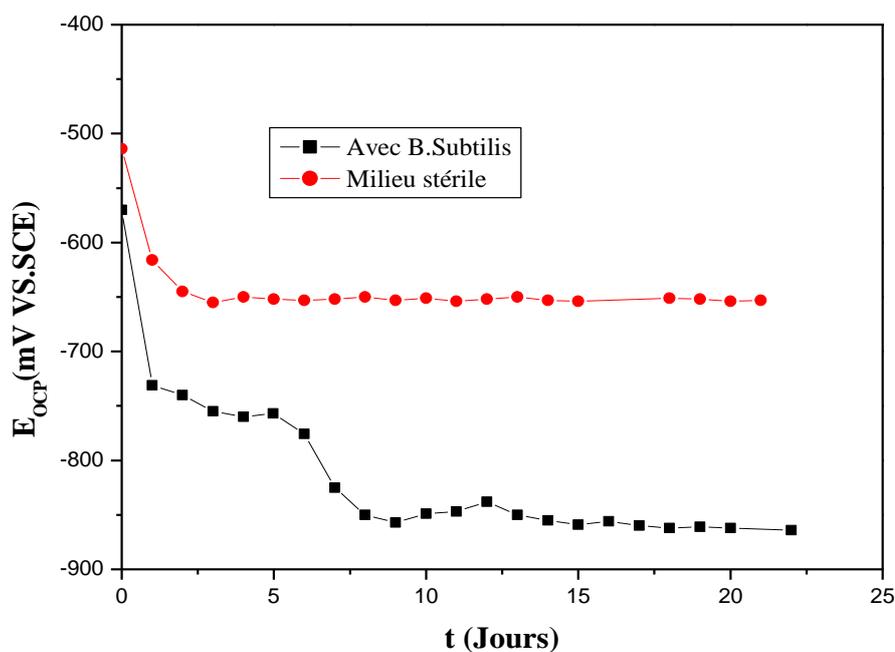


Figure IV.2 L'évolution de E_{PCO} de l'acier au carbone A60 immergé en eau de mer naturelle stérile avec et sans *B. subtilis*

IV.1.2.2 Résistance de polarisation (R_p)

La figure IV.3 présente la variation de R_p avec le temps d'immersion de l'acier A60 en milieu stérile en présence et en absence de *B. subtilis*. En milieu stérile, on remarque sur cette figure que R_p augmente dès l'immersion pour atteindre une valeur maximale de $1.31 k \Omega$ après 2 jours d'exposition avant d'évoluer dans le sens contraire.

En revanche, en milieu contaminé, on observe sur cette figure, une augmentation notable de R_p avec le temps d'immersion ce qui caractérise une diminution notable de la vitesse de corrosion. On remarque en effet que R_p atteint une valeur proche de $38.5K\Omega$ après 13 jours d'immersion. Les valeurs de R_p relevées en présence de bactéries sont plus élevées comparativement à celles acquises en milieu stérile.

En d'autres termes, le *B. subtilis* se comporte comme un inhibiteur de la corrosion de l'acier A60 dans l'eau de mer stérile contaminée. L'inhibition de la corrosion de l'acier dans ce dit milieu est vraisemblablement dû à une production plus importante des métabolites bactériens et d'EPS par cette bactérie. Autrement dit, c'est la formation d'un biofilm compact de *Bacillus subtilis* à la surface du métal qui est à l'origine de la protection de l'acier [164].

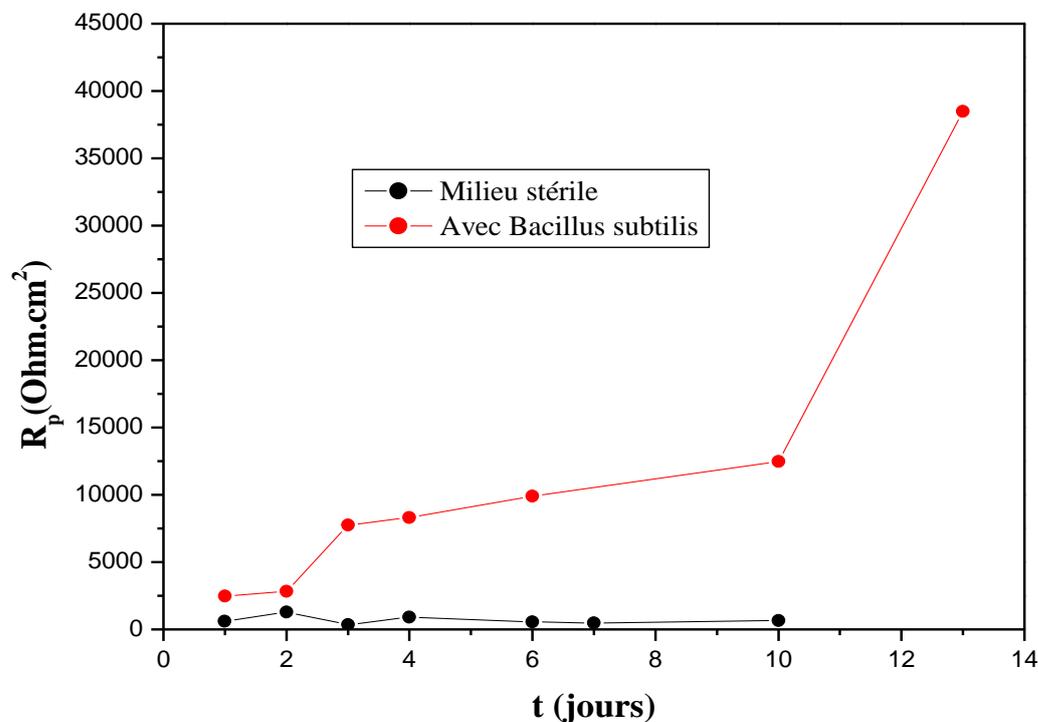


Figure IV.3 Tracés de la R_p de l'acier A60 immergé en eau de mer naturelle stérile en présence et en absence de *B. subtilis*

IV.1.2.3 Tracés de Tafel

La figure IV.4 présente les courbes de polarisation de Tafel de l'acier A60 immergé en eau de mer naturelle stérile en l'absence et en présence de *B. subtilis* en fonction du temps d'immersion.

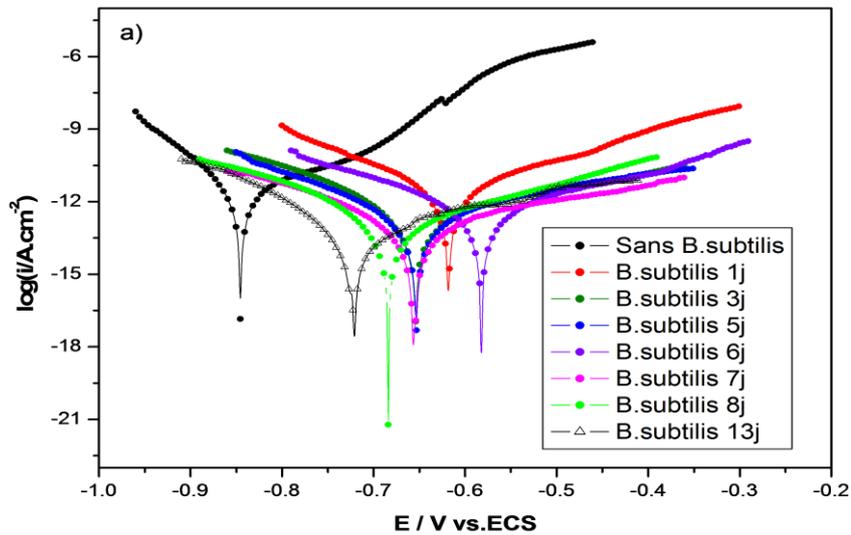


Figure IV.4 Tracés de Tafel de l'acier A60 immergé en eau de mer stérile contenant *B. subtilis*

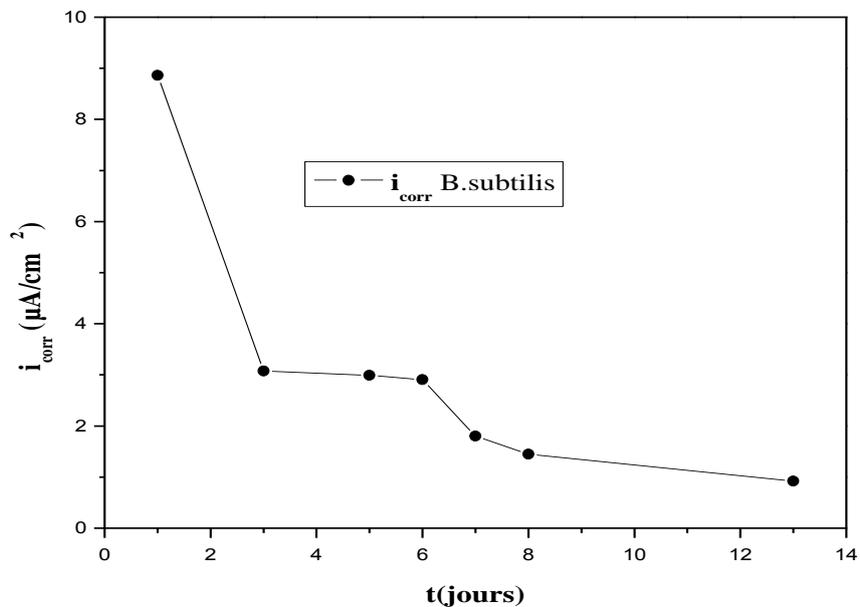


Figure IV.5 Evolution temporelle de i_{corr} de l'acier A60 immergé en eau de mer stérile en présence de *B. subtilis*

L'addition de *B. subtilis* se traduit par une diminution notable de la densité du courant anodique comparativement à l'essai à blanc. Ce résultat suggère qu'en présence de *B. subtilis*, un biofilm à caractère protecteur est formé à la surface de l'acier. Ce dernier réduit la dissolution anodique du métal. De plus, les densités de courant de corrosion déduites de l'extrapolation des droites de Tafel diminuent. La figure IV.5 indique en effet que $i_{corr} = 8.9 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ après 1 jour 'immersion n'est plus qu'à $0.73 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ après 13 jours d'immersion. L'ajout de la bactérie dans le milieu se traduit par une réduction importante de la vitesse de corrosion de l'acier.

IV.1.2.4 Impédance électrochimique

Comme cela a été largement mis en évidence dans le chapitre précédent, les mesures d'impédance sont susceptibles de révéler les étapes élémentaires impliquées dans le processus global [165]. L'étude de l'inhibition de la corrosion par les mesures d'impédance électrochimique semble prouver que ces dernières sont très adaptées à la détermination du mode d'action des inhibiteurs.

Les figures IV.6 (a et b) montrent les diagrammes d'impédance dans les plans de Nyquist et de Bode de l'acier A60 immergé dans l'eau de mer stérile sur une période de 15 jours. Les diagrammes ont été enregistrés au potentiel de corrosion (E_{PCO}). On note sur la figure IV.6a une augmentation du diamètre des arcs de demi-cercles capacitifs durant les premiers jours d'immersion ce qui caractérise un ralentissement de la vitesse de corrosion vraisemblablement dû à un phénomène de passivation spontanée après quoi le processus inverse se produit.

En effet, après deux jours d'immersion, on observe, sur cette figure, une diminution des diamètres des arcs de demi-cercle caractérisant une accélération de la vitesse de corrosion mettant ainsi en exergue l'influence du temps d'immersion. Le tracé des diagrammes d'impédances dans le plan de Bode nous a permis de mieux apprécier les caractéristiques pouvant être déduites notamment dans le domaine des hautes fréquences.

En milieu contaminé par le *B. subtilis*, les figures IV.6 (c et d) montrent l'évolution des diagrammes d'impédance de l'acier A60 en fonction du temps d'immersion. Les diagrammes présentent quasiment la même allure. On observe en effet, une boucle capacitive aux hautes fréquences, de faible diamètre, et une boucle capacitive de plus grand diamètre aux basses fréquences. De plus, ces diagrammes révèlent un comportement CPE. Celles-ci décrivent une augmentation de l'impédance totale du système avec le temps d'immersion. Cette évolution suggère une forte inhibition du processus de dissolution s'opérant à la surface.

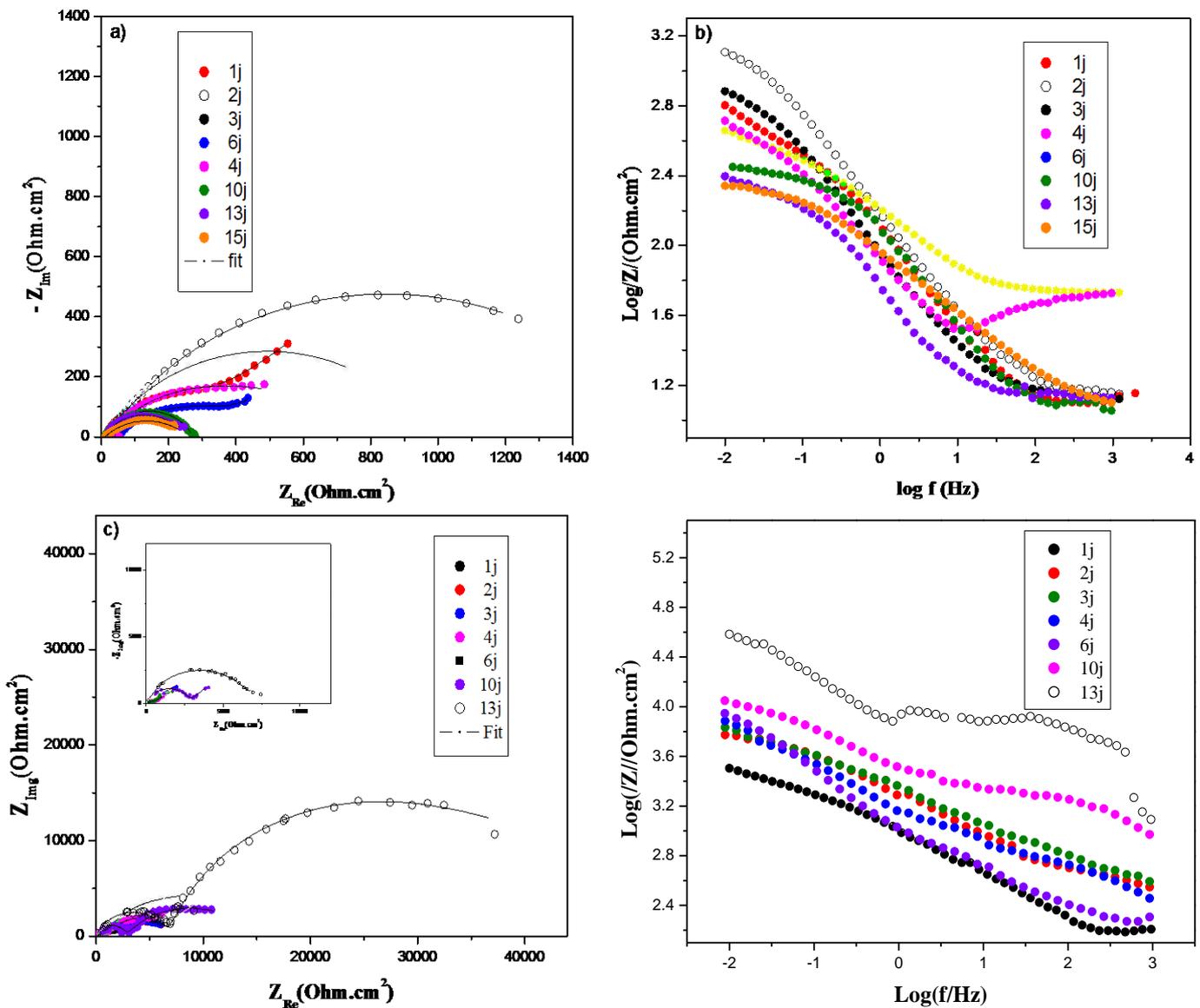


Figure IV.6 Diagrammes de Nyquist (a,c) et de Bode (b,d) de l'acier A60 immergé dans de l'eau de mer stérile (a, b sans *B. subtilis*, c, d avec *B. subtilis*) pour différents temps d'exposition

Le comportement de l'interface acier A60/ eau de mer stérile contenant *B. subtilis* est discuté à l'aide d'un circuit électrique équivalent présenté sur la figure IV.7. Une bonne corrélation est obtenue entre les données expérimentales et simulées non seulement sur les spectres observés, mais également à travers les valeurs du facteur d'erreur χ^2 ($\chi^2 < 10^{-3}$).

Les paramètres cinétiques déduits de l'ajustement des spectres d'impédance sont reportés dans les Tableaux IV.2 et IV.3 pour le milieu stérile et le milieu contaminé par *B. subtilis* respectivement. Il s'agit de la résistance de la solution électrolytique, R_s , la résistance de transfert de charge R_t , la pseudo capacité de la double couche, CPE_{dl} . R_f et CPE_f représentent respectivement la résistance et la pseudo capacité du film poreux externe et W caractérise l'impédance de diffusion à travers le film poreux.

Compte tenu de la rugosité et de l'inhomogénéité de la surface de l'électrode, les éléments capacitifs ont été simulés par un élément à phase constante (CPE).

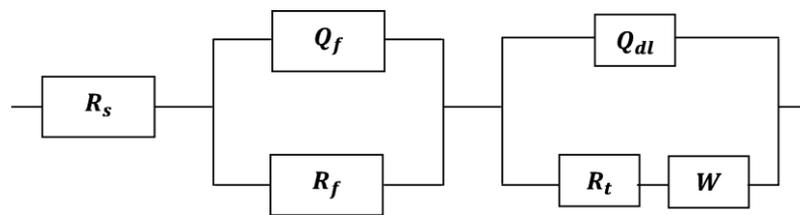


Figure IV.7 Circuit équivalent caractérisant le comportement de l'interface

Les résultats présentés dans les Tableaux IV.1 et 2) montrent que les valeurs de R_t obtenues au milieu stérile contenant *B. subtilis* sont plus élevées que celles obtenues au milieu stérile, ce qui traduit une propriété protectrice du biofilm vivant formé par *B. subtilis*.

Tableau IV.1 Paramètres cinétiques déduits de mesures d'impédance électrochimique en milieu stérile.

| Temps immersion (jours) | R_s $\Omega.cm^2$ | Q_f $s^n.\Omega^{-1} cm^{-2}$ | n_f | R_f $\Omega.cm^2$ | Q_{dl} $s^n.\Omega^{-1} cm^{-2}$ | n_{dl} | R_t $\Omega.cm^2$ | W |
|-------------------------|------------------------|------------------------------------|-------|------------------------|---------------------------------------|----------|------------------------|--------|
| 1 | 11.97 | 6.48×10^{-4} | 0.88 | 45 | 12.35×10^{-4} | 0.74 | 280 | 0.0098 |
| 2 | 13.42 | 15.01×10^{-4} | 0.70 | 361 | 7.57×10^{-4} | 0.80 | 1145 | - |
| 3 | 12.58 | 30.44×10^{-4} | 0.67 | 110 | 1.10×10^{-4} | 0.67 | 850 | - |
| 4 | 38.5 | 23.36×10^{-4} | 0.90 | 100 | 48.88×10^{-4} | 0.56 | 575 | - |
| 6 | 53.80 | 8.80×10^{-4} | 0.61 | 93.9 | 29.45×10^{-4} | 0.55 | 280 | 0.0297 |
| 10 | 11.34 | 8.85×10^{-4} | 0.84 | 70 | 18.13×10^{-4} | 0.55 | 212 | - |
| 13 | 13.80 | 42.11×10^{-4} | 0.76 | 28.63 | 5.35×10^{-4} | 0.55 | 200.6 | - |
| 15 | 11.97 | 2.83×10^{-4} | 0.86 | 18 | 32.80×10^{-4} | 0.58 | 200 | - |

On remarque également, Tableau IV.2, une augmentation de R_f avec le temps d'immersion. Cette évolution de R_f peut avoir pour origine à la présence de la matrice extracellulaire EPS, qui représente une partie importante de l'organisation structurale du biofilm. Il faut noter que dans le cas de *B. subtilis* cette dernière est composée de polysaccharides, de protéines, de l'ADN ainsi que de lipides [166]. L'EPS a la capacité de se lier avec des ions métalliques et par conséquent, l'accroissement de la R_f peut s'expliquer par la formation d'une couche homogène de complexe organométalliques (Fe EPS) formée après l'interaction du fer dissous (Fe^{2+}) avec EPS sécrétées par les bactéries au cours de leur croissance.

Il faut aussi signaler l'augmentation de R_t avec le temps d'immersion. « L'attachement » des cellules et le développement du biofilm à la surface du métal retardent les cinétiques de transfert électronique à l'interface et augmentent la résistance de transfert électronique. Le biofilm, de ce fait, contribue à l'inhibition de la corrosion de l'acier et agit comme barrière au transport des agents agressifs tel que les ions Cl^- .

Tableau IV.2 Paramètres cinétiques déduits des mesures d'impédance électrochimique en milieu stérile contenant *Bacillus subtilis*

| Temps immersion (jours) | R_s $\Omega.cm^2$ | Q_f $s^n.\Omega^{-1} cm^{-2}$ | n_f | R_f $\Omega.cm^2$ | Q_{dl} $s^n.\Omega^{-1} cm^{-2}$ | n_{dl} | R_t $\Omega.cm^2$ | W |
|-------------------------|------------------------|------------------------------------|-------|------------------------|---------------------------------------|----------|------------------------|--------|
| 1 | 30 | 1.31×10^{-6} | 0.8 | 334 | 2.44×10^{-4} | 0.6 | 1874 | 0.0024 |
| 2 | 30 | 3.99×10^{-5} | 0.4 | 405 | 1.90×10^{-4} | 0.55 | 6530 | 0.0062 |
| 3 | 30 | 0.76×10^{-6} | 0.8 | 444 | $1,84 \times 10^{-4}$ | 0.52 | 6900 | 0.0075 |
| 4 | 30 | 1.42×10^{-5} | 0.6 | 567 | 3.21×10^{-4} | 0.6 | 8050 | 0.0062 |
| 6 | 58.7 | 1.3×10^{-4} | 0.4 | 922 | 4.76×10^{-4} | 0.76 | 9360 | 0.0016 |
| 10 | 50 | 0.65×10^{-6} | 0.85 | 2741 | 2.35×10^{-4} | 0.6 | 11220 | 0.0091 |
| 13 | 50 | 0.62×10^{-6} | 0.8 | 6750 | 0.95×10^{-4} | 0.8 | 34400 | 0.0010 |

IV.2. Comportement électrochimique de l'acier au carbone en eau de mer naturelle

IV.2.1 Analyse de surface

Les images MEB de l'acier au carbone immergé dans l'eau de mer non stérile pendant 6 jours sont présentées sur la figure IV.8e. On peut observer ainsi le biofilm développé à la surface du métal. On voit clairement que le voile biologique est hétérogène et est composé d'agrégats

entourés par des substances polymères extracellulaires résultant de l'activité métabolique des microorganismes. Ces agrégats peuvent être des champignons. L'image agrandie de ce film (Figure IV.8f) révèle la présence de plusieurs fissures sur ce dernier.

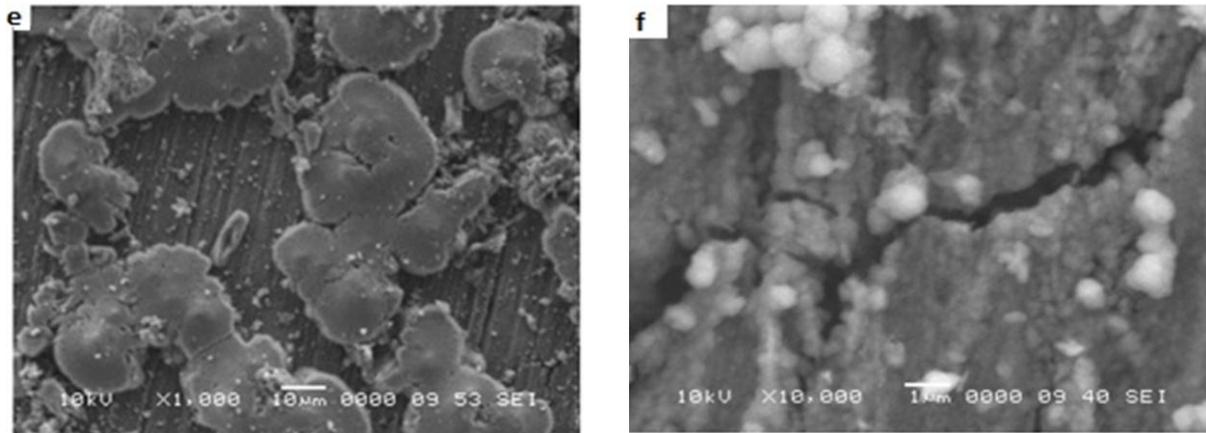


Figure IV.8 Images de la surface de l'acier A60 immergé dans l'eau de mer naturelle brute après 6 jours d'immersion

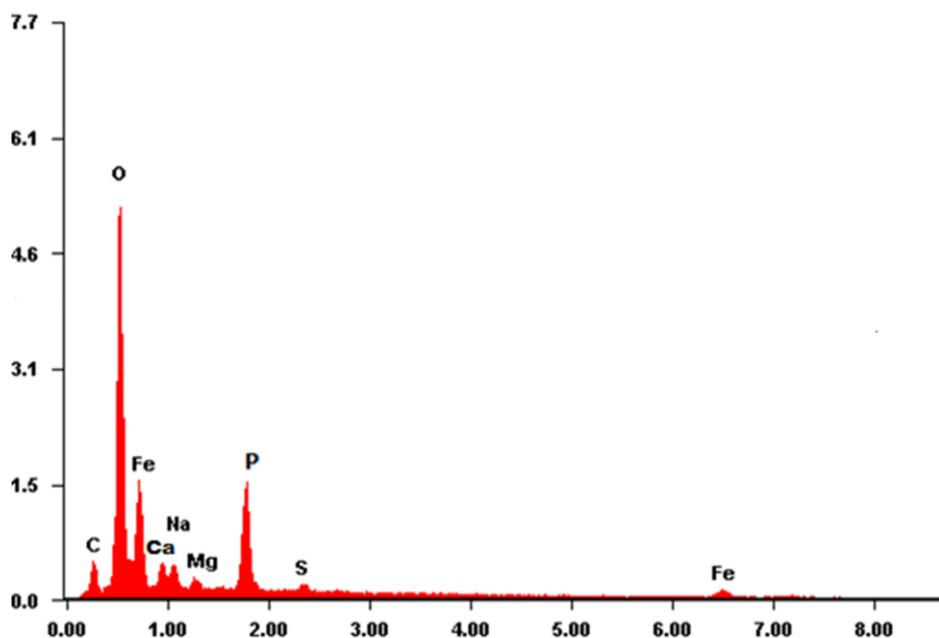


Figure IV.9 Spectre EDX de l'acier A60 immergé dans l'eau de mer naturelle brute

L'analyse EDX dont le spectre est présenté sur la Figure IV.9 révèle la présence de O, C, P, Na, Mg, Ca, S et de Fe. Les pics de O et C peuvent être attribués à la couche d'oxyde et aux substances extracellulaires secrétées par les champignons. Ainsi, il est vraisemblable qu'au

contact de l'eau de mer naturelle brute, il se forme à la surface de l'acier A60 une couche d'oxyde de phosphate de fer couverte par des micro-organismes et EPS. Les autres éléments, en très faibles proportions en l'occurrence, Na, Mg, Ca et S résultent de l'eau de mer.

Par ailleurs, l'analyse microbiologique du biofilm formé à la surface de l'acier A60 immergé en eau de mer naturelle brute, après 6 jours d'immersion, nous a permis de mettre en évidence la présence de champignon. La figure IV.10 illustre ces champignons, ce qui confirme les résultats obtenus par l'analyse MEB.

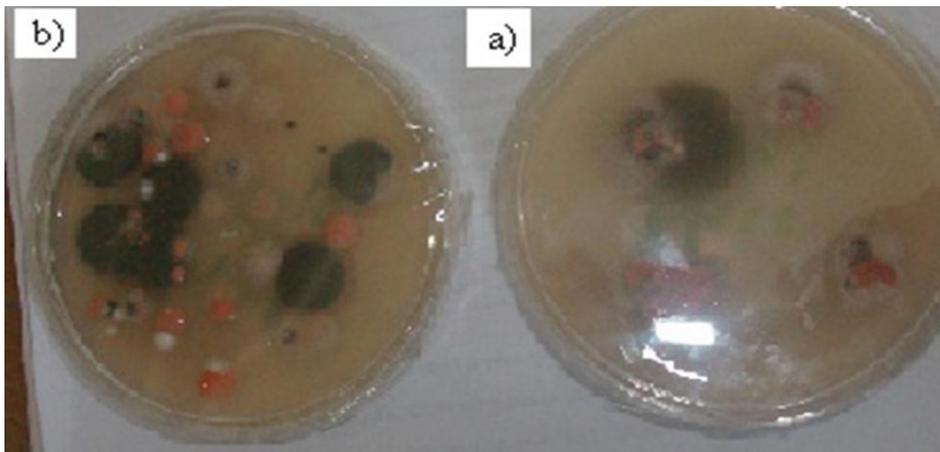


Figure IV.10 Images révélant les micro-organismes : a) après 2 jours d'incubation.

IV.2. 2 Mesures électrochimiques

IV.2.2.1 Tracés de Tafel

La figure IV.11 présente les courbes de polarisation (tracé de Tafel) de l'acier A60 immergé en eau de mer naturelle et en eau de mer stérile. Notons que les courbes ont la même allure ce qui peut indiquer que les mécanismes réactionnels cathodique et anodique ne changent pas avec le temps d'immersion.

En eau de mer naturelle non stérile (milieu brut), i_{corr} diminue durant les 3 premiers jours d'exposition et se poursuit jusqu'à une valeur de $3.38 \mu A cm^{-2}$. Au-delà, le courant de corrosion augmente rapidement (Figure IV.12). La diminution de la vitesse de corrosion de l'acier peut s'expliquer par la formation d'un biofilm protecteur à sa surface. Après 3 jours d'immersion, l'augmentation du courant de corrosion observée peut avoir pour origine la rupture du film protecteur

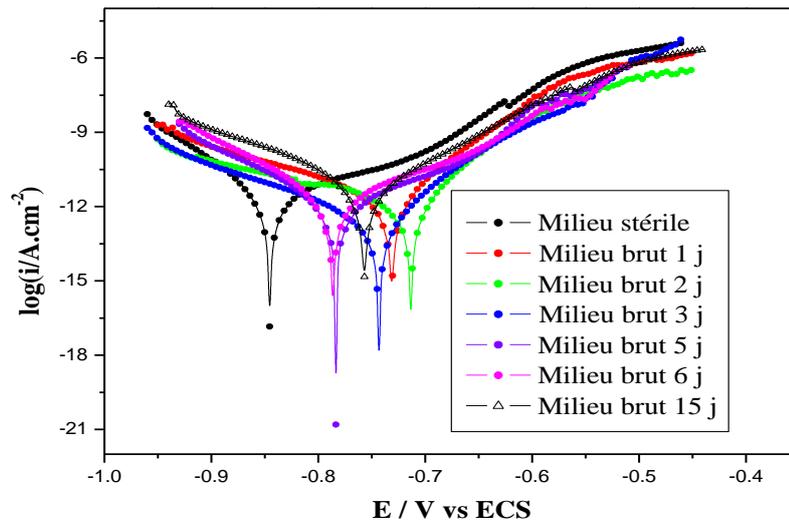


Figure IV.11 Tracé de Tafel de l'acier A60 immergé en eau de mer naturelle

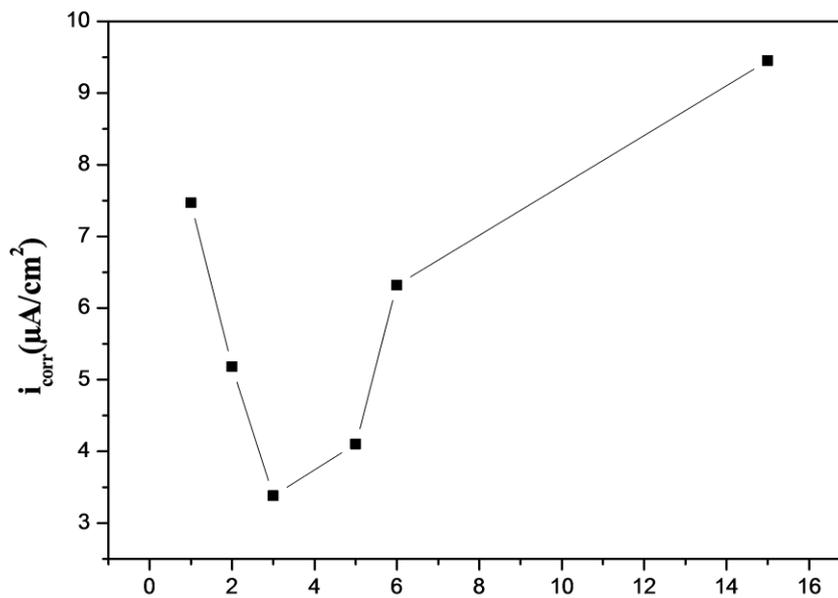


Figure IV.12 Tracés de i_{corr} de l'acier A60 immergé en eau de mer naturelle

IV.2.2.2 Impédance électrochimique

Les figures IV.13(e et f) présentent les diagrammes d'impédance, de l'acier A60 en contact de l'eau de mer naturelle, dans les plans de Nyquist et de Bode respectivement. L'examen des diagrammes enregistrés semblent indiquer la présence de deux boucles capacitives indiscernables. Ce qui peut correspondre vraisemblablement à deux contributions différentes. La première boucle, aux hautes fréquences correspond au processus de transfert de charge alors qu'aux basses fréquences, la boucle pourrait être associée à un film externe poreux formé à la surface du métal. On note que le diamètre de ces boucles augmente avec le temps d'immersion durant les trois premiers jours. Ce phénomène peut caractériser un processus de blocage de la réaction de transfert de charge engendré par la formation spontanée d'un film protecteur. Au-delà, on note une diminution des diamètres de ces boucles qui peut avoir comme origine la rupture du film protecteur qui s'est développé à la surface de l'acier durant les premiers jours d'exposition. Ce résultat est en corrélation avec les résultats déduits des tracés de Tafel.

Pour tenter de comprendre le comportement de l'interface étudiée, il était intéressant de l'identifier à l'aide d'un circuit électrique équivalent. La figure IV.7 présente le circuit électrique équivalent qui a donné les résultats les plus proches des diagrammes expérimentaux. Les paramètres cinétiques déduits des diagrammes simulés sont reportés dans le Tableau IV.3.

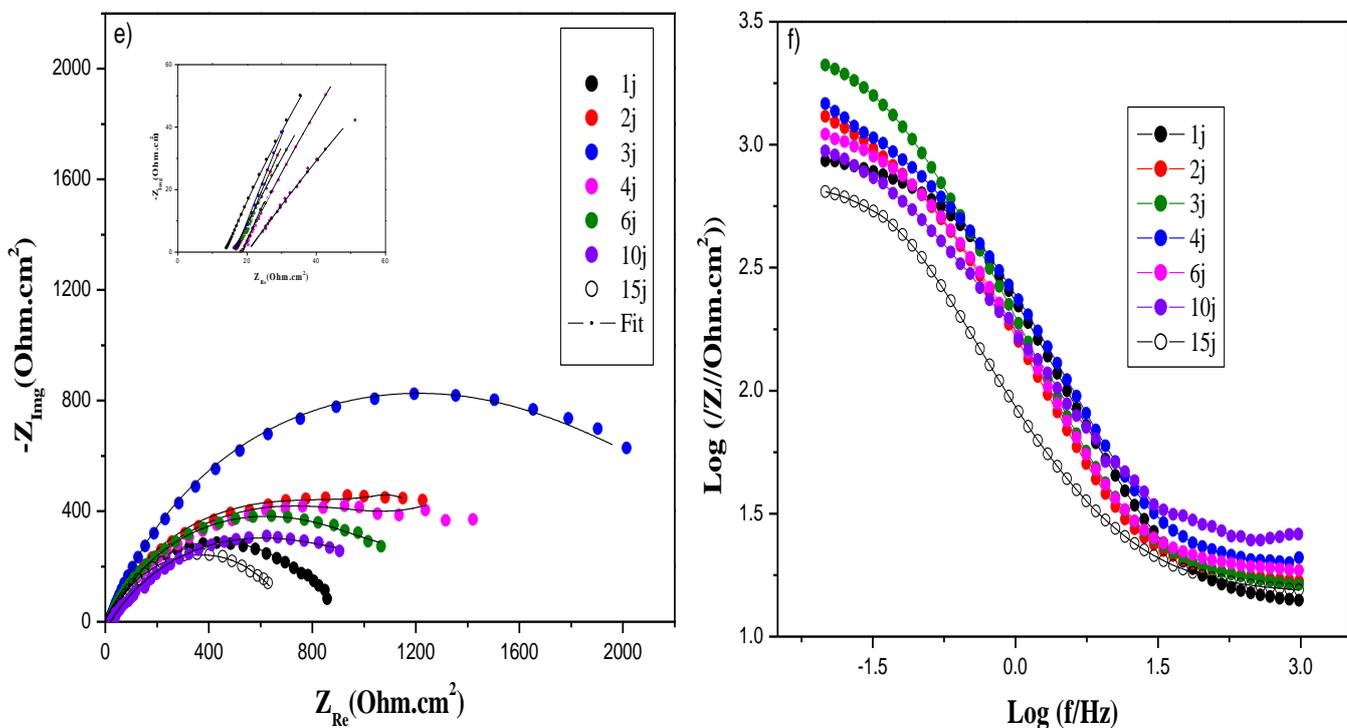


Figure IV.13 Diagrammes de Nyquist et de Bode de l'acier A60 dans une eau de mer naturelle. Influence du temps d'immersion

Tableau IV.3 Paramètres cinétiques déduits des mesures d'impédance électrochimique en eau de mer naturelle

| Temps immersion (jours) | R_s $\Omega.cm^2$ | Q_f $s^n.\Omega^{-1} cm^{-2}$ | n_f | R_f $\Omega.cm^2$ | Q_{dl} $s^n.\Omega^{-1} cm^{-2}$ | n_{dl} | R_t $\Omega.cm^2$ | W |
|-------------------------|------------------------|------------------------------------|-------|------------------------|---------------------------------------|----------|------------------------|--------|
| 1 | 5 | 2.43×10^{-6} | 0.8 | 9.86 | 9.42×10^{-4} | 0.78 | 816 | 0.0546 |
| 2 | 3.8 | 2.93×10^{-6} | 0.8 | 11.94 | 1.42×10^{-3} | 0.79 | 1034 | 0.0087 |
| 3 | 5 | 7.63×10^{-6} | 0.8 | 11.70 | 1.19×10^{-3} | 0.79 | 2197 | 0.0177 |
| 4 | 5 | 0.10×10^{-6} | 0.6 | 13.60 | 1.71×10^{-3} | 0.73 | 1280 | 0.0168 |
| 6 | 5 | 1.30×10^{-6} | 0.4 | 11.03 | 1.44×10^{-3} | 0.74 | 1100 | 0.0253 |
| 10 | 5 | 0.1×10^{-6} | 0.4 | 15 | 1.81×10^{-3} | 0.64 | 1050 | 0.035 |
| 15 | 5 | 3.00×10^{-6} | 0.6 | 13.88 | 3.03×10^{-3} | 0.78 | 689 | 0.5337 |

En eau de mer naturelle, on remarque sur ce tableau une augmentation de R_t durant les 3 premiers jours d'exposition qu'on pourrait identifier avec une période d'incubation pour la formation du biofilm. La valeur maximale de R_t enregistrée au bout de cette période peut avoir pour origine le caractère protecteur du voile biologique qui vient renforcer le film poreux formé par les phosphates dès les premiers instants d'exposition.

On remarque une évolution de R_t vers des valeurs plus faibles ; au delà des 3 jours d'exposition, ce qui caractérise un changement de l'état de surface de l'acier. On peut suggérer qu'après une certaine période d'immersion, la couche poreuse externe devient moins stable et plus ou moins adhérente perdant ainsi son pouvoir protecteur.

Les valeurs plus élevées de n_f durant les 3 premiers jours d'exposition indiquent que la couche externe poreuse est presque homogène. Au-delà ce paramètre devient plus faible ce qui est en relation avec le caractère inhomogène de la surface de l'électrode. L'évolution de ces paramètres est en corrélation avec l'analyse MEB. Nous avons observé en effet de nombreuses fissures à la surface de l'acier après 6 jours d'exposition. Il faut noter que les valeurs de R_t enregistrées en milieu brut sont plus élevées que celles déduites à partir de l'étude en milieu stérile ce qui explique l'effet plus ou moins inhibiteur du biofilm formé à la surface de l'acier.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

L'objectif de cette étude était d'étudier le comportement électrochimique d'un acier au carbone lorsqu'il est en contact d'un environnement marin brute, stérile et stérile contenant des espèces bactériennes genre *Bacillus* (*Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*). Pour ce faire, des mesures électrochimiques couplées avec des observations au MEB et des analyses EDS et microbiologique ont été utilisées.

Dans la présente étude, nous avons alors évalué l'influence de certains micro-organismes ainsi que le temps d'immersion sur la corrosion de l'acier au carbone immergé en eau de mer naturelle aérée et agitée prélevée de Boumerdes.

L'ensemble des résultats présenté, dans ce travail a permis de mieux caractériser les phénomènes de corrosion d'un acier au carbone dans une solution d'eau de mer naturelle brute, stérile, stérile contenant *Bacillus cereus* et Stérile renfermant *Bacillus subtilis*.

Il ressort de l'ensemble des résultats sur l'étude du processus de corrosion de l'acier au carbone en milieu stérile, une concordance des résultats issus des différentes techniques.

En milieu stérile, les mesures d'impédance électrochimiques ont révélé que la R_t et la R_f augmentent au cours des 2 premiers jours d'exposition, puis diminuées. La valeur élevée du R_t (près de $1 \text{ K}\Omega \text{ cm}^2$) observée après 2 jours d'exposition, peut être interprétée par le caractère résistif de la couche de phosphate de fer en temps d'exposition relativement court. Alors qu'après 2 jours d'immersion, R_t et R_f ont diminué, ce qui reflète un changement de l'état de surface de l'acier. La méthode de la résistance de polarisation, a montré le même comportement de l'acier dans ce milieu. L'analyse MEB couplée à l'analyse EDS ont illustré qu'une couche duplex épaisse est formée sur la surface de l'acier. Elle est composée d'une couche interne compacte et d'une couche externe poreuse composé des produits de corrosion contenant des phosphates.

En milieu stérile contenant *Bacillus cereus*, les résultats de MEB ont montré la formation d'un biofilm sur le métal. Les courbes de polarisation potentiodynamique ont montré une réduction significative de la densité de courant de corrosion. La méthode de la résistance de polarisation a illustré que la R_p augmente avec le temps ensuite elle se stabilise à une valeur proche de 10 KV. Les valeurs de la R_p estimées sont plus élevées en présence de bactéries par rapport à celles obtenues en milieu stérile. La diminution de la vitesse de corrosion de l'électrode avec le temps d'immersion est peut-être due à la formation d'un film protecteur sur sa surface. Les mesures des spectres d'impédance ont également montré l'effet inhibiteur de biofilm formé par *B. cereus*. Le suivi de potentiel de corrosion a révélé le déplacement de potentiel à circuit ouvert E_{OCP} vers des valeurs plus électrochimiques en présence de *B. cereus*

Conclusion générale

on le comparant avec le milieu stérile. Ceci peut suggérer que l'augmentation de la résistance à la corrosion de l'acier A60 était due à la réduction de la concentration d'oxygène à la surface de l'électrode par un biofilm.

Les essais menés en présence de *Bacillus subtilis* ont montré que *ces bactéries* peuvent adhérer sur la surface de l'acier au carbone pour former un biofilm dans l'eau de mer stérile dans des conditions aérobies. Les résultats de MEB ont illustré la formation d'un biofilm sur le métal en présence de *B. subtilis*.

La présence de *B. subtilis* déplace le potentiel à circuit ouvert E_{OCP} vers des valeurs plus électronégatives qu'en milieu stérile, ce qui peut être expliqué par la diminution de la concentration d'oxygène consommé par les micro-organismes.

Les tracés de Tafel ont révélé une diminution notable de la densité de courant de corrosion en présence de *Bacillus subtilis*. Ce résultat suggère qu'en présence de *ces bactéries*, un biofilm à caractère protecteur est formé à la surface de l'acier. Les mesures des spectres d'impédance ont également montré l'effet inhibiteur de biofilm formé par *B. subtilis*.

En eau de mer naturelle brute, la formation d'un biofilm à base de champignon a été détecté par l'analyse de surface à savoir les observations au MEB, analyse EDS et analyse microbiologique.

Les courbes de polarisation potentiodynamique enregistrés en eau de mer naturelle ont montré une réduction de la densité de courant de corrosion au cours de 3 premiers jours d'immersion. La diminution de la vitesse de corrosion de l'électrode avec le temps d'immersion peut être interprétée par le caractère protecteur de voile biologique qui vient renforcer le film poreux formé par les phosphates. Au-delà de 3 jours, la vitesse de corrosion augmente. On peut suggérer, qu'après une certaine période d'immersion, la couche poreuse externe devient moins stable et moins adhérente et donc perdre le rôle protecteur. Les mesures des spectres d'impédance ont également montré l'effet protecteur de biofilm formé en eau de mer naturelle au cours de 3 premiers jours d'immersion. Au-delà, le caractère protecteur de biofilm diminue.

Perspectives

- Compléter cette étude en évaluant l'efficacité des deux espèces bactériennes de genre *Bacillus* (*Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*) pour des temps d'immersion plus longs.
- Etudier l'effet de couplage des deux espèces sur la corrosion de l'acier au carbone en milieu marin.

Références bibliographiques

- [1] S. Kim, K. Chon, S. J. Kim, S. Lee, E. Lee, J. Cho. "Uncertainty in organic matter analysis for seawater reverse osmosis (SWRO) desalination". *Desalination*. 2009, 238, 30–36.
- [2] R. Massana, R. Logares. "Eukaryotic versus prokaryotic marine picoplankton ecology". *Environmental Microbiology*. 2013, 15, 1254–1261.
- [3] G. Bitton. "Wastewater microbiology". Department of Environmental Engineering Sciences University of Florida, Gainesville, Florida. Third Edition. Wiley series in ecological and applied microbiology. 2005. ISBN 0-471-65071-4.
- [4] W. F. Doolittle. "Phylogenetic classification and the universal tree". *Science*. 1999, 284, 2124-2128.
- [5] JC. Callen, R. Perasso. "BIOLOGIE CELLULAIRE ; des molécules aux organismes". Dunod, Paris. 2005, ISBN 2 10 0492365.
- [6] J. Willey, L. Sherwood, Chr. Woolverton. "Microbiologie". Traduction de J. Coyette et M. Mergeay. 4^{ème} édition. De Boeck Supérieur s.a, 2013, ISBN 978-2-8041-8039-3
- [7] R.E. Buchanan. "Life phases in a bacterial culture". *The Journal of Infectious Diseases*. 1918, 98, 1271-1273
- [8] F. Langlois et P. Lelong. "Observations sur *Bacillus rossius catalauniae* Nascetti et Bullini". *Le Monde des Phasmes*. 1993, 24, 3-8
- [9] I. Berber. "Characterization of *Bacillus* species by numerical analysis of their SDS-PAGE protein profiles". *Journal of Cell and Molecular Biology*. 2004, 3, 33-37.
- [10] SO. Allna, F. Constantinescu, CC petruta. "Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection". *Romanian Biotechnological Letters*. 2015, 20, 10737- 10750.
- [11] H. Qin, A. Driks. "Contrasting evolutionary patterns of spore coat proteins in two *Bacillus* species groups are linked to a difference in cellular structure". Qin and Driks *BMC Evolutionary Biology*. 2013, 13, 1-12.
- [12] CH. Huang, L. Huang, MT. Chang, KL. Chen. "Establishment and application of an analytical in-house database (IHDB) for rapid discrimination of *Bacillus subtilis* group (BSG) using whole-cell MALDI-TOF MS technology" *Molecular and Cellular Probes*. 2016, 30, 312-319.

- [13] KA. Joshi, MB. Kumthekar, VP. Ghodake. "Bacillus Subtilis Bacteria Impregnation in Concrete for Enhancement in Compressive Strength". International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET). 2016, 03, 1229-1234.
- [14] F. Kunst., N. Ogasawara, I. Moszer, A.M. Albertini., G. Alloni, , V. Azevedo, M.G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S.C Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C.V. Bruschi, B. Caldwell, V.Capuano, N.M. Carter, S.K. Choi, J.J. Codani, I.F. Connerton, A. Danchin, et al. "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*". Nature. 1997, 390, 249-256.
- [15] JO. Lacoursière, J. Boisvert. "Le *Bacillus thuringiensis* israelensis et le contrôle des insectes piqueurs au Québec". L'université du Québec à Trois-Rivières.2004. Québec, ministère de l'Environnement. 2004. Envirodoq no ENV, 2004, 0278, 1-101
- [16] MP. Doyle. "Foodborne bacterial pathogen". Library of congress cataloging in publication Data. 1989, ISBN 0 - 8247- 7866 – 9.
- [17] E. Dromigny. *Bacillus cereus*. Editions médicales internationales Tec et Doc, Lavoisier. 2008, ISBN 978-2-7430-1073-7.
- [18] L. Pradhan, P. Kanekar, S. Godbole. "Microbiology of spoiled mango pickles.Tolerance to salt, acidity and oil of the microbes isolated from spoiled mango pickles". Journal of Food Science and Technology India. 1985, 22, 339_341.
- [19] CJ. Doona, FE. Feeherry, K. Kustin, GG. Olinger, P. Setlow, AJ. Malkin, T. Leighton. "Fighting Ebola with novel spore decontamination technologies for the military". Frontiers in Microbiology. 2015, 6, 1 – 25.
- [20] A. Anderson, U. Rönner, PE. Granum. "What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*". International Journal of Food Microbiology. 1995, 28, 145-155.
- [21] T.S.M. Pitkajarvi, M.A. Andersson , MS. Salkinoja-Salonen . "Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial rocesses". International Journal of Food Microbiology. 2000, 60, 231-239.
- [22] GA. Van der Auwera, S. Timmery, F. Hoton, J. Mahillon. "Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs". International Journal of Food Microbiology. 2007, 113, 164-172.

- [23] A. Lapidus, E. Goltsman , S. Auger , N. Galleron, B. Segurens , C. Dossat , ML. Landa, V. Broussolle, J. Brillard , MH Guinebretiere , V. Sanchis , C. Nguen-the et al. "Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity". *Chemico-Biological Interactions*. 2008, 171, 236-249.
- [24] K. Kavita, A. Mishra, B. Jha. "Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: Characterization and applications". *Carbohydrate Polymers*. 2013, 94, 882-888.
- [25] M.D. Ghafari , A. Bahrami , I. Rasooli , D. Arabian , F. Ghafari. "Bacterial exopolymeric inhibition of carbon steel corrosion". *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2013, 80, 29-33.
- [26] A. Park, HH. Jeong, J. Lee, KP. Kim, CS. Lee. "Effect of shear stress on the formation of bacterial biofilm in a microfluidic channel". *Biocontrol Hybrid Journal*. 2011, 5, 236-241.
- [27] P. Stoodley, K. Sauer, D.G. Davies, and J.W. Costerton, "Biofilm as complex differentiated communities". *Annual Review of Microbiology*. 2002, 56, 187-209.
- [28] R M. Donlan. "Biofilms: Microbial Life on Surfaces". *Emerging Infectious Diseases*. 2002, 8, 881 – 890.
- [29] L. M. Purish, L. G. Asaulenko, D. R. Abdulina, V. N. Vasil'ev, and G. A. Iutinskaya. "Role of Polymer Complexes in the Formation of Biofilms by Corrosive Bacteria on Steel Surfaces". *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012, 48, 262 – 269.
- [30] D. G. Allison and I. W. Sutherland. "The Role of Exopolysaccharides in Adhesion of Freshwater Bacteria". *Journal of General Microbiology*. 1987, 133, 1319-1327.
- [31] A. Branger, MM. Richer, S. Roustel. "Microbiochimie et alimentation". Educagri éditions. Dijon. 2007, ISBN: 978 – 2- 84444-558-2.
- [32] J. Kreth and MC. Herzberg. "Molecular Principles of Adhesion and Biofilm Formation". Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2015, DOI 10.1007/978-3-662-47415-0_2.
- [33] P. Gupta, S. Sarkar, B. Das, S. Bhattacharjee, P. Tribedi. "Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review". *Arch Microbiol*. 2016, 198, 1–15.
- [34] A. Heydorn, BK. Ersbøll, M. Hentzer, MR. Parsek, M. Givskov and S. Molin. "Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms". *Microbiology*. 2000, 146, 2409 - 2415.

- [35] V. A. Parsegian. "Van der Waals Forces: a Handbook for Biologists, Chemists, Engineers". Cambridge university press. 2006, ISBN 0-521-54778-4.
- [36] R. Bos, H.C. Van der Mei, and H.J. Busscher. "Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study". FEMS Microbiological Revue. 1999, 23, 179-230.
- [37] Ph. Courière , G. Baziard, JL. Stigliani. Chimie physique. Elsevier Masson S.A.S. 2007, ISBN 978-2-294-00836-8
- [38] A. Gerschel. "Liaisons intermoléculaires, les forces en jeu dans la matière condensée". CNRST éditions. 1995.
- [39] D.C. Grahame. "The electrical double layer and the theory of electrocapillarity". Chem. Rev. 1947, 41, 441 - 501
- [40] AT. Poortinga, R. Bos, W. Norde, HJ. Busscher. "Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces". surface Science Reports. 2002, 47, 1 – 32
- [41] F. Hamadi, H. Latrache, H. Zahir, S. el abed, M. ellouali, IK. saad. "The relation between the surface chemical composition of Escherichia coli and their electron donor/electron acceptor (Acid-base) properties". Research journal of Microbiology. 2012, 7, 32 – 40.
- [42] M. Guymont. "Structure de la matière Atomes, liaisons chimiques et cristallographie". Éditions Belin. 2003, ISBN 978-2-7011-3631-8.
- [43] J. Israelachvili. "The science and applications of emulsions – an overview". Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect. 1994, 91, 1 - 8.
- [44] J. Drelich, E. Chibowski, D. Desheng Meng , K. Terpilowski. "Hydrophilic and Superhydrophilic Surfaces and Materials". Soft Matter. 2011, 21, 9804 - 9828.
- [45] R. F. Mueller. "Bacterial transport and colonization in low nutrient environments". Water Research. 1996, 30, 2681 - 2690.
- [46] A. De Toni, A. Tournon-Bodilis, F. Wallet. "Effet du changement climatique sur les micro-organismes aquatiques pathogènes : quelques exemples". Environnement, Risques et Santé. 2009, 8, 311 - 321.
- [47] NY. Choi, BR. Kim, YM. Bae, SG. Lee. "Biofilm Formation, Attachment, and Cell Hydrophobicity of Foodborne Pathogens under Various Environmental Conditions". Journal of korean society applied biology chemistry. 2013, 56, 207 – 220.

- [48] L E. Applegate, C W. Erkenbrecher Jr. "Monitoring and control of biological activity in Permasep seawater RO plants". *Desalination*. 1987,65, 331 - 359.
- [49] JD. Gu. "Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances". *International biodeterioration et biodegradation*. 2003, 52, 69 - 91.
- [50] MP. Ortega, T. Hagiwara, H. Watanabe, T. Sakiyama. "Factors Affecting Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Stainless Steel Surface". *Japan Journal of Food Engineering*. 2008, 9, 251 – 259.
- [51] G G. Geesey, RJ. Gillis, R. Avci, D. Daly, M. Hamilton, P. Shope, G. Harkin. "The influence of surface features on bacterial colonization and subsequent substratum chemical changes of 316L stainless steel". *Corrosion Science*. 1996, 38, 73 - 95.
- [52] P. Stoodley, I. Dodds, J.D.Boyle, H.M. Lappin-Scott. "Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure". *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 1999, 85, 19s -28 s
- [53] J. Bryers, W. Characklis. "Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system: overall kinetics". *Water research*. 1981, 15,483 – 491.
- [54] P. Stoodley, I. Dodds, J.D. Boyle, H.M. Lappin-Scott. "Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure". *J. Appl. Microbiol*. 1998, 85: 19S-28S
- [55] Chopp. D.L, Kirisits. M.J, Moran.B, Parsek. M.R. "A mathematical model of quorum sensing in a growing bacterial biofilm". *Journal of Industrial Microbiology et Biotechnology*. 2002, 29, 339–346.
- [56]DG. Allison, P. Gilbert. "Modification by surface association of antimicrobial susceptibility of bacterial populations". *J Ind Microbiol*. 1995, 15, 311-317.
- [57] P. Gilbert, T. Maira-Litran, A J. McBain, A H. Rickard, F W. Whyte. "The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities". *Advances in Microbial hysiology*. 2002, 46, 203 – 256.
- [58] S. Srivastava, A. Bhargava. "Biofilms and human health". *Biotechnology letters*. 2016, 38,1–22
- [59] JW. Costerton, Z. Lewandowski, D. De Beer, D. Caldwell, D. Korber , G. James. "Biofilms, the customized microniche". *J. Bacteriol*. 1994, 176, 2137-2142
- [60] D. De Beer, P. Stoodley. "Microbial Biofilms". *The Prokaryotes*. 2013. DOI 10.1007/978-3-642-31331-8_32.

- [61] D. De Beer, P. Stoodley. "Microbial Biofilms". *Prokaryotes*. 2006. DOI 10.1007/0-387-30741-9_28.
- [62] A. Mishra, B. Jha. "Microbial Exopolysaccharides". *The Prokaryotes*. 2013. DOI 10.1007/978-3-642-31331-8_25.
- [63] S. Andersson, G. Dalhammar, GK. Rajarao. "Influence of microbial interactions and EPS/polysaccharide composition on nutrient removal activity in biofilms formed by strains found in wastewater treatment systems". *Microbiological Research*. 2011, 166, 449 – 457.
- [64] A. Pal, A K. Pau. "Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation". *Indian J. Microbiol.* 2008, 48, 49 – 64.
- [65] R. Zhang, S. Bellenberg, TR. Neu, W. Sand, M. Vera. "The Biofilm Lifestyle of Acidophilic Metal/Sulfur-Oxidizing Microorganisms". *Biotechnology of Extremophiles, Grand Challenges in Biology and Biotechnology*. 2016. DOI 10.1007/978-3-319-13521-2_6.
- [66] AG. Geyik, B. Kilic, F. Çeçen. "Extracellular polymeric substances (EPS) and surface properties of activated sludges: effect of organic carbon sources". *Environ Sci Pollut Res*. 2016, 23, 1653 – 1663.
- [67] A. Aguilera, V. Souza-Egipsy, PS. Martín-Úriz, R. Amils. "Extraction of extracellular polymeric substances from extreme acidic microbial biofilms". *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008, 78, 1079–1088.
- [68] ZH. Dong, W. Shi, HM. Ruan, GA. Zhang. "Heterogeneous corrosion of mild steel under SRB-biofilm characterized by electrochemical mapping technique". *Corros. Sci.* 2011,53,2978–2987.
- [69] H. Venzlaff, D. Enning, J. Srinivasan, KJJ. Mayrhofer, AW. Hassel, F. Widdel, M. Stratmann. "Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria". *Corros. Sci.* 2013,66, 88–96
- [70] S. Chen, P. Wang, D. Zhang: "Corrosion behavior of copper under biofilm of sulfate-reducing bacteria" *Corros. Sci.* 2014,87, 407–415
- [71] A. Rajasekar, TG Babu, SK. Pandian, S. Maruthamuthu, N. Palaniswamy, A. Rajendran. "Biodegradation and corrosion behavior of manganese oxidizer *Bacillus cereus* ACE4 in diesel transporting pipeline". *Corros. Sci.*, 2007,49, 2694–2710.

- [72] SJ. Yuan, SO. Pehkonen. "Microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by aerobic *Pseudomonas* NCIMB 2021 bacteria: AFM and XPS study". *Colloids. Surf, B*. 2007,59, 87–99.
- [73] N. Muthukumar, S. Maruthamuthu, N. Palaniswamy. "Water-soluble inhibitor on microbiologically influenced corrosion in diesel pipeline". *Colloids. Sur, B.*, 2006,53, 260–270.
- [74] R. Stadler, W. Fuerbeth, K. Harneit, M. Grooters, M. Woellbrink, W. Sand. "First evaluation of the applicability of microbial extracellular polymeric substances for corrosion protection of metal substrates". *Electrochim. Acta*. 2008,54, 91-99.
- [75] BD. Mert, ME Meet., G. Kardas, B. Yazici. "The role of *Spirulina platensis* on corrosion behavior of carbon steel". *Mat. Chem. And. Phys*. 2011,130, 697-701.
- [76] KA. Zarasvand, VR. Rai: "Microorganisms: Induction and inhibition of corrosion in metals". *Inter. Biodeter et Biodegrad*. 2014,87, 66-74.
- [77] MD. Ghafari, A. Bahrami, I. Rasooli, D. Arabian, F. Ghafari. "Bacterial exopolymeric inhibition of carbon steel corrosion". *Inter. Biodeter. & Biodegrad*. 2013,80, 29-33
- [78] A. Jayaramane, FB. Mansfeld, TK. Wood. "Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms by expressing the antimicrobial peptides indolicidin and bactenecin". *J. of. Indust. Microbiol. et Biotechnol*. 1999,22, 167-175
- [79] EJ. Pérez, R. Cabrera-Sierra, I. González, F. Ramírez-Vives. "Influence of *Desulfovibrio* sp. biofilm on SAE 1018 carbon steel corrosion in synthetic marine medium". *Corros. Sci*. 2007,49, 3580-3597
- [80] HA. Videla, LK. Herrera. "Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview". *Inter. Biodeter et Biodegr*. 2009,63, 896-900
- [81] D. Ornek, A. Jayaraman, TK. Wood, Z. Sun, C.H. Hsu, F. Mansfeld: "Pitting corrosion control using regenerative biofilms on aluminium 2024 in artificial seawater". *Corros. Sci*. 2001,43, 2121-2133
- [82] A. Jayaraman, ET. Cheng, JC. Earthman, TK. Wood. "Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of SAE 1018 steel through oxygen depletion". *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 1997,48, 11-17
- [83] A. Jayaraman, JC. Earthman, TK. Wood: "Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel". *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 1997,47, 62-68

- [84] A. Jayaraman, AK. Sun, TK. Wood. "Characterization of axenic *Pseudomonas fragi* and *Escherichia coli* biofilms that inhibit corrosion of SAE 1018 steel". J. Appl. Microbiol. 1998, 84, 485-492
- [85] G. Gunasekaran, S. Chongdar, SN. Gaoukar, P. Kumar. "Influence of bacteria on film formation inhibiting corrosion". Corros. Sci. 2004,46, 1953-1967
- [86] A. Nagiub and F. Mansfeld. "Evaluation of microbiologically influenced corrosion inhibition (MICI) with EIS and ENA". Electrochim. Acta. 2002, 47, 2319–2333.
- [87] D. Örnek, A. Jayaraman, BC. Syrett, CH. Hsu, F.B. Mansfeld, T.K. Wood. "Pitting corrosion inhibition of aluminum 2024 by *Bacillus* biofilms secreting polyaspartate or γ -polyglutamate". Appl Microbiol Biotechnol. 2002, 58, 651–657.
- [88] S. Chongdar, G. Gunasekaran and P. Kumar: "Corrosion inhibition of mild steel by aerobic biofilm". Electrochim. Acta. 2005, 50, 4655 – 4665.
- [89] J. Eimutis, R. Rimantas, L. Albinas, L. Konstantinas, S. Meilute and S. Aloyzas: "Influence of wild strain *Bacillus mycoides* on metals: From corrosion acceleration to environmentally friendly protection". Electrochim. Acta, 2006, 51, 6085–6090.
- [90] F. Mansfeld, H. Hsu, D. Ornek, TK. Wood, BC. Syrett. "Corrosion control using regenerative biofilms on Aluminum 2024 and brass in different media". J. Electrochem. Soc. 2002, 149, B130–B138
- [91] Q. Qu, Y. He, L. Wang, H. Xu , L. Li , Y. Chen , Z. Ding, "Corrosion behavior of cold rolled steel in artificial seawater in the presence of *Bacillus subtilis* C2". Corrosion Science". 2015, 91, 321–329.
- [92] H. Kanematsu, DM. Barry. "Corrosion Control and Surface Finishing". 2016. DOI 10.1007/978-4-431-55957-3-3.
- [93] B. Baroux. "La corrosion des métaux". Dunod, Paris, 2014. ISBN 978-2-10-070546-7.
- [94] M. Fenker, M. Balzer, H. Kappl. "Corrosion protection with hard coatings on steel: Past approaches and current research efforts". Surface et Coatings Technology. 2014, 257, 182–205.
- [95] S. Palraj, M. Selvaraj, K. Maruthan and M. Natesan. "Kinetics of Atmospheric Corrosion of Mild Steel in Marine and Rural Environments". J. Marine Sci. Appl. 2015, 14, 105-112

- [96] A. Abdel-Samad, Y. Soud, M. Zaki. "Influence of Paint on Steel Corrosion for Marine Applications". *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*. 2014, 4, 189-195.
- [97] PA. Sørensen, S. Kiil, K. Dam-Johansen, CE. Weinell. "Anticorrosive coatings: a review". *J. Coat. Technol. Res.* 2009, 6, 135–176.
- [98] A. Sanchez del Junco, D. A. Moreno, C. Ranninger, J J. Ortega-Calvo, C. Sfiiz-Jimrnez. "Microbial Induced Corrosion of Metallic Antiquities and Works of Art: a Critical Review". *International Biodeterioration et Biodegradation*. 1992, 29, 367-375.
- [99] P. Eriksson, LG. Johansson, J. Gullman. "A laboratory study or corrosion reactions on statue bronze". *Corrosion Science*. 1993, 34, 1083-1097
- [100] A. Masalles, E. Lehmann, D. Mannes. "Non destructive investigation of the violinist" a lead sculpture by Pablo Gargallo, using the neutron imaging facility neutra in the Paul Scherrer Institute". *Physics Procedia*. 2015, 69, 636 – 645.
- [101] AE. Hughes, JMC. Mol, M L. Zheludkevich, RG. Buchheit. "Active Protective Coatings, New-Generation Coatings for Metals". *Springer Series in Materials Science*. 2016. ISBN 978-94-017-7538-0.
- [102] N. Perez. *Electrochemistry and Corrosion Science*. 2016. ISBN 978-3-319-24847-9.
- [103] M. Pourbaix. "Thermodynamique and corrosion". *Corrosion science*. 1990, 30, 963-988.
- [104] M. Pourbaix. *Atlas d'équilibres électrochimiques*. Paris: Gauthier-Villars, 1963.
- [105] B. Beverskog, I. Puigdomenech. "Revised pourbaix diagrams for iron at 25–300 °C". *Corrosion Science*. 1996,38, 2121-2135
- [106] C. Wagner and W. Traud. "On the Interpretation of Corrosion Processes Through the Superposition of Electrochemical Partial Processes and on the Potential of Mixed Electrodes". *Classic paper in corrosion science and engineering*. 2006, 62, 843-855)
- [107] N. Perez, *Electrochemistry and Corrosion Science*, 2016, DOI 10.1007/978-3-319-24847-9_8. 2016.
- [108] N. Perez, *Electrochemistry and Corrosion Science*. 2016. DOI 10.1007/978-3-319-24847-9_5.
- [109] JD. Moore. "Long-Term Corrosion Processes of Iron and Steel Shipwrecks in the Marine Environment: A Review of Current Knowledge". *J Mari Arch*. 2015, 10 ,191–204

- [110] S. Saker, N. Aliouane, H. Hammache, S. Chafaa, G. Bouet. "Tetra phosphonic acid as eco-friendly corrosion inhibitor on carbon steel in 3 % NaCl aqueous solution". *Ionics*. 2015 21, 2079 – 2090.
- [111] N. Perez, *Electrochemistry and Corrosion Science*. 2016. DOI 10.1007/978-3-319-24847-9_1.
- [112] C. V. Vedavyasan. *Corrosion*. 2016, 465-473.
- [113] R. Mansour, A. Mohamed Elshafei. "Role of Microorganisms in Corrosion Induction and Prevention". *British Biotechnology Journal*. 2016, 14, 1-11.
- [114] E. Hamzah, M. F. Hussain, Z. Ibrahim, A. Abdolahi. "Corrosion Behaviour of Carbon Steel in Seawater Medium in Presence of *P. aeruginosa* Bacteria". *Arab J Sci Eng*. 2014, 39, 6863 – 6870.
- [115] CC. Gaylarde , HA. Videla. "Localized corrosion induced by a marine *Vibrio*". *Int Biodegr*. 1987, 23, 91-104
- [116] HA. Videla, K. Herrera. "Microbiologically influenced corrosion: looking to the future". *International microbiology*. 2005, 8,169-180.
- [117] FM. AlAbbas, C. Williamson, SM. Bholra, JR. Spear, DL. Olson, Brajendra Mishra, Anthony E. Kakpovbia. "Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80)". *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2013, 78, 34 - 42.
- [118] MS. Shihab, AH. Alshukrawi, and WH. Aldahhan. "Study of Inhibition Effect of Carboxylic Salt Derivative on Corrosion of C1010 Carbon Steel in Saline Solution". *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2016, 52, 1086–1092.
- [119] CG. Dariva and AF. Galio. "Corrosion Inhibitors – Principles, Mechanisms and Applications". 2016.. doi.org/10.5772/57255
- [120] D. Landolt. *Corrosion et chimie de surfaces des métaux*. Presses polytechniques et Universitaires Romandes, Vol. 12, Lausanne, 1997.
- [121] B. Elsener, M. Buchler, F. Stalder, H. Bohni "Amigrating corrosion inhibitor blend for reinforced concrete-Part I: Prevention of corrosion". *Corrosion*. 1999, 55, 1155-1163
- [122] AE. Hughes, JMC. Mol, ML. Zheludkevich, RuG. Buchheit. "Active Protective Coatings". *Springer Series in Materials Science*. 2016. ISBN 978-94-017-7540-3.

- [123] C. Fiaud, C. Lemaitre, N. Pébère. "*Corrosion et anticorrosion*, chapitre 13". Lavoisier, Paris, 2002.
- [124] A.E. Hughes et al. *Active Protective Coatings*, Springer Series in Materials Science. 2016. DOI 10.1007/978-94-017-7540-3.
- [125] FH. Karman, I. Felhösi, E. Kalman, I. Cserny, L. Kover. "The role of oxide layer formation during the corrosion inhibition of mild steel in neutral aqueous media". *Electrochimica Acta*. 1998, 43, 69-75.
- [126] N. Perez, *Electrochemistry and Corrosion Science*. 2016. DOI 10.1007/978-3-319-24847-9_8.
- [127] OK. Abiola and Y. Tobun. "Cocos nucifera L. water as green corrosion inhibitor for acid corrosion of aluminium in HCl solution". *Chinese Chemical Letters*. 2010, 21, 1449-1452.
- [128] HM. Abdel-Fatah, H. Abdel-Samad, AM. Hassan, HE. El-Schiety. "Effect of variation of the structure of amino acids on inhibition of the corrosion of low-alloy steel in ammoniated citric acid solutions". *Res Chem Intermed*. 2014, 40,1675–1690.
- [129] M. Dehdab, M. Shahraki, SM. Habibi-Khorassani. "Theoretical study of inhibition efficiencies of some amino acids on corrosion of carbon steel in acidic media: green corrosion inhibitors". *Amino Acids*. 2016, 48,:291–306.
- [130] L. Touafri, A. Kadri, A. Khelifa, N. Aimeur, N. Ben brahim. "The inhibition and adsorption processes of L-cystéine against the corrosion of X18 carbon steel in 2N H₂SO₄". *Journal of Engineering and Applied Sciences*. 2008, 3, 688 - 696
- [131] R. Zuo. "Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms". *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007, 76, 1245–1253.
- [132] A. Jayaraman, JC. Earthman, TK. Wood. "Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel". *Appl Microbiol Biot*. (1997a), 47 ,62–68.
- [133] S. Ponmariappan, S. Maruthamuthu, N. Palaniswamy and R. Palaniappan. "Corrosion control by bacterial biofilms". 2004, 22, 307- 323.
- [134] JS. Potekhina, NG. Sherisheva, LP. Povetkina, AP. Pospelov, TA. Rakitina, F. Warnecke, G. Gottschalk. "Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats". *Appl Microbiol Biot*. 1999, 52, 639–646.

- [135] A. Jayaraman, FB. Mansfeld, TK. Wood. "Inhibiting sulfatereducing bacteria in biofilms by expressing the antimicrobial peptides indolicidin and bactenecin". *J Ind Microbiol Biot.* (1999b), 22, 167–175.
- [136] A. Jayaraman, PJ. Hallock, RM. Carson, CC. Lee, FB. Mansfeld, TK. Wood. "Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated in situ". *Appl Microbiol Biot.* (1999c), 52, 267–275.
- [137] B. Little, R. Ray. "A perspective on corrosion inhibition by biofilms". *Corrosion.* 2002, 58, 424–428.
- [138] D. Ornek, A. Jayaraman, BC. Syrett, CH. Hsu, FB. Mansfeld, TK. Wood. "Pitting corrosion inhibition of aluminum 2024 by *Bacillus* biofilms secreting polyaspartate or g-polyglutamate". *Appl Microbiol Biot.* (2002a), 58, 651–657.
- [139] II. Tsveteslava, R. Ivanov. "Exopolysaccharides from Lactic acid Bacteria as Corrosion Inhibitors". *Journal of Life Sciences.* 2014, 8, 940-945.
- [140] J. Rodier, B. Legube, N. Merlet et coll. "L'analyse de l'eau". 9^{ème} édition Dinod. 2009. ISBN 978 – 2 – 10 – 007246-0.
- [141] S. Tabak, A. Bensoltane. "L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales". *Nature et Technologie.* 2011, 6, 71-79.
- [142] G. Leyral, JN. Joffin, F. Boineau, J. Figarella. "Microbiologie technique 2 documentation technique". 2^{ème} édition. - Bordeaux : CRDP d'Aquitaine.1998. ISBN 978-2-86617-334-1.
- [143] ME. Orazmen, B. Tribollet. "Electrochemical impedance spectroscopy". ECS-The Electrochemical Society series. Wiley. 2008. ISBN 978-0-470-04140-6.
- [144] AT. Faritov, YG. Rozhdestvenskii, SA. Yamshchikova, ER. Minnikhanova, and AS. Tyusenkov. "Improvement of the Linear Polarization Resistance Method for Testing Steel Corrosion Inhibitors". *Russian Metallurgy (Metally).* 2016, 2016, 1035–1041.
- [145] C. Gabrielli. Identification of electrochemical processes by frequency response analysis. Rapport technique 004/83, Solartron, 1998.

- [146] I. Epelboin, C. Gabrielli, M. Keddam, H. Takenouti "Ac impedance measurements applied to corrosion studies and corrosion rate determination". Electrochemical corrosion testing ed. Mansfeld and U. Bertocci, STP 727, ASTM 1980.
- [147] C. Grauliere, S. Molon-Noblot. La microscopie électronique à balayage : principe et applications". Rev.fr. Histotechnol. 1989, 2, 49-54
- [148] FM. AlAbbas, C. Williamson, SM. Bhola, JR. Spear, DL. Olson, B. Mishra and AE. Kakpovbia. "Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behaviour of low alloy, high-strength steel (API-5L X80) ". Int. Biodeter. Biodegrad. 2013, 78, 34–42.
- [149] E. Trostmann, B. Frolund, BH. Olesen. B. Hilbrecht. "Tap water as a hydraulic pressure medium". New York, Basel, Marcel Dekker, Inc. 2001. ISBN 0-8247-0505-X
- [150] F. Garcia, ALR Lopez, J.C. Guille, LH Sandoval, C.R.Gonzalez and V. Castano. "Corrosion inhibition in copper by isolated bacteria". Anti-Corros. Methods Mater. 2012, 59, 10–17.
- [151] S. Bragadeeswaran, R. Jeevapriya, K. Prabhu, S. Sophia Rani, T. Balasubramanian. "Exopolysaccharide production by Bacillus cereus GU812900, a fouling marine bacterium". Afr. J. Microbiol. Res. 2011, 5, 4124–4132.
- [152] WH Li, Q. He, ST Zhang, CL. Pei, BR. Hou. "Some new triazole derivatives as inhibitors for mild steel corrosion in acidic medium". J. Appl. Electrochem. 2008, 38, 289- 295.
- [153] ES. Ferreira, C. Giacomelli, FC. Giacomelli and A. Spinelli: "Evaluation of the inhibitor effect of l-ascorbic acid on the corrosion of mild steel". Mater. Chem. Phys. 2004, 83, 129–134.
- [154] ZT. Chang, B. Cherry and M. Marosszeky. "Polarisation behaviour of steel bar samples in concrete in seawater. Part 1: Experimental measurement of polarisation curves of steel in concrete". Corros. Sci. 2008, 50, 357–364.
- [155] H. Castaneda, X. D. Benetton. "SRB-biofilm influence in active corrosion sites formed at the steel electrolyte interface when exposed to artificial seawater conditions". Corros. Sci. 2008, 50, 1169–1183.
- [156] S J Yuan, S O. Pehkonen, Y P. Ting, ET. Kang and K G. Neoh. "Corrosion behavior of type 304 stainless steel in a simulated seawater-based medium in the presence and absence of aerobic pseudomonas NCIMB 2021 bacteria". Ind. Eng. Chem. Res. 2008, 47, 3008–3020.

- [157] E. Almeida, D. Pereira, M. O. Figueiredo, VM M. Lobo and M. Mocillo. "The influence of the interfacial conditions on rust conversion by phosphoric acid". *Corros. Sci.* 1997, 39, 1561–1570.
- [158] G. Gunasekaran, N. Palaniswamy, B V. Apparao and V S. Muralidharan. "Synergistic inhibition in low chloride media". *Electrochim. Acta*, 1997, 42, 1427–1434.
- [159] C. Barchiche, C. Deslouis, O. Gil, P. Refait and B. Tribollet. "Characterisation of calcareous deposits by electrochemical methods: role of sulphates, calcium concentration and temperature". *Electrochim. Acta*, 2004, 49, 2833–2839.
- [160] K. Kavita, A. Mishra, B. Jha. "Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: characterization and applications". *Carbohydrate. Polymers*. 2013, 94, 882–888.
- [161] J. Jin, G. Wu, Z. Zhang, Y. Guan. "Effect of extracellular polymeric substances on corrosion of cast iron in the reclaimed wastewater". *Bioresource Technology*. 2014, 165, 162–165.
- [162] Q. Qu, Y. He, L. Wang, H. Xu, L. Li, Y. Chen, Zhongtao Ding. "Corrosion behavior of cold rolled steel in artificial seawater in the presence of *Bacillus subtilis* C2". *Corrosion Science*. 2015, 91, 321–329.
- [163] RF. Jack, DB. Ringelberg, DC. White. "Differential corrosion rates of carbon steel by combinations of *Bacillus* sp, *Hafnia alvei* and *Desulfovibrio gigas* established by phospholipid analysis of electrode biofilm". *Corros. Sci.* 1992, 33, 1843–1853.
- [164] HZ. Wadood, A. Rajasekar, YP. Ting, AN. Sabari. "Role of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* on Corrosion Behaviour of Stainless Steel" *Arab J Sci Eng*. 2015, 40, 1825 – 1836.
- [165] M E. Orazem et B. Tribollet. *Electrochemical Impedance Spectroscopy* J. Wiley & Sons 2008
- [166] HC Flemming, J. Wingender. "The biofilm matrix". *Nature reviews. Microbiology*. 2010, 8, 623 – 633.