



HAL
open science

Évaluation de la corrosion de la fonte ductile influencée par les microorganismes

Laura Didierjean

► **To cite this version:**

Laura Didierjean. Évaluation de la corrosion de la fonte ductile influencée par les microorganismes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0211 . tel-03604864

HAL Id: tel-03604864

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03604864>

Submitted on 10 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Laura DIDIERJEAN-FIGEL

Évaluation de la corrosion de la fonte ductile influencée par les microorganismes

Le 02 novembre 2021

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme Filipa LOPES
Mme Régine BASSEGUY

PU, CentraleSupélec LGPM, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette
DR, LGC, CNRS, Toulouse

Examineurs :

M. Bernard TRIBOLLET
M. Patrick BILLARD
M. Frédéric JORAND
Mme Christelle DESPAS

DR, LISE, UPMC, Paris
MC, LIEC, UL, Nancy
PU, LCPME, UL, Nancy, directeur de thèse
MC, LCPME, UL, Nancy, co-encadrante de thèse

Membre invité :

Mme Amandine DOLLE

Ingénieure corrosion, Saint-Gobain PAM, Pont à Mousson

Remerciements

Je tenais à remercier messieurs les directeurs qui se sont succédés, au LCPME, Alain Walcarius (jusqu'en 2020) puis Christophe Gantzer, ainsi qu'au Technocentre Saint-Gobain PAM, Arnaud Marchal (jusqu'en 2019) puis Jean-Sébastien David (jusqu'en 2021), de m'avoir accueillie au sein de leurs établissements. Ce travail n'aurait d'ailleurs pas été possible sans le soutien financier de Saint-Gobain PAM qui m'a permis de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Je tenais à remercier Pr Filipa Lopes et Dr Régine Basséguy d'avoir accepté de rapporter mon manuscrit de thèse. J'adresse également mes plus chaleureux remerciements à mes examinateurs et membres de mon comité de thèse Dr Bernard Tribollet et Dr Patrick Billard.

Je remercie mon directeur de thèse Pr Frédéric Jorand, et à ma co-encadrante de thèse Dr Christelle Despas et également mes encadrants de Saint-Gobain PAM Dr Maxime Vaufleury et Dr Carole Hehn puis Carine Alves. Merci pour votre encadrement, vos conseils et votre bienveillance.

Mes remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui m'ont apporté une aide précieuse durant ces années de thèse et ont contribué de près ou de loin à ma réussite. Et en particulier, Claire (LCPME), merci pour ton aide à l'ICP et à la chromatographie ; Mathilde (SGPAM), merci de m'avoir sauvée lorsque l'ICP du LCPME avait rendu l'âme ; Christophe M. et Xavier (LCPME), merci pour votre aide précieuse pour mes qPCR ; Cédric (LCPME), merci pour les nombreux coupons analysés en Raman ; Renaud (LIEC), merci pour les analyses DRX ; Aurélien (LCPME), merci pour les analyses en MEB, parfois bien surprenantes ! Gérard (LCPME), merci mille fois pour les nombreuses coupes de coupons et tous les autres services ; Arlindo et Clotilde (SGPAM) merci de m'avoir accueillie dans votre service de métallographie, la résine ça nous connaît maintenant !! Gyslène (SGPAM), merci pour tous les précieux conseils et merci aussi à Pascale (SGPAM) de m'avoir aidée à organiser et désorganiser ce qui devait être le premier lointain voyage de ma vie... (Je ne remercie pas le Covid-19...) Merci aussi aux personnels de l'administration et du pôle technique (LCPME) (notamment Jean Paul et Patrick, merci pour votre bonne humeur et votre aide). Merci aux personnes de l'équipe ELAN (LCPME), particulièrement pour les discussions constructives pendant les réunions d'équipe. Merci également aux personnes de l'équipe CSI (LCPME). Je tenais également à remercier tous les doctorants que j'ai côtoyés au LCPME-Villers (merci à Samuel, Taiisia, Himanshu, Bachira, Joanna, Elena et tous les autres doctorants des équipes ELAN et CSI). Merci aussi à toutes les autres personnes que j'ai pu croiser et côtoyer durant ces années de thèse au Technocentre Saint-Gobain PAM (Baptiste, Romain, Patrick...). J'adresse également un énorme merci aux personnes de l'équipe MIC. Merci pour tous vos conseils, discussions, pour tous les midis et les pots partagés, toujours dans la bonne humeur, bonne humeur qui me faisait chaud au cœur ! Merci donc à tous les permanents MIC et notamment Christophe M. notre chef d'équipe, David, Hélène, Xavier, Laurence, Isabelle, Sylvie et tous les autres. Merci aussi à tous les non permanents MIC ; les doctorants (Stéphane à mes débuts, Charlène, Manon, Maryse, Honorine et tous les autres), les post doc (Marjorie ; un énorme merci pour tous tes conseils qu'ils soient scientifiques ou personnels, Alice, Anaïs, Guillaume, Séverine, Nicolas, Marion, Marie, et tous les autres). Je tenais également à remercier particulièrement Julie et Véronica, mes

CMI, avec qui j'ai gravi un bon et long bout de chemin (9 ans ça passe à une vitesse folle finalement... !) Merci les filles, vous avez adouci ce chemin semé d'embûches... ! Merci aussi aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer ; Lucile, Antoine et Nicolas.

Enfin, tout ce travail n'aurait pas été possible sans tout ce qui va autour. Alors méga merci à tous mes amis de longue date (notamment à mes Grubériens, à jamais à mes côtés (Adèle, Vincent et Jade), à ma Lydia et à tous les autres). Merci aussi à mes amis de moins longue date (notamment les amis de Romain, devenus miens). Merci à vous tous pour tous les moments de décompression autour d'une bonne bière.

J'exprime également ma reconnaissance envers ma famille... Et en particulier : mes parents Patrick et Yvette, ma sœur Amélie, mon beau-frère Maxime et mes neveux Melvyn et Mahé. Vous avez toujours cru en moi, vous m'avez toujours soutenue et poussée vers le haut durant toutes mes études et même bien avant. Je n'oublie pas non plus ma belle-famille notamment Chloé ma belle-sœur. Un grand merci à toute ma famille, vous m'avez vraiment permis de passer de merveilleux moments de détente, loin de la thèse, alors merci, merci.

Enfin, mille mercis à mon mari, Romain. Tu es toujours à mes côtés, tu as réussi à emporter tous mes moments de doutes et à me porter vers le haut. En fait, un merci n'est même pas à la hauteur de ce que je ressens. Tu m'as apporté tellement de choses dans cette aventure, que cette thèse, c'est aussi un peu la tienne en réalité.

Du plus profond de mon cœur, merci à tous.



Table des matières

Liste des abréviations	8
Introduction générale	10
Chapitre I : Synthèse bibliographique	18
I-1. Les canalisations en fonte de Saint-Gobain PAM.....	20
I-2. Problématique d'altération des surfaces externes des canalisations	21
I-3. La corrosion	23
I-3.1. Description des différents types de corrosion.....	23
I-3.2. Cas de la fonte en milieu anoxique.....	24
I-3.3. Les produits de corrosion	28
I-4. La corrosion influencée par les microorganismes (MIC) en anoxie.....	29
I-4.1. Les facteurs qui influencent la MIC dans les sols.....	31
I-4.2. Procédures à suivre pour démontrer l'existence d'une MIC	50
Chapitre II : Techniques expérimentales	52
II-1. Préparation des coupons en fonte	54
II-2. Description et préparation des espèces bactériennes	57
II-2.1. Description des espèces bactériennes.....	57
II-2.2. Production des suspensions bactériennes	58
II-3. Préparation des suspensions de sols	59
II-4. Tests de (bio)corrosion.....	60
II-4.1. Incubation des coupons avec les microorganismes	60
II-4.2. Contrôle abiotique.....	61
II-4.3. Contrôle de stérilité.....	62
II-5. Techniques de mise en évidence de l'évolution de la (bio)corrosion	62
II-5.1. Méthodes d'analyse du solide	66
II-5.2. Méthodes d'analyses des suspensions et solutions	69

Chapitre III : Mise en place du protocole de diagnostic de la (bio)corrosion de la fonte ductile brute de Saint-Gobain PAM	76
III-1 État de surface de la fonte de Saint-Gobain PAM.....	78
III-1.1. Estimation de la masse de la couche native d'oxydes et de la concentration en fer correspondante.....	83
III-1.2. Mise au point des conditions d'extraction des produits de corrosion.....	84
III-2. Test de corrosion physico-chimique de référence.....	91
III-3. Optimisation des milieux de culture.....	94
III-3.1. Sources de facteurs de croissance.....	95
III-3.2. Optimisation de la concentration en extrait de levure dans le milieu de culture.....	99
III-3.3. Minimisation de la concentration en ions chlorure.....	100
III-3.4. Ajustement des concentrations en donneurs et accepteurs d'électrons.....	102
III-4. Conclusion du Chapitre III.....	111
Chapitre IV : Expériences en présence de monocultures et cocultures bactériennes issues de trois groupes métaboliques	114
IV-1. Expérience en présence de cultures mono-espèces bactériennes.....	119
IV-1.1. Corrosion de la fonte influencée par <i>Shewanella putrefaciens</i> , une bactérie ferriréductrice.....	119
IV-1.2. Corrosion de la fonte influencée par <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , une bactérie sulfato réductrice.....	135
IV-1.3. Corrosion de la fonte influencée par <i>Klebsiella mobilis</i> , une bactérie nitrate réductrice.....	147
IV-1.4. Conclusion sur l'effet des cultures mono-espèces sur la corrosion de la fonte.....	158
IV-2. Expérience en présence de cultures double-espèces bactériennes.....	159
IV-2.1. Corrosion de la fonte influencée par les bactéries ferri-réductrice <i>Shewanella putrefaciens</i> et sulfatoréductrice <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	159
IV-2.2. Corrosion de la fonte influencée par les bactéries ferri-réductrice <i>Shewanella putrefaciens</i> et nitrate réductrice <i>Klebsiella mobilis</i>	183
IV-2.3. Corrosion de la fonte influencée par les bactéries sulfatoréductrice <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> et nitrate-réductrice <i>Klebsiella mobilis</i>	190
IV-3. Conclusion du Chapitre IV.....	196

Chapitre V : Expériences en environnements complexes	200
V-1. Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des sols	204
V-2. Préparation des suspensions de sols et stérilisation	209
V-3. Évaluation du caractère corrosif sur des coupons en fonte nue	212
V-3.1. Suspensions de sols	212
V-3.2. Suspensions de sols enrichis	215
V-4. Évaluation du caractère corrosif sur les coupons en fonte revêtue	224
V-4.1. Suivi du fer oxydé.....	225
V-4.2. Détection des produits de corrosion adsorbés/précipités	228
V-4.3. Évaluation de la population microbiologique à 7 mois	229
V-5. Conclusion du Chapitre V	231
Conclusion générale et perspectives	234
Bibliographie	242
Annexes	260
Annexe 1 : Fonctionnement des revêtements barrières	262
Annexe 2 : Spectres Raman de référence	263
Annexe 3 : Extrait du protocole du kit génomique Wizard® Genomic DNA purification	266
Annexe 4 : Extrait du protocole du kit DNaesy® Power Water®	267
Annexe 5 : Mise au point du dénombrement spécifique de <i>Shewanella putrefaciens</i> et <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> par approche moléculaire (qPCR)	269
A5-1. Vérification de la pureté des ADN extraits	269
A5-2. Optimisation des conditions de mise en œuvre des qPCR.....	271
A5-3. Tests de la spécificité des amorces	273
Annexe 6 : Résultat des essais de décontamination des échantillons de sols.....	275
Annexe 7 : Séquençage d'échantillons de sols issus d'enrichissements en IRB et SRB après 13 mois d'incubation	276
Annexe 8 : Aspects visuel des coupons revêtus après 7 mois d'incubation.....	279
Annexe 9 : Séquençage des échantillons du sol de Pau après 7 mois d'incubation	280
RÉSUMÉ	282

Liste des abréviations

- AFM** : *Atomic force microscope* (microscope à force atomique)
- ATCC** : *American type culture collection* (collection américaine de souches microbiennes)
- ASTM** : *American Society for Testing and Materials* (Société américaine pour les essais et les matériaux)
- CR** : *Corrosion rate* (taux de corrosion)
- DET** : *Direct electron transfer* (transfert direct d'électrons)
- DGGE** : *Denaturing gradient gel electrophoresis* (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant)
- DSMZ** : *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (collection allemande de souches microbiennes)
- DO** : Densité optique
- DRX** : Diffraction des rayons X
- Dsr** : *Dissimilatory sulfite reductase* (sulfite réductase dissimilatrice)
- EDS** : *Energy dispersive spectroscopy* (spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie)
- EDTA** : Acide éthylènediaminetétraacétique
- EET** : *Extracellular electron transfer* (transfert extracellulaire d'électrons)
- EIS** : Spectroscopie d'impédance électrochimique
- EPS** : *Extracellular polymeric substances* (substances polymériques extracellulaires)
- FISH** : *Fluorescence in situ hybridization* (hybridation *in situ* en fluorescence)
- ICP AES** : *Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy* (spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif)
- ICP MS** : *Inductively coupled Plasma mass spectrometry* (spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif)
- IOB** : *Iron oxidizing bacteria* (bactérie ferroxydante)
- IONRB** : *Iron oxidizing nitrate reducing bacteria* (bactérie nitrate réductrice-ferroxydante)
- IRB** : *Iron reducing bacteria* (bactérie ferriréductrice)
- LCPME** : Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement
- LD** : Limite de détection
- LIEC** : Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux
- LML** : Lactose monolaurate
- Mb** : Mégabase
- MEB** : Microscopie électronique à balayage
- MET** : *Mediated electron transfer* (transfert indirect d'électrons)
- MET** : Microscopie électronique à transmission
- MIC** : *Microbially influenced corrosion* (corrosion influencée par les microorganismes)
- MOB** : *Manganese-oxidizing bacteria* (bactérie mangano-oxydante)
- N/D** : Non-déterminé
- NRB** : *Nitrate reducing bacteria* (bactérie nitrate réductrice)
- Nrf** : Nitrate réductase périplasmique
- OTU** : *Operationnel taxonomic unit* (unité taxonomique opérationnelle)
- pb** : Paire de bases

qPCR : *quantitative Polymerase Chain Reaction* (réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel)

RV(s) : Rouille(s) verte(s)

SOB : *Sulfur oxidizing bacteria* (bactérie sulfato-oxydante)

SRB : *Sulfate reducing bacteria* (bactérie sulfatoréductrice)

TSA : *Tryptic Soy Agar*

TSB : *Tryptic Soy Broth*

UFC : Unité formant colonie

XPS : *X-ray photoelectron spectrometry* (spectrométrie photoélectronique X)

Introduction générale

Cette thèse s'inscrit dans une collaboration entre le laboratoire de chimie physique microbiologie pour les matériaux et l'environnement (LCPME, UMR Université de Lorraine/CNRS) et l'entreprise Saint-Gobain PAM. Cette entreprise est leader dans la production de systèmes complets de canalisations en fonte ductile, une fonte déformable, pour l'adduction d'eau potable, l'assainissement et l'irrigation. Le Technocentre de Saint-Gobain PAM s'intéresse notamment à la corrosion des tuyaux en fonte ductile survenue après leur pose dans les sols. Elle possède plusieurs champs d'analyse telles que les analyses de la composition chimique des sols, les analyses métallographiques ou encore micrographiques, qui visent à comprendre pourquoi le temps de vie des tuyaux n'est pas identique d'un emplacement à un autre, à prévenir la corrosion, l'anticiper ou la retarder afin d'être les plus compétitifs sur le marché mondial de production de tuyaux. De nombreuses innovations telles que la formulation de nouveaux revêtements (notamment le BioZinalium®) qui viennent recouvrir la fonte ont été faites au cours de ces dernières années permettant de rallonger la durée de vie des canalisations à une centaine d'années. Mais il reste que, dans de très rares cas, des corrosions fulgurantes apparaissent à l'extérieur des tuyaux enterrés dans les sols. Cela entraîne des problèmes économiques avec une perte coûteuse de production due au remplacement prématuré, des fuites des substances transportées, des difficultés de réparation avec une possible suspension du service de distribution de l'eau courante, mais aussi des problèmes de santé publique (contamination du liquide transporté lorsqu'il s'agit d'eau potable) ou environnementaux (contamination de l'eau potable ou rejet de substances polluantes) (Usher *et al.*, 2014).

La corrosion est un processus électrochimique de dégradation d'un matériau qui consiste en la conjugaison d'une réaction d'oxydation du métal (la réaction anodique), et de réduction d'une espèce chimique à la surface de ce même matériau, en particulier l'oxygène, l'eau ou le proton H^+ (réaction cathodique). De nombreuses études s'intéressent à l'impact de la corrosion de la fonte sur l'eau en circulation : au niveau de l'alimentarité, de la corrosion interne, de la formation de biofilm, etc. (Teng *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2014, Xing *et al.*, 2018). Pour pallier ce problème de corrosion interne, la plupart des tuyaux sont désormais pourvus d'un revêtement cimentaire interne. En revanche, peu d'études sont faites sur l'extérieur des canalisations en fonte qui peuvent également subir des phénomènes de corrosion (Melchers, 2019) et c'est tout l'enjeu de ce projet. La corrosion externe des canalisations apparaît le plus souvent suite à une blessure du revêtement externe faite pendant l'enfouissement, des travaux de maintenance ou à cause d'imperfections lors de la production (Romer et Bell, 2001). Les corrosions fulgurantes semblent le plus souvent être accélérées par la présence de microorganismes, on parle alors de

corrosion influencée par les microorganismes, MIC (pour *microbially influenced corrosion*), ou biocorrosion (Little *et al.*, 1991). Ce cas particulier de corrosion met en jeu trois facteurs que sont la nature du matériau, l’environnement (plus spécifiquement le sol et sa propre composante physico-chimique) et les microorganismes qui sont naturellement présents dans les sols et qui peuvent coloniser la surface des tuyaux pour former un biofilm¹. Les microorganismes sont susceptibles de créer des conditions propices à l’apparition du processus de corrosion comme de l’accélérer ou de le ralentir (Beech & Sunner, 2004). Plusieurs groupes métaboliques bactériens pouvant être impliqués dans ce phénomène ont été décrits, ils sont regroupés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Groupes métaboliques bactériens identifiés dans des processus de biocorrosion.

Groupes métaboliques	Références
Bactéries ferriréductrices	Lee et Newman, 2003
Bactéries ferroxydantes	Emerson, 2018
Bactéries sulfatoréductrices	Hamilton, 1985
Bactéries sulfo-oxydantes	Cragolino et Tuovinen, 1984
Bactéries nitrate réductrices	Xu <i>et al.</i> , 2013, Jia <i>et al.</i> , 2017
Bactéries nitrate réductrice-ferroxydantes	Straub <i>et al.</i> , 1996, Miot <i>et al.</i> , 2014
Bactéries méthanogènes	Daniels <i>et al.</i> , 1987, Uchiyama <i>et al.</i> , 2010
Bactéries mangano-oxydantes	Linhardt, 1997

Pour ce projet, nous avons choisi de nous intéresser aux phénomènes de biocorrosion en anoxie. En effet, la plupart des phénomènes de (bio)corrosion des canalisations rapportés par l’entreprise Saint-Gobain PAM impliquent des sols très argileux dont on sait que la diffusion des molécules de dioxygène (O₂) est faible (Calvet, 2003). Trois groupes métaboliques ont retenu notre attention : les bactéries ferriréductrices (IRB), les bactéries sulfatoréductrices (SRB) et les bactéries nitrate réductrices (NRB). Ces groupes sont retrouvés parmi la microflore des sols (Hansel *et al.*, 2008) et sont donc susceptibles de former des biofilms en colonisant les surfaces qu’elles rencontrent telle la surface externe d’une canalisation. La Figure 1 illustre les différentes réactions catalysées par ces groupes et liées au phénomène de biocorrosion. Les IRB réduisent le Fe^{III} en Fe^{II}, ce qui pourrait déstabiliser la couche native d’oxydes protégeant le

¹ Un biofilm est défini comme un film de bactéries multi espèces enrobées d’une matrice extracellulaire auto produite (Costerton *et al.*, 1995).

Fe⁰. La fonte ductile de Saint-Gobain présente en effet, en surface, une couche principalement composée d'oxydes de fer qui est produite par un traitement thermique au cours du processus de fabrication des tuyaux. Cette couche d'oxydes, composée notamment de magnétite (Fe^{II} Fe^{III}O₄) et de divers oxydes ferriques, est relativement stable et « protège » de fait le Fe⁰ de la corrosion. Toute déstabilisation de cette couche (par les IRB notamment) est alors susceptible d'accélérer le processus de corrosion. Les SRB, quant à elles, réduisent le sulfate (SO₄²⁻) en sulfures (S²⁻), le sulfure précipitant avec le Fe^{II} pour former du FeS. Il est également connu que certaines SRB possèdent une hydrogénase qui leur permet de consommer l'hydrogène permettant alors la mise en place d'une cathode et donc formation d'une pile galvanique entretenant alors la corrosion (Pankhania, 1988). Enfin, les NRB réduisent les nitrates (NO₃⁻) en nitrite (NO₂⁻). Ces derniers, plus réactifs que les nitrates, oxydent abiotiquement des espèces Fe^{II} issues des produits de corrosion.

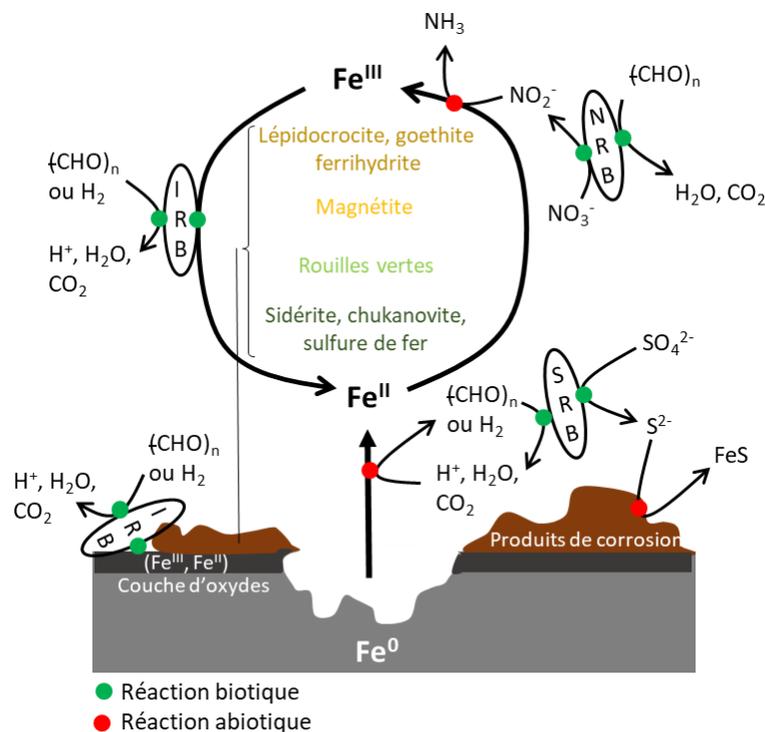


Figure 1 : Réactions connues des groupes métaboliques bactériens ferriréducteurs (IRB), sulfatoréducteurs (SRB) et nitrate réducteurs (NRB) pouvant expliquer une biocorrosion de la fonte en milieu anoxique (adapté de Etique, 2014).

Les biofilms sont généralement constitués d'une multitude d'espèces qui, ensemble, pourraient présenter des comportements synergiques. Il est donc primordial de considérer une approche par coculture pour mieux appréhender le phénomène de biocorrosion.

Notre démarche expérimentale est relativement simple : un coupon en fonte ductile brute issu directement de l'usine de production de tuyau a été placé dans un milieu de cultureensemencé ou non par des microorganismes : i) par un ou deux groupe(s) métabolique(s) (les bactéries ferriréductrices IRB, sulfatoréductrices SRB et nitrate réductrices NRB) représenté(s) par des souches pures de laboratoire ; ii) par des suspensions de sols ou iii) par des enrichissements de suspensions de sols. Les tests ont tous été menés en anoxie à 30 °C (Figure 2).

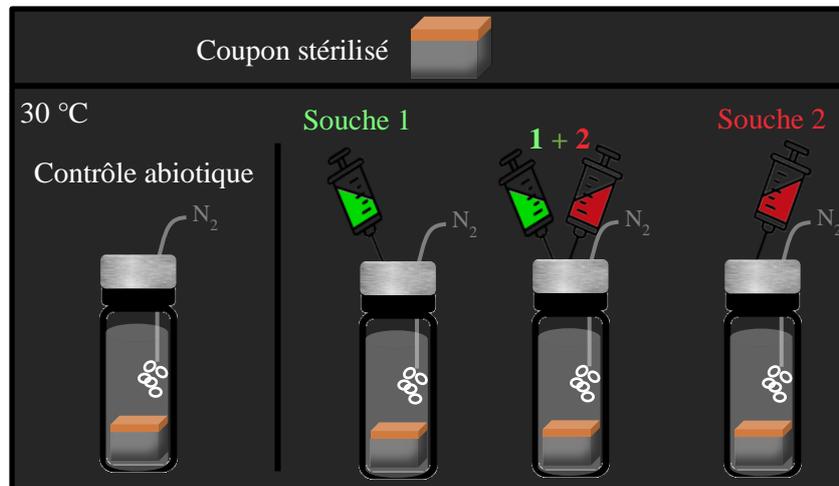


Figure 2 : Schéma des incubations : un coupon préalablement stérilisé est placé dans un flacon avec une souche ou une coculture, un contrôle abiotique est toujours associé aux essais biotiques. Les flacons sont incubés à 30 °C sous N₂.

La technique de mise en évidence de la biocorrosion a été mise en place, développée et améliorée au cours de ce projet. Confronter les résultats abiotiques (i.e. sans aucun organisme vivant) aux résultats biotiques permettra de mettre en évidence ou pas l'influence des microorganismes sur la corrosion de la fonte. Afin de comprendre les mécanismes engendrés dans la corrosion de la fonte influencée par les microorganismes, différentes techniques ont été couplées : des techniques chimiques, microbiologiques et d'analyses de surface.

Ce travail de thèse vise à répondre à divers questionnements :

i) Tout d'abord, distinguer la part de la biocorrosion sur la corrosion physico-chimique en utilisant des outils déjà existants et en les adaptant à nos conditions : maîtrise des contrôles abiotiques pour comparaison systématique entre contrôles abiotiques et tests biotiques ; utilisation de fonte non polie ; élaboration d'un milieu de culture minimum pour éviter toutes interférences ; travail dans des conditions strictement anaérobies, etc. Les résultats sont développés dans le Chapitre III.

ii) Ensuite, déterminer si les microorganismes représentant des groupes métaboliques retenus sont capables d'être impliqués dans la biocorrosion de la fonte. Les études antérieures ont surtout concerné l'acier ou la fonte polie, à l'intérieur des canalisations. Nous souhaitons donc vérifier si les mécanismes décrits dans les phénomènes de MIC de l'acier ou de la fonte polie sont similaires à ceux de la fonte brute. Les résultats sont présentés dans le Chapitre IV.

iii) Nous avons également cherché à montrer quel est le comportement de la fonte vis-à-vis de microorganismes issus directement de sols. Ces tests multi espèces, présentés dans le Chapitre V, visent à se rapprocher un peu plus des conditions réelles.

iv) Enfin, l'efficacité des revêtements protecteurs du groupe Saint-Gobain PAM a été testée en présence de microorganismes. Les tests ont été menés avec ou sans blessure sur les revêtements afin de se rapprocher des conditions réelles. En effet, les blessures sur les tuyaux sont souvent mises en cause dans le déclenchement de phénomènes de corrosion puisqu'elles permettent de laisser la fonte à découvert.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un tout nouvel axe de recherche directement appliqué à la politique de Saint-Gobain qui est de garantir un habitat durable. Il va permettre d'améliorer nos connaissances sur la MIC et à terme de proposer des solutions pour anticiper ce type de phénomène. Ce projet est un véritable challenge et il est original par la nature du matériau utilisé : la fonte ductile brute, non polie et telle qu'elle est en sortie d'usine, par l'approche multi-souches et par les tests conduits dans des extraits de sols bruts, permettant de prendre en compte la diversité microbiologique des sols. De plus, les analyses ont été menées à la fois côté solide (c'est-à-dire le coupon en fonte) et côté solution/suspension.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I-1. Les canalisations en fonte de Saint-Gobain PAM

Saint-Gobain PAM est le premier producteur mondial de canalisations en fonte ductile. Ces canalisations sont enterrées dans les sols de plus de 150 pays à travers le monde. Elles sont enfouies à environ 2 m de profondeur afin d'assurer le transport de l'eau destinée à la consommation humaine et de l'eau résiduaire urbaine. La fonte, un alliage de fer – carbone – silicium, a une concentration en carbone plus élevée (entre 1,7 % et 5 %) que l'acier (entre 0,1 % et 1,7 %). Le carbone s'y trouve soit sous forme de carbure de fer (Fe_3C , cémentite), la fonte est alors appelée fonte blanche ou sous forme de carbone pur (graphite), c'est la fonte grise. La forme des particules de graphite conduit à différents types de fonte grise : la fonte GS (graphite sphéroïdal) aussi appelée fonte ductile et la fonte GL (graphite lamellaire). Dans le cas de la fonte ductile, le graphite cristallise sous forme de sphères en raison d'une étape de désulfuration et de l'introduction d'une petite quantité de magnésium pendant le procédé de fabrication. Cela confère au matériau une forte élasticité et une forte résistance aux chocs et à l'allongement. Contrairement à la fonte ductile, la fonte GL peut être sujette à des fissures et le graphite se présentera sous une forme lamellaire. Les diverses étapes nécessaires pour obtenir des canalisations en fonte ductile de Saint-Gobain PAM sont présentées dans la Figure I-1. De la ferraille (ou du minerai de fer) et du coke (combustible) sont placés dans un haut fourneau, les rendant liquides (température de 1250 °C) (Figure I-1 ①). Le métal liquide obtenu contient une forte teneur en soufre (0,1 % massique), par l'ajout de chaux (oxyde de calcium) cette teneur diminue et permet de garantir l'intégrité des nodules de carbone. La fonte liquide subit ensuite la sphéroïdisation : du magnésium est ajouté, ce qui permet d'obtenir de la fonte dite ductile (Figure I-1 ②). Un inoculant (alliage ferro-silicium) est ensuite ajouté sur la surface d'un moule favorisant ainsi la création de germes nécessaires à la nucléation du graphite et la fonte ductile est façonnée en forme de tuyaux par centrifugation (Figure I-1 ③). Les tuyaux sont recuits et subissent des refroidissements rapides et lents (Figure I-1 ④). Ce traitement thermique entraîne la formation d'une couche d'oxydes de fer native d'environ 50 μm . Cette couche a été mise en évidence dans plusieurs études (Merchant, 1968 ; Pelhan, 1976 ; Corish *et al.*, 2003) et est caractéristique des fontes. Elle présente une structure mixte avec un mélange de différents oxydes de fer tels que la magnétite (Fe_3O_4), l'hématite (Fe_2O_3), la wustite (FeO) et la fayalite (Fe_2SiO_4) (Pelhan, 1976). Cette couche native d'oxydes agit comme une barrière de diffusion et limite la diffusion de l'oxygène dans le métal non oxydé, c'est donc une couche de protection du métal. Pour garantir une protection supplémentaire et optimale, des revêtements externes sont ensuite appliqués (Figure I-1 ⑤ et ⑥).

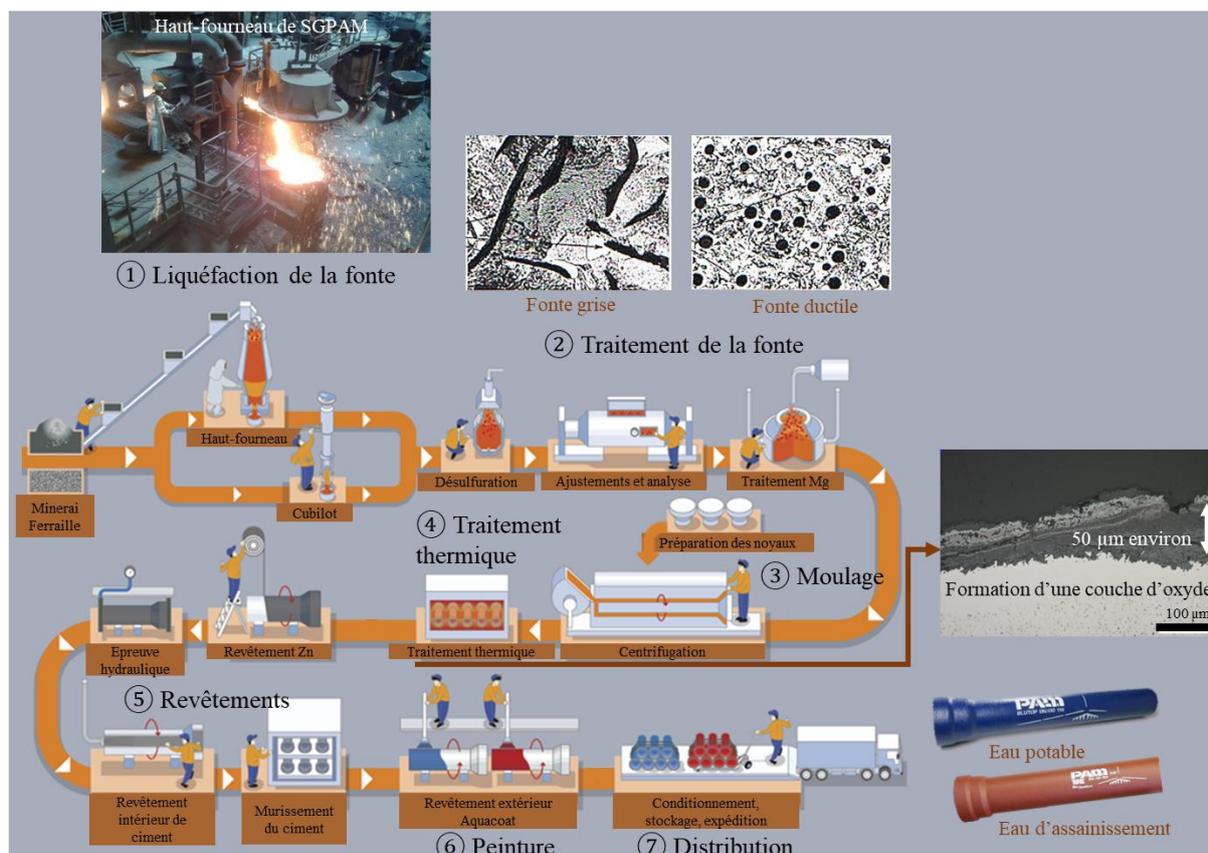


Figure I-1 : Schéma des étapes de fabrication des tuyaux en fonte ductile de Saint-Gobain PAM (Adapté de Saint-Gobain PAM (s. d.). *Ductile iron pipe*. Consulté le 20 novembre 2019 sur <https://www.pamline.com/saint-gobain-pam/ductile-iron-pipe>).

I-2. Problématique d'altération des surfaces externes des canalisations

La surface externe des canalisations enfouies subit les conditions du sol avec des changements physico-chimiques (force ionique, pH, teneur en matière organique, en oxygène, etc.), des changements de température au cours des saisons, ou encore la cohabitation avec la microfaune et la microflore du sol. Tous ces facteurs contribuent à la corrosion (Grandpierre et Moline, 1988). Pour retarder et limiter ce problème de corrosion, la surface externe des canalisations est traitée post production par deux types de revêtement : un revêtement actif à base d'alliage de zinc, aluminium et cuivre (décrit dans l'Annexe 1) puis une peinture de type bouche-pores semi perméable (Aquacoat[®]) (Figure I-2). La peinture bouche pore permet de réduire les émissions de composés organiques volatiles et le risque d'exposition au bisphénol A dans l'environnement du tuyau².

² Saint-Gobain PAM (s. d.). Revêtement biozinalium. <https://www.pamline.fr/biozinalium>, consulté le 20 novembre 2019)

Suite à une blessure occasionnée au cours de l'installation des canalisations ou des différentes phases de manutention (Doyle *et al.*, 2003), deux cas sont possibles : 1) le revêtement bouche pore, le plus externe, est le seul à être endommagé ou 2) le bouche pore et le revêtement actif sont endommagés. Dans le premier cas, la peinture bouche pore sera altérée, laissant alors le revêtement actif composé d'un alliage Zn Al Cu à découvert, le zinc qui a un potentiel inférieur au fer va alors s'oxyder (on parle d'anode sacrificielle). Une couche blanche d'oxydes de zinc se forme alors et elle constitue un produit de conversion stable et insoluble, formant une nouvelle protection. Dans le second cas, les deux revêtements sont altérés, les ions Zn^{2+} formés à partir de l'oxydation du revêtement actif diffusent alors au travers de la peinture bouche pore vers la zone anodique (c'est-à-dire la blessure). La couche d'oxydes de zinc se forme en surface. Dans les deux cas, le revêtement actif joue le rôle de couche auto-cicatrisante au niveau des blessures (cf. Annexe 1).

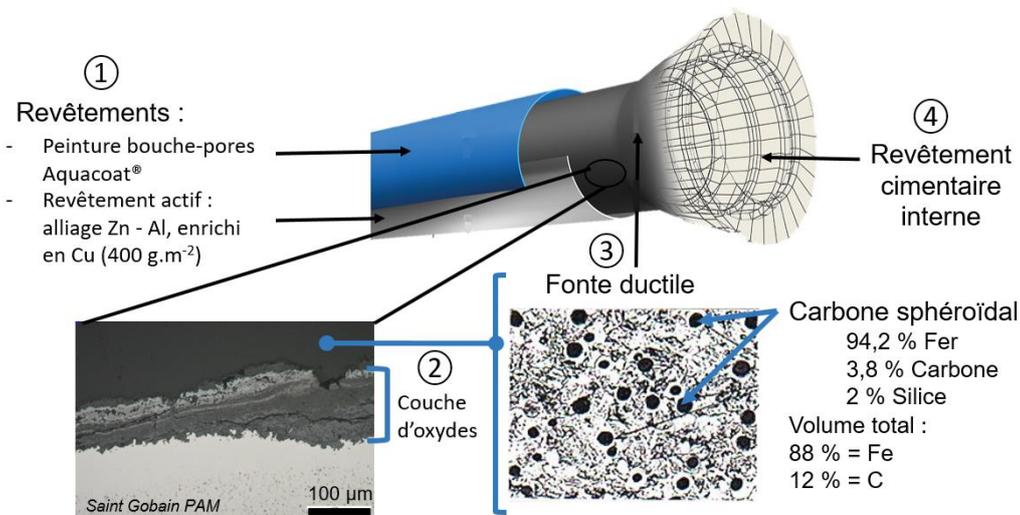


Figure I-2 : Schéma d'une canalisation en fonte de Saint-Gobain PAM et description de sa composition. De l'extérieur vers l'intérieur se trouvent : ① les deux revêtements, ② la couche native d'oxydes, ③ la fonte ductile et ④ le revêtement interne en ciment.

Tous ces traitements apportent aux canalisations une résistance accrue face à leur environnement : elles ont une durée de vie estimée à 100 ans. Dans de rares cas³ et malgré ces couches de protection, la corrosion peut apparaître. Les expertises de Saint-Gobain PAM montrent que la durée de vie d'une canalisation en contact avec des sols peut être réduite de près d'un tiers, soit seulement 30 ans de service au lieu des 100 ans promis. Ces dommages représenteraient, en France, près d'un milliard d'euros de perte par an (Féron, 2002).

³ D'après des rapports internes de la société Saint-Gobain PAM (pas de données quantitatives)

I-3. La corrosion

I-3.1. Description des différents types de corrosion

La norme ISO 8044 : 1999 définit la corrosion comme étant « l'interaction physico-chimique entre un métal et son milieu environnant entraînant des modifications dans les propriétés du métal et souvent une dégradation fonctionnelle du métal lui-même, de son environnement ou du système technique constitué par les deux facteurs ». Il existe deux formes principales de corrosion : i) la corrosion sèche et ii) la corrosion humide. La corrosion sèche survient lorsque des gaz (e.g. O₂, CO, CO₂, Cl₂, SO₂...) attaquent le métal. La corrosion humide (ou aqueuse) survient lorsque le matériau entre en contact avec une solution aqueuse. On y distingue la corrosion mécanique et la corrosion chimique. La première se produit par un effet mécanique lorsqu'un fluide à grande vitesse vient créer une abrasion et/ou une érosion. La corrosion chimique implique un métal (ou un alliage) et un électrolyte et est due à divers processus comme la dissolution des métaux dans l'eau, l'apparition de piles électrochimiques ou l'existence de gradients de concentration. Ces corrosions chimiques peuvent être uniformes ou localisées (type piqûration) (Figure I-3). Lors du processus de corrosion uniforme (ou généralisée), la surface entière du métal sert à l'oxydation et à la réduction (Figure I-3a). L'épaisseur du métal diminue régulièrement car les vitesses de corrosion sont identiques en tout point. La corrosion localisée, quant à elle, (Figure I-3b) peut apparaître par piqûre, par effet crevasse ou sous contrainte. La corrosion par piqûre, qui est la plus rencontrée dans les phénomènes de corrosion influencée par les microorganismes (MIC) (Bryant *et al.*, 1991), est immédiate, localisée et progresse en profondeur afin de former d'importantes perforations. Elle est très difficile à prévoir. La théorie, initiée d'abord par Denison et Darnielle puis reprise par Rossum, montre que la zone anodique est déterminée par des effets locaux ou des microstructures, par exemple une fissure dans la couche d'oxydes de fer ou encore la présence d'un biofilm bactérien (Denison *et al.*, 1939 ; Rossum, 1969). Un germe de piqûre est alors initié provoquant une acidité locale qui permet une dé-passivation du matériau et ce phénomène est entretenu par la présence d'ions chlorure par exemple. En fait, le couplage entre la zone du germe anodique et une surface passive de grande dimension cathodique entraîne une dégradation très rapide.

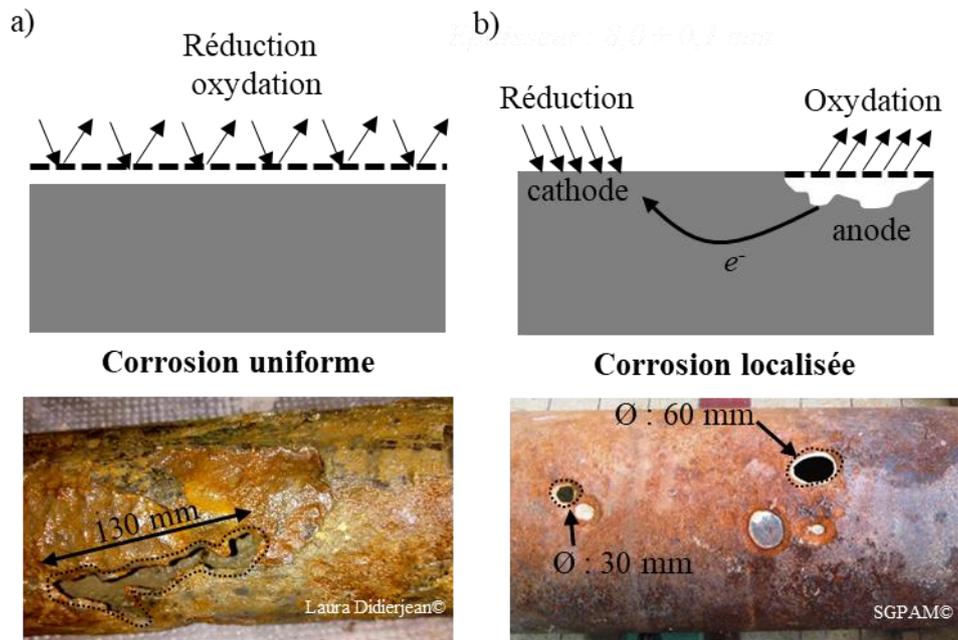


Figure I-3 : Schémas et aspects de tuyaux ayant subi une corrosion (a) uniforme et (b) localisée.
 Sur les schémas, la flèche vers le bas correspond à la réaction de réduction et celle vers le haut, d'oxydation.
 Sur les photographies, les flèches et les pointillés indiquent les lieux de rupture de la canalisation.

I-3.2. Cas de la fonte en milieu anoxique

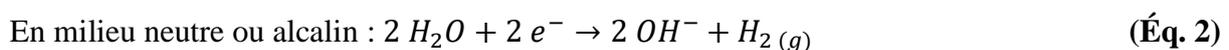
La corrosion est un phénomène physico-chimique spontané et naturel et fait appel aux notions d'électrochimie. Dans tout système électrique, il y a un courant entre un élément positif appelé cathode et un élément négatif appelé anode. La corrosion correspond à une réaction cathodique et une réaction anodique qui se produisent en même temps sur le matériau. Les électrons circulent donc au sein du métal assurant un courant de corrosion d'une anode vers une cathode.

A l'anode, il se produit l'oxydation du métal (Équation 1) :



($Fe^0 \rightarrow Fe^{2+} + 2 e^{-}$ dans le cas de la fonte)

A la cathode, il y a réduction d'un agent oxydant présent dans le milieu afin que les électrons générés à l'anode soient consommés. L'agent oxydant peut être, en anoxie, l'eau (Équations 2 et 3), les nitrates, les sulfates, le dioxyde de carbone, ou encore la matière organique (Grandpierre et Moline, 1988) :



En milieu acide : $2 H^+ + 2 e^- \rightarrow H_2 (g)$

(Éq. 3)

Pour qu'il y ait corrosion, deux principes entrent en jeu :

- La thermodynamique qui permet de définir des potentiels électrochimiques.
- La cinétique des réactions électrochimiques (qui lie l'intensité du courant à la vitesse de corrosion).

I-3.2.1. La thermodynamique d'un phénomène de corrosion

La thermodynamique d'un phénomène de corrosion correspond aux conditions dans lesquelles le métal peut se corroder. Le fer de la fonte, à l'état de valence 0 est instable et a tendance à s'oxyder en Fe^{II} et Fe^{III}. Dans la nature, la forme oxydée Fe^{III} est la plus abondante car c'est dans cet état de valence que le fer est présent dans des minéraux les plus stables thermodynamiquement. Le diagramme de Pourbaix représente les domaines de prédominance et d'existence des différentes formes de l'élément fer dans un domaine de potentiel électrochimique et de pH donné (on parle aussi de diagramme potentiel-pH). Le diagramme présenté sur la Figure I-4 est un diagramme simplifié où seules les espèces oxydées du fer sont Fe²⁺, Fe³⁺, Fe(OH)₂ et Fe(OH)₃. Le Tableau I-1 résume les réactions de chaque couple du fer et les équations des frontières du diagramme de Pourbaix. La superposition du diagramme potentiel-pH de l'eau à celui du fer permet de prédire le comportement du métal (Figure I-4). On distingue trois domaines. Le domaine de la corrosion (en bleu sur la Figure I-4) se trouve dans la région de prédominance du fer sous ses formes ioniques. Le domaine d'immunité (en rouge sur la Figure I-4) est le domaine de stabilité thermodynamique du métal. Enfin, dans le domaine de passivation (en vert sur la Figure I-4), se trouvent les différentes phases d'oxydes et d'hydroxydes de Fe(II) ou Fe(III). Le fer métallique est protégé par une couche d'oxydes qui, en fonction de ses propriétés de perméabilité le protégera plus ou moins de la corrosion.

Les diagrammes potentiel-pH ne fournissent qu'une première information sur la corrosion. En effet, la corrosion thermodynamiquement possible est conditionnée par une cinétique favorable. Pour prévoir les vitesses de réactions de corrosion, il faut donc s'intéresser à la cinétique de corrosion.

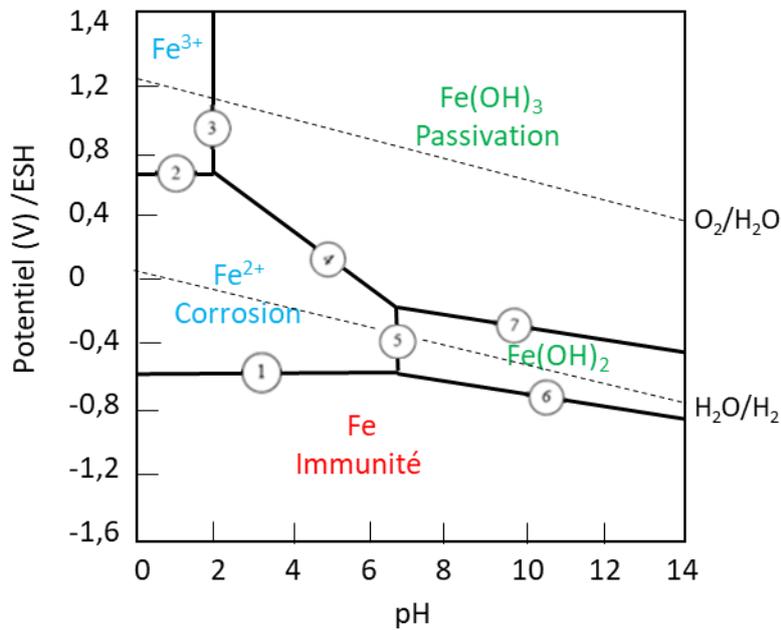


Figure I-4 : Diagramme de Pourbaix simplifié du fer à 25 °C et 1 atm (pour $[Fe^{2+}] = [Fe^{3+}] = 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (Beverskog et Puigdomenech, 1996).

Tableau I-1 : Couples mis en jeu et équations permettant de tracer le diagramme de Pourbaix. Potentiels exprimés par rapport à ENH.

Frontière n°	Couple	Bilan	Équation sur la frontière
1	Fe^{2+} / Fe	$Fe^{2+} + 2 e^- = Fe_{(s)}$ $E = E_1^0 + 0,03 \log ([Fe^{2+}])$	$[Fe^{2+}] = C_{tot}$ $E_1^0 = -0,47 \text{ V}$
2	Fe^{3+} / Fe^{2+}	$Fe^{3+} + e^- = Fe^{2+}$ $E = E_2^0 + 0,06 \log \left(\frac{[Fe^{3+}]}{[Fe^{2+}]} \right)$	$[Fe^{2+}] = [Fe^{3+}]$ $E_2^0 = 0,77 \text{ V}$
3	$Fe(OH)_3 / Fe^{3+}$	$Fe^{3+} + 3 OH^- = Fe(OH)_3$	$[Fe^{3+}] = C_{tot}$ $pH = 2,3$
4	$Fe(OH)_3 / Fe^{2+}$	$Fe(OH)_3 + 3 H^+_{aq} + e^- = Fe^{2+} + 3 H_2O$ $E = E_4^0 + 0,06 \log \left(\frac{[H^+]^3}{[Fe^{2+}]} \right)$	$[Fe^{2+}] = C_{tot}$ $E_4 = E_4^0 + 0,06 - 0,18 \text{ pH}$
5	$Fe(OH)_2 / Fe^{2+}$	$Fe^{2+} + 2 OH^- = Fe(OH)_2$	$[Fe^{2+}] = C_{tot}$ $pH = 7$
6	$Fe(OH)_2 / Fe$	$Fe(OH)_2 + 2 H^+_{aq} + 2 e^- = Fe_{(s)} + 2 H_2O$ $E = E_6^0 + \frac{0,06}{2} \log \left(\frac{[H^+]^2}{1} \right)$	$E_6 = E_6^0 - 0,06 \text{ pH}$
7	$Fe(OH)_3 / Fe(OH)_2$	$Fe(OH)_3 + H^+_{aq} + e^- = Fe(OH)_2 + H_2O$ $E = E_7^0 + 0,06 \log \left(\frac{[H^+]}{1} \right)$	$E_7 = E_7^0 - 0,06 \text{ pH}$

I-3.2.2. La cinétique de corrosion

Un métal en contact avec une solution prend un certain potentiel au repos, on parle alors de potentiel d'abandon. Cette valeur de potentiel caractérise l'équilibre thermodynamique du métal en contact avec la solution considérée. Si un processus de corrosion se produit, cela correspond à l'égalité des vitesses des réactions d'oxydation (oxydation du métal) et de réduction (réduction de l'espèce Ox du second couple impliqué, composé présent en solution). Ces réactions ont lieu simultanément à la surface du métal. Les courants anodique et cathodique sont de même valeur et correspondent au courant de corrosion (noté i_{corr}) (Équation 4). Le potentiel mesuré est alors appelé potentiel de corrosion, E_{corr} .

$$|i_{\text{anodique}}| = |i_{\text{cathodique}}| = i_0 = i_{\text{corr}} \quad \text{soit} \quad i_{\text{anodique}} + i_{\text{cathodique}} = 0 \quad (\text{Éq. 4})$$

Pour étudier les courants de corrosion, un montage électrochimique à trois électrodes (référence, travail et contre électrode) est utilisé ce qui permet de tracer des courbes intensité-potential, dites courbe de polarisation (Figure I-5).

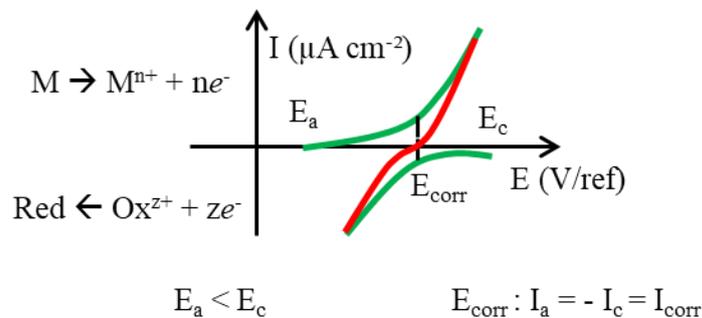


Figure I-5 : Courbes intensité-potential obtenues sur des matériaux corrodables. Le potentiel d'équilibre électrochimique de l'anode est notée E_a et celui de la cathode E_c . La corrosion a lieu uniquement si $E_c > E_a$, le potentiel de corrosion est alors noté E_{corr} .

Pour déterminer le courant et le potentiel de corrosion, on préférera tracer $E = f(\log i \text{ ou } \ln i)$ que l'on nomme diagramme d'Evans (Figure I-6). L'évolution des courants en fonction du potentiel s'exprime à partir de relation de Butler Volmer de chacun des couples mis en jeu (Bard et Faulkner, 2002 ; Équations 5 et 6) :

Pour la partie anodique :

$$i_{\text{anodique}}(Fe) = i_{0(Fe)} e^{\frac{(1-\alpha_{Fe})nF(E-E_{eq}(Fe))}{RT}} \quad E = E_{eq}(Fe) + \frac{RT}{(1-\alpha_{Fe})nF} \ln \frac{i}{i_{0(Fe)}} \quad (\text{Éq. 5})$$

Pour la partie cathodique :

$$i_{cathodique(Ox)} = i_{0(Ox)} e^{\frac{-\alpha_{Ox} n F (E - E_{eq(Ox)})}{RT}} \quad E = E_{eq(Ox)} + \frac{RT}{-\alpha_{Ox} n F} \ln \frac{i}{i_{0(Ox)}} \quad (\text{Éq. 6})$$

Les valeurs numériques des deux paramètres E_{corr} et i_{corr} correspondent aux coordonnées de l'intersection entre les deux droites $E=f(\ln i)$ déduites des Équations 5 et 6 (expressions provenant des approximations de Tafel (Bard et Faulkner, 2002), Équation 7) :

$$E_{Corr} = E_{eq(Fe)} + \frac{RT}{(1-\alpha_{Fe})nF} \ln \frac{i_{corr}}{i_{0(Fe)}} = E_{eq(Ox)} + \frac{RT}{-\alpha_{Ox}nF} \ln \frac{i_{corr}}{i_{0(Ox)}} \quad (\text{Éq. 7})$$

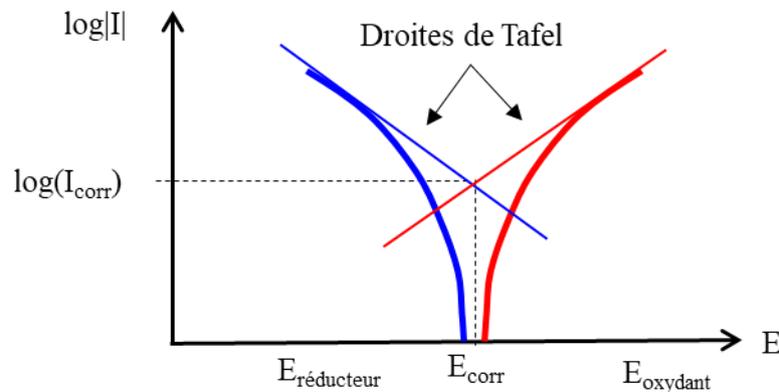


Figure I-6 : Représentation des droites de Tafel. Le courant anodique est représenté en rouge et le courant cathodique en bleu.

Au cours des processus de corrosion, soit l'oxyde formé est soluble et la réaction de corrosion continue, soit l'oxyde formé est insoluble et provoque un ralentissement voire même un arrêt de la réaction. Cette couche de produits de corrosion agit comme une « protection » de la surface du métal. Si cette couche n'est pas parfaitement imperméable et/ou si les conditions environnementales changent, les produits de corrosion subissent des modifications et le processus de corrosion peut reprendre. L'état de surface du métal ou son évolution (présence d'un film d'oxydes et d'irrégularités de surface) peuvent donc influencer le processus électrochimique et favoriser la corrosion.

I-3.3. Les produits de corrosion

Plusieurs produits de corrosion à base de fer existent et varient en fonction de l'environnement avec lequel ils sont en contact, et plus particulièrement en fonction de la température, du pH, de la présence de chlorure, de carbonate, d'oxygène et d'ions sulfates (Usher *et al.*, 2014). Les produits de corrosion représentent ce qu'on appelle communément la rouille qui est en fait un mélange de différentes phases. Le Tableau I-2 regroupe les principaux produits de corrosion du fer et leurs caractéristiques. Dans la littérature, le comportement de différents oxydes a été mis

en lumière : certains oxydes sont thermodynamiquement stables (e.g. magnétite et sidérite), d'autres oxydes sont connus pour être instables (e.g. goethite et lépidocrocite).

Comme les mécanismes de corrosion sont complexes et variés, la détermination des produits de corrosion permet d'apporter des éléments de compréhension. En fonction du degré d'oxydation du fer présent dans les produits de corrosion, il y en aura qui se formeront plutôt en présence de dioxygène et d'autres plutôt en anaérobie. En contact avec le dioxygène, la lépidocrocite (γ -FeOOH) ou la goethite (α -FeOOH) sont retrouvées, alors que dans les zones anoxiques, la rouille verte ou le sulfure de fer prédominent. De plus, en fonction des zones cathodiques et des zones anodiques, les produits de corrosion ne sont pas du même type. Refait *et al.*, 2016 ont montré qu'un acier immergé pendant 6 ans dans l'eau de mer présentait une partie cathodique composée de magnétite et de sidérite, la partie anode était quant à elle composée de rouille verte sulfatée (Refait *et al.*, 2016). Enfin, la présence de certains produits de corrosion renseigne même parfois sur une éventuelle intervention des microorganismes. Par exemple, il est reconnu que la présence de sulfure de fer est synonyme d'activité microbienne sulfato-réductrice (Enning et Garrelfs, 2014).

I-4. La corrosion influencée par les microorganismes (MIC) en anoxie

Le coût global de la corrosion a été estimé à 3,4 % du produit national brut mondial (NACE, 2020). Des chercheurs estiment d'ailleurs que 20 % des problèmes de corrosion seraient liés aux microorganismes naturellement présents dans l'environnement du matériau (sols, eaux, atmosphère) (Little *et al.*, 2020a). L'action des bactéries sur les matériaux a été mise en évidence dans les années 1930-1950 et le terme MIC « *microbial influenced (induced) corrosion* » est introduit la première fois en France par Chantereau et Bouffard (1980) pour lesquels « la corrosion bactérienne rassemble tous les phénomènes de corrosion où les bactéries agissent directement ou par l'intermédiaire de leur métabolisme, en créant les conditions favorables à son établissement ». Les bactéries ne conduisent donc pas à une forme singulière de corrosion, elles viennent en réalité modifier la cinétique de la corrosion (Libert et Bildstein, 2015). Ainsi, les phénomènes de MIC peuvent être de grandes ampleurs, ils sont complexes et nécessitent une approche multidisciplinaire qui réunit la microbiologie, la physico-chimie des surfaces et l'électrochimie (Libert et Bildstein, 2015). Après 50 ans de recherche, une analyse récente de la littérature estime qu'aucun progrès majeur n'a été obtenu concernant la maîtrise ou la compréhension des phénomènes de MIC (Little *et al.*, 2020a).

Tableau I-2 : Caractéristiques des principaux produits de corrosion du fer (adapté de Vega, 2004).

	Produit de corrosion	Formule	Valence du fer	Masse volumique (g cm ³)	Effet protecteur
	Wustite	FeO	II	5,70	
Oxydes de fer	Magnétite	Fe ₃ O ₄	II / III	5,18	+ (Cole <i>et al.</i> , 2011 ; Yang <i>et al.</i> , 2014)
	Hématite	α-Fe ₂ O ₃	III	5,24	
	Maghémite	γ-Fe ₂ O ₃	III	4,87	
	Goethite	α-FeOOH	III	3,80	
Oxyhydroxydes ferriques	Akaganéite	β-FeOOH	III	3,56	- (Tang <i>et al.</i> , 2006 ; Yang <i>et al.</i> , 2012)
	Lépidocrocite	γ-FeOOH	III	3,85	
	Rouille verte	Fe ^{II} ₄ Fe ^{III} ₂ (OH) ₁₂ X _x • nH ₂ O	II / III	2,37 - 2,54	
Sulfures de fer	Mackinawite	Fe _{1+x} S	II	4,17	± (Stumper, 1923 ; Stott, 1993 ; Ma <i>et al.</i> , 2000 ; Wen <i>et al.</i> , 2018)
	Greigite	Fe ₃ S ₄	II / III	4,049	
	Pyrrhotite	Fe _{1-x} S		4,69	
	Marcasite	FeS ₂	II	4,88	
	Pyrite	FeS ₂	II	5,02	
Composés carbonatés	Sidérite	FeCO ₃	II	3,87	+ (Cole <i>et al.</i> , 2011 ; Yang <i>et al.</i> , 2014)
	Chukanovite	Fe ₂ (CO ₃)(OH) ₂	II	3,60	
Composé silicate	Fayalite	Fe ₂ SiO ₄		4,39	

I-4.1. Les facteurs qui influencent la MIC dans les sols

Étudier la MIC nécessite de considérer trois facteurs (Féron *et al.*, 2002) (Figure I-7) :

- Le facteur « matériau » : ici la fonte ductile et dont nous avons présenté les principales caractéristiques précédemment,
- le facteur « environnement » : ici le sol,
- le facteur « microorganismes » c'est-à-dire les bactéries du sol.

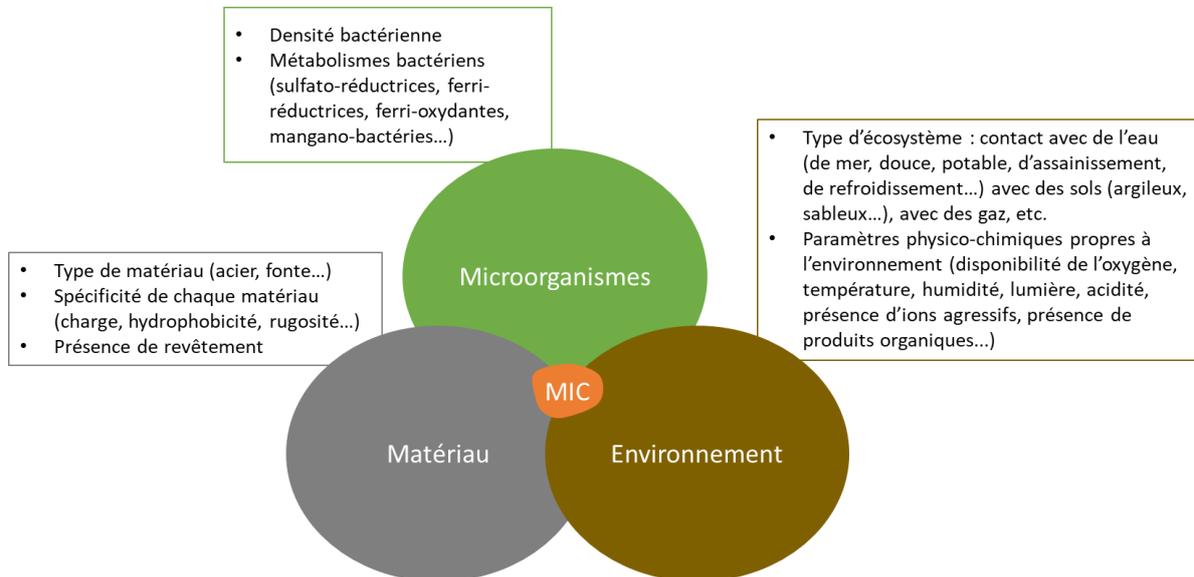


Figure I-7 : Facteurs impliqués et pouvant intervenir dans le phénomène de corrosion influencée par les microorganismes (MIC).

I-4.1.1. L'environnement des tuyaux enfouis : le sol

Les canalisations sont enfouies dans une fouille débarrassée des cailloux et objets tranchants, un remblayage est effectué en sable afin de créer un lit de pose (10 cm environ). Par-dessus, il est placé un remblai en sable de protection (10 cm environ). Au fur et à mesure des années, un mouvement de terrain naturel s'installe et les canalisations peuvent être en contact direct avec le sol. Un sol correspond à la couche supérieure de la croûte terrestre qui provient de l'altération du sous-sol (roche mère) et des processus physiques/chimiques et biologiques. Le sol est composé de constituants solides minéraux (95 à 98 %) et organiques (2 à 5 %), d'eau, de gaz (essentiellement CO₂, O₂, N₂ et vapeur d'eau) et d'organismes vivants (norme ISO 11074 :2015). Chaque sol a donc ses propres caractéristiques. Les facteurs généralement pris en compte pour déterminer le taux de corrosivité d'un sol sont (Romanoff, 1964 ; O'Day, 1989 ; Robinson, 1993) :

- Sa texture (proportions relatives en sable grossier, sable fin, limon, argile) et sa structure (porosité et donc perméabilité) qui vont notamment jouer un rôle sur la disponibilité en oxygène. Par exemple, un sol argileux, qui restreint l'oxygène car il est composé de fines particules, facilitera la croissance des microorganismes anaérobies (Keiluweit *et al.*, 2018). La texture du sol impactera également l'infiltration et la rétention de l'eau et donc la disponibilité de l'eau.
- Sa conductivité qui indique sa capacité à véhiculer les courants électriques. Plus elle est forte, plus les charges se déplacent facilement et plus le sol est jugé agressif. La conductivité est dépendante de i) la concentration en ions, plus le sol est riche en sels, plus elle est importante ; ii) la teneur en eau du sol (qui est elle-même liée à la texture du sol) ; iii) la température du sol, plus la température est importante plus la conductivité augmente. La conductivité variera de 700 à 3000 S cm⁻¹ pour les sols argileux (qui retiennent fortement l'eau), de 5000 à 10000 S cm⁻¹ pour les sols de limons, et supérieure à 10000 S cm⁻¹ pour les sables (qui retiennent faiblement l'eau).
- Son potentiel rédox, qui permet de calculer le pouvoir oxydant ou réducteur d'espèces chimiques et prévoit leur réactivité entre elles. Plus le potentiel sera faible (en dessous de 100 mV), moins le sol sera aéré et les conditions d'anoxie prédomineront, ce qui pourra favoriser le développement de microorganismes anaérobies.
- Son pH, généralement compris entre 4 et 8. Au-delà de ces valeurs, le sol peut être jugé comme agressif.
- La présence d'ions inorganiques (comme le sulfure, chlorure, nitrate, etc.) qui peuvent influencer sa résistivité. D'autre part, l'identification de ces ions peut permettre d'identifier des mécanismes mis en jeu. Par exemple, la présence d'ions sulfures peut traduire la présence de bactéries sulfatoréductrices qui sont connues pour accélérer les processus de corrosion.
- Sa teneur en matières organiques qui apporteront les nutriments nécessaires à la croissance bactérienne.
- Sa teneur en eau via la pluviométrie qui peut fortement faire varier sa corrosivité en favorisant la corrosion humide (Cole *et al.*, 2011).

L'environnement local des canalisations enterrées joue un rôle important dans la corrosion et les nombreux paramètres, décrits précédemment, agissant de concert, vont induire des niveaux de corrosivité différents. Il existe des classifications et des normes qui essaient d'évaluer la capacité des sols à favoriser la corrosion. Par exemple, « *The American Water Works Association and the American National Standards Institute* » (ANSI/AWWA (1999) C105/A21.5–99 standards) a établi un système à points permettant d'évaluer le taux de corrosivité d'un sol envers des tuyaux en fonte (Tableau I-3). Si dix points sont atteints, cela signifie que le sol est corrosif vis-à-vis des tuyaux en fonte ductile. Cette norme prend en compte cinq paramètres différents : la résistivité, le pH, le potentiel redox, la concentration en sulfure et l'humidité. Elle n'est donc pas entièrement exhaustive, des études de corrélation ont d'ailleurs montré que la résistivité et le pH ne sont pas forcément les meilleurs indices pour juger de l'agressivité d'un sol (Jakobs et Hewes, 1987 ; O'Day, 1989 ; Doyle *et al.*, 2003). De plus, le seul paramètre en lien avec l'état microbiologique d'un sol est la présence de sulfure. Cela traduit la présence des groupes métaboliques sulfatoréductrice ou thiosulfato-réductrice et non pas la présence d'autres groupes susceptibles d'influencer la corrosion. Marciales *et al.*, 2019 ont comparé 10 modèles de prédiction de la MIC et ont montré que la plupart du temps, seules les SRB sont considérées et que les modèles ne sont souvent pas validés en laboratoire (Marciales *et al.*, 2019).

De plus, certains auteurs avancent que tout facteur favorisant la croissance ou toute activité bactérienne, comme l'apport de nutriments via la matière organique du sol, les fertilisants du sol (azote par exemple), ou l'augmentation saisonnière des températures, augmenterait la vitesse de corrosion (Little *et al.*, 1991 ; Melchers, 2007, Cole *et al.*, 2012). De nombreux facteurs affectent également la distribution des microorganismes dans le sol comme le pH, le type d'écosystème, le niveau de nutriments, la disponibilité en oxygène, le niveau de lumière, la température et l'humidité (Usher *et al.*, 2014). Enfin, la nature et l'évolution du sol ont un impact sur l'activité, la composition et la communauté microbienne. Les sols affectent donc significativement la croissance, la répartition dans l'espace, l'activité et la composition microbienne.

Tableau I-3 : Système de score pour estimer la corrosivité des sols (adapté de ANSI/AWWA C105/A21.5-99).

Caractéristiques du sol	Points
Conductivité[†] (S cm⁻¹)	
< 700	10
700 – 1000	8
1000 – 1200	5
1200 – 1500	2
1500 – 2000	1
> 2000	0
pH	
0 – 2	5
2 – 4	3
4 – 6,5	0
6,5 – 7,5	0 [‡]
7,5 – 8,5	0
> 8,5	3
Potentiel redox (mV)	
> +100	0
+50 à +100	3,5
0 à +50	4
Négative	5
Concentration en sulfure[‡]	
Positive	3,5
Trace	2
Nulle	0
Humidité	
Drainage pauvre, continuellement humide	2
Drainage moyen, généralement humide	1
Drainage bon, généralement sec	0

[†] Basé sur une seule électrode à la profondeur du tuyau.

[‡] Si les sulfures sont présents et que le potentiel redox est bas ou négatif, ajouter trois points.

I-4.1.2. Le facteur microorganisme : colonisation bactérienne des tuyaux

Il a été démontré que le facteur microbiologique peut avoir un impact considérable sur la corrosion des matériaux métalliques, en l'accéléralant ou en la ralentissant (Salgar-Chaparro *et al.*, 2020). Les microorganismes, et en particulier les bactéries, sont majoritairement sessiles dans l'environnement, elles s'organisent en biofilm de quelques μm à quelques mm d'épaisseur (Costerton *et al.*, 1995). Il faut souligner que le biofilm se compose de tout un ensemble de

microorganismes (bactéries, protozoaires, microchampignons etc.) qui adhèrent entre eux et sur une surface. La matrice extracellulaire polymérique autoproduite, assurant l'adhésion et la protection de l'édifice, est constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et de lipides, appelés substances polymériques extra-cellulaires (EPS, Costerton, 1999). Les tuyaux enterrés dans les sols constituent donc une surface colonisable par les bactéries naturellement présentes (Figure I-8).

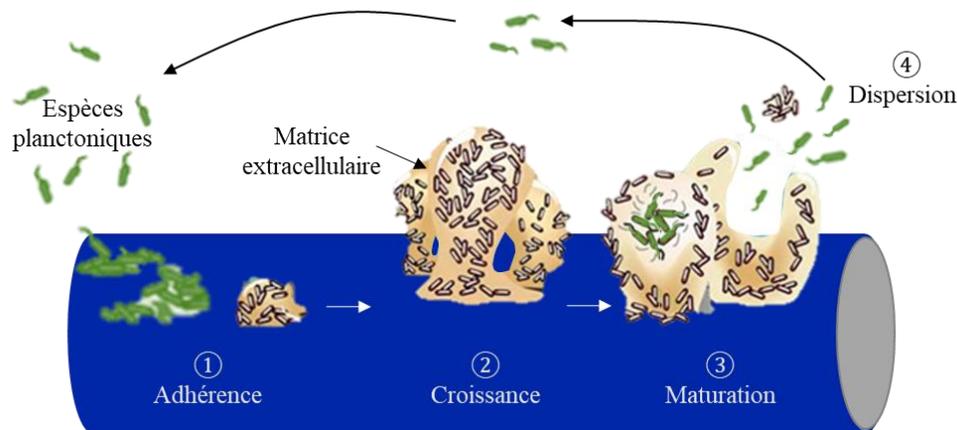


Figure I-8 : Formation d'un biofilm sur un tuyau enfoui. ① Les bactéries planctoniques isolées adhèrent à la surface et s'organisent en amas. ② Elles s'ancrent de façon irréversible via des appendices cellulaires et des exopolymères autoproduits. ③ Le biofilm arrive à maturation et acquiert une structure tridimensionnelle. ④ Les bactéries, de par le vieillissement du biofilm, de carences ou de stress, se dispersent, un certain nombre de cellules retournent à l'état planctonique et peuvent former plus loin un nouveau biofilm.

La vie en biofilm donne aux microorganismes des capacités physiologiques spécifiques. Par exemple, les bactéries présentent une meilleure résistance aux agents antimicrobiens que sous forme planctonique et s'autorégulent notamment par une communication chimique telle que le « *quorum sensing* » (Donlan et Costerton, 2002). Des recherches en génétique ont montré que certaines espèces microbiennes en biofilm induisent l'expression de gènes comme ceux liés à la synthèse de flagelles (O'Toole et Kolter, 1998 ; Fuqua *et al.*, 2001 ; Vu *et al.*, 2009). Du point de vue morphologique et structurel, le biofilm provoque une distribution de la biomasse non uniforme, les micro-colonies vont s'organiser de telle sorte que des "canaux" internes assurent la circulation du milieu environnant avec ses nutriments (Flemming *et al.*, 2016) et permettent un développement bactérien aisé, grâce à cette stabilité et protection.

L'action des biofilms bactériens sur la corrosion des tuyaux enfouis peut se faire à différents niveaux :

i) Au niveau du type de matériau testé. Il a en effet été montré un effet corrosif d'un biofilm de *D. desulfuricans* sur de l'acier inoxydable AISI 316 (Sheng *et al.*, 2007) mais pas sur de l'acier au carbone SAE 1018 (Perez *et al.*, 2007).

ii) Au niveau des altérations qui se forment lorsque le tuyau ne résiste pas aux conditions d'enfouissement. Ces altérations laissent à découvert les espèces du fer présentes à la surface du tuyau. Elles seraient alors favorisées et plus importantes en présence de certains microorganismes du sol qui ont la capacité de réagir avec les espèces du fer (e.g. bactéries ferriréductrices).

iii) Au niveau des oxydes de fer, qui apparaissent suite aux altérations, et qui ont leur propre charge et rugosité. Ces paramètres peuvent favoriser l'adhésion des microorganismes, et donc contribuer à la colonisation bactérienne (Li et Logan, 2004) et indirectement à l'augmentation de la corrosion.

iv) Au niveau de la diversité des microorganismes en biofilm (différents groupes métaboliques, différentes espèces...) et de leur forte densité puisqu'ils proviennent des sols (Vos *et al.*, 2013). Des bactéries, des archées, des champignons, des algues et d'autres eucaryotes peuvent coexister, être en synergie ou en compétition (Beech et Gaylarde, 1999).

Ce caractère hétérogène du sol, du point de vue microbiologique, aboutit à la création de zones où les concentrations des éléments chimiques sont modifiées. Par exemple, la consommation d'oxygène par les bactéries aérobies va conduire à des zones anoxiques permettant la croissance de bactéries anaérobies (Marsili *et al.*, 2008). De plus, la diversité microbiologique du sol impose une cohabitation de toutes les espèces. Ainsi, Lee *et al.*, 2006 ont montré que la corrosion d'un acier doux 1018 était plus importante en présence de la souche pure *D. desulfuricans* G20 qu'en présence d'une coculture de *D. desulfuricans* G 20 - *Shewanella oneidensis* MR-1 dans des conditions strictement identiques. Sheng *et al.*, 2007 ont également remarqué que la souche *D. desulfuricans* contribue à une augmentation de la corrosion de l'acier inoxydable 316 plus fortement qu'un isolat de bactéries marines. En effet, le biofilm de la souche pure est plus poreux par rapport à celui de l'isolat, l'accès à l'acier est donc facilité. Le biofilm de l'isolat est quant à lui compact, il n'y a pas d'accès à l'acier et il y a formation d'une couche de sulfure de fer protectrice. Au contraire, avec le même matériau (i.e. acier 316) une coculture de SRB et d'IOB (bactérie ferroxydante) isolée d'un système d'eau de refroidissement mène à une corrosion plus importante qu'une culture de SRB seule ou IOB seule (Xu *et al.*, 2008). La compétition entre les microorganismes peut s'installer via la production de composés

nocifs par une espèce bactérienne envers une autre. Par exemple, Jayaraman *et al.*, 1999 ont construit un mutant de *Bacillus subtilis* capable de sécréter des agents anti microbiens (indolicidine, bacternecine et probactenecine) puis ils l'ont mis en présence de SRB (*Desulfovibrio vulgaris* et *Desulfovibrio gigas*). Un biofilm a été formé sur un coupon d'acier SAE 1018 puis les auteurs ont mesuré le taux de corrosion. Les agents anti microbiens produits par *B. subtilis* sont en fait capables d'inhiber la croissance des SRB et par conséquent de réduire le taux de corrosion.

Lorsqu'une MIC est suspectée, un consortia de bactéries, plutôt qu'une seule espèce, est majoritairement retrouvé. Les espèces présentes changeant énormément d'un endroit à un autre et comme il n'est pas possible de cultiver en laboratoire toutes les souches bactériennes présentes dans un sol, il est compliqué de définir quel métabolisme est vraiment impliqué dans les phénomènes de MIC. À noter donc l'importance des consortia bactériens dans la MIC, impliquant alors de nombreux mécanismes cellulaires qui ne mènent donc pas forcément à une augmentation du taux de corrosion. Certains peuvent même être protecteurs, cela dépendra des espèces bactériennes présentes.

I-4.1.2.1. Activités microbiennes et mécanismes mis en jeu

Pour se développer, les microorganismes ont besoin de substrats nutritifs pour leur constitution mais également d'accepteurs et de donneurs d'électrons (Figure I-9). Ces réactions dites dissimilatrices vont apporter l'énergie cellulaire à la bactérie et vont ainsi lui permettre de se maintenir en vie, de se développer et de répondre aux stimuli de son environnement. En fonction des réactions produites, le microorganisme va appartenir à un certain groupe métabolique (i.e. à un regroupement d'êtres vivants capable d'engendrer les mêmes réactions chimiques).

Dans les sols, de nombreux groupes métaboliques cohabitent. Un biofilm bactérien formé sur un tuyau est alors constitué d'une grande variété de groupes métaboliques, ce qui engendre différentes réactions d'oxydoréduction. Les bactéries sont alors capables de participer directement ou non aux réactions électrochimiques cathodiques ou anodiques de la corrosion. Par exemple, en réagissant avec les produits de corrosion, en déstabilisant la couche d'oxydes des matériaux, ou en utilisant une large diversité de donneurs et d'accepteurs d'électrons dont certains sont caractéristiques des environnements corrodés (Fe^{II} , Fe^{III} , sulfure, ...).

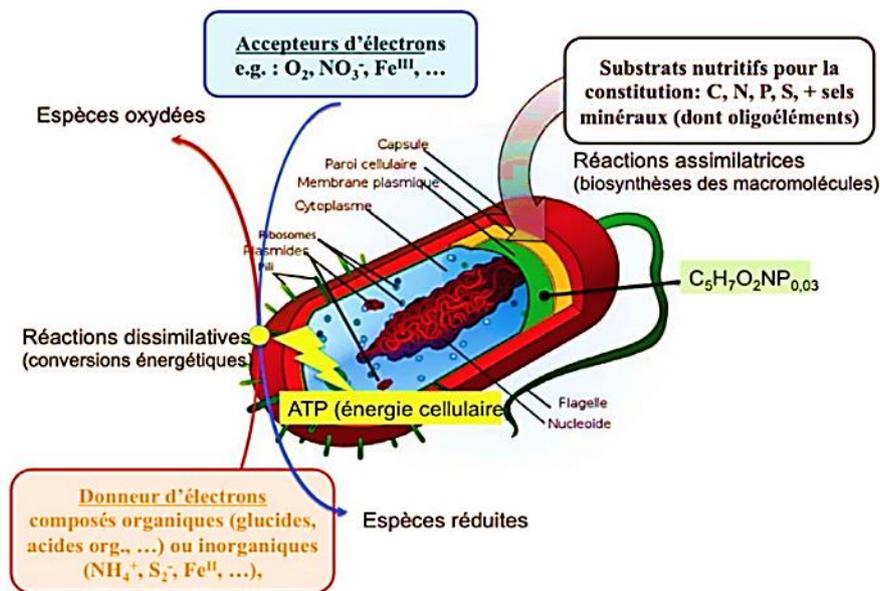


Figure I-9 : Schéma de l'utilisation des donneurs et accepteurs d'électrons permettant des conversions énergétiques (ATP) et des substrats nutritifs permettant la biosynthèse des macromolécules (Jorand, 2017).

Différents exemples de corrosion influencée par les microorganismes (MIC) de l'acier sont illustrés en Figure I-10. Il est possible de regrouper les mécanismes dans trois grandes familles :

i) La première famille correspond au mécanisme de transfert des électrons du métal vers un microorganisme dit « électroactif ». Il s'agit d'un transfert extracellulaire d'électrons (EET). Le transfert peut être direct (DET) ou indirect (via des médiateurs, MET) (Jia *et al.*, 2017). Le DET est rendu possible par exemple par l'implication de nanofilaments conducteurs (Usher *et al.*, 2014). Ces « *nanowires* » sont des appendices filamenteux (extensions membranaires chez *Shewanella* ou pili chez *Geobacter*) transférant les électrons directement à la surface du métal (Loto, 2017). Le MET utilise des médiateurs présents dans le milieu afin de transporter les électrons, telles que les flavines ou encore la riboflavine. Dans la Figure I-10, les groupes métaboliques indiqués par les lettres A, B, C et G utilisent le mécanisme de transfert extracellulaire d'électrons EET. Les bactéries illustrées en A sont méthanogènes et sulfatoréductrices anaérobies, elles extraient des électrons directement de l'acier en produisant du Fe^{II} . Les bactéries en B sont des ferri-oxydantes anaérobies, elles utilisent le nitrate comme accepteur d'électrons et oxydent le Fe^{II} en Fe^{III} qui précipite en oxydes de fer. Les bactéries C sont hétérotrophes anaérobies et réduisent les oxydes de Fe^{III} insolubles en Fe^{II} . Les bactéries illustrées en G sont ferri-oxydantes neutrophiles, elles oxydent les précipités de fer ferreux créant alors une aération différentielle et une cellule galvanique.

ii) La deuxième famille est liée à la corrosion causée par les microorganismes fermentatifs. Ils libèrent des acides organiques qui vont oxyder le métal (Xu et Gu, 2014). Par exemple,

illustrées en E, les bactéries hétérotrophes produisent des acides organiques et des enzymes qui sont capables d'attaquer l'acier (Figure I-10). De plus, ces bactéries consomment l'oxygène, créant un gradient de concentration dans le biofilm et donc des régions anoxiques. Elles recyclent également les nutriments pour d'autres microorganismes.

iii) Enfin la troisième famille correspond aux métabolismes bactériens qui contribuent à accélérer la corrosion en changeant les conditions physico-chimiques de l'environnement. Les bactéries illustrées en D, F et J de la Figure I-10 en sont des exemples. En D, ce sont des bactéries anaérobies sulfatoréductrices réduisant et utilisant les sulfates comme accepteur final d'électrons. Elles sont capables de produire PH_3 , H_2S , FeS qui peuvent précipiter et augmenter le taux de corrosion. Les bactéries en F sont des sulfure-oxydantes qui produisent de l'acide sulfurique, capable d'attaquer l'acier. En J, se trouve du peroxyde d'hydrogène, un agent oxydant, produit par les microorganismes aérobies du sol, capable d'attaquer notamment les aciers.

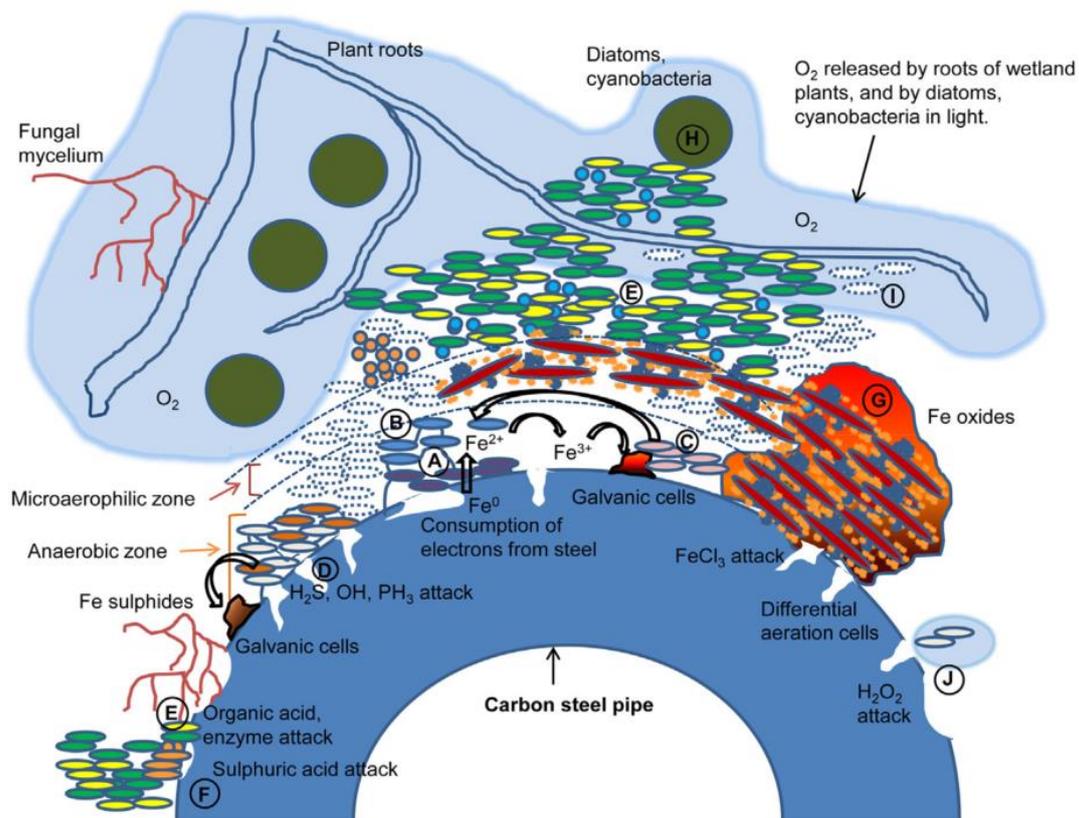


Figure I-10 : Schéma simplifié de quelques mécanismes de MIC d'un tuyau en acier enterré dans un sol. Les lettres représentent les différents groupes métaboliques impliqués dans les mécanismes d'accélération de la corrosion (Usher *et al.*, 2014).

Beaucoup de mécanismes ont été proposés et il est possible qu'aucun d'entre eux ne soit prédominant. En effet, de nombreuses espèces bactériennes interviennent dans le processus de MIC et les paramètres environnementaux rendent le processus encore plus complexe. Par ailleurs, les microorganismes sont impliqués dans la corrosion via deux voies (Little *et al.*, 2020a) :

- Les microorganismes participent directement au processus de transfert de charge lié à la corrosion : des médiateurs redox pourraient participer directement aux réactions (e.g. extraction et consommation directe des électrons du matériau).
- Les microorganismes ne participent pas directement au processus de transfert de charge lié à la corrosion. Ils modifient le milieu et les mécanismes sont donc similaires à la corrosion abiotique (e. g. attaque acide, formation d'une cellule d'aération différentielle...)

Les groupes métaboliques bactériens impliqués dans ces mécanismes sont assez bien documentés : les bactéries sulfatoréductrices (SRB) (Hamilton, 1985), les bactéries ferriréductrices (IRB) (Lee et Newman, 2003), les bactéries nitrate réductrices (NRB) (Xu *et al.*, 2013 ; Jia *et al.*, 2017), les bactéries ferroxydantes (IOB) (Emerson, 2018), les bactéries méthanogènes (Daniels *et al.*, 1987, Uchiyama *et al.*, 2010), les bactéries nitrate réductrices ferroxydantes (IONRB) (Straub *et al.*, 1996 ; Miot *et al.*, 2014), les bactéries sulfo-oxydantes (Cragolino et Tuovinen, 1984) ou encore les bactéries mangano-oxydantes (Linhardt, 1997). D'ailleurs, plusieurs études ont permis de mettre en évidence des bactéries ferriréductrices et sulfatoréductrices proches de canalisations en fonte déjà corrodées (King *et al.*, 1986 ; Kajiyama et Koyama, 1997 ; Doyle *et al.*, 2003). Pour ce travail de thèse, trois groupes métaboliques ont retenus notre attention : les IRB, SRB et NRB qui sont décrits ci-après.

I-4.1.2.2. Les bactéries ferriréductrices (IRB)

Le rôle des bactéries ferriréductrices (IRB) dans le processus de la MIC est peu connu et est controversé car plusieurs travaux ont montré que ce groupe métabolique est capable d'inhiber la corrosion par la formation d'un biofilm protecteur empêchant la dissolution des produits de corrosion du Fe^{II} (Dubiel *et al.*, 2002 ; Herrera et Videla, 2009). Toutefois, d'autres études ont clairement mis en évidence l'implication des IRB dans la MIC de l'acier (Little *et al.*, 1998). Le genre *Shewanella*, par exemple, est une IRB à respiration obligatoire. En aérobiose, le dioxygène est l'accepteur final d'électrons mais dès qu'il est épuisé de nombreuses espèces

chimiques peuvent jouer le rôle d'accepteur final d'électrons tels que NO_3^- , Mn(IV) , Fe^{III} et fumarate (Myers et Myers, 1993 ; Nevin et Lovley, 2002 ; Lloyd, 2003). La respiration microbienne du fer a un rôle important dans les cycles biogéochimiques, et elle est donc très étudiée (Weber *et al.*, 2006 ; Gralnick et Newman, 2007 ; Bird *et al.*, 2011). Pour respirer le Fe^{III} qui est essentiellement sous forme solide dans les environnements qui nous intéressent (ce qui l'empêche de diffuser dans la bactérie afin d'y être réduit comme pour la plupart des accepteurs solubles), les bactéries ont développé plusieurs voies de transfert d'électrons (Figure I-11).

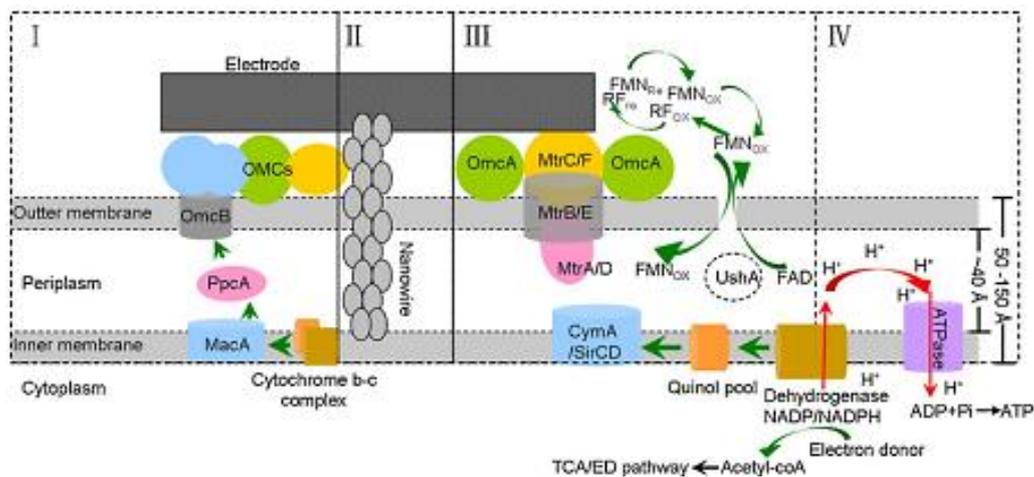


Figure I-11 : Modèles de voies de transfert d'électrons entre une électrode et des bactéries ferriréductrices *Geobacter* et/ou *Shewanella* ; (I) transfert d'électrons direct ; (II) transfert par *nanowires* ; (III) transfert par des navettes à électrons et (IV) respiration couplée à la force motrice et à la génération d'ATP (d'après Yang *et al.*, 2012).

- (I) La première voie est utilisée par les bactéries gram négatives du genre *Shewanella*, qui possèdent un cytochrome c (Lower *et al.*, 2001). Ce cytochrome c permet de transférer les électrons de la membrane plasmique vers une protéine située sur la membrane externe de la cellule qui réagit directement avec le substrat solide. Les réactions sont détaillées en Figure I-12a pour *Shewanella*. Les électrons portés par les cofacteurs réduits (NADH) sont pris en charge au niveau de la membrane plasmique par une déshydrogénase puis par des cytochromes de type c les menant jusqu'aux protéines membranaires (Fe^{III} réductase et OmcB) où le Fe^{III} est réduit en Fe^{II} .
- (II) Les bactéries du genre *Geobacter* produisent un appendice conducteur de type pili (Reguera *et al.*, 2005). Il fait le contact électrique entre la cellule et le substrat et ainsi transfère les électrons à l'accepteur. Les réactions pour *Geobacter* sont détaillées en Figure I-12b. Les électrons portés par les cofacteurs réduits sont pris en charge à la

membrane plasmique par une déshydrogénase puis par une protéine PpcA qui les mène jusqu'aux protéines membranaires (c'est-à-dire les protéines du *nanowire*). *Shewanella* possède également ces pili (Gorby *et al.*, 2006).

- (III) Chez *Shewanella*, des navettes à électrons (i.e. flavine, riboflavine) permettent une réduction à distance afin de catalyser le transfert d'électron entre la cellule et le substrat (Weber *et al.*, 2006). La navette à électrons est particulièrement importante lorsque le Fe^{III} est peu disponible, par exemple au sein des biofilms ou dans un sol argileux.

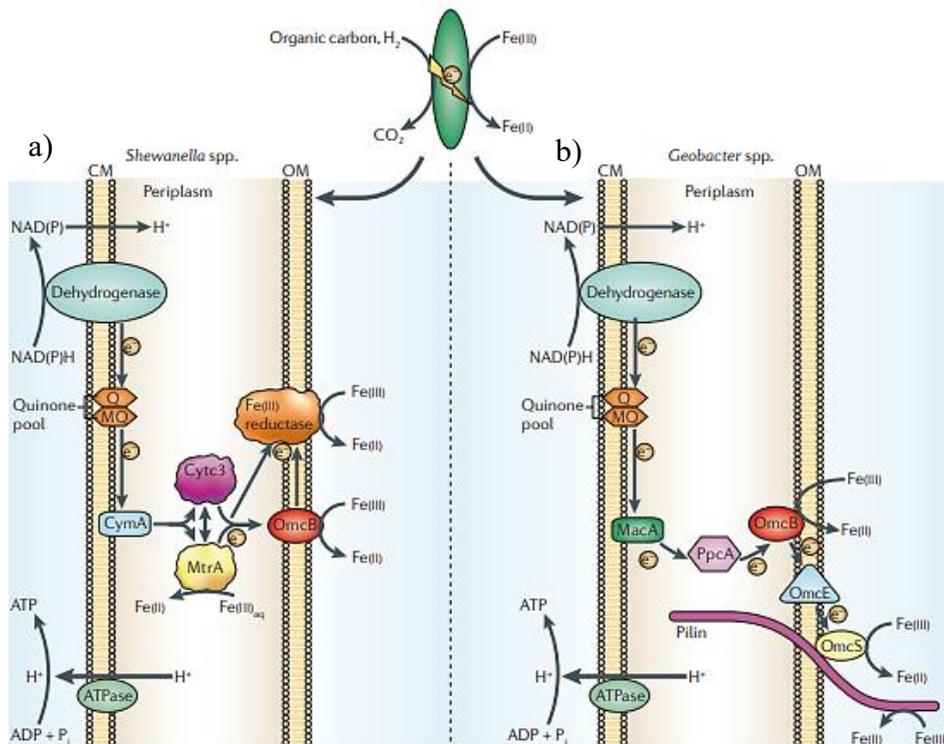


Figure I-12 : Modèle de la chaîne respiratoire de (a) *Shewanella spp.* et (b) *Geobacter spp.* : Les électrons sont transférés à la membrane via une déshydrogénase, puis ils sont transférés à des quinones et métaquinone (Q et MQ) puis au cytochrome CymA ou MacA au niveau de la membrane cytoplasmique selon le genre bactérien. Les électrons traversent ensuite le périplasma via différents transporteurs, diffusant librement dans le périplasma, en fonction du genre bactérien (e.g. Cytc3 et MtrA pour *Shewanella* et MacA et PpcA pour *Geobacter*). Les électrons sont alors transférés aux protéines membranaires de surface OmcB et Fe^{III} réductase pour *Shewanella* ou pmcB et un ensemble de protéines du *nanowire* pour *Geobacter*. Enfin, l'accepteur final, Fe^{III} , peut alors être atteint (d'après Weber *et al.*, 2006).

Les bactéries ferriréductrices sont capables de respirer des formes solides du Fe^{III} . Ainsi, les IRB sont capables de déstabiliser les couches d'oxydes de fer formées en surface des métaux, ce qui accélère alors le phénomène de corrosion (Little *et al.*, 1997). Au contraire, la respiration de la couche d'oxydes de fer peut mener, dans certains cas, à une protection contre la corrosion. En effet, une expérience a consisté à exposer un acier à un milieu salin avec des IRB. Après

quelques mois, une couche cohésive de produits de corrosion (e.g. goethite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et magnétite (Fe_3O_4)) et d'EPS (*Extracellular Polymeric Substance*) produites par les bactéries s'est formée (Herrera et Videla, 2009). Selon les conditions du milieu, cette couche peut constituer une protection contre la corrosion. De plus, la vivianite, qui est un produit de corrosion obtenu dans les milieux riches en phosphate ($> 2 \text{ mM}$), est reconnue pour avoir un effet protecteur après plusieurs semaines d'incubation avec des IRB. Les IRB dissolvent la couche d'oxydes de fer, du Fe^{II} est alors libéré du coupon et il y a précipitation de vivianite, qui peut alors avoir un effet protecteur (Little *et al.*, 2020a).

Un autre moyen d'interaction IRB – fer métallique a été mis en lumière par des études récentes. La première rapporte la capacité d'une souche de *Shewanella* spp. à consommer directement le Fe^0 en tant que donneur d'électrons en présence de fumarate (Philips *et al.*, 2018). L'étude a montré une consommation de fumarate en présence du seul donneur Fe^0 et une augmentation du Fe^{II} . Cette étude n'a pas pris en compte que la souche peut être capable d'utiliser le dihydrogène, H_2 . En effet, l'oxydation abiotique du Fe^0 est couplée à une réaction de réduction, qui correspond, la plupart du temps, à la réduction de protons avec production de H_2 . L'hydrogène peut potentiellement être utilisé comme source d'électrons (Meshulam-Simon *et al.*, 2007). Une seconde étude a pris en compte ce biais et, afin de s'assurer que les bactéries ne sont pas capables d'utiliser ce H_2 , le gène *hybL* (responsable de l'assimilation de l'hydrogène) et le gène de la formate déshydrogénase d'une souche de *G. sulfurreducens* ont été délétés. Cette délétion empêche donc la bactérie d'avoir une croissance avec H_2 ou le formate comme donneur d'électron. De cette manière, il a été démontré que la souche mutante est capable de s'attacher et d'utiliser les particules de Fe^0 en tant que donneurs d'électrons (Tang *et al.*, 2019). Comme ces études ont été menées à l'aide de particules de Fe^0 , il reste à confirmer que les bactéries ferriréductrices sont capables d'utiliser du Fe^0 issu d'alliages ferreux.

I-4.1.2.3. Les bactéries sulfatoréductrices (SRB)

Le groupe métabolique sulfatoréductrice est le plus étudié (Hamilton et Lee, 1995 ; Little *et al.*, 2020b) et serait le plus impliqué dans les phénomènes de MIC, notamment dans l'environnement marin où les sulfates abondent. Les SRB sont la plupart du temps anaérobies stricts mais peuvent cependant tolérer la présence d'oxygène sans pour autant l'utiliser (Lobo, 2007). Ces bactéries utilisent les espèces oxydées du soufre comme accepteur terminal d'électrons de leur chaîne respiratoire. Certains représentants du groupe respirent également le fumarate, ou les nitrates, voire assurent des fermentations, ce qui donne une certaine versatilité

des voies énergétiques de ce groupe métabolique. De nombreux mécanismes ont déjà été proposés pour expliquer la capacité des SRB à accélérer la corrosion (Loto, 2017). Les quatre mécanismes les plus importants sont (i) la dépolarisation cathodique, (ii) l'attaque par les sulfures, (iii) l'absorption directe des électrons par les microorganismes et (iv) l'impact des microorganismes sur la minéralogie des films de surface (Blackhood, 2020).

(i) Le mécanisme de dépolarisation anodique est souvent évoqué : les SRB conduisent à la génération des sulfures (S^{2-}) par réduction des sulfates. Les sulfures peuvent alors catalyser des réactions anodiques en réagissant avec le fer ferreux Fe^{II} qui précipite sous forme de sulfures ferreux. Cela provoque alors un transfert d'électron du fer métallique vers ces sulfures ferreux et par conséquent la formation d'une pile galvanique de corrosion (Figure I-13 et Tableau I-4). Ce mécanisme repris depuis des années a été démenti par Blackwood, 2020.

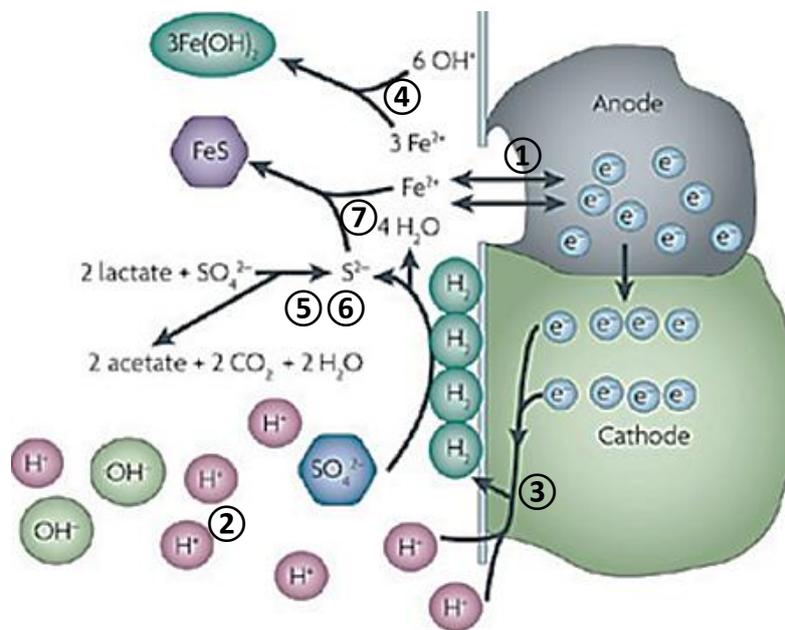


Figure I-13 : Mécanisme de corrosion par les SRB. Les numéros correspondent à ceux du Tableau I-4 (d'après Loto, 2017).

Tableau I-4 : Mécanismes de corrosion par les SRB : réactions chimiques de dépolarisation.

1. Réaction anodique	$Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2 e^{-}$
2. Dissociation de l'eau	$H_2O \leftrightarrow H^{+} + OH^{-}$
3. Réaction cathodique	$4 H^{+} + 2 e^{-} \rightarrow 2 H \text{ (adsorbé)} + H_2$
4. Dépolarisation anodique	$Fe^{2+} + 2 OH^{-} \leftrightarrow Fe(OH)_2$
5. Réduction du sulfate par la bactérie	$SO_4^{2-} + 9 H^{+} + 8 e^{-} \rightarrow HS^{-} + 4 H_2O$
6. Dissociation de HS^{-}	$HS^{-} \leftrightarrow H^{+} + S^{2-}$
7. Dépolarisation anodique	$Fe^{2+} + S^{2-} \leftrightarrow FeS$
Réaction totale	$4 Fe + SO_4^{2-} + 4 H_2O \rightarrow FeS + 3 Fe(OH)_2 + 2 OH^{-}$

(ii) L'attaque par les sulfures s'explique par le fait que les SRB réduisent les sulfates en sulfure qui sont connus pour être corrosifs pour le fer (Équation 8).



Les sulfures réagissent avec les protons de la solution pour former H_2S . Le sulfure d'hydrogène attaque donc le matériau afin de réagir avec le fer pour former du FeS (Équation 9).



Certains sulfures de fer insolubles qui précipitent en surface et forment un film sont semi-conducteurs. Ils provoquent alors une dissolution anodique et donc une piqûre de corrosion (Loto, 2017). Après initiation d'une piqûre, il y a une propagation, ce qui peut engendrer des dégâts considérables.

(iii) Très récemment, un autre mécanisme a été proposé, il s'agit du transfert direct d'électrons par une SRB en contact avec une surface en acier ou un film semi-conducteur FeS (Gu *et al.*, 2019). Les électrons de la réaction anodique (oxydation du fer) sont transmis, via un *pili* ou via un médiateur, au travers de la SRB à l'aide d'une chaîne de transport d'électrons (Figure I-14). Des recherches génétiques chez *Pseudomonas aeruginosa* ont montré que le gène *phzH*, responsable de la production d'un médiateur pour le transfert d'électrons, a un impact sur la MIC (Huang *et al.*, 2018).

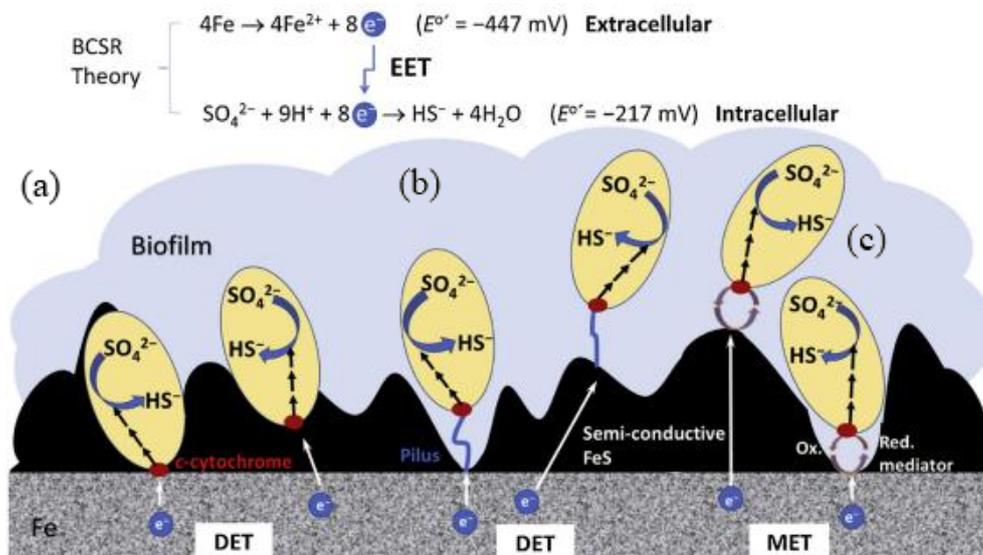


Figure I-14 : Mécanisme de transfert extracellulaire d'électrons (a) via un contact direct avec un cytochrome *c* sur la membrane cellulaire externe de la bactérie ; (b) via un pilus conducteur et (c) via un médiateur d'électrons (Gu *et al.*, 2019).

(iv) Si la plupart des études mettent en évidence la capacité des SRB à accélérer la corrosion de matériaux métalliques, leur activité peut également conduire à une protection de ces matériaux. Par exemple, en présence de lactate comme source d'électrons, des SRB conduisent à la formation d'un film protecteur de sulfure ferreux cristallisé comme la mackinawite (King *et al.*, 1976 ; Valencia-Cantero et Peña-Cabriaes, 2014). Les SRB peuvent donc avoir un impact sur la minéralogie des films de surface.

I-4.1.2.4. Les bactéries nitrate réductrices (NRB)

Les bactéries nitrate réductrices (NRB) appartiennent à la communauté bactérienne anaérobie. Elles sont capables de réduire les nitrates en diverses espèces azotées (nitrite (NO_2^-), diazote (N_2) voire ammonium (NH_4^+)). L'impact des NRB dans les processus de MIC reste peu étudié mais il y a quelques décennies déjà, certaines études suspectaient leur rôle dans les processus de corrosion (Zhu *et al.*, 2003). Il a été montré par plusieurs auteurs (Till *et al.*, 1998 ; Kielemoes *et al.*, 2000 ; Sunger et Bose, 2009, Wan *et al.*, 2018) que la consommation d'hydrogène (produit à la cathode) par les NRB supportait leur croissance et accélérât l'oxydation des espèces du fer ($\text{Fe}^0 \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$) (Figure I-15).

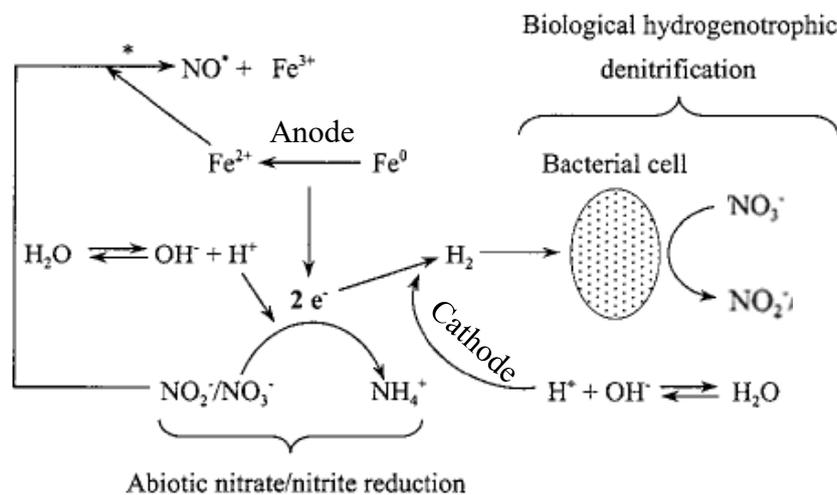


Figure I-15 : Dénitrification couplée à la consommation de H_2 issu de la réaction à la cathode, accélérant le phénomène d'oxydation du Fe^0 qui se produit à l'anode (* : formation de NO^* si le rapport de concentration de nitrite et le fer ferreux est suffisamment élevé) (adapté de Kielemoes *et al.*, 2000).

Un autre mécanisme, a été montré avec la souche *K. mobilis* et des particules d'oxydes de fer(II) (Etique *et al.*, 2014 ; Etique et Jorand, 2016). Il s'agit d'une combinaison de réactions biotique et abiotique, pouvant mener à la précipitation de rouille verte carbonatée, un oxyde mixte $\text{Fe}^{\text{II}} - \text{Fe}^{\text{III}}$ métastable, à la surface cellulaire de *Klebsiella mobilis*. La bactérie transforme le nitrate

en nitrite par la respiration via la nitrate réductase. Survient ensuite une réaction abiotique entre NO_2^- , une espèce bien plus réactive que NO_3^- , et le Fe^{II} induisant la coprécipitation d'espèces mixtes $\text{Fe}^{\text{II}} - \text{Fe}^{\text{III}}$ (Figure I-16, Etique *et al.*, 2014). Il est possible d'imaginer que des formes Fe^{II} passivant la surface d'un matériau métallique (e.g. vivianite, mackinawite, magnétite) soient déstabilisées par les nitrites biogénérés et qu'il y ait donc un accès libre aux formes Fe^0 et donc une augmentation de la corrosion.

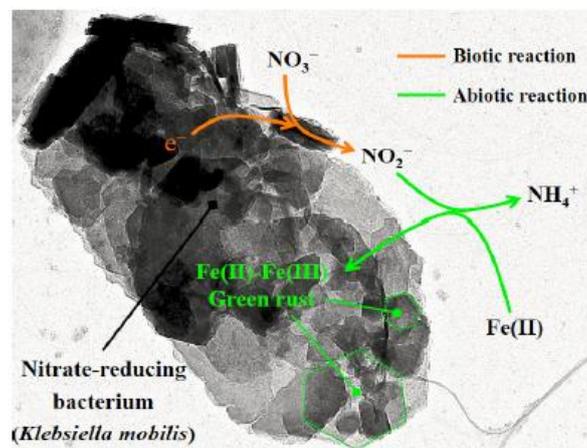


Figure I-16 : Combinaison de réactions biotiques (par *Klebsiella mobilis*) et abiotiques menant à une déstabilisation des produits de corrosion passivant la surface (Etique *et al.*, 2014).

La littérature rapporte également un autre mécanisme. Il s'agit de la consommation directe de Fe^0 d'un acier poli en tant qu'accepteur d'électrons par les NRB (Ginner *et al.*, 2004 ; Biswas et Bose, 2005 ; Ghafari, 2008).

I-4.1.2.5. La corrosion influencée par les microorganismes (MIC) : un phénomène multi-espèces dépendant

Pour réduire le nombre de paramètres mis en jeu dans la MIC et simplifier les conditions de laboratoire, les recherches fondamentales sur la MIC sont la plupart du temps effectuées sur une seule souche. Cependant, plusieurs groupes métaboliques coexistent au sein de la matrice du sol, ce qui affecte les procédés électrochimiques de la corrosion (Beech et Coutinho, 2003). En effet, les bactéries du sol qui vont former un biofilm sur le tuyau, communiquent ensemble et libèrent donc des composés (*quorum sensing*) (Ng et Bassler, 2009 ; Teplitski *et al.*, 2011). Elles sont donc capables de modifier leur métabolisme en réponse à d'autres bactéries, d'avoir des effets synergiques ou compétitifs entre elles et/ou d'entrer en compétition pour la place sur une surface (e.g. un coupon en acier ; Pitonzo, 2004), etc. Ainsi, l'impact sur la corrosion de consortia bactériens en biofilm est bien différent de celui de souches pures comme l'ont démontré Little *et al.* ou Beech et Gaylarde avec des tests en mono-souches et en cocultures ;

en fonction du mélange bactérien, la perte de masse de l'échantillon en acier peut même doubler (Little *et al.*, 1991 ; Beech et Gaylarde, 1999).

Les résultats sur l'association IRB et SRB sont contradictoires. Il a été montré qu'un consortium de souches IRB et SRB augmente la vitesse de corrosion au sein de pipelines. En souche pure, une SRB, cultivée en présence de lactate, provoque un effet protecteur sur l'acier. Mais si celle-ci est cultivée avec une IRB, cet effet protecteur est dissipé car les IRB sont capables de dissoudre le film protecteur de fer ferrique à la surface des coupons. Il y a donc une nouvelle surface exposée. Cela permet aux SRB d'accéder à l'acier, ce qui accélère la corrosion (Valencia-Cantero *et al.*, 2003 ; Valencia-Cantero et Peña-Cabriales, 2014). En revanche, Lee *et al.* ont montré que le mélange *S. oneidensis* MR1 et *D. desulfuricans* G20 diminue la vitesse de corrosion d'un acier car il y a la formation d'un film de Fe_xS_y protecteur (Lee *et al.*, 2005). Concernant les interactions d'IRB avec NRB, elles ne mènent pas forcément à une accélération de la corrosion car les NRB sont capables de réduire les nitrates en nitrites présents naturellement dans les sols. Le rapport nitrite/ fer ferreux devient alors élevé, ce qui permet la formation de monoxyde d'azote, toxiques pour les bactéries (Kielemoes *et al.*, 2000). Les NRB, quant à elles, en compétition avec les SRB, seraient capables d'inhiber la croissance des SRB. La présence de nitrate, ou des nitrites produits par les NRB, s'ils s'accumulent, peuvent conduire à une inhibition de la réduction des sulfates (Greene *et al.*, 2003) ou directement du métabolisme et de la prolifération des SRB (Haveman *et al.*, 2005 ; He *et al.*, 2010).

Toutes ces études ont montré des résultats contradictoires, parfois même sur le même matériau. Comme l'ont noté Javed *et al.*, 2014 les conditions ne sont jamais strictement identiques entre les différents tests (e.g. milieu d'incubation). Il faut évidemment prendre des précautions afin de comparer les résultats. Il est, de plus, évident que la MIC fait appel à de nombreux paramètres qui peuvent accélérer voire même diminuer le phénomène de corrosion. En fonction des groupes métaboliques, du mélange de groupes métaboliques, de la proportion relative de chaque groupe mais aussi du matériau testé (acier, fonte, ...), la réponse à la corrosion pourra être totalement différente et opposée.

Plusieurs pistes sont exploitées pour contrôler et prévenir la MIC :

- La première piste, la plus évidente, est le remplacement de la partie affectée, mais c'est une solution onéreuse. De plus, si une MIC était déjà apparue une première fois, elle reviendrait certainement.

- Il y a également l'application de traitement physique. Par exemple, certaines entreprises adoptent le raclage des tuyaux. Cependant, parfois la surface peut devenir encore plus corrosive que ce qu'elle n'était déjà (Vigneron *et al.*, 2018).
- Les traitements chimiques sont également utilisés et plus particulièrement la désinfection. L'application de biocide (Enning et Garrelfs, 2014) est souvent évoquée mais pose plusieurs problèmes (Loto, 2017). En effet, comme l'ont noté Little *et al.*, 2020a, tuer ce n'est pas nettoyer. La biomasse peut affecter la MIC même si elle est inactivée car elle crée des hétérogénéités de surface. Les cellules qui survivent peuvent alors se multiplier et « cannibaliser » la biomasse, et par conséquent se développer. (Flemming, 2002). Les autres problèmes sont liés à la corrosivité de certains biocides (e.g. glutaraldéhyde) (Eid *et al.*, 2018), ou encore au fait que les biocides n'ont souvent pas de cible spécifique. Des entreprises comme Advanced Nano Solutions® ont d'ailleurs créé des additifs antimicrobiens mais leur effet reste discutable car cela ne va pas forcément toucher les bactéries responsables de la corrosion. Enfin, il y a l'irradiation par UV. Le problème de cette méthode est que les bactéries encastrées dans le biofilm vont résister aux UV. Les bactéries planctoniques quant à elles vont mourir et constitueront donc des nutriments pour les bactéries survivantes (Little *et al.*, 2020a).
- Les méthodes biologiques constituent une autre piste. Des chercheurs se sont penchés sur un mécanisme d'inhibition de communication bactérienne (*quorum sensing*) qui provoquerait une désorganisation des biofilms et également une inhibition de la production de composés transporteurs d'électrons entre les bactéries et le métal (Libert et Bildstein, 2015), mais cette piste reste encore artificielle. D'autres recherches se sont intéressées au caractère inhibiteur de souches bactériennes (Kim *et al.*, 2018). Par exemple, l'addition de nitrate stimule la croissance des bactéries nitrate ou nitrite réductrices (NRB) et des bactéries ferro-oxydantes nitrate-réductrices (IONRB). Si les bactéries « ont le choix » et se retrouvent avec une forte concentration en nitrate, la respiration du NO_3^- est plus préférable que les sulfates (Jorand, 2017). Cela pourrait ainsi réduire l'activité des populations de SRB et donc le taux de corrosion (Pillay et Lin, 2014). De plus, cela créerait une compétition entre les différents microorganismes présents dans le sol. Mais les nitrites générés sont susceptibles de réagir avec le Fe^{II} et de déstabiliser les couches d'oxydes stables de surface comme souligné précédemment (Etique *et al.*, 2014 ; Etique et Jorand, 2016). Enfin, une autre équipe de recherche a mis en lumière que l'utilisation des EPS d'une bactérie spécifique (du genre *Pseudomonas*)

pourrait inhiber la corrosion (Feugeas *et al.*, 2016). Les EPS permettraient à la couche d'oxyde de fer de rester intacte, menant à une protection passive du matériau (Grooters *et al.*, 2007).

- Le revêtement est une piste privilégiée par les entreprises de fabrication de tuyaux pour lutter contre la corrosion. Plusieurs types de revêtements peuvent être protecteurs ; ils peuvent contenir des biocides (e.g. zinc) ou du graphène, avoir une surface résistante à l'adhésion microbienne, avoir une surface conductrice, etc. (Little *et al.*, 2020a). Cependant, ces revêtements peuvent être endommagés voire même biodégradés (Bhola *et al.*, 2010).
- Enfin, la protection cathodique est également utilisée. Mais cette technique est très lourde à mettre en place. Il s'agit de diminuer le potentiel de corrosion du métal en faisant circuler un courant électrique entre une anode auxiliaire et le matériau à protéger.

Plusieurs pistes sont exploitées afin de protéger les matériaux contre la corrosion. Aucune ne semble être la solution miracle. Une meilleure compréhension de la MIC permettrait d'améliorer ces pistes.

I-4.2. Procédures à suivre pour démontrer l'existence d'une MIC

Pour détecter, suivre et proposer des mécanismes de la MIC d'un matériau, différentes techniques ont été développées et sont utilisées (Tableau I-5). La plupart du temps, cela consiste en la comparaison entre les propriétés du matériau avant et après l'immersion. Ainsi, l'utilisation d'éprouvettes est systématique. Comme le rappellent Little *et al.*, coupler des analyses physiques, chimiques et microbiologiques est essentiel pour comprendre et estimer le taux de corrosion d'un matériau (Little *et al.*, 2020a). En effet, chacune de ces techniques a sa propre spécificité, ses qualités, ses contraintes de mises en œuvre et souvent ses limites. Le couplage des analyses gravimétriques, chimiques et d'électrochimie permettent de quantifier l'impact des microorganismes sur le phénomène électrochimique. Associer aux autres analyses (microscopiques, spectroscopiques et génomiques), des détails sur les mécanismes de corrosion peuvent être apportés.

Tableau I-5 : Liste des techniques et de leurs applications utilisées pour mettre en évidence et étudier l'influence des microorganismes sur la corrosion et les mécanismes mis en jeu.

Méthodes	Techniques	Applications
Microbiologiques et génomiques	Séquençage ARN 16S	Identification
	DGGE	Identification, relation évolution, empreinte communautaire
	FISH	Relation spatiale entre des espèces spécifiques
	Tests protéiques	Présence de microorganismes
Microscopiques	Microscopie optique sous épifluorescence	Organisation spatiale des microorganismes, dénombrement des microorganismes
	Microscopie confocale	Relation spatiale entre les microorganismes
	MET	Images des structures cellulaires dans une section particulière
	MEB	Topographie de surface de l'échantillon et des microorganismes
Spectroscopiques	MEB EDS / XPS	Analyse chimique élémentaire de tous les éléments présents, carte de leur distribution
	DRX	Analyse aléatoire de la composition
	Raman	Analyse des liaisons chimiques et composition
Chimiques	Chromatographie ionique	Dosage d'anions, de cations en solution
	ICP AES	Dosage d'espèces chimiques en solution
	Colorimétrie	Dosage d'espèces chimiques en solution
	pH / potentiel redox	Suivi de l'évolution de la solution
Gravimétriques	Inspection visuelle	Détection de la corrosion et du type de corrosion
	Gravimétrie	Évolution de la taille/poids du coupon
Électrochimiques	Courbes de polarisation	Détermination du taux de corrosion et de l'état de l'électrode
		→ Détermination de E_{corr} , I_{corr}
	EIS	→ Détermination de la résistance de polarisation
		Détermination du taux de corrosion (si uniforme) et suivi et caractérisation de l'évolution du système étudié
Chronopotentiométrie à courant nul	Chronoampérométrie	Détermination du courant global cathodique ou anodique

Chapitre II : Techniques expérimentales

II-1. Préparation des coupons en fonte

Les échantillons de tuyau en fonte ductile ont été obtenus auprès du centre de recherche de Saint-Gobain PAM. Ces tuyaux ont été récupérés avant la mise en place des revêtements. Ils présentent deux faces différentes. Une face interne « lisse » qui est dédiée au revêtement interne en ciment mais qui n'en a pas été recouverte. Et une face externe « pinning » qui correspond à une couche native d'oxydes et qui sera dédiée à être recouverte avec les revêtements externes de protection. C'est ce côté externe qui nous intéresse dans ce projet.

Les échantillons sans revêtement ont été découpés à l'aide d'une scie à ruban pour obtenir des plaquettes de 4,5 mm d'épaisseur et de 10 × 30 mm de côtés ou 10 × 10 mm de côtés (Figure II-1a et b). Afin d'évaluer l'impact de la couche native d'oxydes sur les processus de corrosion, certains coupons ont été surfacés à l'aide d'une fraiseuse équipée d'une fraise de diamètre 40 mm (Figure II-1c).

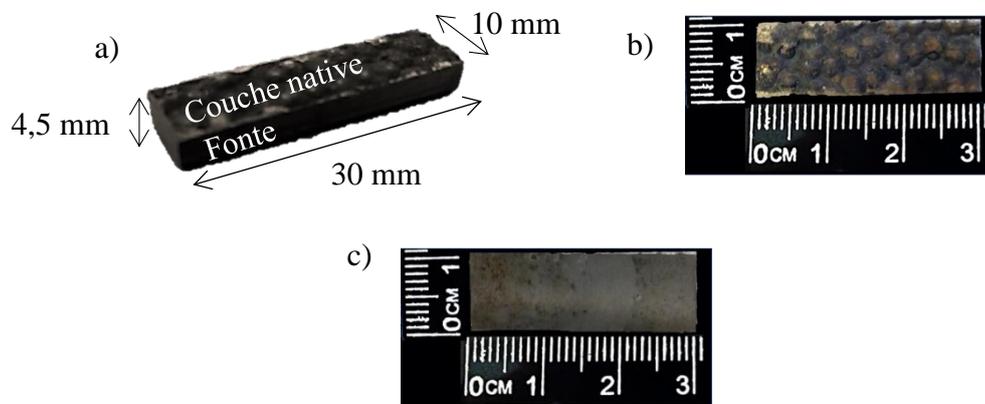


Figure II-1 : (a) Aspect d'un coupon de fonte tel que reçu du centre de recherche après découpage ; (b) vue du dessus (face externe) d'un coupon : observation de la couche native d'oxydes ; et (c) vue du dessus (face externe) d'un coupon après fraisage : observation de la fonte brute.

Des échantillons avec revêtement ont également été utilisés. Ils étaient revêtus soit avec Aquacoat® (couleur rouge ; Figure II-2a), soit avec Zn Al Cu (couleur grise ; Figure II-2b) soit avec Zn Al Cu puis Flogel qui est identique à Aquacoat® mais de couleur bleue, il sera aussi nommé par la suite Aquacoat® pour faciliter la compréhension (couleur bleue ; Figure II-2c). Soit avec aucun revêtement (Figure II-2d).

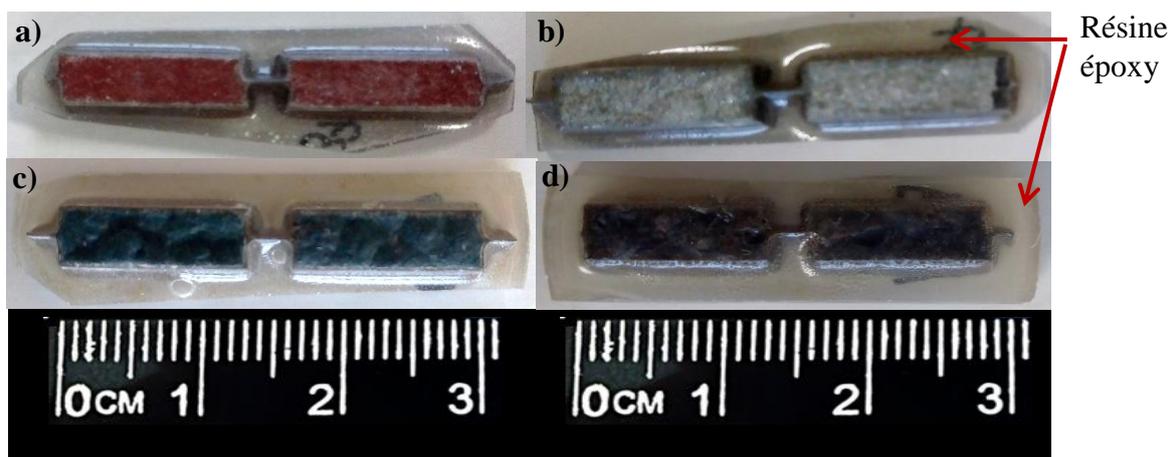


Figure II-2 : Aspect des coupons revêtus et enrobés d'une résine époxy : (a) revêtement Aquacoat® de couleur rouge, (b) revêtement Zn Al Cu, (c) double revêtement Zn Al Cu / Aquacoat® de couleur bleue et (d) coupon sans revêtement, seulement avec la couche native d'oxydes.

Pour cette série d'échantillons, la découpe a été faite par jet d'eau de précision aux dimensions $15 \times 4,5 \times 4,5$ mm (Société ADS – AQUA DECOUPE SERVICES). Ils ont ensuite été enrobés d'une résine (Epofix Resin Struers®) couplé à un durcisseur (Epofix Hardener Struers®) excepté la surface externe du coupon (Figure II-3a et b). Ainsi, seule cette surface sera soumise aux différents tests de corrosion. La Figure II-3 montre les différentes étapes de cette préparation, de l'enrobage à la découpe de la résine pour obtenir les coupons élémentaires.

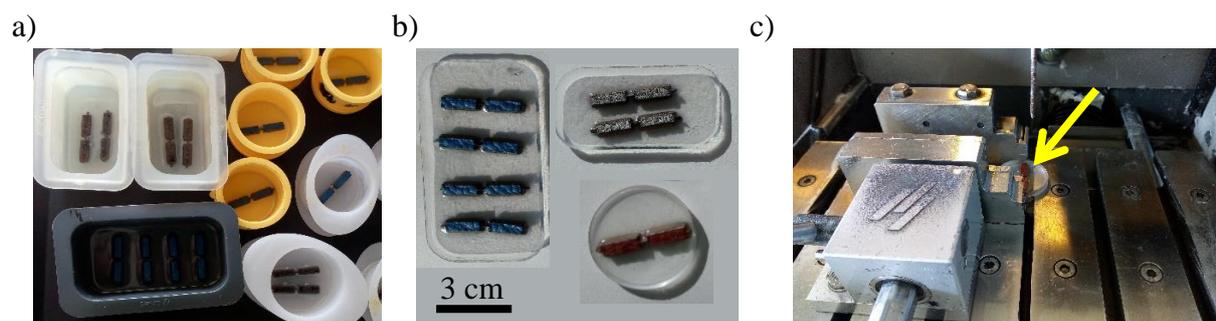


Figure II-3 : (a) Enrobage des coupons dans différents moules, (b) Étape de démoulage et (c) découpage de la résine pour séparer les coupons. La flèche montre un coupon.

Pour simuler une blessure, la moitié du lot de coupons a été perforé à l'aide d'une perceuse à colonne, équipée d'un foret de 12 mm (Figure II-4).

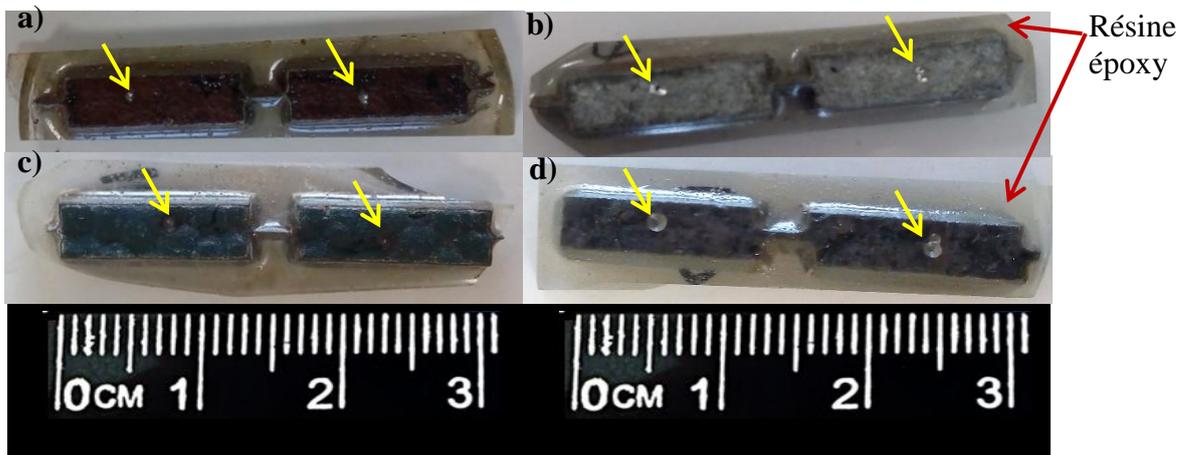


Figure II-4 : Aspect des coupons revêtus et enrobés d'une résine époxy « blessés » à l'aide d'une fraiseuse : (a) revêtement Aquacoat® de couleur rouge, (b) revêtement Zn Al Cu, (c) double revêtement Zn Al Cu / Aquacoat® de couleur bleu et (d) coupon sans revêtement. Les perforations superficielles des coupons sont indiquées par une flèche verte.

La profondeur de blessure, déterminée par profilométrie, est de 0,3 mm (Figure II-5).

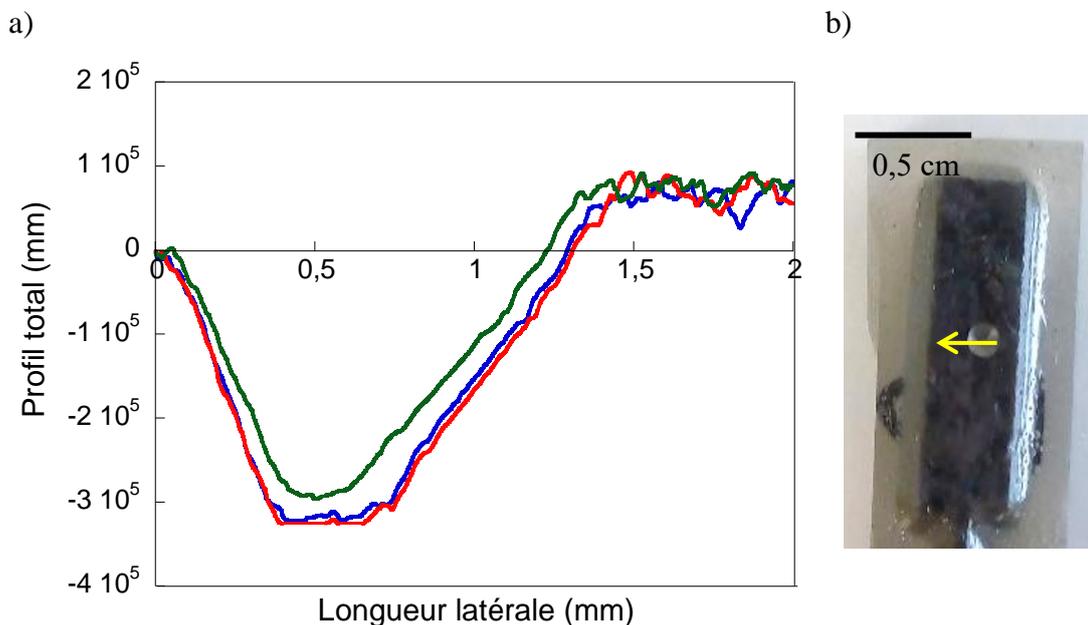


Figure II-5 : (a) Profil total de la blessure de trois coupons en fonte différents en fonction de la longueur latérale parcourue représentée par la flèche sur le coupon perforé (b).

Tous les types de coupons présentés précédemment ont été pesés sur une balance de précision (Ohaus Pioneer®, précision $\pm 0,001$ g) après séchage à l'étuve (1 h à 100 °C) et refroidissement dans un dessiccateur (15 min). Les coupons ont ensuite été stérilisés par autoclavage (15 min à 121 °C).

II-2. Description et préparation des espèces bactériennes

Trois espèces bactériennes appartenant à trois groupes métaboliques différents ont été sélectionnées :

- *Shewanella putrefaciens* CIP 80.40 : bactérie ferriréductrice (*iron reducing bacteria* IRB)
- *Klebsiella mobilis* FJ01 : bactérie nitrates réductrice (*nitrate reducing bacteria* NRB)
- *Desulfovibrio desulfuricans* DSM-12129 : bactérie sulfatoréductrice (*sulfate reducing bacteria* SRB)

II-2.1. Description des espèces bactériennes

II-2.1.1. Espèce bactérienne ferriréductrice *Shewanella putrefaciens*

Shewanella putrefaciens CIP-80.40 provient de la collection de l'institut Pasteur (CIP). C'est un bacille à coloration de Gram négative anaérobie facultative non fermentative (à respiration obligatoire), c'est-à-dire qu'il peut être cultivé en aérobie ou en anaérobie et doit utiliser un oxydant externe pour produire l'énergie nécessaire à son métabolisme. Cette souche a été choisie car elle présente la particularité d'utiliser une large gamme d'oxydants dont le fer ferrique solide ou sous forme soluble tout en étant facile à cultiver.

II-2.1.2. Espèce bactérienne sulfatoréductrice *Desulfovibrio desulfuricans*

Desulfovibrio desulfuricans DSM-12129 provient de boues sulfurée (DSMZ, *German Collection of Microorganisms*). C'est une bactérie gram négative anaérobie bien que capable d'avoir une croissance à une très faible concentration en oxygène (Lobo, 2007). Les sols représentent un de ses habitats. Cette souche a été choisie car elle est capable de réduire le sulfate en sulfure, un composé corrosif.

II-2.1.3. Espèce bactérienne nitrate réductrice *Klebsiella mobilis*

Klebsiella mobilis FJ01 (syn. *Enterobacter aerogenes*) est un bacille gram négative fermentatif, responsable d'infections nosocomiales. Cette souche, a été isolée au laboratoire d'une boîte contaminée, et bien que ne fréquentant pas les sols, elle a été choisie car elle est de culture aisée et possède une nitrate réductase, une activité enzymatique bien représentée dans la communauté bactérienne des sols. Elle a donc la capacité de réduire les nitrates en nitrites qui ont la capacité de réagir abiotiquement avec le Fe^{II}.

II-2.2. Production des suspensions bactériennes

S. putrefaciens et *K. mobilis* sont conservées à -80 °C et ont été remises en culture en conditions aérobies sur milieu gélosé trypto-caséine de soja (TSA) (Fluka, 22091). Afin de produire une suspension bactérienne de densité suffisante, une colonie de 48 h a été prélevée de ces boîtes de culture gélosé TSA et remise en culture dans un bouillon trypto-caséine de soja (TSB, Fluka, 22092) pendant 24 h pour la NRB et 48 h pour la IRB à 30 °C sous agitation orbitale (160 rpm) en aérobie. La densité maximale dans le milieu TSB à 30 °C en aérobie pour *S. putrefaciens* est atteinte après 30 h de croissance à une DO de 1,8 (Figure II-6a). Pour *K. mobilis*, elle est de 3,0 à 24 h de culture (Figure II-6b).

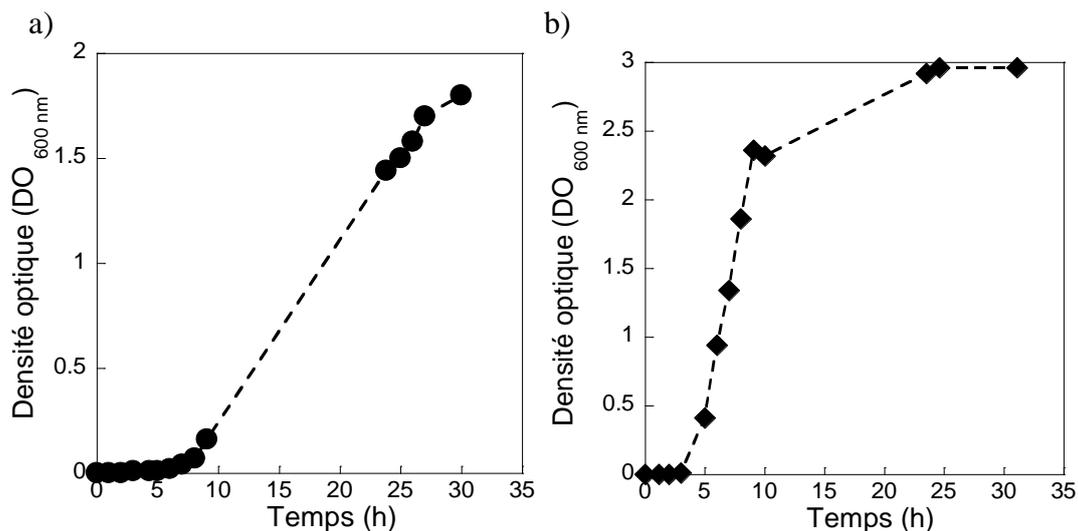


Figure II-6 : Suivi de la densité optique à 600 nm dans le milieu de préculture TSB à 30 °C et en aérobie pour la souche (a) *Shewanella putrefaciens* et (b) *Klebsiella mobilis*.

D. desulfuricans a été reçue sous forme lyophilisée. Elle a été réhydratée et incubée dans le milieu de Postgate (DSMZ 63) sous atmosphère N₂ (obtenue par barbotage au diazote 99,99 %) à 30 °C pendant une semaine. Un flacon de réduction d'une capacité de 30 mL et contenant le milieu DSMZ 63 stérilisé a été ensemencé au 1/10^e par le précédent milieu DSMZ 63 contenant la souche revivifiée. Ce flacon a été incubé à 30 °C pendant 5 jours toujours sous atmosphère N₂. La croissance de *D. desulfuricans* dans le milieu de Postgate à 30 °C en anaérobie (Figure II-7) montre une densité optique maximale de 0,6 ± 0,1 après 31 h de culture.

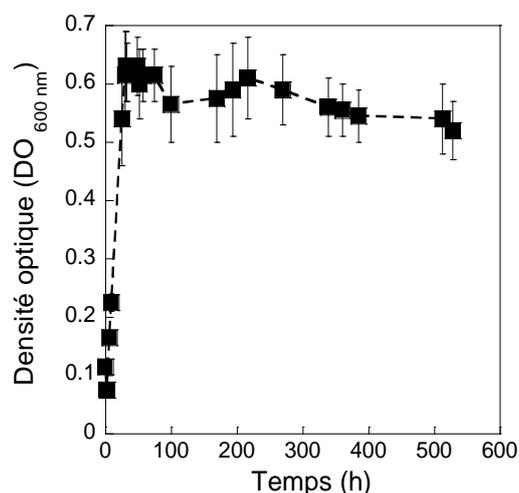


Figure II-7 : Suivi de la densité optique à 600 nm dans le milieu de préculture Postgate à 30 °C et en anaérobie pour *Desulfovibrio desulfuricans*, (n = 3).

A l'issue de ces incubations, les cellules ont été collectées et lavées par une solution stérile anoxie de NaCl 9 % via deux centrifugations successives de 10 min à 6500 g. Un barbotage au diazote (100 %) a ensuite été appliqué et les cellules ont été remises en suspension dans le milieu d'incubation anoxie afin d'obtenir une densité cellulaire finale de 10^8 cellules mL^{-1} . Les flacons ont été fermés hermétiquement par un bouchon en butyle et sertis par une bague en aluminium pour conserver les conditions anaérobies.

Pour les cocultures, les souches pures ont été mélangées deux à deux. Soit *S. putrefaciens* + *K. mobilis*, *S. putrefaciens* + *D. desulfuricans* ou *D. desulfuricans* + *K. mobilis*. Elles ont été obtenues par le mélange des souches pures préalablement cultivées afin d'obtenir une densité cellulaire de 10^8 cellules mL^{-1} pour chaque souche pure.

Des contrôles abiotiques ont été menés avec des bactéries tuées par la chaleur (121 °C pendant 30 min).

II-3. Préparation des suspensions de sols

Trois sols d'origines géographiques différentes ont été sélectionnés : le sol de Pau (Pyrénées atlantiques, 64), le sol de Saint Firmin (Meurthe et Moselle, 54) et le sol de Lesménils (Meurthe et Moselle, 54). Ces sols ont été conservés à 4 °C et remis à 21 °C avant utilisation. Dix grammes équivalents matière sèche de chaque sol ont été placés dans 100 mL d'eau ultra-pure (Elga, $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Un traitement aux ultrasons ($2 \times 30 \text{ s}$, 600 W, Vibra Cell 7 2412, sonde de diamètre 10 mm) a permis de disperser les plus fines particules des sols et de faciliter la remise en suspension des bactéries en séparant les agrégats bactériens des particules du sol. Pour

réaliser les expériences de corrosion, nous avons réalisé des prélèvements de ces milieux après 30 min, en anaérobie, afin de laisser décanter les particules les plus grossières.

II-4. Tests de (bio)corrosion

II-4.1. Incubation des coupons avec les microorganismes

Pour les expériences en souches pures de laboratoire, un coupon a été placé dans un flacon à sertir pendant plusieurs jours avec 10 mL du milieu de culture M4 et des donneurs et des accepteurs d'électrons adaptés aux souches bactériennes testées. Le Tableau II-1 présente la composition du milieu de culture M4 (les étapes d'optimisation sont développées dans la deuxième partie du Chapitre III). Le pH a été ajusté à $7,0 \pm 0,1$ avec l'addition de NaOH 1 M. Le milieu a été ensemencé avec une densité cellulaire finale de 10^8 cellules mL^{-1} . Des tests ont été menés en monosouche, en coculture (10^8 cellules mL^{-1} de chacune des souches) et en coculture « séquentielle », c'est-à-dire qu'une souche a été incubée pendant une semaine en présence d'un coupon qui a ensuite été récupéré afin d'être mis en contact avec cette même souche plus une autre pendant 30 jours et dans un milieu de culture adapté neuf.

Pour les expériences avec les sols, un coupon a été placé dans un flacon à sertir pendant plusieurs jours voire plusieurs mois avec soit 10 mL du milieu LB dilué au dixième, soit 10 mL du milieu M4 avec tous les accepteurs ou soit avec 10 mL du milieu M4-sulfate, M4-nitrate ou M4- Fe^{III} citrate (pour les expériences d'enrichissements). Le pH a toujours été ajusté à $7,0 \pm 0,1$ avec l'addition de NaOH 1 M. Le milieu a été ensemencé soit avec 5 mL de la suspension de sol pour 100 mL final, soit avec 2,5 mL (i.e. 2,5 %) ou 10 mL (i.e. 10 %) de la suspension de sol pour 100 mL final.

Toutes les incubations ont été réalisées à (30 ± 1) °C, à l'obscurité et en conditions anaérobies qui ont été obtenues par ébullition du milieu puis refroidissement sous un barbotage N_2 (100 %).

Tableau II-1 : Milieux retenus pour enrichir les cultures en bactéries ferriréductrices (IRB), nitrate réductrices (NRB) ou sulfatoréductrices (SRB). (a) Composition du milieu M4, milieu de base optimisé et commun aux groupes métaboliques et (b) donneur et accepteurs d'électrons spécifiques à chaque groupe métabolique.

a)

Espèces chimiques	Concentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9,5 mM
MgSO_4	7 mM
KH_2PO_4	4 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,09 mM
Extrait de levure (Merck 1.03753)	0,10 g L ⁻¹
Résazurine	4,4 mM

b)

Groupes métaboliques	Donneur d'électrons		Accepteurs d'électrons	
	Espèce chimique	Concentration	Espèces chimiques	Concentration
IRB		15 mM	Fumarate de sodium Fe ^{III} de la couche native	10 mM
NRB		15 mM	Nitrate de sodium	24 mM
SRB		15 mM	Sulfate de sodium	6 mM
IRB + NRB	Lactate de sodium	30 mM	Fumarate de sodium Nitrate de sodium Fe ^{III} de la couche native	10 mM 24 mM
IRB + SRB		30 mM	Fumarate de sodium Sulfate de sodium Nitrate de sodium Fe ^{III} de la couche native	10 mM 6 mM 1,2 mM
SRB + NRB		30 mM	Sulfate de sodium Nitrate de sodium	6 mM 24mM

II-4.2. Contrôle abiotique

Un contrôle abiotique a systématiquement été associé à chaque expérimentation. Ce contrôle devra permettre de distinguer les transformations liées à une activité biologique, directement ou indirectement, des réactions purement abiotiques. Le milieu d'incubation a été stérilisé par la chaleur humide (121 °C, 15 min), dépourvus donc d'organismes vivants, toute

chose étant par ailleurs égale à l'essai avec l'inoculum. Pour les expériences en environnements simulés abiotiques, les suspensions de sol ont subi trois traitements à la chaleur de 1 h à 121 °C avec 15 h de pause à température ambiante entre chaque afin de pouvoir laisser germer les éventuels organismes qui ont sporulé. L'optimisation de ce traitement est développée au Chapitre V.

II-4.3. Contrôle de stérilité

La stérilité des contrôles abiotiques a été effectuée en étalant en profondeur 1 mL des milieux respectifs sur gélose nutritive TSA. L'expérience a été réalisée en duplicata et l'incubation a été conduite pendant 7 jours à 30 °C en anaérobiose. Pour les expériences en souches pures, le contrôle est validé s'il n'y a pas de colonie. Pour les expériences en environnements simulés, le contrôle est validé s'il y a moins d'une colonie sur gélose capable de se développer.

La Figure II-8 résume le protocole d'incubation des coupons. Toutes les expérimentations ont été réalisées en triplicatas. C'est-à-dire qu'il y a trois flacons indépendants contenant chacun un coupon indépendant, cela correspond donc à $n = 3$. A chaque mesure, un flacon contenant un coupon est sacrifié.

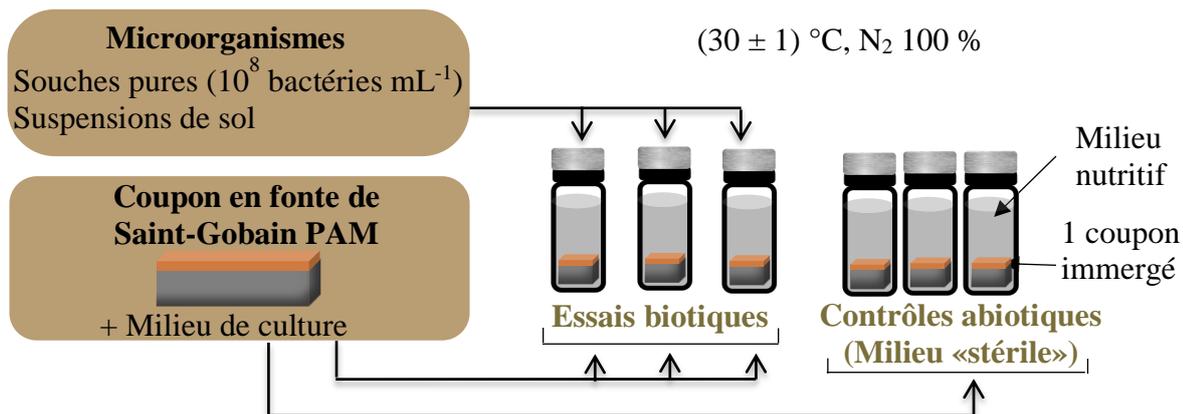


Figure II-8 : Protocole d'incubation des coupons pour les essais de corrosion.

II-5. Techniques de mise en évidence de l'évolution de la (bio)corrosion

Au cours de l'incubation, des prélèvements de coupon mais également de la phase aqueuse (suspension bactérienne, solution avec les espèces solubles et en suspension) ont été effectués afin de faire différentes analyses. Les techniques utilisées sont présentées dans le Tableau II-2. L'originalité est ici d'obtenir à la fois des informations sur l'activité bactérienne, la solution et sur le coupon. Cela permettra d'avoir de multiples renseignements sur l'évolution de la corrosion et de proposer des pistes de mécanismes.

Tableau II-2 : Techniques employées dans ce projet pour estimer la biocorrosion et suivre l'activité bactérienne.

	Techniques employées	Informations apportées	
SOLIDE	Microbiologie Marquage au SYBR Green® (microscopie optique sous épifluorescence)	Localisation des cellules bactériennes sur les coupons, agrégées ou non, et dénombrement	
	Analyse visuelle du coupon	Différenciation de l'état du coupon avant et après incubation	
	Physicochimie Gravimétrie	Estimation du taux de corrosion	
		Spectroscopie Raman	Caractérisation des produits de corrosion
		Diffraction des rayons X	
		Microscopie électronique à balayage	Localisation des microorganismes et topographie de surface de l'échantillon
		Profilométrie	Mesure du relief de la surface du coupon
SOLUTION	Densité optique	Mesure de la densité bactérienne en suspension	
	Microbiologie Marquage au SYBR Green® (microscopie optique sous épifluorescence)	Dénombrement total des bactéries	
		Marquage au kit <i>Live/Dead® BacLight™</i> (microscopie optique sous épifluorescence)	Dénombrement des bactéries « vivantes » et des bactéries « mortes »
		qPCR	Dénombrement de l'ADN total des bactéries
	Physicochimie Séquençage de l'ARN 16S	Assignation taxonomique	
		Culture en milieu solide	Dénombrement des colonies formées par les bactéries Contrôle de stérilité
		Dosage en ICP-AES	Mesure de la concentration en élément ⁵⁶ Fe
Colorimétrie – méthode phénantroline et méthode ferrozine adaptée		Mesure de la concentration en Fe ^{II}	
Chromatographie ionique		Mesure de la concentration en ions inorganiques (SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , NH ₄ ⁺) et organiques (fumarate, succinate)	
pHmètre	Suivi du pH		

Trois approches ont été développées pour estimer le taux de corrosion (Figure II-9) :

1. La première approche consiste à déterminer la concentration en fer (Fe^{II} et Fe^{III}) présent dans la phase aqueuse, en solution ou en suspension spontanément libéré par les coupons au cours du temps (Figure II-9 **A**). Le prélèvement du surnageant est acidifié par ajout de HCl 5 M (1 : 1, v : v) pour garder soluble ou solubiliser les espèces du fer. L'analyse est réalisée par ICP-AES. Dans toute la thèse, cette fraction de fer sera appelée « **fer libéré** $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ » et est exprimée en mg cm^{-2} .
2. Des produits de corrosion peuvent rester précipités ou accrochés à la surface du coupon. Ne déterminer que la quantité de fer oxydé en solution (« fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ ») ne donnerait qu'une réponse partielle du degré de corrosion. Il est donc important de considérer les produits de corrosion non solubles déposés à la surface du coupon. Pour cela le coupon subit un traitement acide (HCl 5 M) couplé à un inhibiteur de corrosion, l'hexaméthylènetétramine (HMT - $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$) à 2 % durant 2 h. La mise au point de ce traitement est décrite au Chapitre III. Le coupon est ensuite rincé à l'eau distillée et la solution est reprise par HCl 5 M (1 : 1, v : v) afin de s'assurer de la solubilisation complète des espèces du fer. Elle est ensuite analysée par ICP-AES (Figure II-9 **B**). Pour la suite, le terme de « **fer solide extrait** » pour cette partie des espèces de fer sera utilisé et exprimé en mg cm^{-2} .

La quantité totale de fer oxydé, appelée « **fer total** $m_{\text{fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) » correspondra donc à la somme des espèces du fer libéré en solution (« fer soluble et en suspension ») et le fer issu des dépôts solides (« fer solide extrait »), soit **A** + **B**, exprimée en mg cm^{-2} . Les résultats ont été traités de sorte à soustraire à cette masse, la masse en fer de la couche native d'oxydes et ainsi rendre compte de la corrosion propre à nos conditions expérimentales.

3. La troisième approche est une analyse gravimétrique des coupons en fonte (Figure II-9**C**). La perte de masse observée après avoir réalisé le traitement « acide + inhibiteur » du coupon incubé est reliée au taux de corrosion. Nous exprimons cette perte de masse après soustraction de la masse de la couche native d'oxydes et en mg cm^{-2} .

Les échantillons ont été prélevés au cours du temps sous atmosphère N_2 et en asepsie dans une chambre à atmosphère contrôlée (GP-Campus, Jacomex, Dagneux, France) équipé d'un bec Bunsen électrique (Figure II-10).

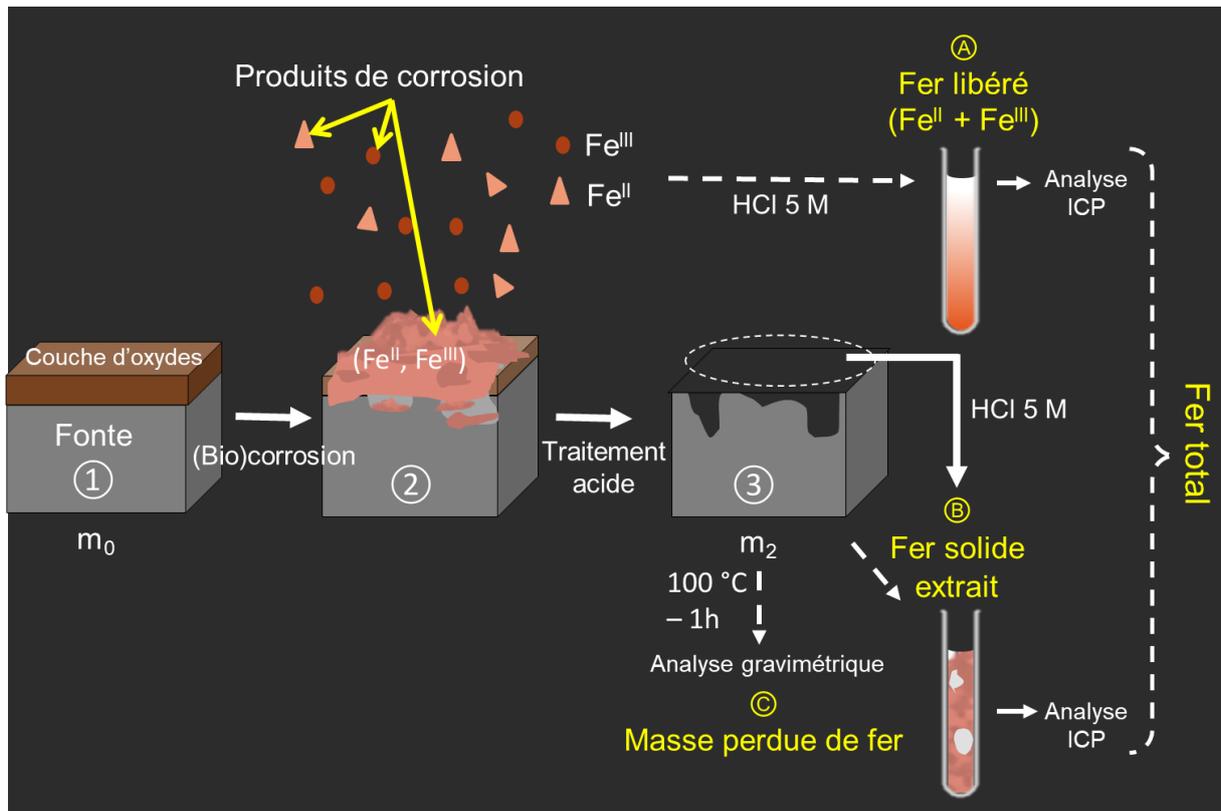


Figure II-9 : Stratégie analytique : ① Coupon en fonte avant incubation de masse m_0 . ② Coupon après plusieurs jours dans le milieu et présentant des produits de corrosion adsorbés ou précipités à sa surface et des espèces du fer libérées en solution, la quantité de fer libéré soluble et en suspension est déterminée (A). ③ Coupon après traitement acide, l'analyse des produits de corrosion après leur solubilisation (B) et l'analyse gravimétrique (C) sont effectuées.

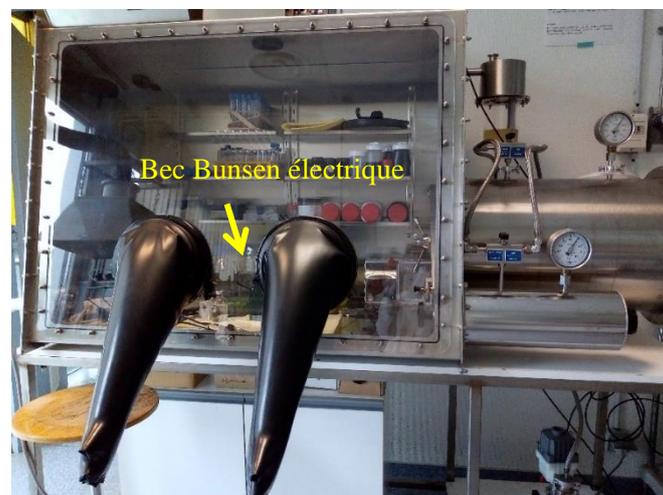


Figure II-10 : Chambre anaérobie Jacomex utilisée pour les prélèvements sous atmosphère contrôlée.

II-5.1. Méthodes d'analyse du solide

II-5.1.1. Observation en microscopie optique sous épifluorescence des bactéries adhérees sur le coupon

Pour observer la colonisation des bactéries sur la fonte, une observation microscopique a été réalisée. Les coupons en fonte ont été prélevés à l'aide de pinces stériles dans la chambre anaérobie et ont été placés dans une boîte de Pétri stérile contenant 10 mL d'eau. La boîte de Pétri a été agitée par des mouvements orbitaux afin de décrocher les bactéries peu ou mal fixées. L'échantillon a ensuite été rincé, fixé au glutaraldéhyde 2 % pendant 5 min puis rincé par l'eau. Pour l'observation, le coupon a été placé dans une solution stock de SYBR® Green (SYBR® Green II, S7586, In Vitrogen - Molecular Probes) à concentration inconnue mais à diluer, d'après le fournisseur, au 1/1000, puis il a été incubé 15 min à l'obscurité. Le coupon a ensuite été fixé sur une lame en verre par de la gomme fixe et la lame a été placée sur le porte objet. Une goutte d'huile à immersion y a été déposée sous l'objectif $\times 100$, et sous la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome (excitation en lumière bleue à 494 nm, émission en lumière verte à 521 nm) (« Microscope inversé » Olympus BX51). Des clichés de la surface du coupon ont été effectués aléatoirement afin d'observer les bactéries fluorescentes en vert. La fonte ayant une surface très irrégulière, plusieurs clichés ont été effectués à différentes focales pour observer puis dénombrer tous les microorganismes présents à un même endroit.

II-5.1.2. Analyse gravimétrique des coupons

La masse initiale des coupons (m_0) a été déterminée avant incubation et après séchage à l'étuve à 100 °C pendant 1 h. La masse moyenne de nos coupons est $2,8 \pm 0,1 \text{ g cm}^{-2}$ ($n = 80$). Après l'incubation, les coupons ont été de nouveau séchés à l'étuve (100 °C pendant 1 h) puis pesés. Afin d'éliminer les dépôts de produits de corrosion, les échantillons ont été nettoyés à l'aide d'un traitement chimique qui est développé dans le Chapitre III, il s'agit d'un traitement HCl 5 M + HMT 2 % - 2 h. Les coupons ont été de nouveau placés à l'étuve (1 h à 100 °C) et pesés après complet refroidissement en dessiccateur (environ 15 min) (m_2). La perte de masse a été évaluée par différence entre la masse avant incubation et celle après incubation et traitement chimique, soustrait de la masse estimée de la couche native d'oxydes m_c . Cette perte de masse Δm a ensuite été normalisée par rapport à la surface, S, du coupon exprimée en cm^2 (Équation 10) :

$$\Delta m = \frac{(m_0 - m_2) - m_c}{S} \quad \text{Eq. 10}$$

m_0 : masse initiale des coupons après séchage

m_2 : masse des coupons après incubation, nettoyage et séchage

m_c : masse de la couche native d'oxydes

S : surface des coupons

Afin de savoir s'il y a une différence significative entre les différentes conditions, des tests paramétriques de comparaison de deux moyennes indépendantes et à faible population ont été effectués à l'aide de la table de Student (Équation 11) :

$$\sigma_e^2 = \frac{n_1 \sigma_1^2 + n_2 \sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{Eq. 11}$$

n_1 et n_2 : effectifs

σ_1 et σ_2 : écarts types

Pour pouvoir comparer l'effet des différentes conditions testées sur la dégradation du matériau, le taux de corrosion (CR), exprimé en mm an^{-1} , a été calculé à partir de l'Équation 12 (ASTM, 2004)

$$\text{CR} = \frac{K \times \Delta m}{\rho \times A \times T} \times 0,001 \quad \text{Eq. 12}$$

K : constante d'unité : $8,76 \times 10^4$ pour obtenir l'unité en mm an^{-1}

Δm : perte de masse (g)

ρ : densité du métal (g cm^{-3}), ρ_{fonte} : $7,4 \text{ g cm}^{-3}$ (Stefanescu, 2003)

A : surface exposée (cm^2)

T : durée d'exposition (h)

II-5.1.3. Analyse en spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une méthode non destructive d'observation et de caractérisation de la composition moléculaire et de la structure d'un matériau. L'échantillon a été préalablement séché en chambre anaérobie puis il a été placé dans une cellule hermétique (N_2 - 100 %) créée au LCPME de 3 cm de diamètre et constituée d'une fenêtre en saphir (Figure II-11).

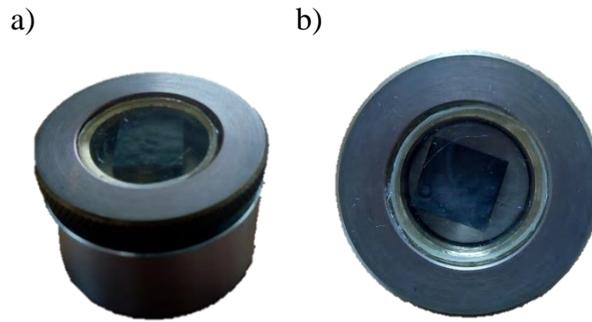


Figure II-11 : Cellule hermétique, contenant un coupon, utilisée pour la spectroscopie Raman (a) vue de côté et (b) vue du haut.

La spectroscopie Raman a été réalisée à l'aide d'un dispositif Renishaw équipé d'un laser de longueur d'onde de 532 nm et de puissance de sortie de 0,5 %, un objectif $\times 50$, un détecteur Renishaw Centrus 0LL829 et une grille de 2400 l mm^{-1} . Le temps d'exposition était de 20 s. La gamme du spectre est variable en fonction de la condition analysée, elle varie généralement de 100 cm^{-1} à 1400 cm^{-1} . Des cartographies ont été effectuées afin d'obtenir plusieurs points d'analyse sur une surface de $180 \times 120 \mu\text{m}$. Les spectres ont été analysés avec le logiciel Renishaw WiRE. Les spectres Raman de référence sont présentés en Annexe 2.

II-5.1.4. Analyse en diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X (DRX) est une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X par la matière cristalline. Les analyses ont été réalisées au LIEC (UMR 7360 CNRS - Université de Lorraine) et les mesures ont été effectuées sur un diffractomètre D8 Advance Bruker avec une anode en cobalt ($\text{Co-}\lambda\text{K}\alpha = 1.78897\text{\AA}$). Le détecteur est un détecteur linéaire LynxEye. La puissance du générateur a été fixée à 35 kV et 45 mA. Le domaine de mesure en 2θ était de 3° à 90° , avec un pas de $0,035^\circ$ en 2θ , et une durée d'acquisition par point de 3. L'échantillon a été placé dans un dôme en plastique hermétique commerciale ($\text{N}_2 - 100\%$) (Figure II-12), après avoir été préalablement séché en chambre anaérobie.

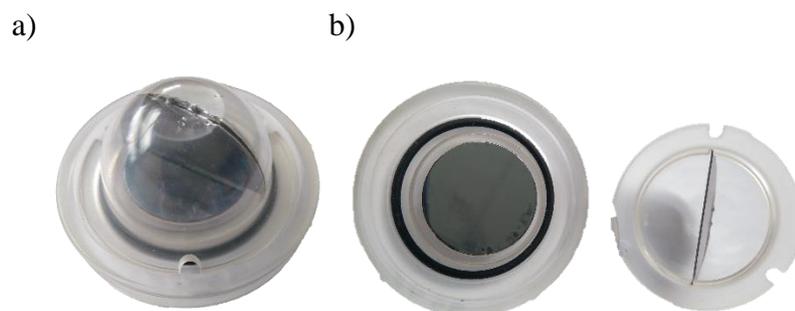


Figure II-12 : Cellule hermétique en plastique utilisée pour la diffraction des rayons X (a) fermée, vue de côté et (b) ouverte, vue du haut.

II-5.1.5. Analyses par microscopie électronique à balayage

Des analyses MEB ont été effectuées sur la section transversale d'un coupon qui a été préalablement poli miroir à 1 μm et a été stocké sous vide pour être métallisé avec du carbone. Il a été examiné à l'aide d'une sonde EDS en mode électrons rétrodiffusés avec un microscope électronique à balayage (XL 40 Philips) à 20 kV.

D'autres analyses MEB ont été effectuées sur la surface externe d'un coupon (non poli et non métallisé). Il a été analysé sous vide et examiné avec un microscope électronique à balayage MEB-FEG (JSM-IT500HR) à 5, 10 ou 20 kV, avec un courant à 50 % et un diagramme de 60 μm .

II-5.1.6. Profilométrie des coupons

Le profilomètre Brucker dektabXT® nanofab a été utilisé pour obtenir des données topographiques. Cela permet de connaître d'une part la rugosité de surface des coupons en fonte et d'autre part de caractériser la perforation superficielle appliquée pour mimer une blessure. Cette technique est basée sur un contact direct entre une pointe et un échantillon. Lors de la mesure, la pointe touche la surface tout en se déplaçant horizontalement le long de celle-ci. En suivant le profil de l'échantillon sur l'axe X, la pointe subit les déplacements simultanés dans la direction perpendiculaire à l'axe Y, ce qui donne un profil. Le rayon de la pointe était de 2 μm , l'échantillon a été balayé de gauche à droite sur une distance de 524 μm avec une force de pression de 1 mg. Trois mesures ont été effectuées pour chaque échantillon.

II-5.2. Méthodes d'analyses des suspensions et solutions

II-5.2.1. Suspensions bactériennes

II-5.2.1.1. Densité optique

La variation de densité bactérienne a été estimée par densité optique à 600 nm ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$) avec un spectrophotomètre (Fisher Scientific, *cell density meter model 40*).

II-5.2.1.2. Microscopie optique sous épifluorescence

La microscopie optique sous épifluorescence permet de dénombrer les bactéries et donc de suivre leur croissance. Un millilitre d'une suspension bactérienne a été fixé au glutaraldéhyde 2 %. Pour les bactéries accrochées au coupon, le protocole de Gosselin *et al.*, 2018 a été suivi.

Le mélange suspension bactérienne + bactéries accrochées au coupon a été dilué avec de l'eau ultrapure (eau apyrogène B-Braun) afin d'obtenir des champs comportant entre 20 et 200 bactéries. Cent microlitres d'une solution stock de SYBR® Green (SYBR® Green II, S7586, In Vitrogen - Molecular Probes) diluée au 1/1000 ont été ajoutés. Pour le dénombrement des bactéries vivantes et mortes, le kit LIVE/DEAD™ BacLight™ a été utilisé : 2,5 µL d'une solution à 3,34 mM de Syto®9 *nucleic acid* et 3 µL d'une solution à 20 mM de propidium iodide ont été ajoutés à 1 mL de l'échantillon. La suspension a été incubée 15 min à l'obscurité puis elle a été filtrée (Millipore, polycarbonate, 0,22 µm) avec 5 – 10 mL d'eau apyrogène puis rincée par 5 mL d'eau apyrogène pour récolter l'ensemble des bactéries. La membrane a ensuite été déposée sur une lame de microscope avec 30 µL de glycérine tamponnée et observée sous épifluorescence × 1000 (OLYMPUS BX51) sous huile à immersion à la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome (excitation en lumière bleue à 494 nm, émission en lumière verte à 521 nm). Des clichés (n = 10) ont été effectués aléatoirement afin d'observer les bactéries fluorescentes.

II-5.2.1.3. Test d'inhibition par microbiologie pasteurienne

Le test d'inhibition par microbiologie pasteurienne est simple et visuel. Il permet de savoir si un microorganisme a un effet antagoniste sur un autre. Les tests d'inhibition entre deux souches bactériennes ont été effectués à l'aide de cultures microbiennes solides sur boîte de pétri. Chaque souche a été cultivée dans un milieu riche (pendant 48 h dans le milieu TSB pour *S. putrefaciens* et pendant 5 jours dans le milieu de Postgate pour *D. desulfuricans*). Un mL de la culture en milieu riche a étéensemencé par incorporation dans un milieu de culture solide riche (le milieu TSA) pour chacune des bactéries. Ensuite, 10 µL de la suspension de la seconde souche a été ajoutée à la culture en profondeur de la première souche. Les cocultures ont alors été incubées en anaérobiose, à 30 °C, pendant 5 jours. En parallèle, des contrôles ont été effectués afin de garantir que les souches ont bien une croissance. Il s'agit des ensemencements en profondeur de chaque souche sans ajout de la seconde souche. La durée et la température d'incubation sont les mêmes.

II-5.2.1.4. Techniques de biologie moléculaire

1. Extraction de l'ADN

Des extractions d'ADN ont été effectuées, le gène codant pour l'ARN 16S a été ciblé car il correspond à des séquences conservées au sein de chaque espèce de procaryotes.

Pour les souches pures de laboratoire, les extractions d'ADN ont été réalisées à partir d'un millilitre de suspension sans filtration préalable. Le kit génomique Wizard® Genomic DNA purification kit a été utilisé pour extraire l'ADN total (Annexe 3).

Le kit DNaesy® *Power Water*® (Qiagen, Cat No 14900-50-NF) (Annexe 4), habituellement utilisé pour extraire les ADN de communautés aquatiques, a ici été utilisé pour extraire l'ADN total des suspensions de sol. Une étape de filtration a été nécessaire afin de récupérer les microorganismes issus des suspensions de sol car les extractions par ce kit impliquent l'emploi de bactéries filtrées. Pour cela, un millilitre de suspension de sol a été filtré à travers une membrane (Millipore, polycarbonate, 0,22 µm) placée au préalable dans une tulipe d'une rampe de filtration équipée d'une mise sous vide. Le filtra a alors été récupéré afin d'extraire l'ADN.

2. Quantification de l'ADN par spectrophotométrie

L'ADN total a été dosé par spectrophotométrie (Nanodrop® 2000 *Thermo Scientific*) à 230 nm, 260 nm et 280 nm. La quantification des acides nucléiques s'effectue à une absorbance de 260 nm car les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement à cette longueur d'onde. La limite de détection est de 0,25 µg mL⁻¹. Les mesures d'absorbance permettent aussi de définir la pureté des extractions. Lorsque le ratio $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ est compris entre 1,8 et 2,0, la qualité/pureté de l'extraction est considérée comme acceptable. Un rapport inférieur à 1,8 indique la présence de protéines et/ou des composés phénoliques, l'extraction est donc polluée. Un rapport supérieur à 1,8 indique la présence d'ARN et/ou de bulles d'air. Le ratio $\frac{A_{260}}{A_{230}}$ est un deuxième indicateur de pureté, la valeur attendue se situe entre 2,0 et 2,2, ce qui indique une bonne pureté des acides nucléiques. Lorsque ce ratio est significativement plus faible, cela indique nécessairement qu'un composé absorbe à 230 nm, plusieurs contaminants proviennent de l'échantillon ou de la purification. Ces composés peuvent être de l'EDTA, des sucres, du phénol, de l'isothiocyanate de guanidine, des carbohydrates, des peptides, de l'acide humique, et/ou de l'urée.

3. Séquençage et analyse de metabarcoding de l'ADN 16S

Le metabarcoding consiste à identifier des groupes taxonomiques à partir de l'ADN présent dans des échantillons environnementaux (eau, sol, etc.). Les échantillons d'ADN extraits des suspensions de sols ont été envoyés au groupe Qualtech (ADNid – Montferrier-sur-Lez) pour pyroséquençage et analyses bio-informatiques. De courts fragments d'ADN 16S (régions V3-V4) ont été utilisés comme marqueurs taxonomiques. Ils ont donc été amplifiés par PCR puis

séquencés par approche MiSeq®. Pour la détection taxonomique, les OTU (Unité Taxonomique Opérationnelle) ont été comparées avec la base SILVA afin de procéder à l'assignation d'espèces.

4. Réaction en chaîne par polymérase quantitative

La qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) met en œuvre une réaction en chaîne par polymérase qui permet d'amplifier l'ADN d'une souche bactérienne. Un programme d'amplification est composé de plusieurs étapes (Figure II-13). D'abord il y a la dénaturation de l'ADN, qui permet de dénaturer les ADN doubles brins et de casser les structures secondaires. Puis, il y a l'hybridation où des amorces spécifiques de la séquence cible s'hybrident aux ADN matrices à une température qui leur est thermodynamiquement favorable (i.e. température d'hybridation T_m). Cette étape déclenche alors l'étape d'élongation, où les polymérases synthétisent le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce cycle est répété plusieurs fois afin d'amplifier le signal. Un marqueur fluorescent (sonde TaqMan® ou SYBR®) permet alors de détecter un signal rigoureusement proportionnel au nombre de fragments d'ADN amplifiés.

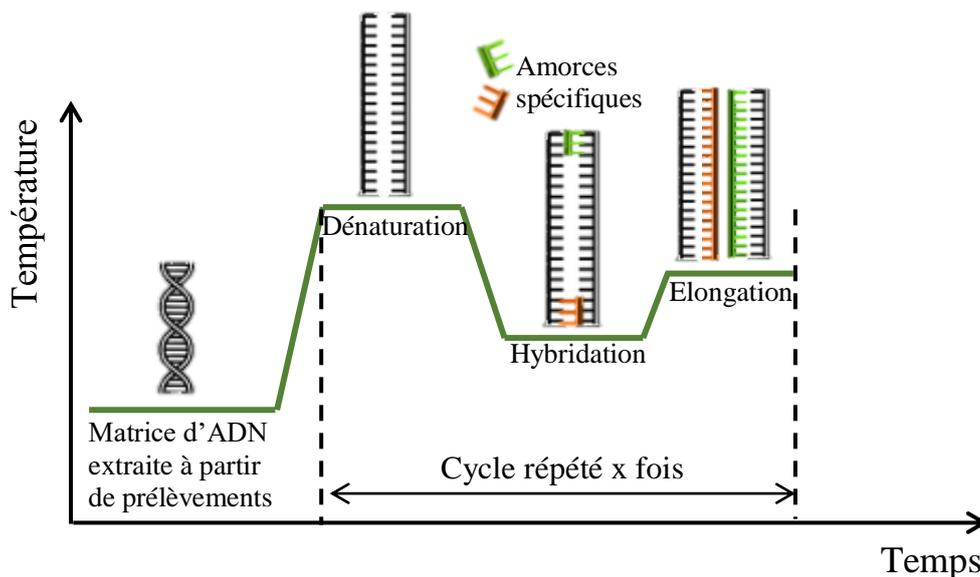


Figure II-13 : Schéma simplifié des étapes de la qPCR.

Les qPCR ont été effectuées sur des échantillons de mono-cultures et de cocultures où l'ensemencement initial correspondait à une densité DO_{600nm} égale soit à 1 soit à 0,1. Les amorces utilisées pour amplifier l'ADN de *S. putrefaciens* sont issues des travaux de Li *et al.*, 2018. Il s'agit d'une séquence d'ADN sur le gène de l'ARN ribosomique 16S (Tableau II-3).

Pour *D. desulfuricans*, elles sont issues des travaux de Kondo *et al.*, 2008. Il s'agit des gènes codant pour les sous unités α (dsrA) et β (dsrB) de la sulfite réductase dissimilatoire (DSR).

Tableau II-3 : Amorces de qPCR (SYBR®) pour *Shewanella putrefaciens* et *Desulfovibrio desulfuricans*.

Souches	Nom	Séquences	Tm °C	% GC
<i>S. putrefaciens</i>	640F	RAC-TAG-AGT-CTT-GTA-GAG-G	58	42,1
	815R	AAG-DYA-CCA-AAY-TCC-GAG-TA	56	35
<i>D. desulfuricans</i>	DSR-1F	ACS-CAC-TGG-AAG-CAC-GCC-GG	68	65
	DSR-R	GTG-GMR-CCG-TGC-AKR-TTG-G	62	52,6

Pour ces deux souches, le mix de réaction (25 μ L final) est composé de 12,5 μ L de Master Mix (SYBR® Green Master Mix No UNG), 1,25 μ L de chaque amorce à 10 μ M et 10 μ L de la matrice d'ADN.

Pour chaque condition, 1 mL d'une culture *overnight* de la souche *E. coli* EDCM a été ajouté. Cette souche est un contrôle interne permettant de normaliser les biais d'extraction et de contaminations par des éventuels inhibiteurs. Les amorces et sonde utilisées pour amplifier le chromosome d'*E. coli* EDCM367, une souche issue de la collection du LCPME, sont représentées dans le Tableau II-4.

Tableau II-4 : Amorces et sonde de qPCR (Taqman®) d'*Escherichia coli* EDCM

Nom	Séquences
EDCM367-F	GACAGGTTTCCCGACTGG
EDCM367-R	CGACTTCATTCACCTGACGA
EDCM367-P	(FAM)5'-CCGCTTGGAACGGGCTCACT-3'(TAMRA)

Le mix de réaction (25 μ L final) est composé de 12,5 μ L de Master Mix (Taqman® Universal Master Mix No UNG), 0,5 μ L de chaque amorce à 40 μ M, 0,25 μ L de sonde à 20 μ M, 1,25 μ L d'eau ultrapure et 10 μ L de la matrice de plasmide.

Pour toutes les souches, le programme d'amplification est le même et se compose d'une étape initiale de 2 min à 50 °C suivie de 10 minutes à 95 °C. Puis 45 cycles d'amplification sont effectués avec une dénaturation de 15 secondes à 95 °C puis une hybridation/élongation de 1 min à 60 °C. Avec le marqueur SYBR®, une courbe de fusion a été réalisée afin de vérifier qu'un seul produit de PCR a été amplifié : le programme est composé d'une étape de 15 s à 95 °C, puis 1 min à 60 °C et à nouveau 15 s à 95 °C. Les qPCR ont été réalisées avec le

thermocycleur iCycler iQ system (Bio-Rad). Les échantillons ont été dilués au 100^e et au 1000^e afin de prévenir l'effet d'éventuels inhibiteurs co-extraits avec les ADN.

II-5.2.2. Suivi de la concentration en fer dans la suspension/solution

II-5.2.2.1. Dosage du fer total

La concentration en fer dans les flacons contenant un coupon en fonte a été suivie au cours du temps. Avant l'analyse, les échantillons prélevés ont été dilués par 2 dans l'acide chlorhydrique 5 M, afin de favoriser la dissolution des phases solides du fer, puis filtrés (MF-Millipore™ Membrane 0,22µm) et re-dilués si nécessaire en fonction de la gamme étalon dans H₂O. L'étalonnage a été préparé à partir d'une solution normée commerciale (ROTI® STAR, 1000 mg L⁻¹ ± 0,2 %). La quantité de fer (Fe^{II} + Fe^{III}) a été déterminée par ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometer*) avec l'ICP Jobin Yvon® avec une détection effectuée à 259,940 nm (limite de détection 0,05 mg L⁻¹) ou avec l'ICP Vista-Pro® et une détection à 239,563 nm (limite de détection 0,05 mg L⁻¹).

II-5.2.2.2. Dosage par spectrophotométrie UV-visible du fer (II)

La concentration en espèce Fe^{II} extractible par HCl 5 M, a été déterminée en diluant les échantillons dans l'acide car cela empêche l'oxydation du Fe^{II} sous atmosphère oxygénée et cela favorise la dissolution des phases solides du fer. Deux méthodes de dosage colorimétrique ont été utilisées : avec la phénanthroline et avec la ferrozine.

- La méthode de dosage colorimétrique à la phénanthroline est issue des travaux de Fadrus et Maly (1975) et de Kotska et Neelson (1998). À l'échantillon dilué dans HCl (dilution par 2) a été ajouté 10 mL de la solution (i.e. 5 volumes de phénanthroline 0,025 M + 5 volumes de glycolle 0,5 M + 1 volume d'acide nitrilotriacétique 0,1 M). Le volume a ensuite été complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Le mélange a été laissé 15 min à l'obscurité afin de laisser la complexation se faire. L'absorbance a été mesurée à 510 nm et comparée à une gamme étalon obtenue à partir d'une solution de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ • 6 H₂O dans la gamme de 2 à 100 µg L⁻¹.
- La méthode de dosage colorimétrique à la ferrozine a été optimisée au cours de la thèse afin de réduire les temps d'analyse. La ferrozine forme un complexe avec Fe²⁺ qui présente un maximum d'absorption à 562 nm. Une gamme étalon a été préparée à partir d'une solution de Fe(SO₄) • 7 H₂O avec des concentrations de 0 à 10 mg L⁻¹, et la courbe A = f(C) a été

tracée, avec A l'absorbance de la solution et C la concentration en Fe^{II} . Pour titrer Fe^{2+} présent dans une solution, 1 mL de la solution à doser a été additionné à 100 μL de la solution de ferrozine préparée en milieu acétate d'ammonium 0,1 mol L^{-1} et à 0,5 mL de tampon pH ammoniacal 5 M garantissant un pH où le complexe ferrozine - Fe^{2+} est stable.

II-5.2.3. Dosage dans la suspension/solution des anions inorganiques et organiques par chromatographie ionique

L'évolution des concentrations en anions inorganiques nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-), sulfate (SO_4^{2-}) et en anions organiques fumarate ($\text{C}_4\text{H}_2\text{Na}_2\text{O}_4$) et succinate ($\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4$) a été suivie par chromatographie ionique. L'analyse a été réalisée avec un chromatographe 882 compact IC plus de chez Metrohm équipé d'une pompe haute pression, d'un injecteur (boucle 20 μL) pourvu d'un neutraliseur à résine sulfonate qui permettent d'éliminer d'autres cations tels que le fer, d'une colonne d'analyse (A Supp 16 250 mm/4 mm - copolymère polystyrène-divinylbenzène fonctionnalisé ammonium quaternaire) avec colonne de garde, de deux systèmes de suppression (suppresseur chimique et supprimeur CO_2). La détection est conductimétrique et l'éluant utilisé est un mélange soude et carbonate de sodium (NaOH 0,75 mM et Na_2CO_3 , 7,5 mM). Pour les ions inorganiques, une pré-colonne (Metrosep RP 2 Guard) a été placée en amont de la colonne d'analyse afin d'éliminer les traces de composés organiques et l'étalonnage externe a été préparé à l'aide d'une solution normée commerciale (AccuSPEC lot S161110006, SCP Science). Pour les ions organiques, l'étalonnage a été préparé à l'aide de fumarate de sodium et de succinate de sodium.

L'analyse des cations (NH_4^+) a été réalisée avec le chromatographe 761 compact IC de chez Metrohm à l'aide d'une colonne d'analyse Metrosep C6 250/4.0 mm (Acide maléique de polybutadiène sur base de gel de silice) munie d'une colonne de garde adéquate. Une pré-colonne (Metrosep RP 2 Guard) a été placée en amont de la colonne d'analyse. L'éluant est un mélange d'acide nitrique (1,7 mM) et d'acide dipicolinique (1,7 mM). Le volume d'injection est ici de 5 μl et la détection est également conductimétrique. L'étalonnage externe a été préparé à l'aide d'une solution normée commerciale (AccuSPEC lot 5170531008, SCP Science).

Tous les échantillons à analyser ont été centrifugés puis filtrés sur membrane (MF-Millipore™ Membrane 0,22 μm) et conservés à 4 °C avant analyse.

**Chapitre III : Mise en place du protocole de diagnostic de la
(bio)corrosion de la fonte ductile brute de Saint-Gobain PAM**

De nombreuses études sur la biocorrosion ont émergé ces dernières décennies, avec plus de 2000 publications sur le thème MIC ces 25 dernières années (Little *et al.*, 2020a). Cependant, peu de travaux ont été menés sur des échantillons de fonte ductile (Teng *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2014 ; Qiu *et al.*, 2018). Ils sont même inexistants lorsqu'il s'agit de fonte ductile brute. Par brute, il est entendu de la fonte provenant d'un tuyau sorti du site de production, avant qu'il ne soit revêtu pour augmenter sa durée de vie d'utilisation (ici dépôts des revêtements Zn Al Cu puis Aquacoat®) et donc sans polissage. La fonte utilisée dans notre projet présente, à sa surface externe (i.e. la surface en contact avec l'environnement), une couche d'oxydation liée au traitement thermique lors de la fabrication des tuyaux que nous appellerons **couche native d'oxydes** dans la suite de ce manuscrit. Apprécier la progression de l'altération d'un matériau présentant déjà une couche d'oxydation de surface est plus difficile mais est nécessaire lorsqu'il s'agit de se rapprocher de la réalité. En effet, il arrive que les tuyaux revêtus subissent des dommages entraînant alors un contact direct entre la fonte munie de sa couche native d'oxydes et l'environnement. Ce Chapitre III présente l'approche expérimentale et les outils que nous avons choisis pour cette étude ainsi que les mises au point de certaines de ces approches. La fonte brute et sa couche native d'oxydes ont été caractérisées afin de mettre en place un protocole de mise en évidence de la MIC. Ce protocole a été testé dans des conditions simples et contrôlables (i.e. sans organismes vivants). Enfin, le milieu d'incubation a été amélioré afin de tester le potentiel corrosif de différentes bactéries sur la fonte brute (des bactéries en souches pures dont les résultats sont développés au Chapitre IV et des bactéries issues de sols dont les résultats sont développés au Chapitre V).

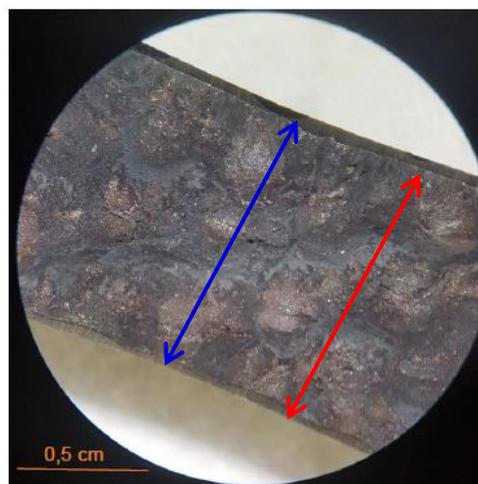
III-1 État de surface de la fonte de Saint-Gobain PAM

Si la fonte se trouve dans un environnement corrosif, des produits de corrosion se formeront en plus de ceux déjà présents originellement. Estimer ce que représente la couche native d'oxydes, connaître sa masse et la concentration correspondante en fer, nous permettra d'apprécier, par différence avec ce qui a été précipité et adsorbé en surface durant une corrosion, le véritable effet corrosif d'une condition donnée.

Les études sur la corrosion rapportées dans la littérature se font sur des échantillons de fonte généralement polis. Si cela permet de simplifier et maîtriser l'état de surface, cela ne représente pas tout à fait la réalité. Le polissage est généralement réalisé avec du papier abrasif (e.g. Wang *et al.*, 2014) ou encore de la pâte de diamant (e.g. Akinribide *et al.*, 2019). La fonte ductile de Saint-Gobain PAM présente, sur sa surface externe, deux types de structures, visibles à l'œil

nu, il s'agit d'aspérités et de cavités (Figure III-1). La rugosité de surface de l'échantillon a été estimée à l'aide d'un profilomètre (Figure III-1b). Deux mesures ont été réalisées à différents endroits sur la surface du coupon et sont représentées en rouge et bleu (Figure III-1a). La distance moyenne entre les pics et les creux est régulière, elle est de $1,72 \pm 0,16$ mm. La rugosité totale (R_t) est estimée égale à 0,4 mm. Ainsi, une préparation par abrasion mènerait à une destruction de la rugosité et des structures et changerait considérablement la surface de la fonte. Étant donné que la rugosité et la topographie de surface influencent l'attachement des bactéries (Crawford *et al.*, 2012 ; Javed *et al.*, 2017), aucun traitement de surface n'est appliqué avant les tests de corrosion afin de se rapprocher au maximum des conditions réelles.

a)



b)

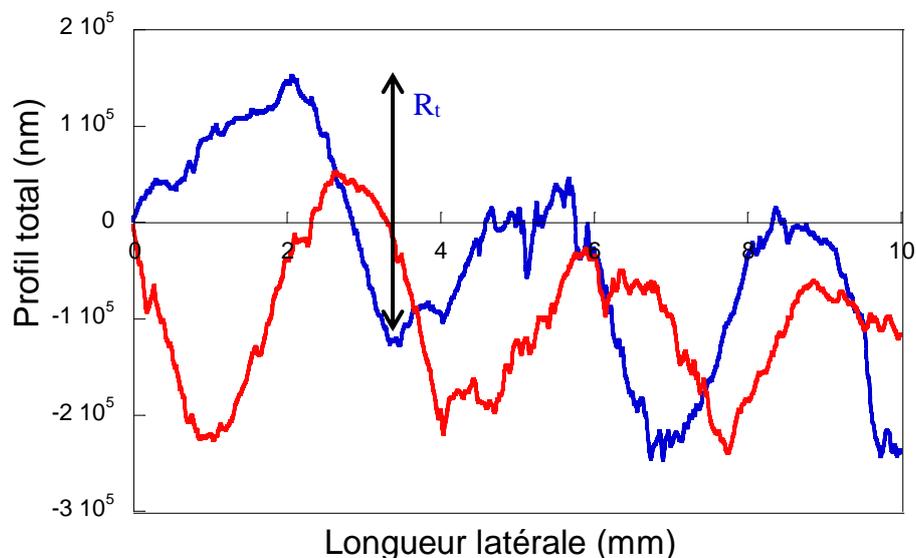


Figure III-1 : (a) Aspect d'un coupon en fonte ductile sans revêtement observé à la loupe binoculaire de face (grossissement $\times 20$). Les flèches indiquent le profil total du coupon en fonte représenté en (b), $R_t = 0,4$ mm.

Pour connaître la composition de la couche native d'oxydes, un coupon a été tout d'abord cartographié en spectroscopie Raman (Figure III-2). Les spectres Raman de référence sont présentés en Annexe 2 et chaque zone analysée est matérialisée sur la figure par un carré de même couleur. La surface révèle la présence essentiellement d'hématite ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$) et de maghémite ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$) qui sont des oxydes de Fe^{III} (Figure III-2b). L'hématite est l'oxyde de fer le plus abondant dans la nature puisqu'il est stable thermodynamiquement, c'est donc cohérent de le retrouver sur la surface externe du coupon. On remarque des zones plus blanches sur la surface de la fonte. Il s'agit d'un mélange d'hématite et d'un autre composé que nous n'avons pas réussi à identifier à partir de la base de données RRUFF™.

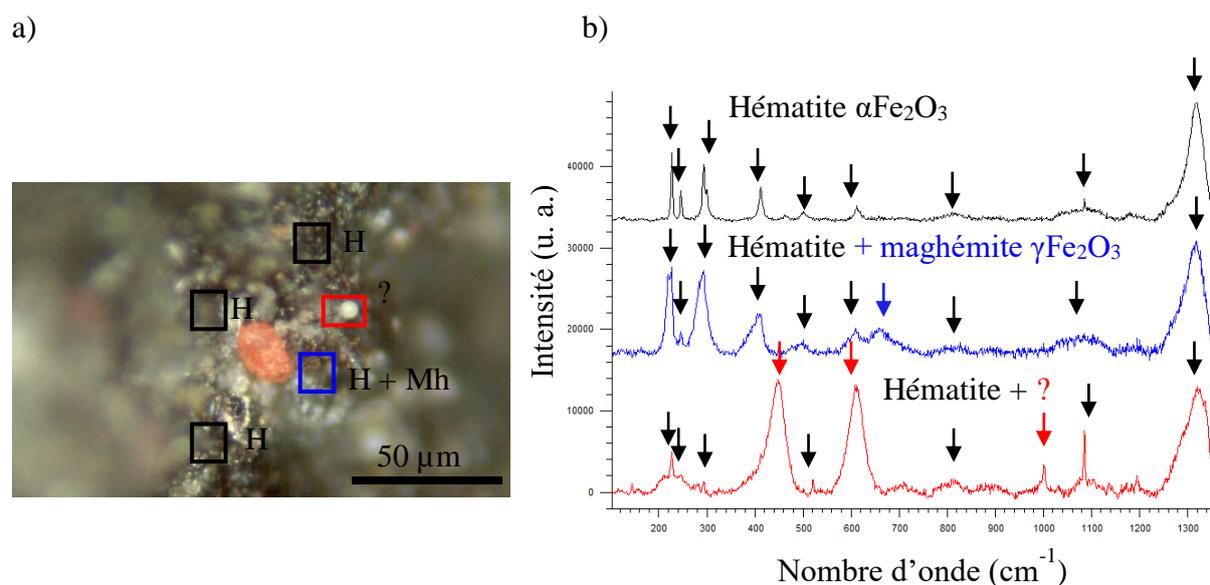


Figure III-2 : Surface balayée par spectroscopie Raman (a) et spectres correspondants (b) de la face supérieure d'un coupon en fonte brute de Saint-Gobain PAM.

H = hématite et Mh = maghémite.

La DRX révèle également la présence d'hématite mais également de magnétite et de Fe^0 (Figure III-3). Le faisceau de la DRX peut aller à une profondeur supérieure à celle du faisceau Raman, ce qui explique la détection de la magnétite, un oxyde de fer mixte ($\text{Fe}^{\text{II}+} \text{Fe}_2^{\text{III}+}\text{O}_4$) et surtout du Fe^0 .

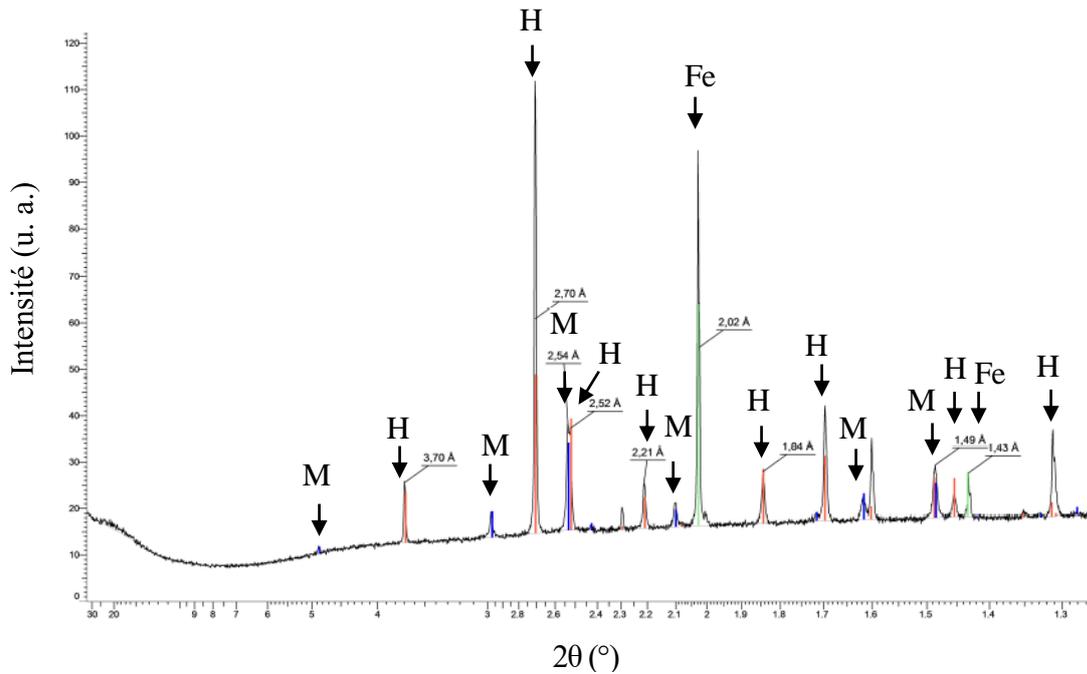


Figure III-3 : Spectre de diffraction des rayons X de la face supérieure d'un coupon en fonte brute de Saint-Gobain PAM.

H = hématite, M = magnétite et Fe = Fe⁰.

Des clichés en MEB, réalisés sur la surface externe d'un coupon en fonte brute de Saint-Gobain PAM, confirment d'une part l'hétérogénéité significative de la fonte avec une forte rugosité et des structures variables (Figure III-4). D'autre part, les structures des aspérités et des cavités sont différentes. Les aspérités présentent plus de 5 structures différentes (signalées par différentes formes dans la Figure III-4a). Les cavités, quant à elles, semblent être plus homogènes et des sortes de cratères sont visibles (signalés par une flèche dans la Figure III-4b). D'autres clichés en MEB ont été réalisés sur la section transversale d'un échantillon de tuyau en fonte brute (Figure III-4b). De bas en haut, la fonte est en blanc et les deux flèches indiquent le carbone sphéroïdal de la fonte. En gris clair, il s'agit de la couche native d'oxydes. Différentes teintes de gris sont notables, elles représentent différents types d'oxydes. Cette image montre également l'irrégularité d'épaisseur de cette couche. L'épaisseur moyenne de cette couche a été estimée à partir de nombreux clichés de la société Saint-Gobain PAM à $50 \pm 15 \mu\text{m}$. Les clichés MEB mettent en évidence que la surface de la couche est poreuse et fissurée.

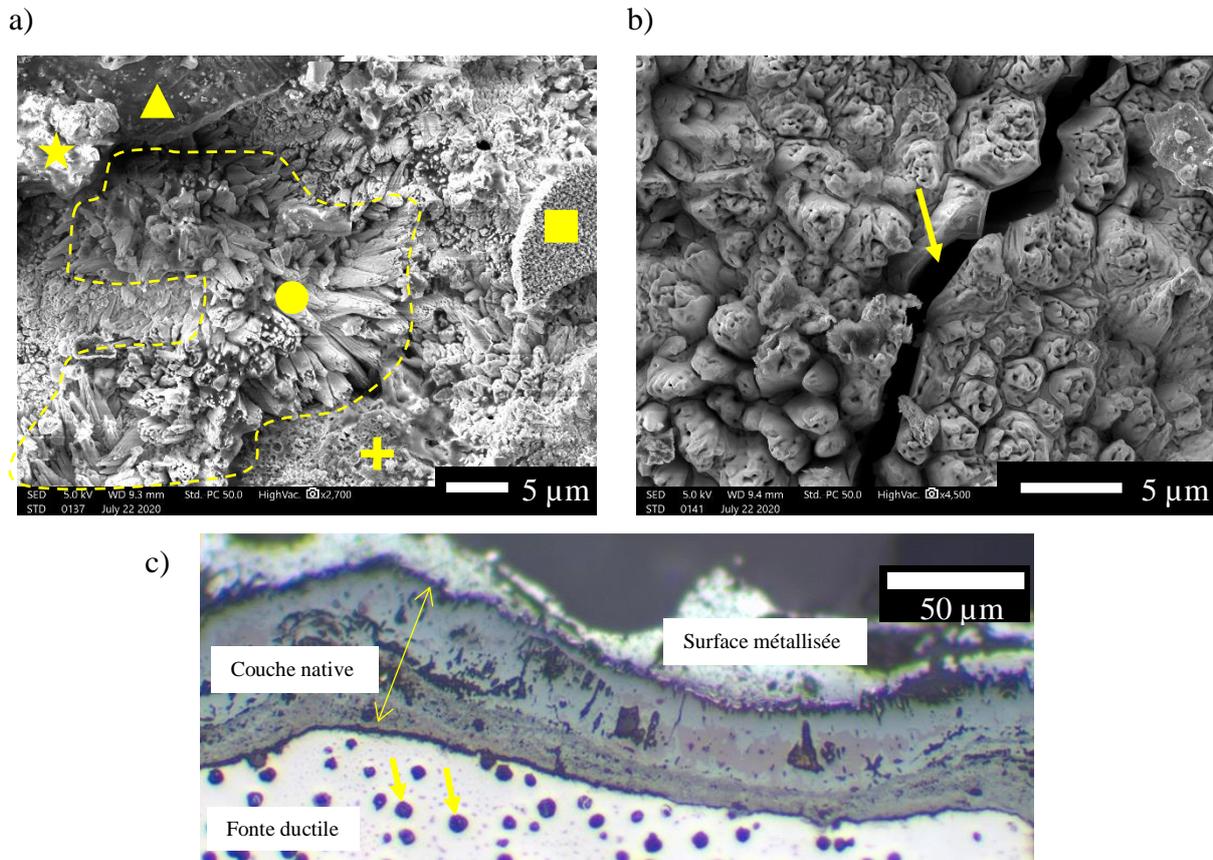


Figure III-4 : Images en microscopie électronique à balayage (a et b) enregistrées à deux endroits de la surface d'un échantillon de tuyau en fonte montrant des structures différentes (marquées en (a) par le triangle, la croix, le carré, le rond et l'étoile par exemple), des crevasses sont également apparantes en (b). En (c), une section transversale montre la couche native d'oxydes d'épaisseur moyenne de 50 µm et la fonte ductile avec son carbone sphéroïdal signalé par des flèches.

La fabrication des tuyaux en fonte répond à des exigences (norme EN ISO 9001) qui certifient la maîtrise et la qualité des procédés de fabrication. La composition de la fonte est donc strictement toujours identique d'un tuyau à un autre. La couche native d'oxydes, quant à elle, comme nous venons de le montrer, n'est pas toujours strictement identique sur toute la surface d'un tuyau, en accord avec Corish *et al.* (2003). Ainsi, ces analyses effectuées sur un coupon brut non poli mettent en évidence l'hétérogénéité de la couche native d'oxydes d'un point de vue chimique (composition) et physique (structure, taille de la couche et rugosité). Cette hétérogénéité impacte le taux de corrosion. En effet, une étude statistique sur dix tuyaux en fonte de grand diamètre, choisis au hasard et exhumés du sol a prouvé que les imperfections et les trous d'évent (qui se forment lors du processus de coulée) ont contribué à une augmentation progressive de la profondeur des piqûres de corrosion (Asadi et Melchers, 2017). Par ailleurs, certains des oxydes présents, comme la magnétite, sont protecteurs de la corrosion du fer élémentaire situé sous la couche native d'oxydes (Li *et al.*, 2016), d'autres ne le sont pas et en

fonction de ces oxydes retrouvés en surface, le taux de corrosion peut être multiplié par 10 (Sancy et *al.*, 2010). Ainsi, pour se rapprocher le plus possible des conditions réelles, il est préférable de garder la surface des coupons telle quelle, i.e. brute.

III-1.1. Estimation de la masse de la couche native d'oxydes et de la concentration en fer correspondante

L'analyse DRX a été effectuée sur la section transversale d'un coupon en fonte (Saint-Gobain PAM, 2017) et le Tableau III-1 rassemble les composés retrouvés et leur proportion relative. En cohérence avec la spectroscopie Raman, on observe la présence de fer métallique (Fe^0) et différents oxydes de Fe^{III} et/ou Fe^{II} : hématite (Fe_2O_3), wustite (FeO), magnétite (Fe_3O_4) et fayalite-magnésium manganosique ($\text{Mg}_{0,3}\text{Fe}_{1,6}\text{Mn}_{0,1}\text{SiO}_4$).

Tableau III-1 : Liste des composés et leur proportion relative dans la couche native d'oxydes de la fonte ductile de Saint-Gobain PAM.

Nom du composé	Formule	Analyse semi-quantitative (%)	Densité (Vega, 2004)
Hématite	$\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$	31,0	5,24
Quartz	SiO_2	22,8	2,65
Magnétite	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{O}_4$	19,8	5,20
Fer	Fe^0	19,4	7,87
Wustite	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}$	4,2	5,70
Fayalite magnesian manganoan	$\text{Mg}_{0,3}\text{Fe}^{\text{II}}_{1,6}\text{Mn}_{0,1}\text{SiO}_4$	2,7	4,22
Total		99,9	5,14

En tenant compte, d'une part, de la densité de chaque constituant et, d'autre part, de leur proportion au sein de la couche, la densité de la couche native d'oxydes calculée est alors de $5,14 \text{ g cm}^{-3}$ (Tableau III-1). En considérant le volume occupé par cette couche sur les coupons qui est égale en moyenne à $0,005 \text{ cm}^3$ ($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 50 \pm 15 \mu\text{m}$), la masse totale de la couche est ainsi estimée à $26 \pm 8 \text{ mg}$.

Remontant à la composition élémentaire, détaillée dans le Tableau III-2, cela nous permet d'estimer la quantité moyenne de fer oxydé présent à la surface d'un coupon. D'après les résultats du Tableau III-2, la composition chimique moyenne de la couche native d'oxydes est $\text{Fe}_{1,493} \text{O}_{2,328} \text{Si}_{0,255} \text{Mg}_{0,008} \text{Mn}_{0,003}$. Sa masse molaire est égale à $128,24 \text{ g mol}^{-1}$. Pour une couche native d'oxydes de 26 mg , cela représente donc 3×10^{-4} mole de fer soit $17 \pm 5 \text{ mg cm}^{-2}$ (pour un coupon de 1 cm par 1 cm).

Tableau III-2 : Composition élémentaire de la couche native d'oxydes.

Élément chimique	Fe	O	Si	Mg	Mn
Masse atomique (g mol ⁻¹)	56	16	28	24	55
Composition relative (%)					
Fe ₂ O ₃	31,0 × 2	31,0 × 3	0	0	0
SiO ₂	0	22,8 × 2	22,8 × 1	0	0
Fe ₃ O ₄	19,8 × 3	19,8 × 4	0	0	0
Fe	19,4 × 1	0	0	0	0
FeO	4,2 × 1	4,2 × 1	0	0	0
Mg _{0,3} Fe _{1,6} Mn _{0,1} SiO ₄	2,7 × 1,6	2,7 × 4	2,7 × 1	2,7 × 0,3	2,7 × 0,1
Total	1,493	2,328	0,255	0,008	0,003

Cette estimation nous permettra d'évaluer le degré de corrosion induit par nos conditions opératoires.

III-1.2. Mise au point des conditions d'extraction des produits de corrosion

Au cours du processus de corrosion, les produits de corrosion générés peuvent être insolubles et précipiter à la surface du coupon ou se retrouver dans la phase eau en suspension avec les espèces solubles. Il faut donc développer un traitement spécifique pour extraire l'ensemble de ces produits afin de les quantifier (Figure II-9). Il est aussi indispensable de vérifier que le traitement d'extraction ne vienne pas attaquer la fonte au risque de conduire à une surestimation de la corrosion (Figure III-5). La nature de la couche native étant un mélange d'oxydes de fer issus de la fonte, nous avons choisi de l'utiliser comme matériau modèle pour mettre au point le traitement d'extraction. Connaissant sa teneur en fer, cela nous permettra de vérifier l'efficacité ou pas du traitement envisagé.

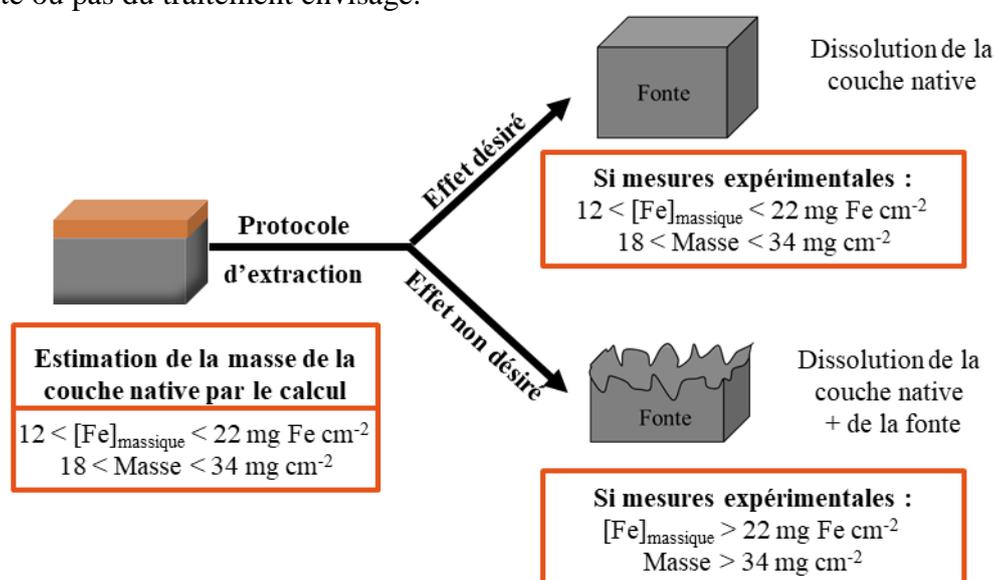


Figure III-5 : Schéma illustrant les deux effets probables du traitement acide pour extraire les produits de corrosion.

Le traitement mis en place s'inspire de la méthode normalisée ASTM G1 (ASTM G1, 2004). Cette méthode expose la procédure à suivre afin de i) préparer, ii) nettoyer et iii) d'évaluer la corrosion d'un échantillon :

i) Il est indiqué que la préparation de l'échantillon doit être effectuée uniquement si elle ne change pas les conditions métallurgiques du métal.

ii) La norme explique ensuite qu'il existe trois catégories de procédure pour retirer les produits de corrosion : mécanique, électrolytique et chimique. La norme précise que la procédure mécanique ne doit être utilisée qu'en cas d'échec des deux autres procédures car elle est agressive. Pour les procédures électrolytique et chimique, le matériel est plongé dans une solution qui dépend du type de matériau (mélange de sels ou d'acide) pendant un temps défini et à une température contrôlée. Pour la procédure électrolytique, un courant cathodique est appliqué et dépend également du type de matériau.

iii) Enfin, après avoir appliqué l'une des trois procédures, l'estimation de la corrosion s'effectue à l'aide d'un calcul de perte de masse.

Dans notre cas, nous avons montré que la couche native d'oxydes a une composition particulière pouvant influencer la corrosion et doit donc être conservée. Ainsi, afin de suivre les recommandations de la norme, aucune préparation préalable de l'échantillon n'est effectuée. Afin de retirer les produits de corrosion, la procédure chimique a été retenue car elle ne nécessite pas de matériel et est donc plus accessible pour un usage routinier. Plusieurs traitements chimiques sont proposés dans la norme, soit en présence d'acide, de soude ou de sel de citrate. Le traitement en présence d'acide a été choisi car c'est un traitement largement employé et qui a démontré son efficacité dans l'extraction et l'évaluation de la distribution du fer dans les sédiments aquifères (Heron *et al.*, 1994). L'acide chlorhydrique (HCl) a été choisi car c'est celui proposé dans la norme (ASTM G1, 2004). En outre, il apparaît que HCl, est plus efficace que l'acide sulfurique (H₂SO₄) (Bayol *et al.*, 2007) car les ions chlorures sont moins hydratés que les ions sulfate et sont donc fortement adsorbés à la surface du métal (Singh *et al.*, 1995).

L'effet de l'acide chlorhydrique (0,3 M et 1 M) sur la fonte en termes de perte de masse et de quantité de fer dosé extractible en fonction du temps de contact avec la solution de traitement est représenté par la Figure III-6. La perte de masse et la concentration en fer ont la même allure en fonction du temps et quelle que soit la concentration de HCl : il y a une forte augmentation suivie d'une amorce de plateau. Comme attendu, avec HCl 1 M la perte de masse et la

concentration en fer est plus importante qu'avec HCl 0,3 M. À 120 min, la perte de masse est de $19 \pm 2 \text{ mg cm}^{-2}$ avec HCl 0,3 M et la quantité de fer dosée atteint $15 \pm 2 \text{ mg cm}^{-2}$. Avec HCl 1 M, les quantités sont d'environ 1,5 fois plus importante avec $28 \pm 1 \text{ mg cm}^{-2}$ de perte de masse et $26 \pm 5 \text{ mg cm}^{-2}$ de fer. La couche native d'oxydes, estimée à $17 \pm 5 \text{ mg cm}^{-2}$ de fer, est complètement dissoute et le Fe^0 de la fonte commence même à être attaqué au bout de 6 h avec HCl 0,3 M et au bout de 2 h avec HCl 1 M.

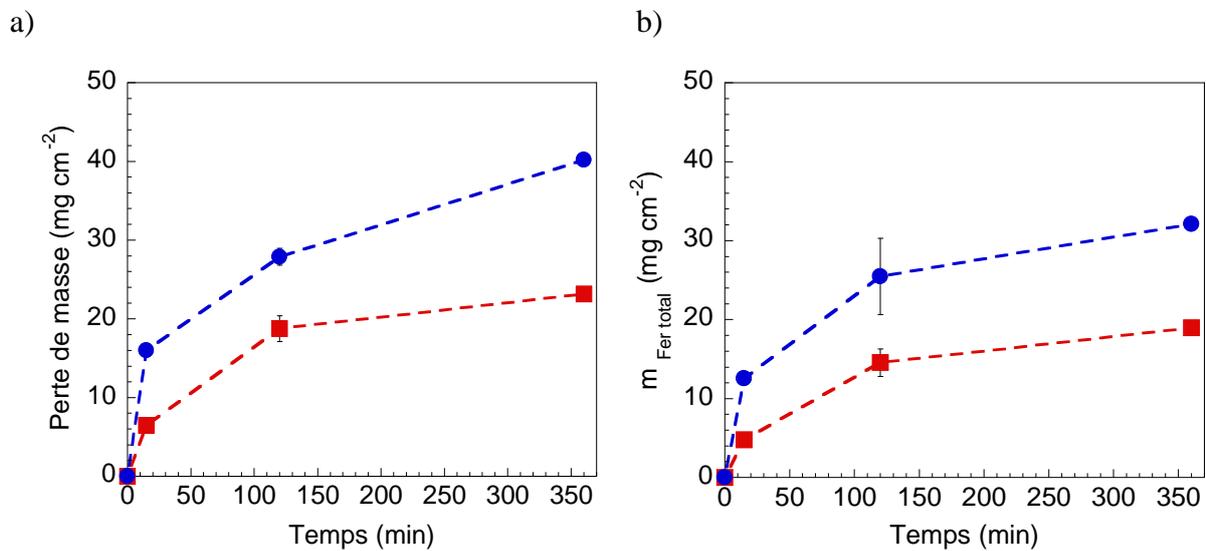


Figure III-6 : Évolution (a) de la perte de masse et (b) de la quantité de fer extraite des coupons en fonction du temps de traitement avec 0,3 M HCl (carré) et 1 M HCl (cercle). Les barres verticales représentent les écart-types (n = 3 coupons).

D'après ces résultats, il est probable que l'acide chlorhydrique attaque non seulement la couche native d'oxydes mais également la fonte. Ainsi, pour ne retirer que la couche d'oxydes de fer native et donc éviter la corrosion de la fonte, un inhibiteur de corrosion est mélangé à l'acide. Différents inhibiteurs sont proposés dans la littérature, notamment des acides aminés (Amin *et al.*, 2010), des produits naturels tels que le miel, les extraits de plante comme l'acacia, etc. (Raja et Sethuraman, 2008) ou encore des composés organiques aromatiques tels que l'hexaméthylentétramine (HMT, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$) ou l'aniline (Issa et Alshatteri, 2018). L'inhibiteur sélectionné est le HMT car il est proposé dans la norme ASTM (ASTM G1, 2004), il a été bien étudié (Bayol *et al.*, 2007, Issa et Alshatteri, 2018), il est utilisé par Saint-Gobain PAM et enfin car il a prouvé son efficacité sur la corrosion du Fe^0 (Singh *et al.*, 1995). En présence d'acide chlorhydrique, l'HMT joue un rôle de protection de la surface du matériau. En effet, la présence de chlorure dans une solution contenant un matériau entraîne un excès de charges négatives à proximité de l'interface solution/métal. Ce phénomène facilite l'adsorption des ions chargés positivement sur la surface. Or l'HMT est protonée en milieu acide et vient interagir avec la

surface du matériau via des interactions électrostatiques. Les molécules d'HMT sont alors adsorbées sur la surface métallique.

La méthode normalisée ASTM recommande d'appliquer, pour les matériaux à base de fer, un mélange de HCl 6 M + 0,35 % de HMT pendant 10 min à 20-25 °C (ATSM, 2004, Table A1.1 c 3.5.). Il est notifié, dans le cas des métaux à plusieurs phases, que des temps plus longs peuvent être requis et qu'il est nécessaire de répéter la procédure sur plusieurs cycles. C'est pour cette raison que nous avons testé différentes durées de traitement : de 15 min à 8 jours. De plus, nous avons mené des tests avec des solutions d'HCl à 0,3 ; 1 et 5 M. Ces différentes concentrations nous permettent de tester notre matériau qui est non poli. Enfin, nous avons ajouté 2 % d'HMT. Par rapport à la norme, la concentration en HMT a été augmentée car elle a montré une efficacité d'inhibition significative comparée à une concentration 100 fois plus faible (Bayol *et al.*, 2007). Les tests ont été effectués en duplicata comme il est recommandé dans la méthode normalisée ASTM.

La Figure III-7a montre l'évolution de la perte de masse de l'échantillon pour différentes concentrations en HCl et la Figure III-7b l'évolution du fer extrait. En augmentant la concentration de HCl (0,3 à 5 M) dans une solution de HMT à 2 %, la corrosion des échantillons augmente logiquement. Mais celle-ci est près de 2,5 fois inférieure avec HCl 0,3 M et 1,5 fois inférieure avec HCl 1 M à celle retrouvée sans HMT (Figure III-6 et III-7). Cela indique que HMT joue bien son rôle d'inhibiteur.

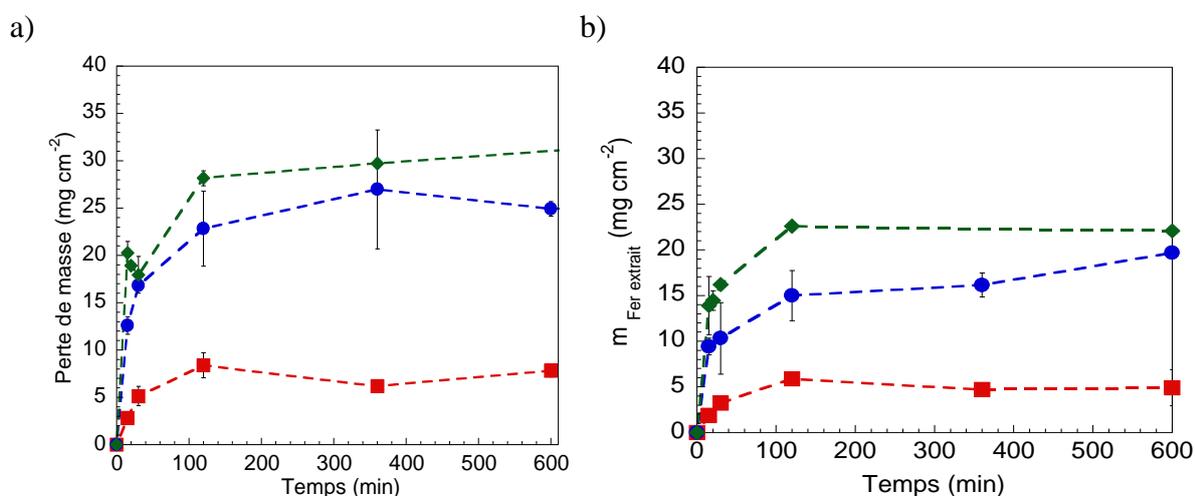


Figure III-7 : Évolution (a) de la perte de masse et (b) de la quantité de fer extraite des coupons en fonction du temps de traitement avec HCl 0,3 M + HMT 2 % (carré), HCl 1 M + HMT 2 % (rond) et HCl 5 M + HMT 2 % (losange). Les barres verticales représentent les écart-types (n = 3 coupons).

Indépendamment des concentrations en HCl, et aux écarts type près, un pseudo-plateau est atteint après 120 min (Figure III-7a et b). Les résultats sont en cohérence avec la méthode normalisée ATSM qui préconise de choisir le nombre de cycles (ou le temps de contact) où la pente est la plus faible, c'est-à-dire le point B représenté sur la Figure III-8.

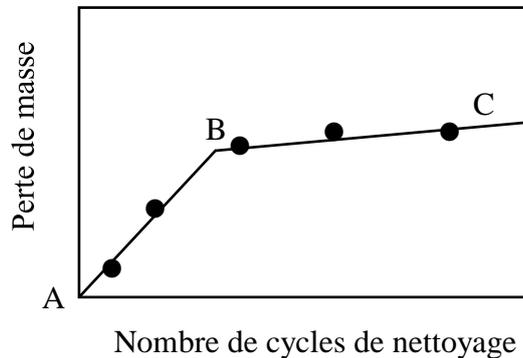


Figure III-8 : Représentation de la perte de masse d'un échantillon corrodé en fonction du nombre de cycles de nettoyage (adapté de la norme ASTM G1, 2004).

Nos expériences montrent que le point « B » du pseudo-plateau est atteint à $22,6 \text{ mg cm}^{-2}$ de fer extrait avec HCl 5 M, à $15,0 \text{ mg cm}^{-2}$ avec 1 M et à $5,9 \text{ mg cm}^{-2}$ avec 0,3 M (Figure III-7). Dans tous les cas, seul le fer de la couche native d'oxydes a été dissous, le Fe^0 de la fonte n'est donc pas oxydé. Le suivi de la perte de masse confirme ces résultats. La solubilisation totale de la couche d'oxyde native n'est probablement pas atteinte avec le traitement HCl 0,3 M + HMT 2 % car la perte de masse est de $8 \pm 1 \text{ mg cm}^{-2}$ après 10 h d'incubation, soit seulement 30,5 % de la masse estimée de la couche native d'oxydes. Par contre, elle est atteinte avec HCl 1 M + HMT 2 % à partir de 6 h (perte de masse $27,0 \pm 6,3 \text{ mg cm}^{-2}$) ou avec HCl 5 M + HMT 2 % à partir de 2 h (perte de masse $28,1 \pm 0,8 \text{ mg cm}^{-2}$). Afin de faire un compromis entre la durée et l'efficacité de l'extraction, la solution HCl 5 M + HMT 2 % a été retenue pour la suite du travail. De plus, sachant que la couche native d'oxydes est constituée à 19,8 % de magnétite, et sachant que le temps de dissolution de la magnétite est sensiblement plus faible en milieu HCl 0,5 M que HCl 5 M (Heron *et al.*, 1994), cela conforte donc le choix d'une concentration de 5 M.

De ces expériences, il apparait aussi que le suivi gravimétrique et l'analyse de la quantité totale de fer donnent des résultats cohérents et représentatifs de l'estimation de la corrosion. Les allures des deux courbes « perte de masse » ou « masse de fer total » en fonction du temps sont superposables. Nous retrouvons généralement un rapport de 1,5 entre la masse de la couche d'oxyde native et la masse de fer correspondante. Ce rapport a été calculé à partir de la masse

théorique de la couche native d'oxydes qui a été estimée à $26 \pm 8 \text{ mg cm}^{-2}$ et de la quantité de fer estimée à $17 \pm 5 \text{ mg cm}^{-2}$.

Pour valider le temps minimum de traitement pour une extraction totale, des coupons en fonte ont été placés dans une solution aérée de NaCl à 30 g L^{-1} pendant 30 jours. Les coupons ont été retirés puis ont subi le traitement HCl 5 M + HMT 2 % avec différents temps de contact. L'expérience a également été menée avec une solution de HCl 1 M + HMT 2 % pour comparaison.

Deux lots de coupons en duplicata ont été utilisés (soit $(n = 2) \times 2$), le premier lot a été utilisé pour tester les temps 15 min et 120 min, le second lot pour les temps 30 min, 210 min et 360 min. La Figure III-9 montre les résultats du dosage en fer total et des pertes de masse pour les échantillons traités respectivement avec HCl 1 M + HMT 2 % (avec deux lots distincts en bleu clair et foncé) et HCl 5 M + HMT 2 % (avec deux lots distincts en vert clair et foncé). La quantité de fer reportée correspond au fer contenu dans les produits de corrosion et couche native d'oxydes et le fer retrouvé dans la solution de NaCl après les 30 jours de contact. Dans les deux cas et logiquement, la concentration en fer oxydé augmente en fonction du temps de contact avec la solution HCl + HMT. Avec HCl 1 M + HMT 2 %, un pseudo-plateau est atteint à $22 \pm 1 \text{ mg Fe cm}^{-2}$ après 30 min de traitement. Avec le traitement HCl 5 M + HMT 2 %, un pseudo-plateau s'amorce après 15 min à $39 \pm 1 \text{ mg Fe cm}^{-2}$. Dans les deux cas, la perte de masse et la quantité de fer extraite sont supérieures à la couche native d'oxydes ($26 \pm 8 \text{ mg cm}^{-2}$ et $17 \pm 5 \text{ mg Fe cm}^{-2}$). Cela indique une contribution des produits de corrosion qui se sont formés durant l'incubation avec NaCl 3 %. L'analyse de la perte de masse montre des résultats des deux lots de duplicatas avec HCl 5 M + HMT 2 % similaires contrairement à ceux avec HCl 1 M + HMT 2 % où deux cinétiques se dessinent (Figure III-9c). Le premier duplicata (rond plein) montre une cinétique plus lente mais un plateau apparaît après 200 min et toute la couche native d'oxydes est extraite ainsi qu'une partie des oxydes formés durant l'incubation. En revanche, le deuxième duplicata montre un plateau qui atteint une masse équivalente à la couche native d'oxydes. Cela laisse entendre que le traitement 1 M n'est pas suffisant pour retirer en même temps toute la couche native d'oxydes et tous les produits formés durant l'incubation avec NaCl.

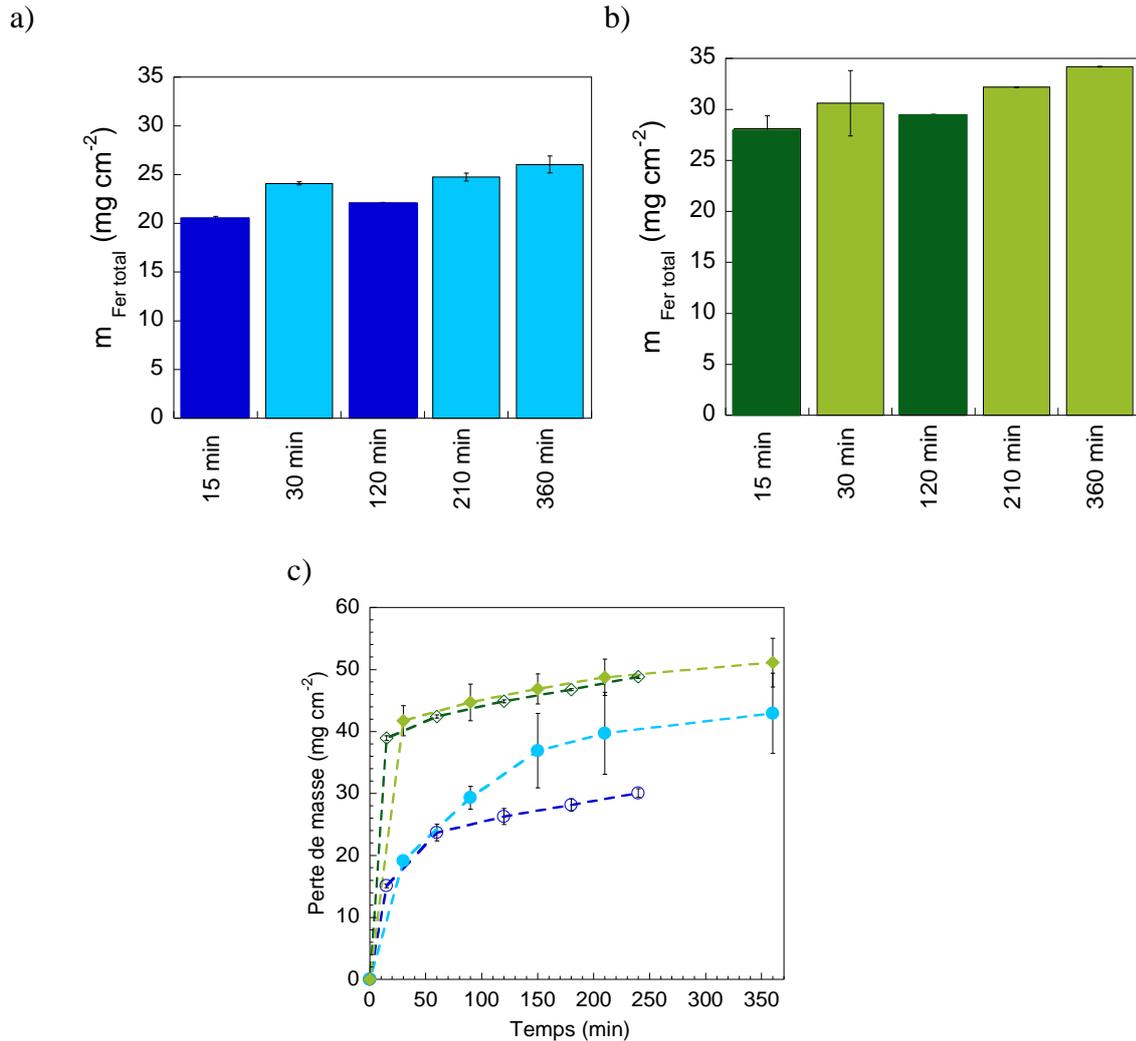


Figure III-9 : Évolution dans le temps de la quantité totale de fer oxydé provenant de coupons préalablement corrodés dans $\text{NaCl } 30 \text{ g L}^{-1}$ pendant 30 jours et traités avec (a) $\text{HCl } 1 \text{ M} + \text{HMT } 2 \%$ ou (b) avec $\text{HCl } 5 \text{ M} + \text{HMT } 2 \%$ et (c) évolution de leur perte de masse traités avec $\text{HCl } 1 \text{ M} + \text{HMT } 2 \%$ (rond) ou $\text{HCl } 5 \text{ M} + \text{HMT } 2 \%$ (losange). Les couleurs représentent les deux lots de duplicatât. Les barres verticales sont les écart-types ($n = 2$).

Nos résultats montrent qu'il a été nécessaire d'adapter la méthode normalisée ASTM G1 à nos conditions expérimentales, nous avons choisi un traitement $\text{HCl } 5 \text{ M} + \text{HMT } 2 \%$ pendant 2 h. La méthode ASTM est de nombreuses fois reprise sans pour autant être validée systématiquement (Zhang *et al.*, 2015). Pourtant, il a été démontré que la performance de cette méthode varie en fonction de la composition du matériau (Singh *et al.*, 2002) et notamment des produits de corrosion insolubles adsorbés ou précipités en surface.

III-2. Test de corrosion physico-chimique de référence

Des expériences en conditions "non corrosives" (c'est-à-dire une eau ultra-pure stérile sous anoxie) et "corrosives" (c'est-à-dire une solution NaCl stérile sous aérobie), ont été menées pour refléter le comportement de la fonte dans la période expérimentale en laboratoire et en l'absence de bactéries. Ces expériences nous donneront des points de références sur la corrosion de la fonte ductile brute, c'est-à-dire recouverte de sa couche native d'oxydes.

Un coupon en fonte a été introduit dans une solution d'eau pure désaérée stérile et dans des solutions de NaCl 5 g L⁻¹ ou 30 g L⁻¹ aérées stériles pendant 30 jours. Au cours du temps des prélèvements ont permis de doser le fer libéré et, au bout de 30 jours, le coupon a été extrait de sa solution et pesé après traitement acide-inhibiteur corrigé de la masse de la couche native d'oxydes. Le fer extrait dosé a également été corrigé de la masse de fer de la couche native d'oxydes. Les écarts types sont importants puisque la couche native d'oxydes est très hétérogène (Figure III-10). Nous pouvons tout de même ressortir des tendances : comme attendu, les échantillons sont plus corrodés en milieu chlorure de sodium qu'en eau pure anoxique. Au jour 30, 16 fois plus de fer sont libérés dans le milieu salin NaCl 5 g L⁻¹ et 94 fois plus avec NaCl 30 g L⁻¹ par rapport au contrôle H₂O stérile sous anoxie (Figure III-10a). Cependant, le degré final de dégradation de l'échantillon de fonte (perte de masse et masse de fer total) reste faible. La perte de masse pour les coupons incubés 30 jours dans H₂O ne correspond qu'à la couche native d'oxydes éliminée par le traitement acide-inhibiteur soit par conséquent un taux de corrosion de 0 mm an⁻¹ (calcul issu de l'Équation 12, Chapitre II). La couleur de la solution reste inchangée entre le jour 1 et le jour 30 (Figure III-11). L'incubation des coupons dans NaCl 5 g L⁻¹ ne mène pas à une corrosion significative. Après 30 jours, seulement 0,1 % de l'échantillon est endommagé, ce qui représente un taux de corrosion de 0,030 ± 0,003 mm an⁻¹. La solution à 30 g L⁻¹ montre un taux de corrosion de 0,225 ± 0,006 mm an⁻¹, soit un taux 7,5 fois plus important que dans la solution à 5 g L⁻¹. La concentration en NaCl a été multipliée par 6 entre les deux tests, était donc attendu d'avoir un facteur 6 et non un facteur 7,5. Cette observation sous-entend donc que la vitesse de corrosion n'est pas seulement fonction de la concentration en chlorure mais également de la présence d'oxygène qui contribue à augmenter le taux de corrosion de la fonte. Les solutions salines se colorent en orange de plus en plus intense au cours du temps, couleur caractéristique de la « rouille » (Figure III-11). Après deux semaines, le degré de dégradation des coupons plongés dans NaCl 5 g L⁻¹ a atteint un maximum qui peut s'expliquer par la formation d'une couche passive, le

système est devenu stable. Avec NaCl 30 g L⁻¹, le plateau n'est toujours pas atteint après 30 jours d'incubation, la stabilité pourrait apparaître dans des temps plus longs.

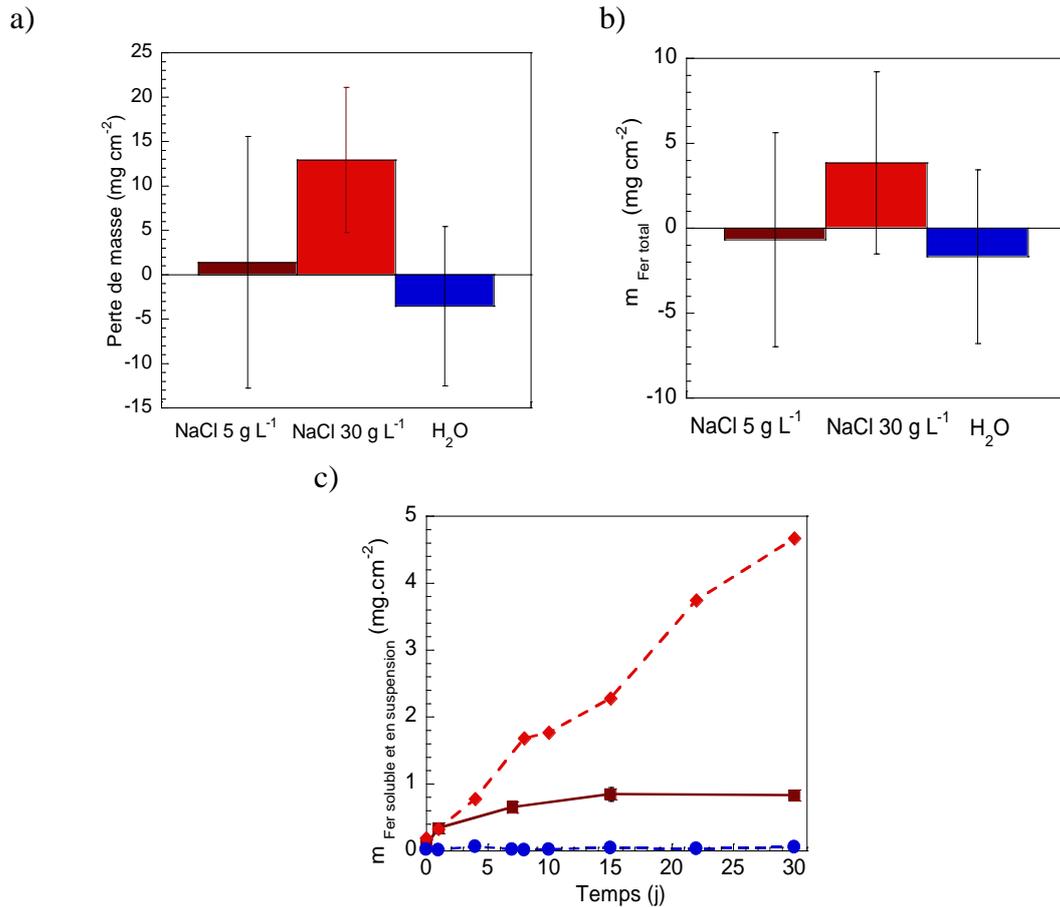


Figure III-10 : (a) Perte de masse des coupons en fonte, (b) teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) après 30 jours d'incubation et (c) variation de la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps d'incubation dans une solution de NaCl 5 g L⁻¹ aérée stérile (carré), de NaCl 30 g L⁻¹ aérée stérile (losange) ou dans de l'eau ultrapure désaérée (rond). Les barres d'erreur ont été calculées à partir de trois tests d'incubation indépendants, (n = 3).

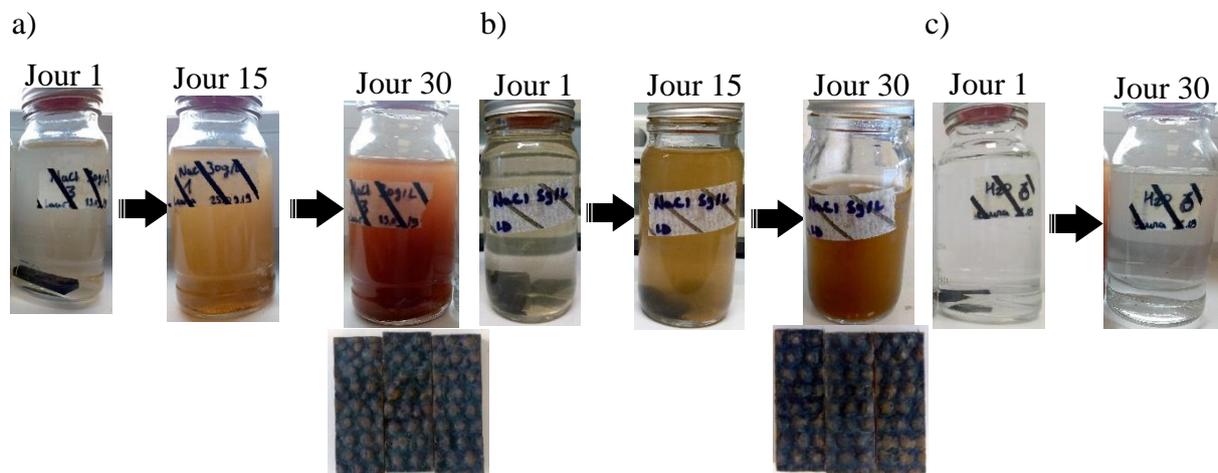


Figure III-11 : Aspect des suspensions et des coupons au cours du temps avec (a) NaCl 30 g L⁻¹, (b) NaCl 5 g L⁻¹ et (c) H₂O.

Le Tableau III-3 compare nos résultats à ceux trouvés dans la littérature et déterminés sur des échantillons de fonte polie ou d'acier poli. Le taux de corrosion avec la fonte polie est nettement inférieur ($0,044 \text{ mm an}^{-1}$ pour une concentration en NaCl de 35 g L^{-1}) à celui avec la fonte brute. Cela indique, comme nous le verrons par la suite en présence de bactéries, que les oxydes de fer présents à la surface externe jouent un rôle important sur les phénomènes de corrosion. L'acier au carbone poli a des taux de corrosion très variables en fonction des deux concentrations en NaCl et sont très supérieurs à ce qui est observé pour la fonte : $0,012 \text{ mm an}^{-1}$ pour une concentration de 6 g L^{-1} et un taux 75 fois plus élevé (soit $0,897 \text{ mm an}^{-1}$) pour une concentration de 30 g L^{-1} . Ces résultats montrent que le polissage et le type de matériau pour étudier la (bio)corrosion peuvent considérablement impacter les résultats et cela nous conforte dans le choix de travailler ici avec des échantillons de fonte brute. De plus, nous avons montré que les résultats de perte de masse entre les échantillons plongés dans NaCl 5 g L^{-1} et dans H_2O sont quasiment similaires. Or, sur la base de la concentration en fer libéré et en fer total, la corrosion est plus importante dans la solution saline que dans l'eau pure anoxie. Les résultats de cette expérience mettent donc en lumière l'importance de coupler les deux analyses afin de rendre compte de la corrosion d'un matériau.

Tableau III-3 : Taux de corrosion comparés en fonction de différents matériaux et de la concentration en NaCl.

Concentration en NaCl (g L^{-1})	Taux de corrosion (mm an^{-1})		
	Fonte brute (notre étude)	Fonte polie (Kwock <i>et al.</i> , 2000)	Acier au carbone poli (Heakel <i>et al.</i> , 2011)
5	0,030	N/D	N/D
6	N/D	N/D	0,012
30	0,225	N/D	0,897
35	N/D	0,044	N/D

N/D signifie non-déterminé

De plus, la différence du taux de corrosion entre ces études peut être liée à la présence de microorganismes. En effet, notre étude a été effectuée avec des solutions stériles. Les solutions des deux études regroupées dans le Tableau III-3 n'ont pas été stérilisées. Or, toutes les expériences faites dans des conditions non stériles dans un environnement aqueux en dessous de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ sont en réalité faites en présence de microorganismes. La Figure III-12 est une observation en microscopie optique sous épifluorescence des bactéries présentes dans une solution de NaCl 5 g L^{-1} non stérile, $(2,0 \pm 0,4) \times 10^7$ bactéries mL^{-1} ont été dénombrées

(n = 10), ce qui n'est pas négligeable. Ainsi, ne pas stériliser son système peut conduire à la formation d'un biofilm comme le rapportent Little *et al.*, 2020a et donc fausser les résultats.

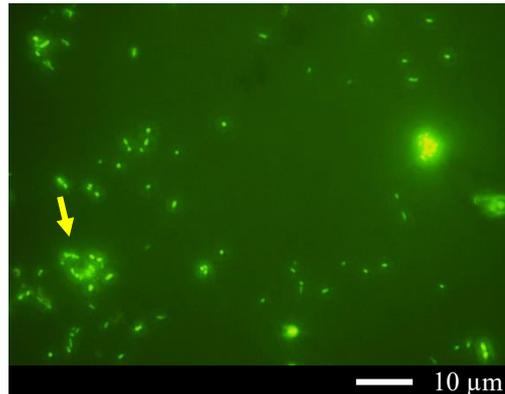


Figure III-12 : Observation en microscopie optique sous épifluorescence des bactéries marquées au SYBR green dans une solution de NaCl 5 g L⁻¹ non stérilisée. La flèche montre un amas de bactéries.

III-3. Optimisation des milieux de culture

Pour étudier la corrosion de la fonte de Saint-Gobain PAM influencée par les microorganismes, trois groupes métaboliques bactériens ont été retenus : les ferriréductrices (IRB), les sulfatoréductrices (SRB) et les bactéries réductrices (NRB). Chaque groupe est représenté par une espèce bactérienne modèle : *S. putrefaciens* a été choisie pour représenter les IRB, *D. desulfuricans* pour les SRB et *K. mobilis* pour les NRB. Le milieu de culture doit être scrupuleusement adapté à ces bactéries afin qu'elles expriment le métabolisme visé. Il doit répondre à certaines exigences :

i) être unique aux trois souches retenues. Mais lors des cocultures elles doivent se développer convenablement. Pour cela, les souches sélectionnées ont certains traits communs : elles sont toutes chimiotrophes (elles ont pour source d'énergie des composés minéraux ou organiques) et hétérotrophes (elles utilisent comme source de carbone uniquement du carbone organique). La croissance en anaérobiose est possible pour toutes ces souches. Enfin, elles sont toutes mésophiles (la température du milieu doit être comprise entre 20 et 40 °C) et neutrophiles (le pH du milieu doit être compris entre 5,5 et 8,5).

ii) apporter l'ensemble des nutriments et accepteurs d'électrons nécessaires à l'expression des métabolismes que nous souhaitons mettre en avant. À savoir un accepteur d'électrons pour le métabolisme IRB (Fe^{III} ou fumarate) ; pour SRB (SO_4^{2-}) et pour NRB (NO_3^-). Néanmoins, il peut exister une compétition pour les nutriments dans le cas d'une coculture entre les espèces

retenues. Par exemple, NO_3^- est également utilisé par *S. putrefaciens* (la IRB) et le fumarate par *D. desulfuricans* (la SRB).

iii) ne pas, ou peu influencer la corrosion, puisque nous cherchons à mettre en évidence la biocorrosion, la contribution du milieu de culture à la dégradation du matériau doit être la plus minimale possible et idéalement inexistante. La nature du milieu pouvant affecter fortement les tests de corrosion comme l'ont montré différents travaux (Javed *et al.*, 2014 ; Wade *et al.*, 2017, Little *et al.*, 2020a).

Pour respecter au mieux ces exigences, plusieurs milieux ont été testés. Tous les milieux de culture testés contenaient un milieu de base commun à toutes les souches et un accepteur et donneur d'électrons adaptés à chacune d'entre elles (Tableau III-4, lignes en vertes). Le pH des milieux a été ajusté à $7,0 \pm 0,1$ avec NaOH 1 M et les cultures ont été faites en anoxie (N_2) à 30 °C pendant 7 à 35 jours en fonction du milieu testé. Pour mémoire, une pré-culture de chacune des souches retenues a été effectuée dans des milieux riches et adaptés à chacune : TSB pour IRB et NRB et Postgate medium pour SRB. Les bactéries ont ensuite été incubées dans les milieux testés à la fin de leur phase exponentielle de croissance dans ces milieux riches. L'optimisation de la composition du milieu a consisté à sélectionner une source de facteurs de croissance. Il nous a également fallu vérifier la concentration en ions chlorure dont nous connaissons sa participation à la corrosion physico-chimique. Et enfin, nous avons regardé pour ajuster les concentrations en accepteurs et en donneurs d'électrons.

III-3.1. Sources de facteurs de croissance

Les vitamines et les éléments traces sont indispensables pour assurer les conditions de vie et une croissance rapide des microorganismes. Le but est d'avoir un milieu permettant la croissance et l'activité des microorganismes en un temps relativement court afin de réaliser des expériences à l'échelle du laboratoire, c'est-à-dire en un mois maximum. Nous avons choisi de regarder l'apport en ces substances via deux sources, un extrait de levure et une solution d'éléments traces et vitamines. Les donneurs et accepteurs d'électrons ont été introduits pour être optimaux en fonction de la souche bactérienne testée en termes de concentration et nature. Les milieux de base ont été appelés M0 ou M1 (Tableau III-4a et b) respectivement pour celui enrichi avec le mélange de vitamines et d'éléments traces (dont les compositions exactes sont connues et contrôlées, Tableau III-5) et pour celui avec l'extrait de levure qui apporte des vitamines, acides aminés et minéraux.

Tableau III-4 : Composition des milieux a) M0 et b) M1 et c) donneurs et accepteurs d'électrons spécifiques à chaque souche ajoutée aux milieux M0 et M1.

a)		b)	
Espèces chimiques	Concentration	Espèces chimiques	Concentration
(NH ₄)Cl	19 mM	(NH ₄)Cl	19 mM
Na ₂ SO ₄	7 mM	Na ₂ SO ₄	7 mM
KH ₂ PO ₄	4 mM	KH ₂ PO ₄	4 mM
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,09 mM	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,09 mM
Thioglycolate de sodium	1,1 mM	Thioglycolate de sodium	1,1 mM
Solution de vitamines	1 mL/L	Extrait de levure	1 g L ⁻¹
Solution d'éléments traces	0,1 mL/L		

Groupes métaboliques	Donneur d'électrons	Accepteurs d'électrons
	(mM)	(mM)
<i>Shewanella putrefaciens</i> (IRB)	Lactate de sodium 15	Fumarate de sodium 80
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (SRB)	Lactate de sodium 18	Sulfate de sodium 8
<i>Klebsiella mobilis</i> (NRB)	Lactate de sodium 10	Nitrate de sodium 17

Tableau III-5 : Solutions aqueuses d'éléments traces et de vitamines pour le milieu M0 (d'après Widdel et Bak, 1992), dit mix Vit-ET.

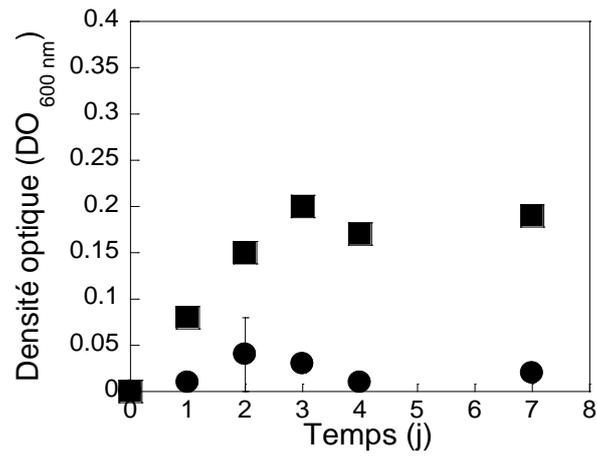
Solution	Espèces chimiques	Concentration (mM)	Solution	Espèces chimiques	Concentration (mM)
Eléments traces (ET.)	CoSO ₄ • 7 H ₂ O	281,10	Vitamines (Vit)	Ac. folique	441,4
	ZnCl ₂	136,30		Pyridoxine	169,18
	H ₃ BO ₃	61,83		Riboflavine	376,36
	NiCl ₂ • 6 H ₂ O	237,6		Thiamine	300,8
	NaWO ₄ • 2 H ₂ O	329,85		Ac. nicotinique	123,11
	Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	241,95		Ac. pentothénique	219,23
	CuSO ₄ • 5 H ₂ O	249,69		Vitamine B12	1355,37
	AlK(SO ₄) ₂ • 12 H ₂ O	474,39		Ac. aminobenzoïque	137,14
	MnSO ₄ • H ₂ O	169,02		Ac. thioctique	206,33

Ac. = acide

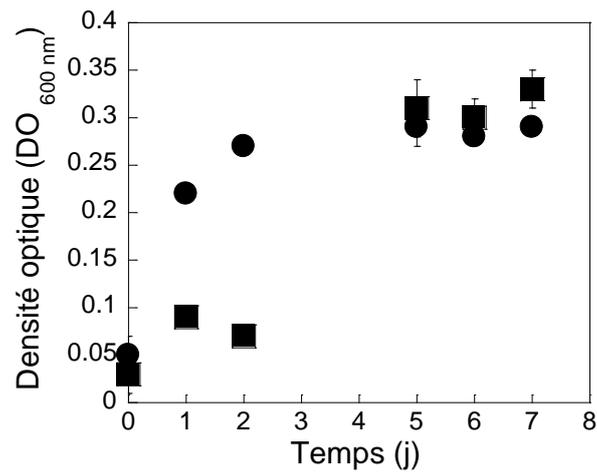
La densité optique à 600 nm nous a permis de suivre la croissance bactérienne (Figure III-13). Avec la bactérie ferriréductrice *S. putrefaciens*, la DO_{600} maximale $0,20 \pm 0,01$ est atteinte après 3 jours en présence d'extrait de levure et seulement après 2 jours avec le mix Vit-ET mais avec une valeur très faible de $0,04 \pm 0,04$ (Figure III-13a). Le milieu M1 enrichi en levure est donc le plus approprié. Avec la bactérie sulfatoréductrice *D. desulfuricans*, la différence est moins marquée (Figure III-13b). Avec l'extrait de levure, la DO_{600} maximale est de $0,29 \pm 0,02$ après 5 jours et est atteinte après 7 jours avec le mix Vit-ET avec une DO_{600} de $0,33 \pm 0,02$. Enfin, quelle que soit la source de facteurs de croissance, la bactérie nitrate-réductrice *K. mobilis* atteint sa densité maximale en 2 jours (Figure III-13c). Cette densité est plus importante en présence de levure (DO_{600} de $0,35 \pm 0,03$) qu'avec le mix Vit-ET (DO_{600} de $0,14 \pm 0,04$).

Little *et al.*, 2020a attirent l'attention sur l'utilisation d'extrait de levure dans le cas des tests de bio(corrosion). En effet, certains composants de l'extrait de levure peuvent être adsorbés sur les surfaces, chélater les métaux. De plus, la présence de médiateurs d'électrons comme la riboflavine influence la corrosion car ils modifient l'équilibre chimique du système en augmentant la production de courant (Little *et al.*, 2020a). Zhang *et al.*, ont montré qu'une concentration de 10 mg L^{-1} de riboflavine menait à un doublement de la perte de masse et à une augmentation de la profondeur de piqûration en présence d'un biofilm de *D. vulgaris* (Zhang *et al.*, 2015). Dans nos expériences, la solution de vitamine utilisée contient $5000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de riboflavine, elle est ajoutée à 0,1 % dans le milieu M0. Le milieu M0 contient donc $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de riboflavine. Dans l'extrait de levure à 1 g L^{-1} , il y en a environ $75 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (Little *et al.*, 2020a). Les deux additifs envisagés apportent donc des teneurs différentes en riboflavine, l'extrait de levure apportant quinze fois plus de riboflavine que la solution de vitamines. Il semblerait donc que la solution de vitamines soit la plus adaptée mais nos résultats suggèrent une croissance et une densité de population bactérienne supérieures en présence de l'extrait de levure par rapport aux vitamines et ce, quelle que soit la souche testée. Ainsi, l'extrait de levure a été privilégié pour la suite des tests de croissance tout en essayant d'abaisser au maximum sa concentration.

a)



b)



c)

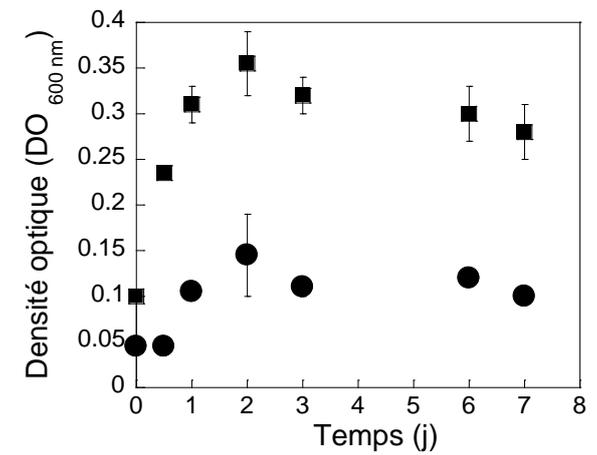


Figure III-13 : Suivi, par densité optique à 600 nm, de la croissance de (a) *Shewanella putrefaciens*, (b) *Desulfovibrio desulfuricans* et (c) *Klebsiella mobilis* en fonction du temps dans les milieux M0 (avec vitamines et éléments traces) (rond), ou M1 (avec extrait de levure) (carré), (n = 3).

III-3.2. Optimisation de la concentration en extrait de levure dans le milieu de culture

Comme nous venons de le voir, l'extrait de levure peut contenir des substances pouvant influencer la corrosion (i.e. la riboflavine). De plus, c'est un composé riche en substances diverses dont on ne connaît pas précisément l'identité ni la concentration. Pour ces deux raisons, il est souhaitable d'ajuster au plus bas sa concentration.

Sur la base du milieu M1, des milieux de culture ont été préparés avec différentes concentrations en extrait de levure, allant de $0,01 \text{ g L}^{-1}$; $0,03 \text{ g L}^{-1}$; $0,1 \text{ g L}^{-1}$ à 1 g L^{-1} . Ces milieux sont appelés M2. La Figure III-14a montre une croissance plus importante avec 1 g L^{-1} d'extrait de levure (DO_{600} maximale de $0,19 \pm 0,01$ au jour 7) pour *S. putrefaciens* qu'avec $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (DO_{600} de $0,10 \pm 0,01$ au jour 7) (Figure III-14a). Concernant *D. desulfuricans*, la croissance est plus conséquente avec $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (DO_{600} maximale de $0,37 \pm 0,01$ au jour 5) qu'avec 1 g L^{-1} (DO_{600} de $0,29 \pm 0,02$ au jour 5) (Figure III-14b). Pour *K. mobilis* la croissance est plus importante avec 1 g L^{-1} avec une DO_{600} maximale de $0,36 \pm 0,04$ au jour 2 qui est suivie d'une chute significative de densité optique. Avec $0,1 \text{ g L}^{-1}$ d'extrait de levure, la DO_{600} maximale est de $0,13 \pm 0,01$ au jour 7 (Figure III-14b).

Les résultats montrent que la croissance est nettement plus importante avec des concentrations en extrait de levure supérieures à $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Dans le cas de *S. putrefaciens* et *K. mobilis*, il y a une croissance d'environ $\text{DO}_{600} 0,1$ avec $0,1 \text{ g L}^{-1}$ d'extrait de levure. Avec *D. desulfuricans* la croissance est plus lente avec $0,1 \text{ g L}^{-1}$ par rapport à 1 g L^{-1} d'extrait de levure mais la DO_{600} maximale atteinte est plus élevée. Nous ne recherchons pas à obtenir d'importantes densités bactériennes mais des activités microbiennes. Néanmoins, nous avons fait le choix d'apporter suffisamment de vitamines, d'acides aminés, etc. aux souches tout en restant à une concentration relativement faible afin d'éviter de perturber les futures mesures de corrosion. Le choix s'est donc porté sur une concentration de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ d'extrait de levure.

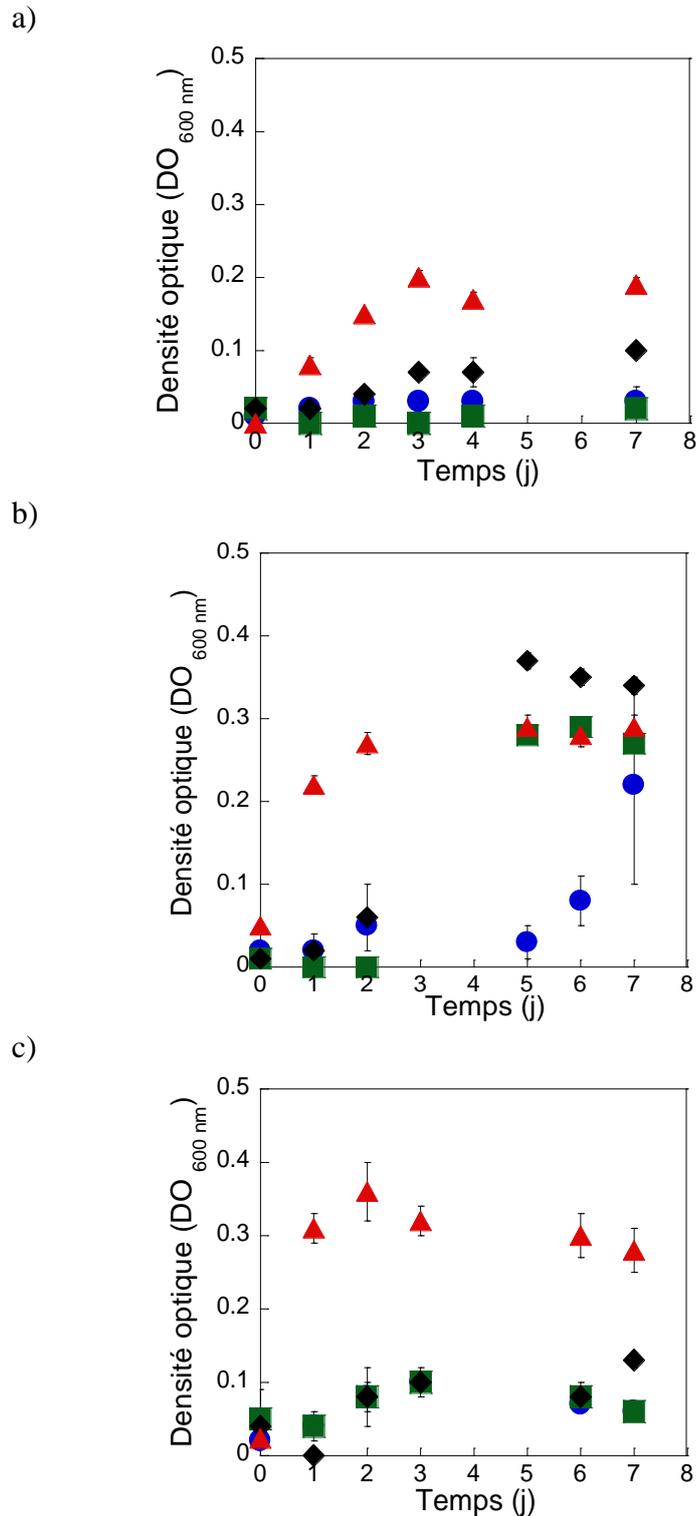


Figure III-14 : Suivi de la croissance, par densité optique à 600 nm, de (a) *Shewanella putrefaciens*, (b) *Desulfovibrio desulfuricans* et (c) *Klebsiella mobilis* dans les milieux M2 supplémentés en extrait de levure 0,01 g L⁻¹ (rond), 0,03 g L⁻¹ (carré), 0,1 g L⁻¹ (losange) et 1 g L⁻¹ (triangle), (n = 3).

III-3.3. Minimisation de la concentration en ions chlorure

Le rôle des ions chlorure dans les phénomènes de corrosion est particulièrement bien documenté et s'avère contribuer à accélérer la corrosion de métaux. D'autre part, s'il est présent

en trop grande concentration, il viendra pénaliser l'analyse des solutions par chromatographie ionique. En concentration supérieure à 150 mg L⁻¹ (4,2 mM), son pic de rétention sera grand et large ce qui masquera les données concernant les ions nitrite et nitrate que nous souhaitons analyser pour caractériser l'action des bactéries nitrate réductrices. Le Tableau III-6 présente la composition du milieu testé que nous appellerons M3. Par rapport au milieu M1, le chlorure d'ammonium a été remplacé par le sulfate d'ammonium et l'extrait de levure est désormais à une concentration de 0,1 g L⁻¹. La concentration en chlorure passe donc de 12,63 mM à 0,04 mM.

Tableau III-6 : Descriptif du milieu M3 avec a) sa composition de base commune à toutes les souches testées et b) donneurs et accepteurs d'électrons spécifiques à chaque souche.

a)

Espèces chimiques	Concentration
(NH ₄) ₂ SO ₄	19 mM
MgSO ₄	8,3 mM
K ₂ HPO ₄	4 mM
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,09 mM
Extrait de levure	0,1 g L ⁻¹

b)

Groupes métaboliques	Donneurs d'électrons mM	Accepteurs d'électrons mM
<i>Shewenella putrefaciens</i> (IRB)	Lactate de sodium 15	Fumarate de sodium 80
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (SRB)	Lactate de sodium 18	Sulfate de sodium 8
<i>Klebsiella mobilis</i> (NRB)	Lactate de sodium 10	Nitrate de sodium 17

Toutes les souches suivent globalement une croissance exponentielle avec un pic de croissance vers 5 ou 7 jours (Figure III-15). La concentration bactérienne varie bien sûr en fonction de la souche. Pour *S. putrefaciens*, la DO₆₀₀ maximale est de 0,31 ± 0,01 au jour 7 (Figure III-15a). Concernant la SRB, *D. desulfuricans*, atteint sa DO₆₀₀ maximale au deuxième jour d'incubation avec DO₆₀₀ 0,28 ± 0,01 (Figure III-15b). Enfin, avec *K. mobilis*, la DO₆₀₀ maximale est atteinte dès le premier jour d'incubation (DO₆₀₀ de 0,12 ± 0,01 ; Figure III-15c). Excepté pour *S. putrefaciens*, la densité optique avec chlorure est plus élevée. Si les bactéries considérées se développent dans le milieu M3, la croissance reste inférieure au milieu M2 sans que l'on puisse comprendre le rôle du chlorure. Nous avons donc voulu vérifier qu'il ne s'agissait pas d'une

limitation par la quantité de donneur et d'accepteurs d'électrons. Après 30 jours d'incubation pour *S. putrefaciens* et *K. mobilis* et 28 jours pour *D. desulfuricans*, les accepteurs et donneurs d'électrons adaptés à la souche présente ont été ajoutés dans les mêmes proportions qu'au début de l'incubation (Tableau III-6b). Toutes les souches ont montré un regain de croissance. Le facteur limitant la croissance correspondait donc bien au donneur et/ou accepteurs d'électrons, qui devront donc être ajustés.

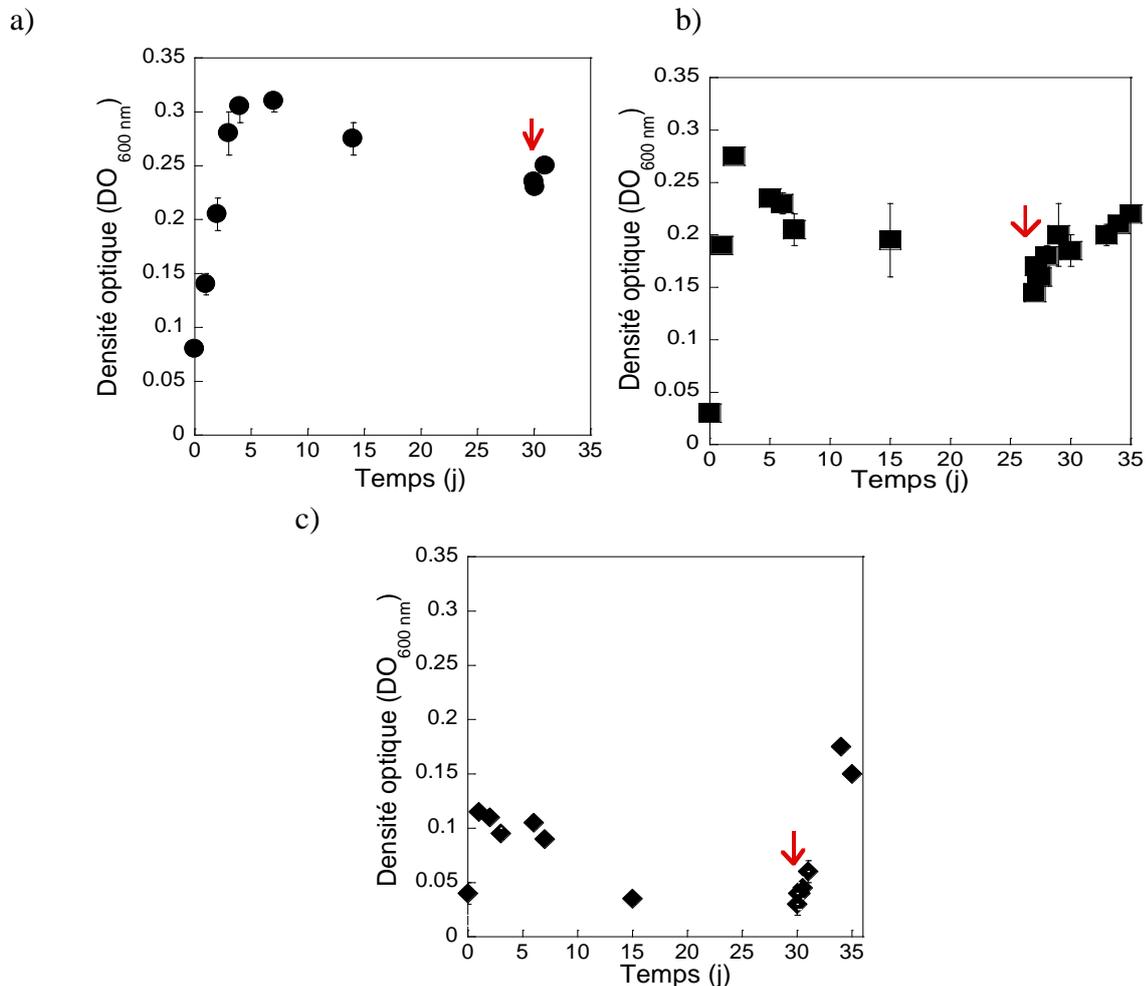


Figure III-15 : Suivi de la croissance bactérienne par densité optique à 600 nm de (a) *Shewanella putrefaciens*, (b) *Desulfovibrio desulfuricans* et (c) *Klebsiella mobilis* dans le milieu M3.

La flèche rouge indique l'ajout supplémentaire des donneurs et accepteurs d'électron adaptés (cf. Tableau III-6b), (n = 3).

III-3.4. Ajustement des concentrations en donneurs et accepteurs d'électrons

Les donneurs et accepteurs d'électrons sont adaptés aux souches en fonction de leur groupe métabolique (Tableau III-7). Les souches sélectionnées utilisent toutes le même donneur d'électrons : le lactate. *S. putrefaciens*, la bactérie ferriréductrice utilise l'accepteur d'électrons

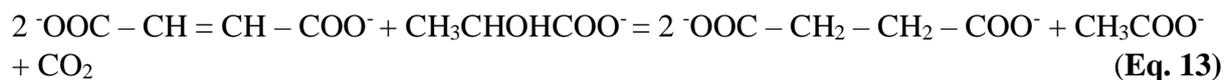
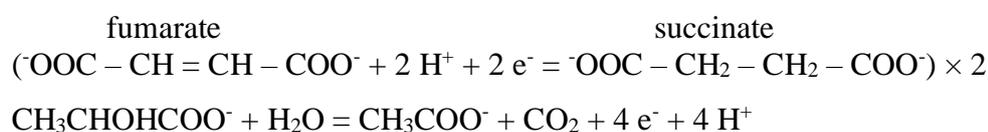
Fe^{III} ou le fumarate mais également le nitrate, elle n'utilise pas le sulfate. *D. desulfuricans*, la bactérie sulfatoréductrice, utilise le sulfate, le fumarate mais pas le Fe^{III} ni le nitrate et *K. mobilis*, la bactérie nitrate réductrice, utilise les nitrates mais pas le sulfate, le Fe^{III} et le fumarate.

Tableau III-7 : Donneur et accepteurs d'électrons en fonction du groupe métabolique.

Groupes métaboliques	Espèces bactériennes	Donneur d'électrons		Accepteurs d'électrons	
		Espèce	Formule	Espèces	Formules
IRB	<i>S. putrefaciens</i>			Fumarate	⁻ OOC-CH=CH-COO ⁻
SRB	<i>D. desulfuricans</i>	Lactate	CH ₃ CHOHCOO ⁻	Sulfate	SO ₄ ²⁻
NRB	<i>K. mobilis</i>			Nitrate	NO ₃ ⁻

La concentration en accepteur et donneur d'électrons affecte la croissance des bactéries mais aussi le taux de corrosion (Little *et al.*, 2020a). Deux cas de figure ont été rencontrés par exemple avec la bactérie *Geobacter sulfurreducens* sur de l'acier 304L : lorsqu'il y a eu déficience en donneur d'électrons, la profondeur des piqûres de corrosion a augmenté. Au contraire lorsque la concentration en accepteur d'électrons était faible, l'acier a été protégé (Mehanna *et al.*, 2010). Les quantités de donneurs et accepteurs d'électrons sont calculés par rapport à la stœchiométrie des réactions en prenant en compte qu'environ 20 % du donneur organique d'électrons est dédié à la biomasse (source de carbone, Caccavo *et al.*, 1994 ; Équations 13 à 15)

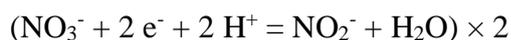
Cas des IRB : fumarate/ lactate



Cas des SRB : sulfate/ lactate



Cas des NRB : nitrate/ lactate



Pour la bactérie ferriréductrice et, pour respecter la stœchiométrie, il est nécessaire d'avoir 1 mole de lactate pour 2 molécules de fumarate, soit 15 mM de lactate pour 30 mM de fumarate (Équation 13). Or, dans ce projet, il est souhaitable que l'IRB utilise le Fe^{III} de la couche native d'oxydes des coupons de fonte, le fumarate est attendu pour jouer le rôle d'initiateur de croissance, il est donc volontairement plus faible que la stœchiométrie de la réaction. Ainsi, la quantité de fumarate est de 10 mM, afin qu'il reste 10 mM de lactate à oxyder par le Fe^{III} des coupons. La souche SRB nécessite 1 mole de sulfate pour 2 moles de lactate auquel on ajoute 20 % de lactate pour la biomasse, soit 15 mM lactate pour au minimum 6 mM de sulfate (Équation 14). Pour la bactérie nitrate réductrice, NRB, il faut 2 moles de nitrate pour 1 mole de lactate (Équation 15). Afin que les bactéries puissent utiliser une partie du lactate pour leur biomasse, on ajoute 20 % de lactate en plus, soit 15 mM pour 24 mM de nitrate. Le Tableau III-8 résume la composition des milieux correspondants que l'on appellera M4.

Tableau III-8 : Composition des milieux M4 avec a) le milieu de base commun à toutes les souches testées et b) les quantités et natures de donneurs et d'accepteurs d'électrons spécifiques à chaque souche.

a)

Espèces chimiques	Concentration
(NH ₄) ₂ SO ₄	9,5 mM
MgSO ₄	7 mM
KH ₂ PO ₄	4 mM
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,09 mM
Extrait de levure	0,10 g L ⁻¹

b)

Groupes métaboliques	Donneur d'électrons	Accepteurs d'électrons
	mM	mM
<i>Shewenella putrefaciens</i> (IRB)		Fumarate de sodium 10
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (SRB)	Lactate de sodium 15	Sulfate de sodium 6
<i>Klebsiella mobilis</i> (NRB)		Nitrate de sodium 24

La croissance des souches dans ces milieux a été suivie par mesure de densité optique 600 nm. Pour les bactéries ferri-réductrices, après 15 jours d'incubation, du Fe^{III} a été ajouté pour vérifier que ces souches sont capables de réduire le Fe^{III} en Fe^{II} en anaérobie (Lovley et Phillips, 1988 ; Myers et Nealson, 1988). Pour d'une part nous assurer de la pertinence des mesures de densité optique et d'autre part parce que la densité optique ne peut être mesurée en présence de précipités de fer, des comptages des bactéries marquées par des fluorochromes en microscopie sous épifluorescence ont été effectués (Figure III-16). *S. putrefaciens* est un bacille de 3 μm environ (Figure III-16a). *D. desulfuricans* présente une forme caractéristique en virgule (Figure III-16b). *K. mobilis* correspond à un petit bacille entre 1 et 3 μm (Figure III-16c).

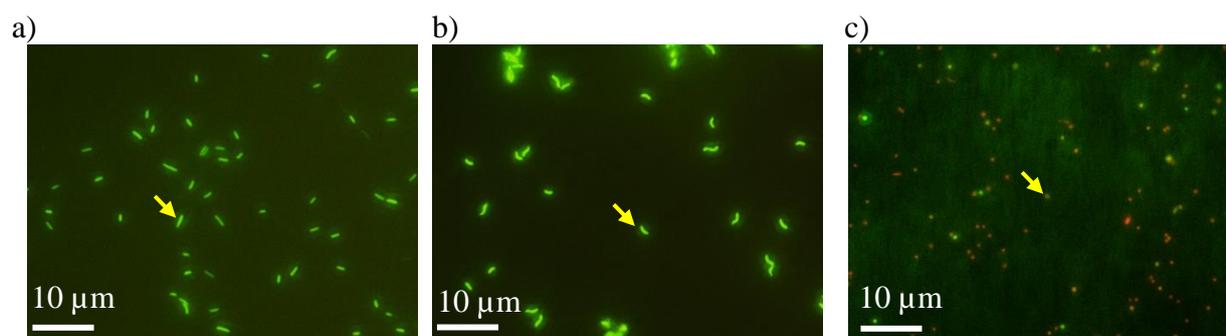


Figure III-16 : Observation en microscopie optique sous épifluorescence de (a) *Shewanella putrefaciens*, (b) *Desulfovibrio desulfuricans* et (c) *Klebsiella mobilis*.

Les résultats sont décrits ci-après et sont présentés souche par souche. Les accepteurs et donneurs sont ajoutés dès le début de l'expérimentation. Après 8 jours d'incubation, les accepteurs et donneurs d'électrons ont été à nouveau ajoutés à la culture et dans les mêmes proportions qu'au départ de l'expérience. La densité optique, le comptage en microscopie sous épifluorescence et la concentration de certaines espèces chimiques ont été suivis (i.e. nitrate, nitrite, sulfate, le Fe^{II} et la somme $\text{Fe}^{\text{II}} + \text{Fe}^{\text{III}}$).

III-3.4.1. La bactérie ferriréductrice : *Shewanella putrefaciens*

Pour estimer la croissance de *S. putrefaciens*, sur une même figure, nous avons superposé l'évolution de la densité optique (DO) et le dénombrement en microscopie optique sous épifluorescence. Les échelles ont été ajustées pour qu'une densité optique de 1 soit alignée avec 5×10^8 bactéries mL^{-1} (Figure III-17a). Les résultats ne corrélaient pas ; la densité bactérienne maximale à 8 jours, dénombrée en microscopie sous épifluorescence, est égale à $(8,9 \pm 2,6) \times 10^7$ bactéries mL^{-1} soit l'équivalent en DO_{600} d'environ 0,23 et non 0,05. Le comptage en épifluorescence n'est sûrement pas fiable en raison des erreurs cumulées lors des nombreuses

étapes de préparation (cf. § II-5.2.1.2. du Chapitre II). Sur la base des mesures de densité optique, la croissance de *S. putrefaciens* est très faible et un maximum semble atteint au jour 4 pour une densité optique (DO) mesurée égale à $0,05 \pm 0,01$. Lorsque l'on rajoute le donneur et l'accepteur d'électrons (fin du jour 8, matérialisé par une simple flèche sur la Figure), il n'y a pas de regain de croissance visible, la DO_{600} est de $0,06 \pm 0,02$. Le citrate de Fe^{III} a été ajouté à la suspension au jour 15 (Figure III-17b, matérialisé par une double flèche). L'analyse régulière du milieu réactionnel montre que la concentration en Fe^{III} diminue très légèrement, elle passe de $33,9 \pm 0,6$ mM au jour 15 à $31,3 \pm 0,6$ mM au jour 19, soit une diminution de 10 %. En parallèle la concentration en Fe^{II} augmente de $1,2 \pm 0,5$ mM au jour 15 à $4,2 \pm 0,3$ mM au jour 19. La consommation n'est pas importante car les bactéries, après 15 jours, sont clairement dans un état de carence, il y a peu de bactéries encore vivantes.

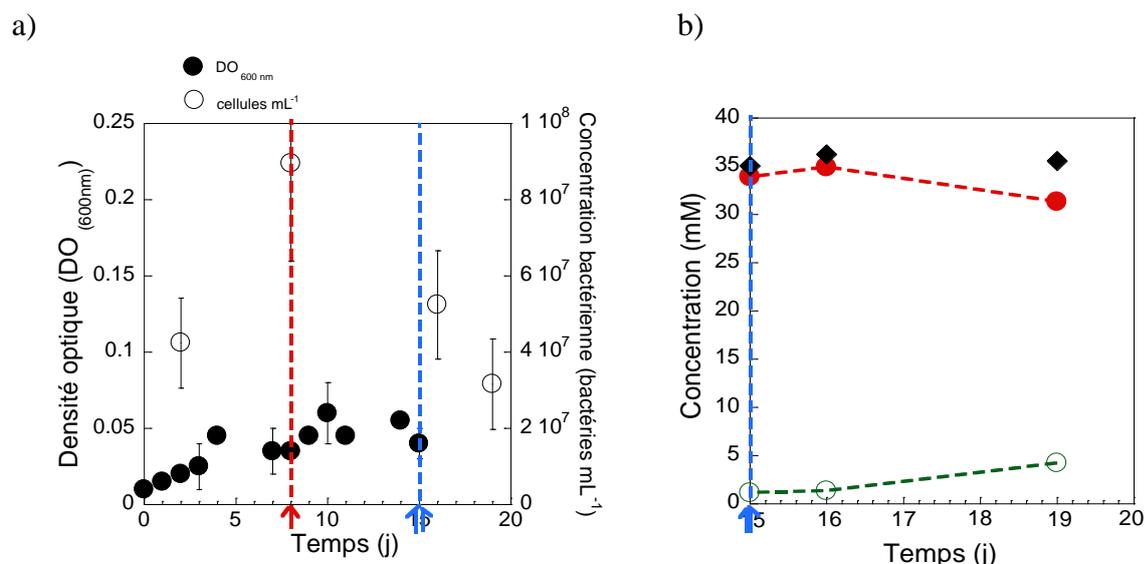


Figure III-17 : (a) Suivi de la densité bactérienne par mesure de DO à 600 nm et par comptage en microscopie optique sous épifluorescence, (b) suivi de la concentration en Fe^{II} (rond vert), Fe^{III} (rond rouge) et de la somme ($Fe^{II} + Fe^{III}$) (losange noir) pour la souche *Shewanella putrefaciens*, (n = 3).

La simple flèche signifie l'ajout de 15 mM de lactate et 10 mM de fumarate.

La double flèche indique l'ajout de citrate ferrique.

Les tests avec la bactérie ferriréductrice ont été effectués dans le milieu M4 qui a été volontairement carencé en accepteur d'électrons (- 67 % en fumarate) afin de l'obliger à consommer les espèces de Fe^{III} présentes dans la couche native d'oxydes.

On observe tout d'abord que *S. putrefaciens* ne semble pas avoir une croissance significative dans ce milieu mais qu'après 15 jours de croissance, il y a tout de même réduction du Fe^{III} en Fe^{II} en anaérobie. Cela montre que les bactéries sont encore actives, le donneur d'électrons se

trouvant encore présent en quantité suffisante. Il est par contre difficile de conclure à partir des mesures de densité optique et du dénombrement par microscopie optique sous épifluorescence car les données ne sont pas cohérentes. La réduction du Fe^{III} en Fe^{II} peut entraîner leur précipitation dans le périplasme ou encroûter les cellules (Miot et Etique, 2016). Cela peut rendre difficile leur dénombrement direct car les marqueurs fluorescents des acides nucléiques tel que le SYBR® Green se fixent moins aux bactéries et de ce fait les bactéries ne sont plus aussi détectables.

Une autre expérience a été menée avec *S. putrefaciens*. Nous avons comparé sa croissance en présence du donneur d'électrons lactate et de trois sources différentes d'accepteurs d'électrons : uniquement le fumarate en quantité limitante, le fumarate + le Fe^{III} soluble (i.e. citrate de fer) et le fumarate + le Fe^{III} de la couche native d'oxydes d'un coupon en fonte. En se basant sur les potentiels des réactions (Figure III-18), il est attendu que l'oxydation du lactate par le Fe^{III} citrate soluble soit la réaction la plus favorable ($E^0 = + 0,38$ V), suivie de la consommation du fumarate ($E^0 = + 0,03$ V) puis des espèces ferriques de la couche native d'oxydes d'un coupon en fonte (i.e. hématite, $E^0 = - 0,29$ V et magnétite, $E^0 = - 0,31$ V).

		↑ E ⁰ (V/ENH)
Fe ³⁺	Fe ²⁺	+ 0,77
Fe ^{III} citrate	Fe ^{II} citrate	+ 0,38
Fumarate	Succinate	+ 0,03
Hématite	Fe ^{II}	- 0,29
Magnétite	Fe ^{II}	- 0,31
Fe ^{II}	Fe ⁰	- 0,44
Acétate - CO ₂	Lactate	- 3,90

Figure III-18 : Potentiels standards de couples rédox impliqués dans le métabolisme de *Shewanella putrefaciens* (Gottschalk, 1986 ; Ilbert et Bonnefoy, 2013).

Nous avons choisi 5 conditions différentes répertoriées dans le Tableau III-9. Toutes les conditions ont été testées en présence de lactate de sodium et de 10 mM de fumarate. On rappelle que le milieu M4 contient du fumarate de sodium volontairement introduit en défaut pour obliger cette souche à utiliser le fer ferrique comme autre source d'accepteur. La croissance de la souche avec le fumarate en quantité limitante a donc été comparée à la croissance en présence soit d'un coupon (comme source de Fe^{III}) + fumarate, soit de Fe^{III} soluble + fumarate. De plus, pour s'assurer que le donneur d'électrons n'est pas limitant, des tests ont également été menés avec une concentration de 70 mM en ions lactate.

Tableau III-9 : Tests de conditions de croissance de *Shewanella putrefaciens* dans le milieu M4 en anaérobie et à 30 °C.

Milieu M4 de base		
+		
Donneur d'électrons		
Lactate de sodium	15 mM	70 mM
Accepteur d'électrons		
Fumarate de sodium	10 mM	10 mM
et		
	Sans coupon de fonte	= Condition #1
	Avec coupon de fonte	= Condition #2
	Citrate de fer(III)	= Condition #3
	Avec coupon de fonte	= Condition #4
	Citrate de fer(III)	= Condition #5

S. putrefaciens a été incubée pendant 7 jours avec une densité bactérienne initiale de $(2,8 \pm 1,1) \times 10^8$ bactéries mL⁻¹ (Figure III-19a et b). La Figure III-19a montre qu'il n'y a pas de croissance de *S. putrefaciens* visible sans source de fer externe (Condition #1). C'était attendu puisque que l'accepteur d'électrons a été introduit à une concentration limitée. Par contre en présence d'une source de fer et quelle que soit la concentration en lactate de sodium (i.e. le donneur d'électrons), la croissance est multipliée très rapidement par 6. En effet, après 24 h d'incubation, sans coupon, la densité bactérienne est de $(0,3 \pm 0,1) \times 10^9$ bactéries mL⁻¹, elle est en moyenne de $(1,9 \pm 0,2) \times 10^9$ bactéries mL⁻¹ avec une source externe de fer (Figure III-19a et b). Il n'y a pas de différence significative entre une culture de *S. putrefaciens* avec un coupon en fonte (Condition #2) ou avec le citrate de fer (Condition #3). Le Fe^{III} du coupon en fonte est donc étonnamment respirable par la bactérie de la même façon que du Fe^{III} soluble. Avec 70 mM de lactate, il n'y a pas de différence significative de croissance entre les deux sources de fer (Condition #4 et #5) mais également par rapport à une concentration de 15 mM (Figure III-19b). Cela signifie que la concentration du donneur d'électrons n'est pas limitante.

En comparant la croissance de la bactérie ferriréductrice avec différents accepteurs d'électrons, nous pouvons affirmer que *S. putrefaciens* est capable de réduire le Fe^{III} de la couche native d'oxydes.

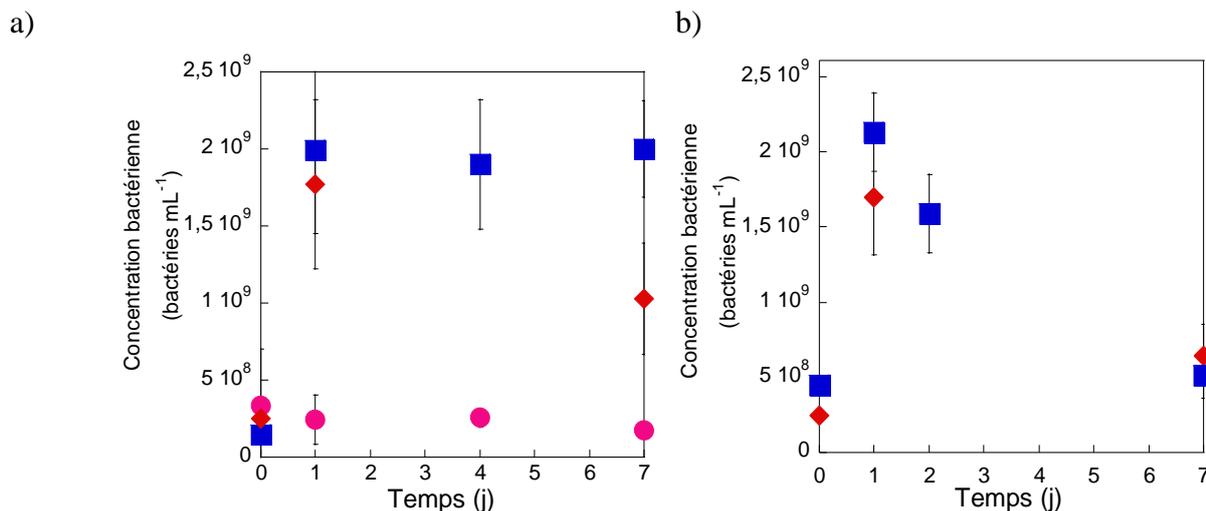


Figure III-19 : Suivi de la densité bactérienne par comptage en microscopie optique sous épifluorescence de *Shewanella putrefaciens* avec une concentration en donneur d'électrons (i.e. lactate de sodium) de (a) 15 mM ou (b) 70 mM, en absence de coupon en fonte (rond rose), en présence d'un coupon en fonte (carré bleu) ou en présence de citrate de fer (losange rouge), (n = 3).

III-3.4.2. La bactérie sulfatoréductrice : *Desulfovibrio desulfuricans*

Au cours des premiers jours, la croissance bactérienne augmente exponentiellement pour atteindre une DO_{600} de $0,35 \pm 0,01$ au jour 6 (Figure III-20). Ceci est en adéquation avec la consommation de sulfate par *D. desulfuricans* qui diminue au cours du temps de $17,3 \pm 0,1$ mM au jour 0 à $8,3 \pm 0,4$ mM au jour 6 (Figure III-20b). Le dénombrement en microscopie optique sous épifluorescence corrèle bien avec la mesure de densité optique, les échelles ayant été ajustées pour qu'une densité optique de 1 soit alignée à 3×10^9 bactéries mL⁻¹ (*D. desulfuricans* a une taille inférieure à celles des autres souches testées, c'est pour cela qu'une unité de densité optique n'équivaut pas à la même quantité de bactéries). L'ajout des donneurs et accepteurs d'électrons au jour 7 montre un regain de croissance, la densité optique maximale est de $0,5 \pm 0,1$ après l'ajout et 1,08 mM de sulfate est consommé (Figure III-20a). Cela suggère que le donneur d'électrons était en quantité limitante. C'est cohérent puisque le milieu de base contient déjà une concentration en ions SO_4^{2-} de 16,4 mM en plus du sulfate de sodium ajouté. Cela fait donc 22 mM de sulfate pour 15 mM de lactate. La croissance de *D. desulfuricans* décline après le jour 8 puis stagne à une DO_{600} égale à $0,40 \pm 0,01$ à partir du jour 12.

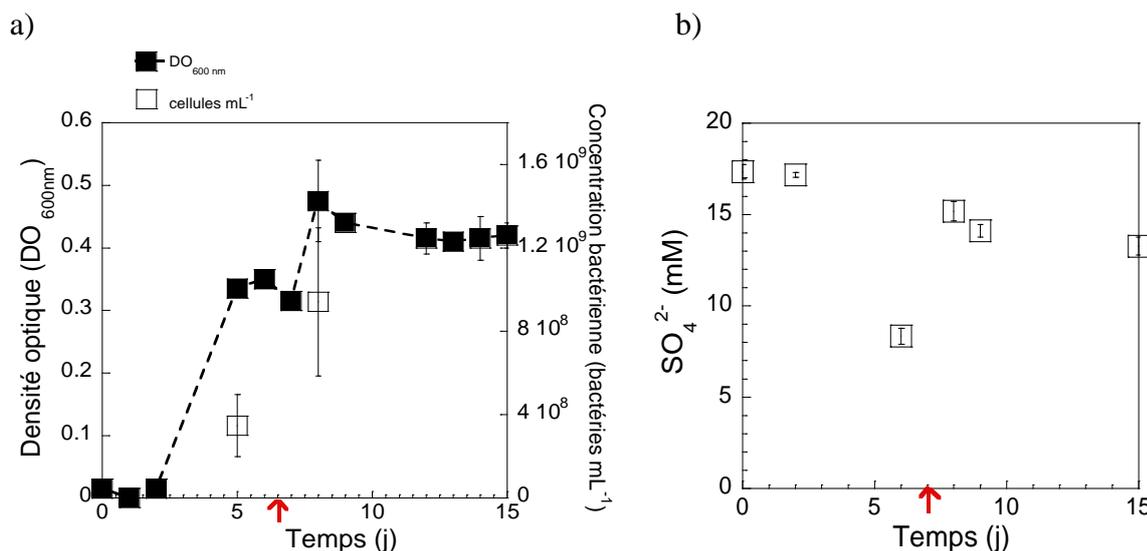


Figure III-20 : (a) Suivi de la densité bactérienne par mesure de DO à 600 nm et par comptage en microscopie optique sous épifluorescence, (b) suivi de la concentration en ions SO_4^{2-} dans le milieu de M4-sulfate en anaérobie pour la souche *Desulfovibrio desulfuricans*, ($n = 3$).

La flèche signifie l'ajout de 15 mM de lactate et 6 mM de sulfate.

III-3.4.3. La bactérie nitrate réductrice : *Klebsiella mobilis*

La concentration de *K. mobilis* augmente d'un facteur 6 pour atteindre son maximum au jour 2 avec une DO_{600} de $0,20 \pm 0,01$ (Figure III-21). La concentration diminue lentement ensuite. Le dénombrement en microscopie optique sous épifluorescence de *K. mobilis* corrèle ici bien avec la mesure de densité optique, les échelles ayant été ajustées pour qu'une densité optique de 1 soit alignée à 5×10^8 bactéries mL^{-1} . Si on suit la concentration en nitrate (l'accepteur d'électrons), elle diminue en parallèle de l'augmentation de densité bactérienne (de $21,8 \pm 0,2$ mM au jour 0 à $0,7 \pm 0,1$ mM au jour 7), la concentration en nitrite quant à elle augmente (de 0 au jour 0 à $15,5 \pm 0,1$ mM au jour 7) (Figure III-21b). La consommation est donc totale, cela signifie que les quantités d'accepteur et de donneur sont adaptées. Au jour 8 lorsque le nitrate et le lactate sont rajoutés dans les mêmes proportions qu'ils étaient au départ, une légère croissance est observée mais qui n'est pas significative (Figure III-22a). La concentration en bactéries « mortes » (i.e. les bactéries dont la perméabilité membranaire est affectée) a été suivie et augmente au cours du temps, au jour 2 il y a près de 15 % de bactéries « mortes » (soit $(4,6 \pm 1,3) \times 10^7$ bactéries mL^{-1} « vivantes » pour $(0,7 \pm 0,5) \times 10^7$ bactéries mL^{-1} « mortes ») et, au jour 6, le rapport atteint près de 43 % soit $(5,9 \pm 2,4) \times 10^7$ bactéries mL^{-1} « vivantes » pour $(2,5 \pm 0,9) \times 10^7$ bactéries mL^{-1} « mortes » (Figure III-21a). L'augmentation de bactéries « mortes » au cours du temps suggère que les nitrites produits et libérés dans le milieu affectent l'intégrité cellulaire.

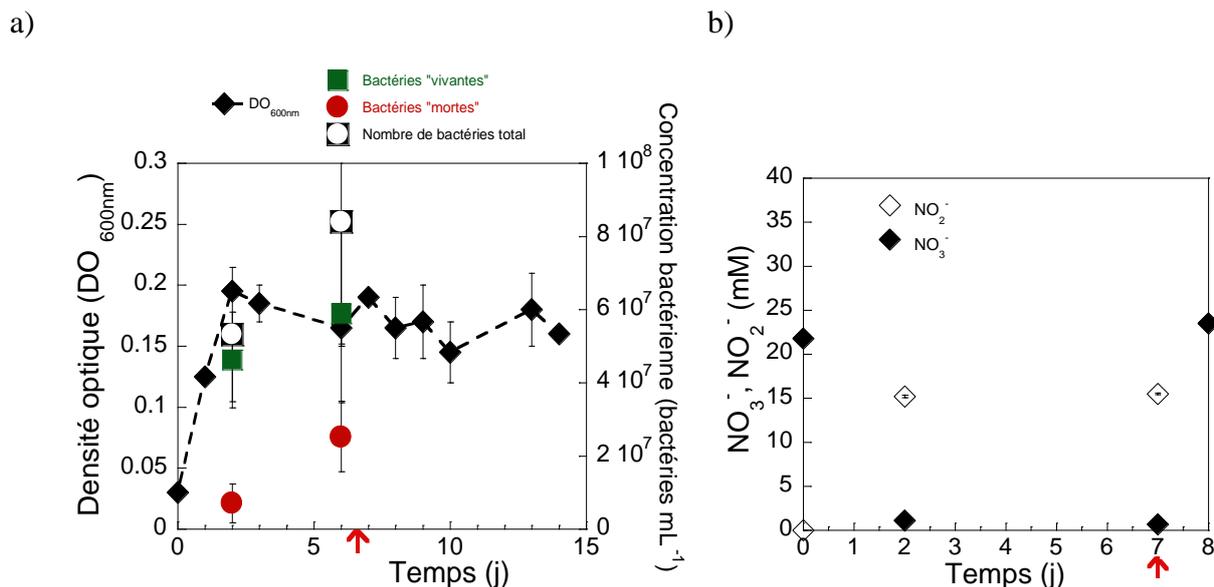


Figure III-21 : (a) Suivi de la densité bactérienne par mesure de DO à 600 nm et par comptage en microscopie optique sous épifluorescence, (b) suivi de la concentration en NO₂⁻ (losange vide) et en NO₃⁻ (losange noir) pour la souche *Klebsiella mobilis*, (n = 3).

La flèche signifie l'ajout de 15 mM de lactate et 24 mM de nitrate.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la croissance bactérienne et l'activité nitrate réductrice de *K. mobilis* par la consommation des nitrates en nitrites dans le milieu M4. Les donneurs et accepteurs d'électrons ajoutés au jour 8 ne permettent pas un regain de croissance significatif mais, avec la diminution des nitrates et l'augmentation de la concentration en ions nitrite, on montre que la population bactérienne n'est pas entièrement affectée. La toxicité des NO₂⁻ est dépendante des souches bactériennes. Par exemple avec *Pseudomonas* sp., une concentration supérieure à 3,04 mM en nitrite inhibe la croissance alors qu'avec la souche *P. denitrificans*, il n'y a pas d'inhibition de la croissance observée (Bollag et Henninger, 1978).

III-4. Conclusion du Chapitre III

La fonte ductile non polie a des caractéristiques très particulières. Elle présente à sa surface externe une couche native d'oxydes qui est très hétérogène. L'estimation du degré de corrosion doit tenir compte de la présence de cette couche d'oxydes de fer native sur l'échantillon qui pèse 26 mg cm⁻², ce qui représente 17 mg cm⁻² en masse de fer. Pour estimer le taux de corrosion de la fonte ductile avec sa couche native d'oxydes, des analyses à la fois du solide et du liquide ont été mises en place : le fer oxydé libéré en solution/suspension et celui issu des produits adsorbés/précipités sont suivis. Pour récupérer ces produits adsorbés/précipités, un traitement

d'extraction a dû être mis au point. En s'inspirant de la norme ASTM (ASTM G1, 2004), le traitement retenu est HCl 5 M + HMT 2 % pendant 120 min. Ce traitement permet la dissolution de toute la couche native d'oxydes et des oxydes qui seront formés au cours des incubations. La démarche expérimentale proposée en réacteur fermé (milieu anoxique) a donc été optimisée et adaptée à la fonte brute. Pour vérifier notre protocole, des tests contrôles ont été menés avec des solutions concentrées en sel NaCl et de l'eau ultrapure. Les tests ont permis de valider notre approche expérimentale et ont démontré la cohérence et la complémentarité de notre méthode. De plus, les résultats montrent différents niveaux de corrosivité de la fonte brute, celle-ci a d'ailleurs une sensibilité à la corrosion bien différente d'un acier poli ou d'une fonte polie.

Afin de mener des expérimentations avec des souches bactériennes, les milieux d'incubation ont été optimisés. Ces milieux permettent aux souches bactériennes d'avoir une activité, c'est-à-dire la consommation et/ou la production par les souches bactériennes de composés qui nous intéressent. Ces composés sont en effet connus pour être impliqués dans les phénomènes de MIC (i.e. la production de nitrite et sulfure et la consommation du Fe^{III}). Les milieux sont également le moins corrosif possible. Le Tableau III-10 résume les différentes étapes qui ont mené à l'obtention du milieu M4. Comme il n'y a pas de tests standards pour étudier la MIC, notre milieu semble adapté et cohérent avec ce que nous cherchons : mettre en évidence la MIC de la fonte de Saint-Gobain PAM en monoculture et coculture.

Tableau III-10 : Milieux de culture testés associés à leurs paramètres variables.

Paramètres variables					N° milieu
Source de vitamines et éléments traces	Solution de Widdel et Bak, 1992 Extrait de levure 1 g L⁻¹ (retenu)				→ M1
Concentration en extrait de levure	0,01 g L ⁻¹				→ M2
	0,03 g L ⁻¹				
	0,1 g L⁻¹ (retenu)				
Concentration en chlorures	12,63 mM				→ M3
	0,04 mM (retenu)				
Concentration en donneur et accepteurs d'électrons (donneur/accepteur)	IRB	SRB	NRB		
	15/80 mM	18/8 mM	10/17 mM		
	15/10 mM	15/6 mM	15/24 mM		(retenu)
	→ M4-fumarate	→ M4-sulfate	→ M4-nitrate		

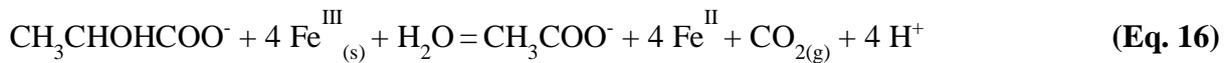
**Chapitre IV : Expériences en présence de monocultures et
cocultures bactériennes issues de trois groupes métaboliques**

Bien que plusieurs études aient porté sur la corrosion influencée par les microorganismes (MIC) d'alliages de fer (e.g. acier) ou de l'intérieur de tuyaux en fonte (e.g. : Teng *et al.*, 2008 ; Gerke *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2014 ; Qui *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 2018), seulement un nombre limité d'études a été mené sur la MIC à l'extérieur de tuyaux en fonte (King *et al.*, 1986 ; Kajiyama et Koyama, 1997 ; Doyle *et al.*, 2003 ; Sancy, 2010 ; Wassim et Djukic, 2020 ; Petersen *et al.*, 2020). Ces études concernent d'ailleurs des tuyaux en fonte déjà corrodés ou des coupons en fonte polis. Or, comme nous l'avons montré dans le Chapitre III, la surface de la fonte a des propriétés qui lui sont spécifiques (notamment sa couche native d'oxydes) et pour évaluer la sensibilité de la fonte de Saint-Gobain PAM à la MIC, il est donc indispensable de travailler sur la fonte brute. Notons bien que l'objectif ici est de s'intéresser à la corrosion de la fonte nue et non d'évaluer l'efficacité des couches protectrices de la fonte (revêtement par des polymères, application d'alliages, ...) qui recouvrent la face externe des canalisations implantées sur le terrain.

Comme nous nous intéressons aux tuyaux en fonte enfouis dans les sols, nous devons prendre en compte que dans cet environnement, les microorganismes sont principalement associés à des agrégats microbiens (que l'on peut assimiler à des biofilms) et ne vivent jamais isolés, ils évoluent avec d'autres microorganismes dont les activités métaboliques se conjuguent souvent de manière d'autant plus complexe que le nombre de microorganismes différents est important. C'est donc le résultat d'actions simultanées de plusieurs groupes métaboliques (Lee *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2008 ; Valence et Cabrieles, 2014 ; Kip et Van Veen, 2015). Il en résulte des relations trophiques qui donnent lieu à des réactions chimiques caractéristiques, impossibles à reproduire en souches pures. A titre d'exemple la méthanotrophie anaérobie, qui conduit à l'oxydation du méthane par les sulfates, n'a lieu que grâce à des associations trophiques entre méthanogènes et SRB (DeLong, 2000 ; Meulepas *et al.*, 2010). Dans cette thèse, nous avons retenu trois groupes car ils sont capables d'interagir avec des composés présents dans l'environnement des tuyaux (i.e. produits de corrosion, nutriments du sol...) : les bactéries ferriréductrices (IRB), les sulfatoréductrices (SRB) et les nitrates-réductrices (NRB). Les SRB et IRB sont largement reconnus dans la MIC (Little *et al.*, 2020b) au contraire des NRB.

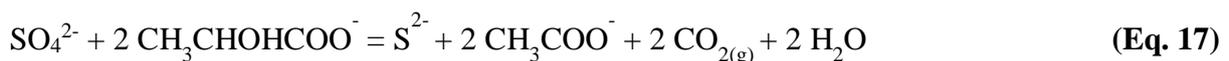
Des IRB ont été trouvées près d'un tuyau en fonte corrodé, enfoui dans des sédiments marins sablonneux (Kajiyama et Koyama, 1997). Elles sont capables par des processus de respirations aéro-anaérobies facultatifs ou anaérobies stricts, en absence d'oxygène, d'utiliser une voie dissimilatrice, c'est-à-dire des formes solides de fer ferrique comme accepteur d'électrons terminaux (Myers et Myers, 1997). Ces bactéries réductrices du fer sont alors responsables du

flux important de fer(II) généré dans les milieux réducteurs (Lovley, 2000), ce qui peut entraîner la déstabilisation de la couche d'oxydes de fer(III) à la surface des tuyaux en fonte (Little, 1997). Par exemple, l'Équation 16 montre l'oxydation des lactates par le Fe^{III} catalysée par une IRB (dont le donneur d'électrons correspond au lactate).



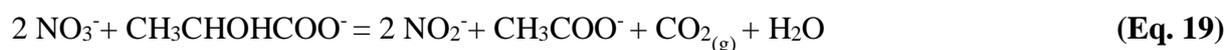
Le fer(II) biogénéré par les IRB est mobilisable dans plusieurs conditions : dans les sols riches en phosphate pour former de la vivianite (Fe₃(PO₄)₂ • 8H₂O (Nembrini *et al.*, 1983) ; dans les sols riches en soufre pour former des sulfures de fer tels que la mackinawite (FeS_{1-x}) ou encore la pyrite (FeS₂) ; dans les sols où l'activité ferriréductrice est couplée à l'oxydation de la matière organique en CO₂, de la sidérite (FeCO₃) est retrouvée (Ellwood *et al.*, 1988 ; Brown *et al.*, 1994), etc. Des études ont montré que les IRB peuvent inhiber la corrosion (Jayaraman *et al.*, 1997 ; Dubiel *et al.*, 2002). Par exemple, dans des conditions microaérobies, *S. putrefaciens* est capable de réduire Fe(III) en Fe(II), qui lui-même consommera les traces d'O₂, entraînant la protection de l'acier contre la corrosion (Dubiel *et al.*, 2002). D'autres processus impliquent notamment la précipitation du Fe²⁺ avec le phosphate en couche de vivianite stable de plusieurs microns d'épaisseur protégeant la surface (Volkland *et al.*, 2000).

Les SRB sont particulièrement impliquées dans la corrosion des matériaux en fer. Plusieurs études ont mis en évidence la présence de sulfure de fer FeS à proximité de tuyaux en fonte corrodés, le FeS étant le minéral caractéristique du métabolisme des SRB (Kajiyama et Koyama, 1997, King *et al.*, 1986). En effet, les SRB utilisent les ions SO₄²⁻ comme accepteur d'électrons, qui sont réduits en sulfure (S²⁻) couplé à l'oxydation du lactate (Équation 17). On suppose que le sulfure est impliqué dans l'accélération de la corrosion par sa réaction avec les ions ferreux. Cette réaction, simplifiée, est décrite par l'Équation 18.



Les SRB sont bien connues pour causer des piqûres sur les matériaux (Loto, 2017). Par contre, il a été montré que le film Fe_{1+x}S comme la mackinawite protège le matériel (Liu *et al.*, 2000 ; Hamilton, 2003 ; Valence et Pena, 2014). Ainsi, les SRB, comme les IRB, pourraient aussi bien se comporter en tant qu'organismes précurseurs de la MIC, ou à l'inverse, protecteur de la MIC.

L'action des NRB sur la corrosion, bien que peu étudiée, a été mise en cause dans la MIC (Zhu *et al.*, 2003). En effet, les sols bien fertilisés, riches en nitrates, sont responsables de l'augmentation de la croissance microbienne des NRB et indirectement de forts taux de corrosion (Little *et al.*, 1991 ; Melchers, 2007). Plusieurs mécanismes sont mis en cause et notamment la réaction abiotique entre les nitrites biogénérés (Équation 19) et le fer ferreux (Équation 20) présent naturellement à la surface des coupons en fonte (i.e. couche native d'oxydes).



La présente étude vise à étudier le comportement de la fonte dans un consortium bactérien, où l'influence des activités multi-espèces reste à peine explorée (Lee *et al.*, 2006 ; Valence et Cabriaes, 2014 ; Jin *et al.*, 2019 ; Suma *et al.*, 2019). Pour y parvenir nous avons d'abord testé l'impact de souches pures modèles de laboratoire en monoculture : *Shewanella putrefaciens* CIP 80-40 pour IRB, *Desulfovibrio desulfuricans* DSM 12129 pour SRB et *Klebsiella mobilis* FJ01 pour NRB. Puis nous avons soumis la fonte non polie à des cocultures de ces souches modèles.

La (bio)corrosion des coupons en fonte a été suivie pendant une immersion d'un mois à 30 °C dans 10 mL d'un milieu minimum (appelé milieu M4, optimisé et présenté dans le Chapitre III) dégazés sous N₂, avec des cultures en souche pure de bactéries appartenant à l'un des trois groupes métaboliques ou avec les cocultures, en duo, de ces souches. Pour chaque condition, un contrôle abiotique a été réalisé, c'est-à-dire que la corrosion des coupons en fonte dans le milieu de croissance stérile, sans bactérie, a été suivie afin d'avoir une indication de la contribution de ce milieu sur la corrosion. Le type de prélèvement est dit « sacrificiel », en triplicata, c'est-à-dire que pour chaque temps de prélèvement et de condition, trois flacons contenant un coupon sont utilisés (à 1 jour, 3 jours, 7 jours, 15 jours et 30 jours d'incubation). La corrosion a été déterminée par analyse gravimétrique et par analyse du fer total, i.e. Fe^{II} et Fe^{III} libéré dans le milieu M4 additionné au fer extractible par traitement acide du coupon (cf. Figure II-9 du Chapitre II). La surface des coupons en fonte a été caractérisée par MEB, spectroscopie Raman et diffraction des rayons X. Les spectres Raman de référence sont présentés en Annexe 2. L'analyse en microscopie optique sous épifluorescence de la surface a été réalisée pour apprécier la colonisation des surfaces par les bactéries et enfin les principaux métabolites et substrats nutritifs propres à l'activité bactérienne ont été suivis par

chromatographie ionique. L'abondance relative des deux souches bactériennes *S. putrefaciens* et *D. desulfuricans* a été déterminée par qPCR sur des gènes spécifiques.

IV-1. Expérience en présence de cultures mono-espèces bactériennes

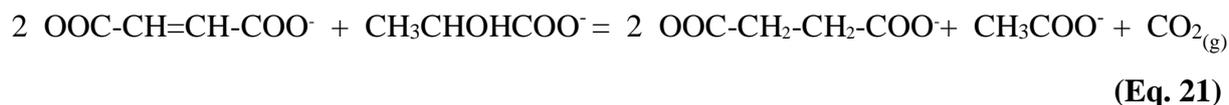
En premier lieu, la corrosion de la fonte a été suivie en souche pure afin d'apprécier l'action spécifique de chaque souche sur la fonte.

IV-1.1. Corrosion de la fonte influencée par *Shewanella putrefaciens*, une bactérie ferriréductrice

L'IRB *S. putrefaciens* est capable de réduire le Fe^{III} solide en Fe^{II}. L'implication de cette bactérie sur la corrosion de la fonte se ferait au niveau de la couche native d'oxydes composée, en outre, d'oxydes de Fe^{III} (i.e. hématite, cf. § III-1 du Chapitre III). L'hypothèse mécanistique est que *S. putrefaciens* déstabilise la couche de Fe^{III} en la respirant (réduction dissimilatrice) ce qui accélère le processus de corrosion de la fonte brute.

IV-1.1.1. Corrosion par *Shewanella putrefaciens* dans le milieu M4-fumarate

L'activité ferriréductrice de *S. putrefaciens* a été contrôlée dans le milieu M4-fumarate en présence ou absence d'un coupon en fonte (Figure IV-1). En présence d'un coupon en fonte, il y a une augmentation d'un logarithme de la densité cellulaire après 24 h d'incubation ($2,4 \times 10^8$ à $2,0 \times 10^9$ cellules mL⁻¹) associée à une augmentation de Fe^{II} (Figure IV-1). Alors qu'en absence de coupon, aucune augmentation significative de la densité cellulaire n'est observée et la teneur en Fe^{II} reste nulle. Ces résultats confirment ce que nous avons montré dans le Chapitre III, à savoir, que le Fe^{III} apporté avec le coupon de fonte autorise la croissance bactérienne en jouant très vraisemblablement le rôle d'accepteur d'électrons. L'oxydation du lactate qui en résulte apportant l'énergie nécessaire à la croissance (Thauer *et al.*, 1977). Quinze millimolaires de lactate sont disponibles dans le milieu, or si nous considérons qu'environ 20 % (soit 3 mM) sont dédiés à l'apport de carbone pour la biomasse, tel que cela a été montré chez d'autres bactéries IRB (Caccavo *et al.*, 1997), alors 12 mM sont disponibles comme source d'électrons. Rappelons que le milieu M4 apporte un autre accepteur d'électrons que le Fe^{III} (pour « amorcer » en quelque sorte la croissance bactérienne) : le fumarate à raison de 10 mM. D'après la stœchiométrie de la réaction du fumarate par le lactate, 1 mole de lactate réagit avec 2 moles de fumarate (Équation 21).



Les 10 mM de fumarate réagissent donc avec 5 mM de lactate, 7 mM restent alors disponibles pour réagir avec le Fe^{III} du coupon de fonte, soit selon l'Équation 16, l'équivalent de 28 mM de Fe^{III}. Or la couche d'oxydes de fer native contient en moyenne 0,3 ± 0,1 mM de Fe^{III} en fonction de son épaisseur (cf. § III-1 du Chapitre III). La quantité de Fe²⁺ mesurée après 24 h d'incubation est de 0,5 ± 0,1 mg cm⁻², soit ramenée au volume réactionnel une quantité équivalente à une concentration de 0,9 ± 0,1 mM (Figure IV-1), une valeur relativement proche des 0,3 mM estimés si l'on tient compte de l'hétérogénéité de la couche. De plus, comme les 5 autres faces du coupon en fonte sont également accessibles à *S. putrefaciens*, ils peuvent apporter une source en Fe^{III} supplémentaire. En accord avec la littérature, *S. putrefaciens* est bien capable d'utiliser les différentes formes de Fe^{III} solides identifiées dans la couche native d'oxydes comme la magnétite et l'hématite (Dong *et al.*, 2000 ; Bonneville *et al.*, 2006).

Pour expliquer la croissance de *S. putrefaciens* en présence d'un coupon sur l'hypothèse d'une respiration du Fe^{III}, il manque tout de même plus de 27 mM de Fe^{III}. Cela peut s'expliquer par : i) la variation de densité bactérienne qui a été surestimée ; ii) une contamination par une souche bactérienne capable de métaboliser l'acétate et le fumarate a eu lieu ; iii) la quantité de Fe^{II} mesurée a été sous-estimée (une partie du Fe^{II} serait restée non extractible). Cette hypothèse est peu probable car cela supposerait aussi une perte de masse d'environ 1,5 g / coupon, ce qui n'est pas en accord avec les données de la Figure IV-2a où la perte de masse estimée est 20 fois plus faible.

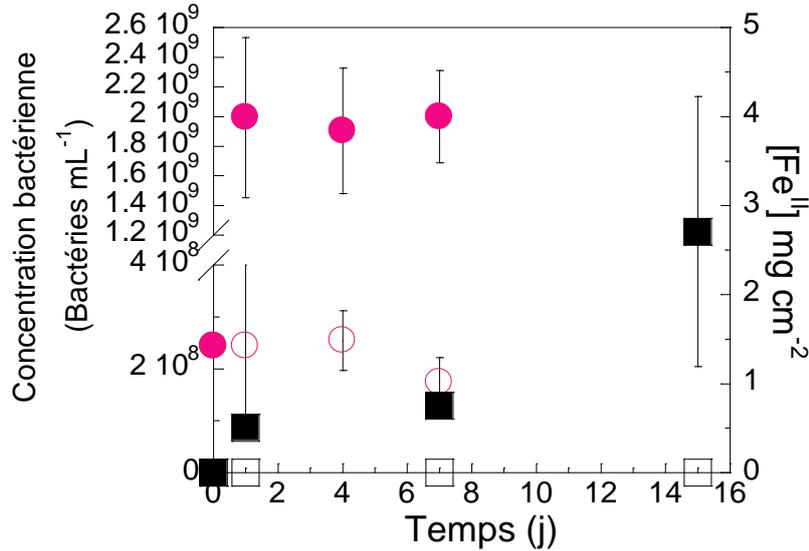


Figure IV-1 : Variation du nombre de cellules de *Shewanella putrefaciens* (rond) en fonction du temps d'incubation avec ou sans coupon de fonte (respectivement rond plein et vide), et suivi de la concentration en Fe^{II} avec et sans coupon (respectivement carré plein et vide). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-fumarate, (n = 3).

Au cours de la période d'incubation avec un coupon en fonte, la perte de masse en présence de *S. putrefaciens* est plus élevée que celle du contrôle abiotique (au 30^e jour d'incubation, 22 ± 13 mg cm⁻² contre 3 ± 10 mg cm⁻² pour le contrôle abiotique) (Figure IV-2a). Cette observation est concomitante avec la concentration en fer total (au 30^e jour, 13 ± 6 mg cm⁻² contre 1 ± 6 mg cm⁻² pour le contrôle abiotique) (Figure IV-2b). La perte de masse et la concentration en fer, étant systématiquement plus élevées dans les essais avec *Shewanella* que dans les contrôles abiotiques, il peut donc être admis que la souche bactérienne est impliquée dans une MIC de la fonte et que celle-ci va au-delà d'une déstabilisation de la couche native d'oxydes en attaquant le fer élémentaire puisque les quantités de fer extraites en présence de la souche sont environ deux fois supérieures à la quantité estimée de fer qui constitue la couche native d'oxydes. Enfin, la teneur en fer libéré (i.e. sans tenir compte du fer du coupon extractible par HCl) augmente très nettement pour *Shewanella* au cours du temps contrairement au fer du contrôle abiotique qui reste stable au 30^e jour, $6,9 \pm 2,7$ mg cm⁻² contre $2,4 \pm 0,7$ mg cm⁻² pour le contrôle abiotique (Figure IV-2c).

Visuellement, le milieu en présence de *S. putrefaciens* vire au vert foncé au cours du temps d'incubation et le coupon a également une légère coloration verte (Figure IV-3a et a'). Le flacon du témoin abiotique reste quant à lui inchangé au cours du temps (Figure IV-3b).

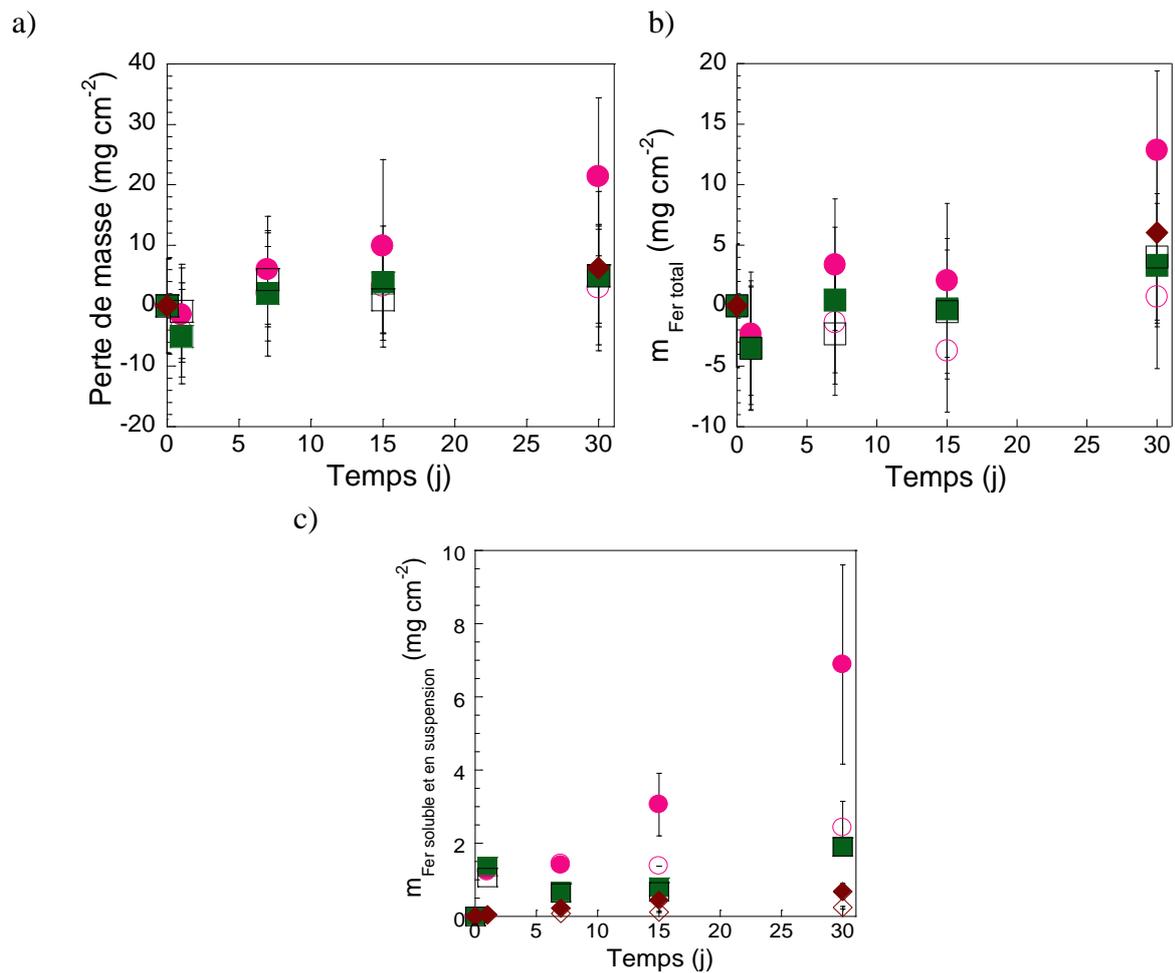


Figure IV-2 : Variation de (a) la perte de masse des coupons en fonte, (b) la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps d'incubation avec *Shewanella putrefaciens* (rond plein), son contrôle abiotique (rond vide) dans M4-fumarate, *Desulfovibrio desulfuricans* (carré plein), son contrôle abiotique (carré vide) dans M4-sulfate et *Klebsiella mobilis* (losange plein) et son contrôle abiotique (losange vide) dans M4-nitrate, (n = 3).

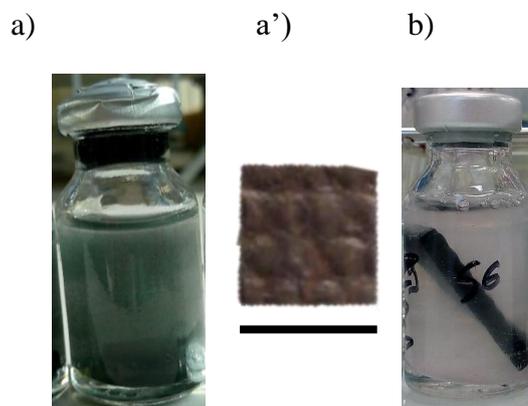


Figure IV-3 : Aspects des suspensions et du coupon au 30^e jour d'incubation dans le milieu M4-fumarate (a - a') avec *Shewanella putrefaciens* et (b) sans bactéries. La barre représente 1 cm.

L'observation par microscopie sous épifluorescence d'un coupon en présence de *S. putrefaciens* montre la présence de bactéries marquées au SYBR green qui fluorescent en vert (Figure IV-4a). L'observation sous épifluorescence du contrôle abiotique a montré des images complètement noires, ce qui confirme que la fluorescence verte provient des bactéries (données non montrées). L'analyse en MEB montre des particules comparables à des aiguilles sur lesquelles nous apercevons des sortes de bâtonnets semblables à de longs bacilles et mesurant en moyenne 3 μm , description conforme à celle de *S. putrefaciens* (Figure IV-4b). Sur le coupon incubé dans le milieu abiotique, les oxydes sont bien différents et aucune cellule bactérienne n'est observable (Figure IV-4c).

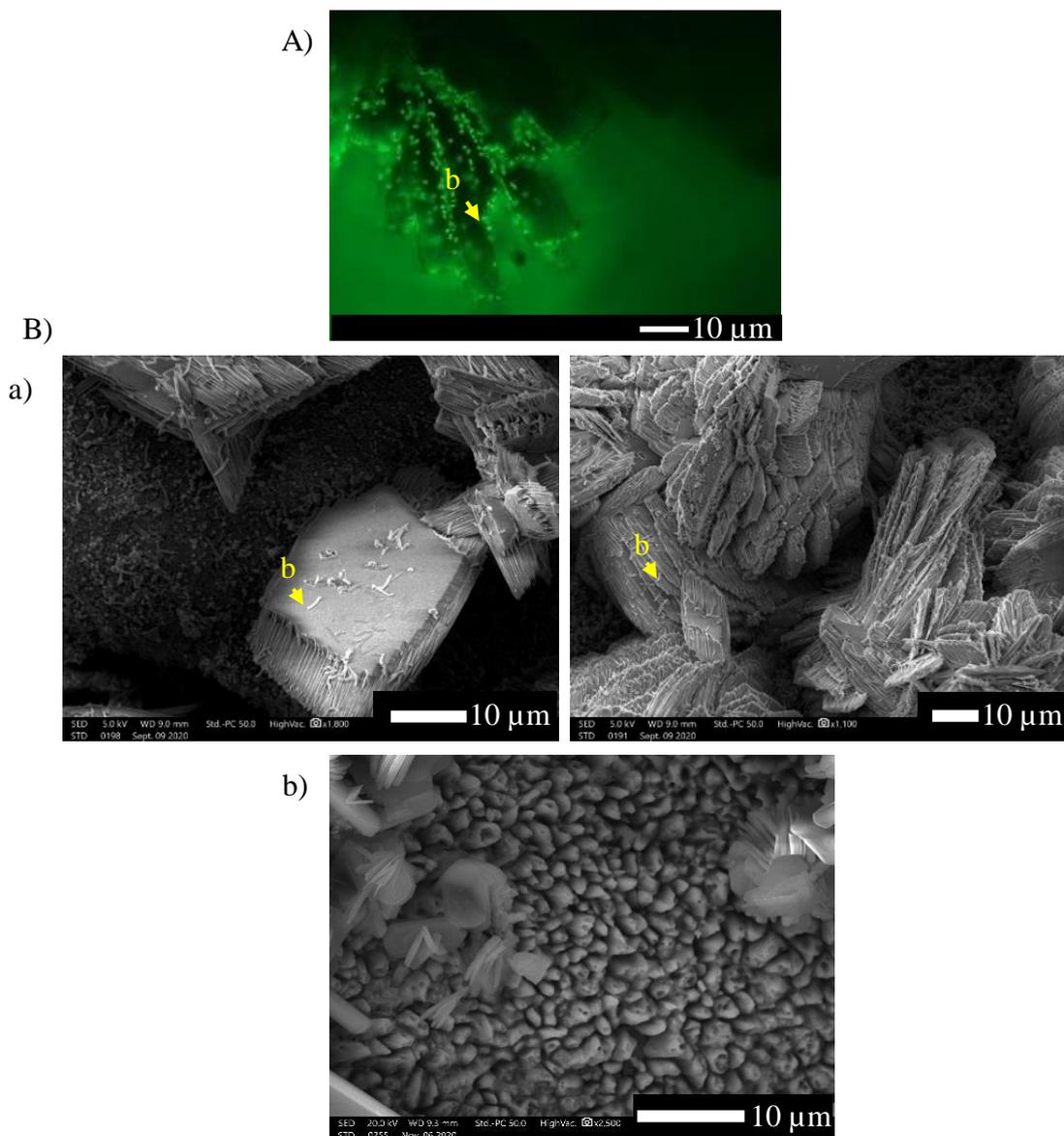


Figure IV-4 : (A) Observation en microscopie optique sous épifluorescence et (B) images de microscopie électronique à balayage de (a) la surface d'un coupon en fonte brute incubé avec *Shewanella putrefaciens* au 30^e jour d'incubation et (b) d'un coupon incubé dans M4-fumarate.

b = objet ayant l'apparence d'une cellule bactérienne.

Les cellules adhérentes sur le coupon ont été dénombrées et augmentent au cours du temps (au jour 1 : $(3 \pm 1) \times 10^6$ bactéries cm^{-2} , au jour 3 : $(13 \pm 3) \times 10^6$ bactéries cm^{-2}) (Tableau IV-1). Cela signifie d'une part que l'environnement de la fonte est favorable à une colonisation bactérienne et d'autre part que *S. putrefaciens* est capable de se développer dans le milieu M4-fumarate, confirmant donc les analyses effectuées dans le milieu de culture.

Tableau IV-1 : Comptage des bactéries *Shewanella putrefaciens* adhérentes sur un coupon en fonte au cours du temps.

Temps (j)	Densité bactérienne (bactéries cm^{-2})
1	$(3 \pm 1) \times 10^6$
2	$(7 \pm 2) \times 10^6$
3	$(13 \pm 3) \times 10^6$

Plusieurs points du coupon en fonte analysés en spectroscopie Raman ont révélé la présence de vivianite $\text{Fe}^{\text{II}}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 (\text{H}_2\text{O})$ et d'hématite $\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$ (Figure IV-5b). Le coupon incubé dans le contrôle abiotique présente seulement de la maghémite $\gamma\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$ et de l'hématite $\alpha\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$ (Figure IV-5d). La vivianite qui n'est retrouvée qu'en présence de *S. putrefaciens*, pourrait être en toute logique une signature de l'activité ferriréductrice de la bactérie, et l'hématite provient vraisemblablement de la couche native d'oxydes. On s'attendait à ce que l'hématite soit réduite par la souche ferriréductrice, mais Little a montré que la biominéralisation par *S. putrefaciens* en anaérobie dépend des oxydes présents. Par exemple, il peut y avoir une transformation de la goethite et de la ferrihydrite en un mélange sidérite, vivianite et magnétite sans que l'hématite ne soit altérée (Little, 1998).

La DRX révèle la présence de magnétite ($\text{Fe}^{\text{II}} \text{Fe}_2^{\text{III}} \text{O}_4$) et d'hématite ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$) qui avaient également été détectées sur un coupon en fonte incubé dans le milieu stérile. Ces oxydes ne sont donc pas associés à l'activité ferriréductrice de *S. putrefaciens* (Figure IV-6). D'ailleurs, rappelons que ce sont des constituants de la couche native d'oxydes. La DRX confirme la présence de vivianite ($\text{Fe}^{\text{II}}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 (\text{H}_2\text{O})$) qui n'est retrouvée que dans la condition *S. putrefaciens* + coupon. La présence de ce minéral était attendue. En effet, le milieu M4 contient une quantité non négligeable de phosphate (i.e. 1,2 mM) qui a réagi avec le Fe^{II} biogénéré pour former la vivianite selon l'Équation 22.



Le Fe^0 a été détecté par DRX ce qui est tout à fait cohérent puisque le faisceau de rayon X peut traverser plusieurs dizaines de microns et atteindre ainsi le fer élémentaire, principal composant de la fonte, contrairement à la spectroscopie Raman qui s'intéresse à l'extrême surface.

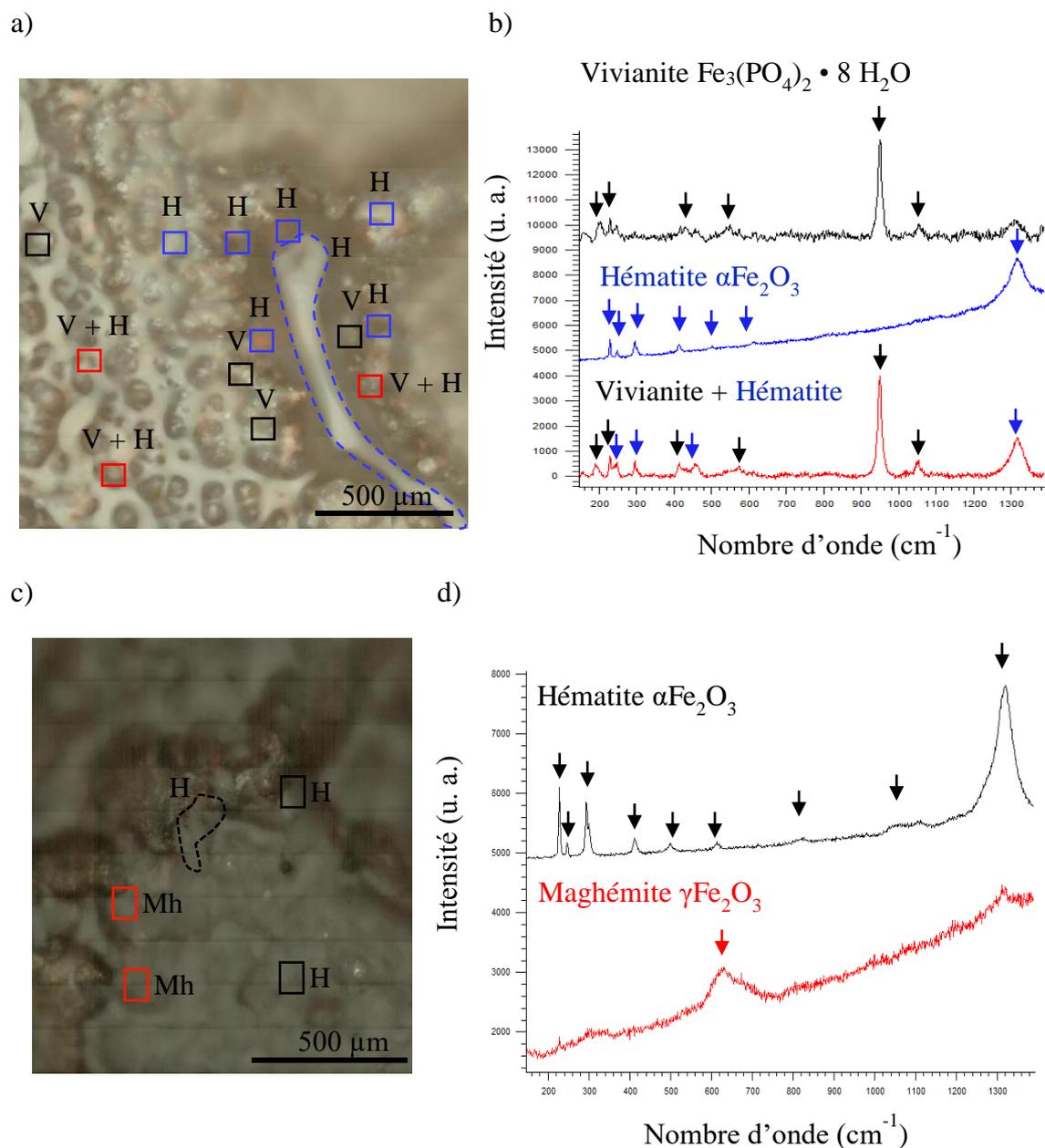


Figure IV-5 : (a) et (c) Surfaces des coupons en fonte brute balayées par spectroscopie Raman et (b) et (d) spectres correspondants enregistrés après 30 jours dans le milieu M4-fumarate avec *Shewanella putrefaciens* (a - b) et sans bactéries (c - d).

V = vivianite, H = hématite et Mh = maghémite.

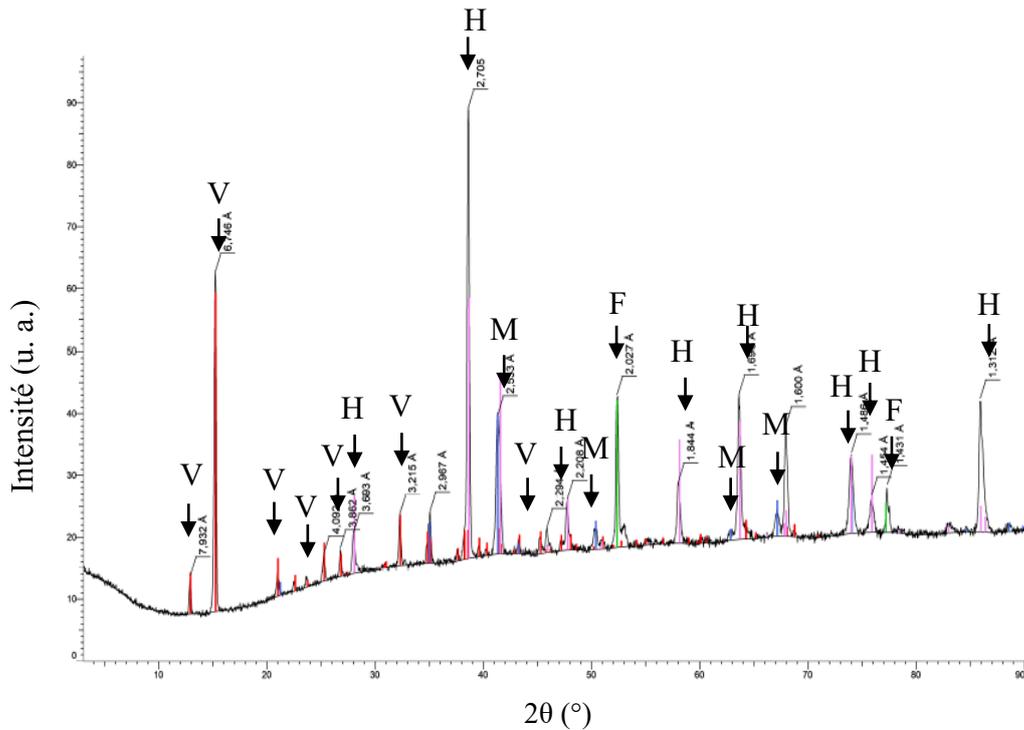


Figure IV-6 : Spectre de diffraction des rayons X d'un coupon en fonte brute incubé avec *Shewanella putrefaciens* après 30 jours à 30°C dans le milieu M4-fumarate.

V = vivianite, M = magnétite, H = hématite et Fe = Fe⁰.

Pour conclure, l'apport en fumarate a permis à *S. putrefaciens* d'amorcer sa croissance et a ainsi entraîné la formation d'un biofilm sur la fonte. Un contact direct entre les bactéries et les composés de fer ferrique de la couche native d'oxydes a donc eu lieu et a déclenché la réduction du fer (Lovley et Phillips, 1988). La nature des oxydes superficiels a été modifiée, on a de la vivianite (Fe^{II}₃(PO₄)₂ • 8(H₂O)), caractéristique de la présence de Fe^{II}. Ce minéral a d'ailleurs déjà été rapporté dans des cultures d'IRB (Fredrickson *et al.*, 1998 ; Dong *et al.*, 2000 ; Jorand *et al.*, 2000). Cette modification de surface a déplacé rapidement les équilibres et a entraîné une accélération de la corrosion, le taux de corrosion avec *S. putrefaciens* est de CR = 0,35 mm an⁻¹ contre seulement CR = 0,05 mm an⁻¹ avec le contrôle abiotique.

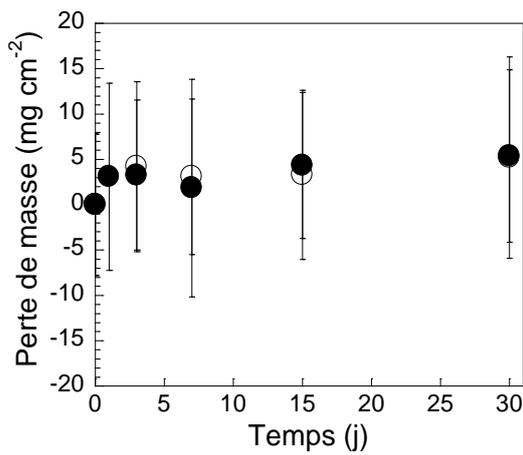
IV-1.1.2. Corrosion par Shewanella putrefaciens tuée par la chaleur dans le milieu M4-fumarate

Pour avoir un contrôle supplémentaire au contrôle abiotique sans inoculum et être plus rigoureux, un inoculum de *S. putrefaciens* a été tué par la chaleur (autoclave de 15 min à 121 °C). Le milieu utilisé dans ce contrôle abiotique est rigoureusement de la même composition chimique que les milieux utilisés pour les essais, à ceci près que toute activité

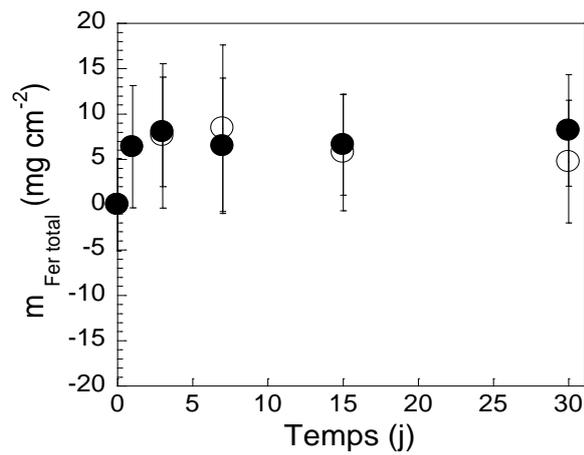
enzymatique a été inactivée par la chaleur et qu'il y a présence de bactéries mortes et de polymères (protéines, etc.).

La perte de masse et la concentration en fer total restent constants quel que soit le temps d'incubation et correspondent à la couche native d'oxydes (Figure IV-7a et b). Une concentration constante de $0,52 \pm 0,06 \text{ mg cm}^{-2}$ de fer est libérée dans le milieu lorsqu'il y a présence de bactéries « mortes » (Figure IV-7c). En absence de bactéries « mortes », la concentration augmente légèrement mais reste tout de même plus faible, elle passe de $0,05 \pm 0,10$ au jour 1 à $0,20 \pm 0,06 \text{ mg cm}^{-2}$ au jour 30. La présence de corps bactériens mène à une libération de fer dans le milieu plus importante qu'en absence de bactéries « mortes ».

a)



b)



c)

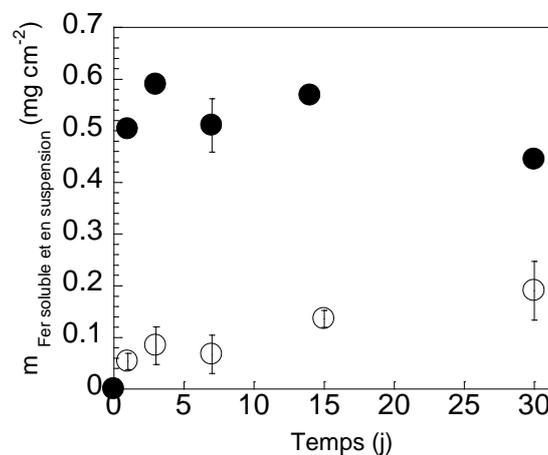


Figure IV-7 : Variation de (a) la perte de masse des coupons en fonte, (b) la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps d'incubation avec *Shewanella putrefaciens* tuée par la chaleur (rond plein) et avec le contrôle stérile sans bactéries (rond vide). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-fumarate (n = 3).

Le milieu M4 en présence des bactéries mortes ne change pas de couleur au cours de l'incubation tout comme le contrôle stérile sans bactéries à la différence du test avec *S. putrefaciens* (Figure IV-8).

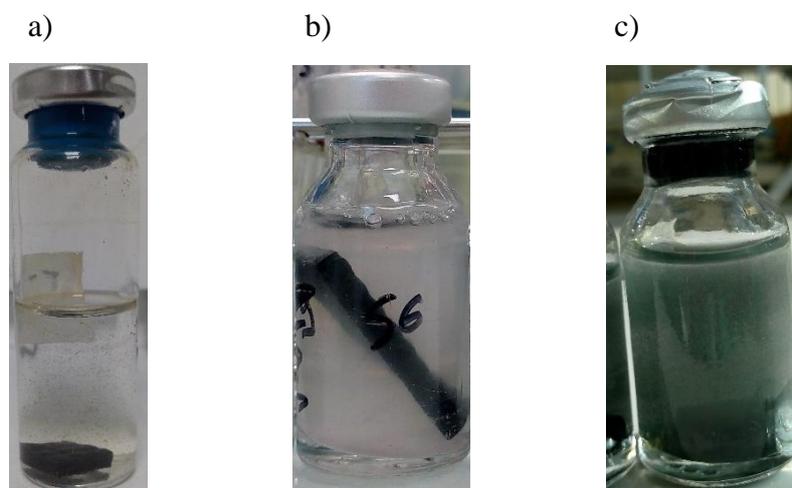


Figure IV-8 : Aspects des suspensions au 30^e jour d'incubation dans le milieu M4-fumarate (a) avec *Shewanella putrefaciens* inactivée par la chaleur, (b) sans bactéries et (c) avec *Shewanella putrefaciens* active.

Une vingtaine de points de la surface du coupon ont été analysés par spectroscopie Raman et seules l'hématite et la magnétite sont retrouvées (Figure IV-9). Ainsi, aucune différence significative n'est retrouvée entre le contrôle stérile sans bactéries (Figure IV-5) et le test avec le corps bactérien de *S. putrefaciens*.

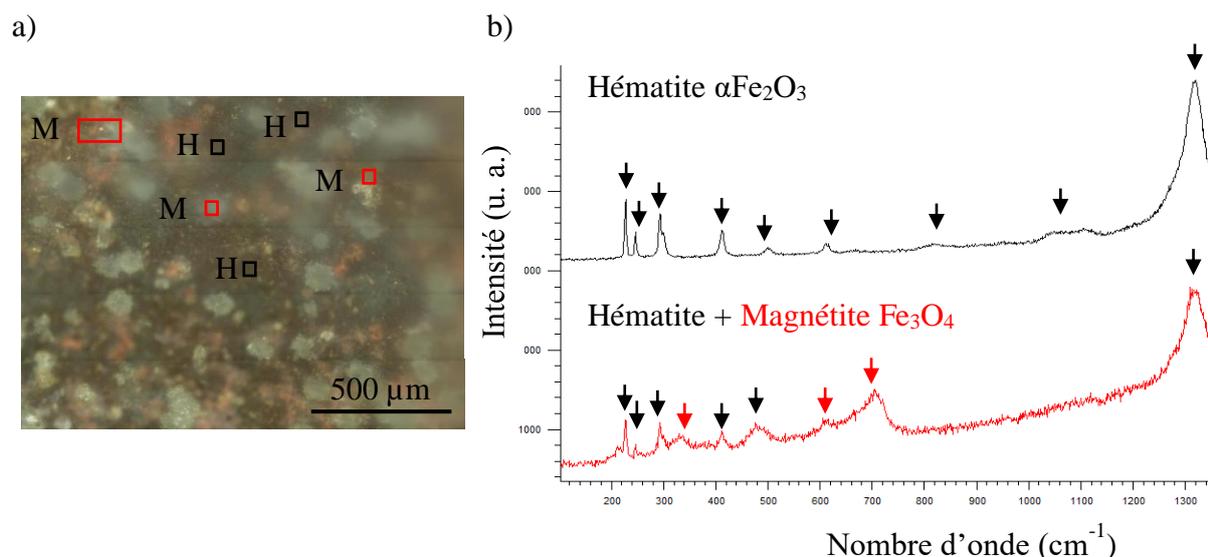


Figure IV-9 : (a) Surface d'un coupon en fonte brute balayée par spectroscopie Raman et (b) spectres correspondants enregistrés après 30 jours dans le milieu M4-fumarate avec *Shewanella putrefaciens* « morte ». H = hématite et M = magnétite.

Lorsque la fonte est mise en contact avec la biomasse de *S. putrefaciens*, seule la quantité de fer libéré est différente du contrôle M4-fumarate, elle est trois fois plus importante. Comme la

concentration en fer libéré est de $6,9 \pm 2,7 \text{ mg cm}^{-2}$ au 30^e jour d'incubation en présence de *S. putrefaciens*, les molécules libérées après la mort cellulaire représentent donc environ 7 % de la libération du fer. Des résultats similaires ont été observés avec des bactéries irradiées de *S. oneidensis* mises en présence de poudre de fer pendant plus de 40 jours (Esnault *et al.*, 2011). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer cet apport non négligeable en fer en présence de bactéries « mortes ».

i) Le fer est un cofacteur essentiel pour divers processus biologiques au sein de la cellule bactériennes. Une cellule de *Escherichia coli* est constituée d'une concentration moyenne en fer de 40 attogrammes (Ikehata *et al.*, 2018). Sachant que 2×10^8 bactéries mL^{-1} ont été ajoutées, cela représente $2,7 \times 10^{-5} \text{ mg cm}^{-2}$ de Fe dans la suspension. Or il y a en moyenne $0,5 \pm 0,1 \text{ mg cm}^{-2}$ de Fe libéré, le fer libéré par les bactéries représente donc seulement 0,05 % de la quantité de fer retrouvé.

ii) La seconde hypothèse est liée à la libération de molécules dans le milieu. En effet, après avoir tuées les bactéries par la chaleur, de nombreuses molécules organiques se retrouvent dans le milieu, e. g. du citrate, des sidérophores, de l'acétate etc. Cela modifie donc le milieu et peut favoriser la solubilisation ou le détachement des oxydes de fer dans la phase aqueuse.

IV-1.1.3. Corrosion par *Shewanella putrefaciens* dans le milieu M4-fumarate d'un coupon en fonte démunie de sa couche native d'oxydes

Comme nous avons montré précédemment, *S. putrefaciens* réduit le Fe^{III} de la couche native d'oxydes. En absence de cette couche, le phénomène de biocorrosion pourrait ne plus se produire, ou du moins être ralenti puisqu'il n'y aurait plus de couche à « déstabiliser ». Cependant, des études relativement récentes ont indiquées que des bactéries du genre *Shewanella* seraient capables d'utiliser Fe^0 comme source d'électrons en présence de fumarate comme unique accepteur, ce qui conduirait alors à une biocorrosion de Fe^0 (Philips *et al.*, 2018). Afin de s'assurer que l'activité de notre souche de *Shewanella* sur la fonte nue est liée uniquement à la déstabilisation de la couche d'oxydes de fer native ou afin de mettre en évidence d'autres mécanismes comme l'oxydation directe du Fe^0 , nous avons suivi la corrosion de coupons de fonte démunis de leur couche d'oxydes de fer native. La face externe de la fonte a donc été polie (cf. Figure II-1c du Chapitre II). Le coupon a ensuite été placé en présence et en absence de *S. putrefaciens* et la corrosion a été suivie. Les éventuelles différences observées entre un coupon non poli et un coupon dont la face supérieure est polie seront donc dues à la couche native d'oxydes.

En présence ou absence de *S. putrefaciens*, les pertes de masse et les teneurs en fer total ne sont pas significativement différentes et le fer libéré augmente au cours du temps (Figure IV-10). La concentration en succinate passe de 0 à 15 mM après 1 jour d'incubation en présence de *S. putrefaciens*, elle reste nulle avec le contrôle abiotique. Cela indique bien que les bactéries ont réduit le fumarate (qui était présent à une concentration de $13,7 \pm 0,4$ mM) en succinate et ont donc été actives.

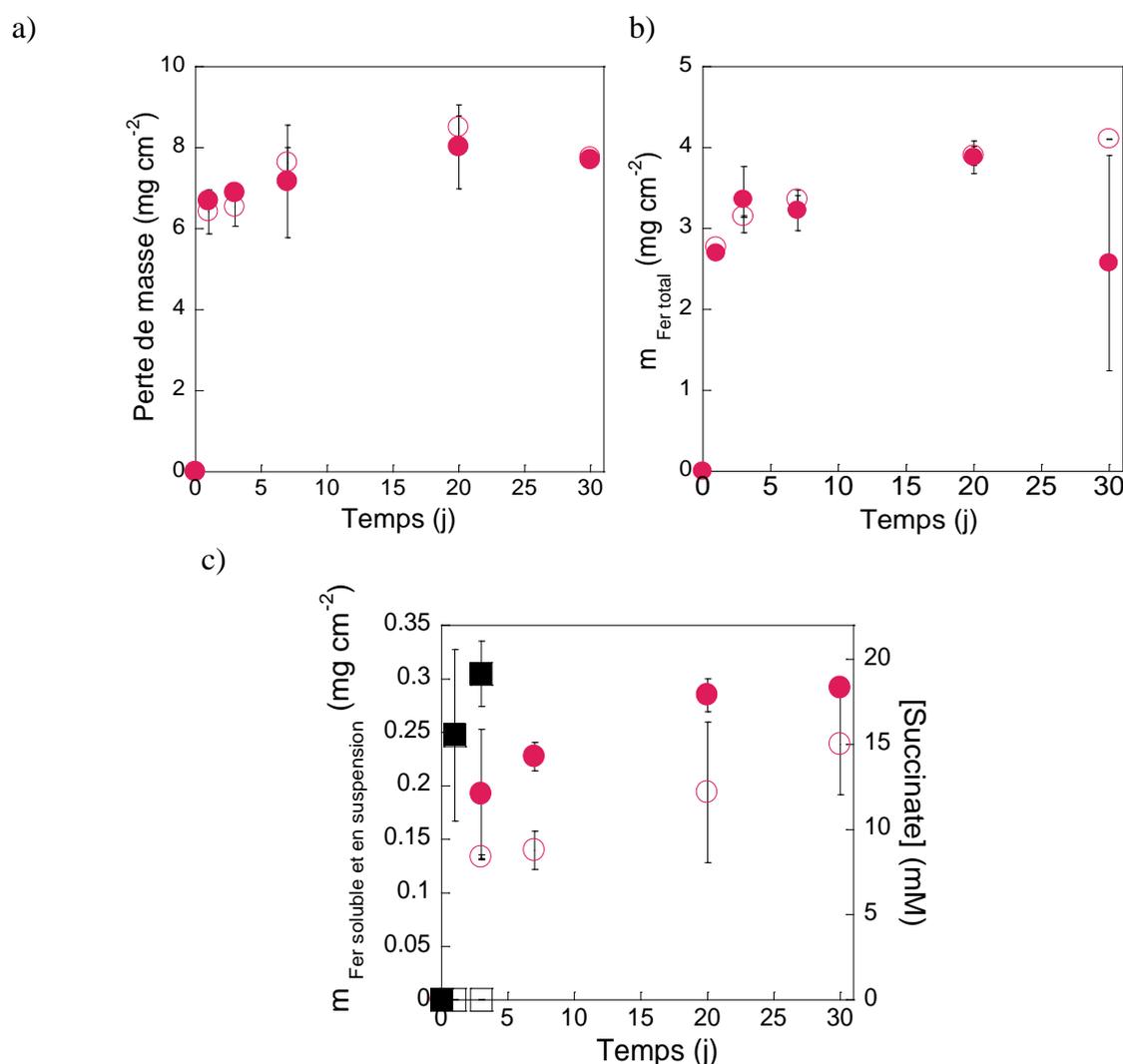


Figure IV-10 : Variation de (a) la perte de masse des coupons en fonte, (b) la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ (rond) et en succinate (carré) en fonction du temps d'incubation avec *Shewanella putrefaciens* (symbole plein) et son contrôle abiotique (symbole vide). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-fumarate avec un coupon démunie de sa couche native d'oxydes (n = 3).

Le coupon incubé en présence de *S. putrefaciens* (Figure IV-11a') présente une couleur rouille contrairement au coupon incubé dans le milieu abiotique qui est resté gris (Figure IV-11b').

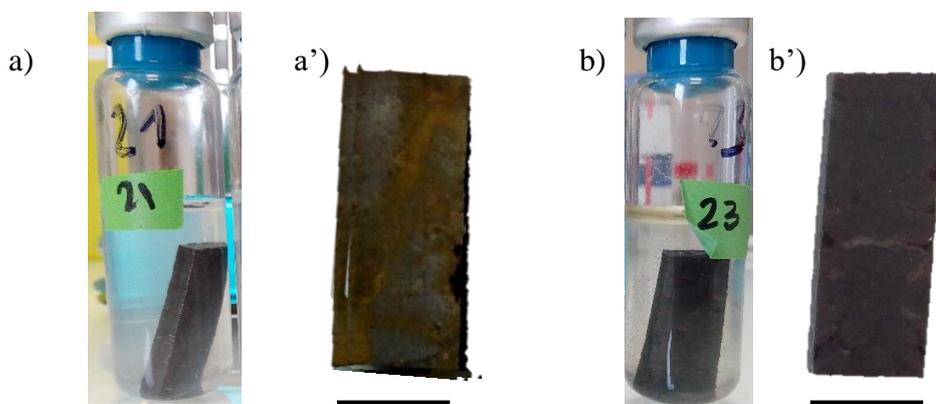


Figure IV-11 : Aspects des suspensions et des coupons démunis de la couche native d'oxydes au 30^e jour d'incubation dans le milieu M4-fumarate (a - a') avec *Shewanella putrefaciens* et (b - b') sans bactéries. La barre représente 1 cm.

Sans la couche native d'oxydes, il n'y a pas de différence significative en termes de perte de masse, fer total et fer libéré entre le contrôle abiotique et le test avec *S. putrefaciens* mais ce dernier présente des tâches orange sur le coupon. Cette observation nous amène à penser qu'il y a bien un effet de la bactérie sur la corrosion de la fonte polie, ce qui suscite plusieurs hypothèses :

i) La première hypothèse est liée au fait que le coupon n'a été poli que sur la surface externe. Les bactéries ont donc eu accès à du Fe^{III} sur les 5 autres faces. *S. putrefaciens* aurait donc pu réduire ce Fe^{III} en Fe^{II} qui aurait alors précipité en surface engendrant alors des tâches. Les coupons ont été retirés des flacons anaérobies puis directement observés en aérobie. Ce court temps a laissé le coupon en contact avec l'oxygène, ce qui pourrait expliquer la présence de tâches de couleur orange, caractéristiques des oxydes de Fe^{III}. Si des analyses du solide avaient été réalisées, elles auraient pu valider ou non la présence d'oxydes de Fe^{II}.

ii) La seconde hypothèse est liée au métabolisme du genre *Shewanella* dont certains représentants pourraient directement ou indirectement (par consommation de l'hydrogène) oxyder le fer métallique (Philips *et al.*, 2018). La réduction du fumarate serait ainsi couplée à l'oxydation de Fe⁰. Dans notre cas, il n'est pas possible de conclure qu'un tel mécanisme puisse être impliqué. Des essais supplémentaires doivent être menés notamment le polissage entier du coupon, le suivi des espèces Fe^{II}, fumarate et des analyses de solide.

IV-1.1.4. Corrosion par Shewanella putrefaciens dans le milieu M4-nitrate

S. putrefaciens n'a pas seulement le métabolisme ferriréducteur mais est également nitrate réductrice (DiChristina, 1992). La concentration en nitrate et nitrite a donc été suivie dans le milieu M4-nitrate en présence de *S. putrefaciens* avec et sans coupon en fonte. Dans les deux

cas, la concentration en NO_3^- diminue en parallèle d'une augmentation en NO_2^- (Figure IV-12). La stœchiométrie de la réaction, indique qu'une 1 mole de lactate réagit avec 2 moles de nitrate (Équation 19). Les concentrations initiales de lactate et de nitrate étaient respectivement de 15 mM et 16 mM. Soit un excès de 7 mM de lactate. L'excès de lactate doit aussi permettre à *S. putrefaciens* d'exprimer son activité ferriréductrice, une fois le nitrate consommé, vis à vis du Fe^{III} présent dans la couche native d'oxydes. Après 6 jours d'incubation la concentration restante en nitrite ne répond pas à la stœchiométrie de l'Équation 9 : en présence du coupon seulement 6,6 mM de NO_2^- sont dosés, soit 43 % du NO_3^- consommé⁴ et en absence de coupon, 3 mM environ de nitrite sont dosés soit environ 66 % des nitrates consommés⁵ mais seulement 35 % des nitrates sont consommés contre 100 % en présence de coupon (Figure IV-12). Ces différences peuvent-elles s'expliquer par une réaction abiotique entre NO_2^- et Fe^{II} selon l'Équation 20 et comme l'ont montré Etique *et al.* (2014) ?

Le Fe^{II} serait obtenu par la respiration des Fe^{III} de la couche native d'oxydes et réduirait ainsi NO_2^- en ion ammonium NH_4^+ . Cette réaction contribuerait à réduire la quantité de nitrite dans la solution qui pourrait passer en dessous du seuil auquel ils sont toxiques pour l'activité bactérienne (Kappler *et al.*, 2006). Cette consommation des ions nitrite favoriserait alors l'activité microbienne et conduirait à la réduction de la totalité des nitrates. Seulement, si on considère que la couche native d'oxydes apporte de 0,2 à 0,6 mM Fe^{III} (cf. Chapitre III), cela conduirait à former au mieux 0,6 mM de Fe^{II} et donc 0,1 mM de nitrites réduit en NH_4^+ selon l'Équation 20. Cela n'explique donc pas complètement les différences de concentration en nitrate et nitrites des incubations réalisées en présence/absence de coupon de fonte.

⁴ $(6,6/15,3^{(*)}) \times 100 = 43 \%$; ^(*) estimé à partir des valeurs du contrôle)

⁵ $3,073/(13,032-8,416) \times 100 = 66 \%$

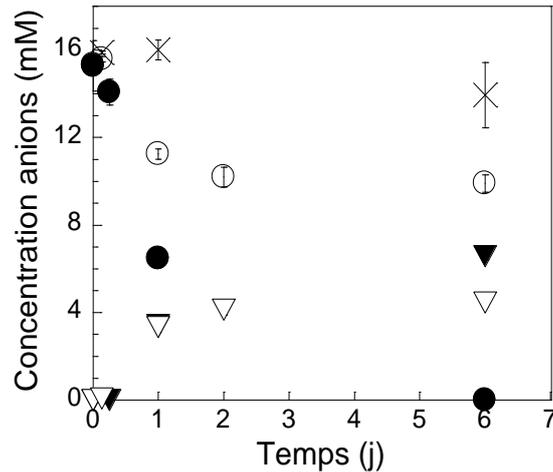


Figure IV-12 : Suivi de la concentration en NO₃⁻ (rond) et NO₂⁻ (triangle inversé) avec et sans coupon (respectivement noir et blanc) et concentration en NO₃⁻ dans le contrôle abiotique (croix). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-nitrate avec ou sans *Shewanella putrefaciens*, (n = 3).

Au 30^e jour d'incubation, la perte de masse du coupon en présence de la bactérie est 1,5 fois plus élevée que pour le contrôle abiotique (Figure IV-13a). La concentration en fer total est différente entre les deux conditions mais le facteur 1,5 n'est pas retrouvé (Figure IV-13a). La concentration en fer libéré est identique quel que soit le temps d'incubation (à 30 jours elle est en moyenne de 7,3 mg cm⁻²) (Figure IV-13b).

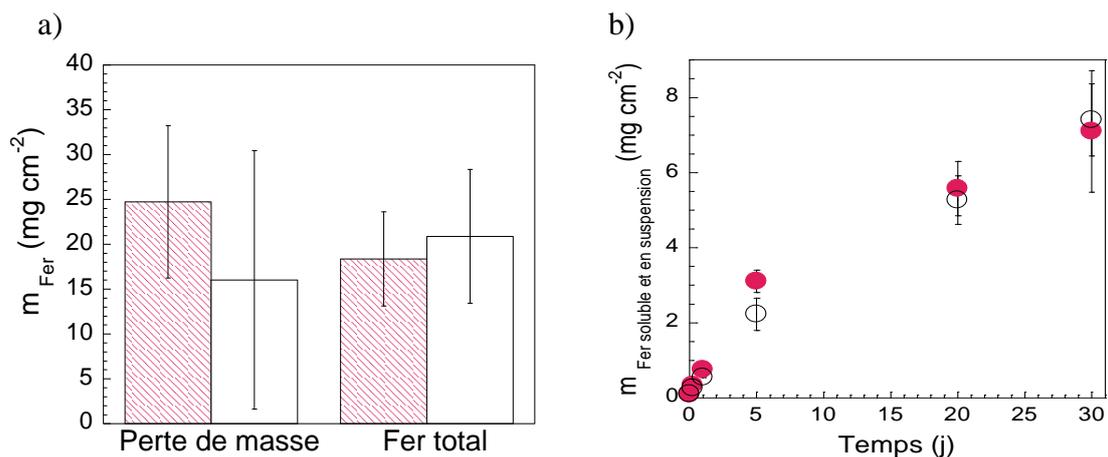


Figure IV-13 : (a) Perte de masse des coupons en fonte et concentration en fer total au 30^e jour d'incubation avec *Shewanella putrefaciens* (hachuré rose) et son contrôle abiotique (blanc) et (b) variation de la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps d'incubation avec *Shewanella putrefaciens* (rond plein) et son contrôle abiotique (rond vide). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-nitrate (n = 3).

Dans le milieu M4-nitrate, la corrosion était attendue car la bactérie a d'abord réduit les nitrates en nitrites puis a consommé le Fe^{III} de la couche native d'oxydes. Le potentiel standard E^{0'} du couple NO₃⁻/NO₂⁻ est de + 0,43 V/(ENH) (Thauer *et al.*, 1977), celui des oxydes de Fe^{III} solides tel que le couple magnétite/Fe^{II} est de - 0,31 V/(ENH) (Iibert et Bonnefoy, 2013). En se basant

sur le potentiel standard du couple acétate-CO₂/lactate qui est de E⁰ - 3,9 V (Gottschalk, 1986), la réaction de réduction des nitrates avec le lactate est plus favorable que celle de la magnétite avec le lactate. Les nitrites ainsi formés peuvent réagir avec le Fe^{II} pour former du Fe^{III}. En effet, la quantité de nitrites retrouvée dans le milieu est inférieure à celle des nitrates mis en solution au jour de l'incubation, signifiant qu'il y a eu une consommation des nitrites. De plus, la réaction des nitrites avec le Fe^{II} est plus probable que la réaction des nitrates avec le Fe^{II} (Hansen *et al.*, 1994), cela va donc dans le sens d'une réaction nitrite/Fe^{II}. Après avoir eu une activité nitrate réductrice et comme il reste théoriquement 7,5 mM de donneur d'électrons (le lactate), la bactérie a alors pu réduire du Fe^{III}. Le Fe^{III} est disponible en quantité importante dans le milieu (il faut savoir que pour consommer 7,5 mM de lactate, il faut 4 fois plus de Fe^{III}, soit 30 mM). Cette réaction contribue à l'accélération de la corrosion de la fonte. Miller *et al.* ont testé l'influence de *S. oneidensis* MR-1 sur la corrosion de l'acier dans un milieu lactate/nitrate. Pour cela deux électrodes en acier ont été séparées dans deux chambres différentes au sein d'une unité électrochimique. Ces conditions expérimentales miment en fait les conditions hétérogènes d'un métal. L'électrode de la chambre 1 a été mis en contact avec la bactérie et le milieu lactate/ nitrate tandis que l'électrode 2 a été mis en contact avec le milieu abiotique. Les nitrites se sont accumulés dans la chambre 1. Il y a eu un transfert d'électrons de la chambre 2 (corrosion de l'acier – anode) à la chambre 1 (réduction des nitrates – cathode). La corrosion a donc été influencée par la production des nitrites par *S. oneidensis*. La perte de masse des coupons a mis en évidence une corrosion uniforme (Miller *et al.*, 2018). Ces résultats sont similaires aux nôtres, *Shewanella* induit une corrosion de la fonte dans les conditions lactate/nitrate.

IV-1.1.5. Effet de Shewanella putrefaciens sur la corrosion de la fonte

En considérant les résultats des tests abiotiques correspondants, nous avons observé que le contrôle abiotique M4-nitrate entraîne une corrosion plus importante que le contrôle M4-fumarate (perte de masse de 3 mg cm⁻² pour M4-fumarate contre 12 mg cm⁻² pour M4-nitrate). En soustrayant la contribution des milieux de cultures, on retrouve une perte de masse en présence de *S. putrefaciens* de 19 mg cm⁻² dans le milieu M4-fumarate et de 13 mg cm⁻² dans le M4-nitrate. L'effet de *S. putrefaciens* sur la corrosion de la fonte apparait plus important dans le milieu M4-fumarate que dans le milieu M4-nitrate.

L'influence de *S. putrefaciens* semble différente dans le cas des aciers. Un effet de limitation de *Shewanella* sur la corrosion de l'acier 1018 a été mis en évidence dans des conditions

aérobies avec pour seul accepteur d'électrons le fer ferrique (Dubiel *et al.*, 2002). Les bactéries colonisent l'acier et consomment localement l'oxygène. Lorsque l'oxygène est épuisé, la bactérie réduit le Fe^{III} de l'acier en Fe^{II}. Le fer ferreux ainsi produit est re-oxydé en Fe^{III} par l'oxygène restant dans le milieu. Le Fe^{III} peut alors à nouveau être réduit par la bactérie, diminuant peu à peu la concentration d'oxygène du milieu et limitant ainsi la corrosion. Cette étude s'est donc basée sur la réaction cathodique qui dès lors que l'oxygène est consommé, ne peut plus avoir lieu et mène alors à une limitation. L'étude s'est déroulée pendant seulement 6 jours. Or, après avoir consommé l'oxygène, la souche continue de réduire le Fe^{III} en Fe^{II} en utilisant le lactate du milieu (le milieu utilisé est le LML medium et contient 20 mM de lactate). Si l'expérience avait été menée sur de plus long temps, ces réactions entraîneraient certainement la modification des oxydes de surface et mèneraient à une augmentation du taux de corrosion. Un autre effet protecteur a aussi été mis en évidence à l'échelle du laboratoire en simulant un environnement marin. Lors de la formation du biofilm sur l'acier, des EPS sont produits par les bactéries. Ces EPS entraînent une réelle cohésion entre les bactéries, l'acier et les produits de corrosion et entrave la dissolution des produits de corrosion Fe^{III}. Cela mène alors à un effet protecteur sur le matériau acier (Herrera et Videla, 2009).

Dans le cas de la fonte et dans nos conditions expérimentales, ce phénomène d'inhibition de la corrosion par le biofilm n'a pas été observé.

IV-1.2. Corrosion de la fonte influencée par *Desulfovibrio desulfuricans*, une bactérie sulfato réductrice

D. desulfuricans génère du sulfure (S²⁻) par la réduction du sulfate. Ce composé est connu pour affecter les réactions anodiques mais aussi cathodiques dans le cas de la corrosion d'un acier (Zheng *et al.*, 2014). Les propositions de mécanismes de la biocorrosion ont été évoqués au Chapitre I (cf. § I-4.1.2.3.).

IV-1.2.1. Corrosion par *Desulfovibrio desulfuricans* dans le milieu M4-sulfate

La croissance de *D. desulfuricans* a été suivie en présence ou en absence de coupon en fonte (Figure IV-14). Dans les deux cas, la croissance est relativement lente dans le milieu de culture considéré ; la phase stationnaire est atteinte au bout de trois jours ou plus (Figure IV-14). Avec le coupon, la croissance augmente d'un logarithme après 4 jours d'incubation, i.e. de $1,9 \times 10^8$ à $1,9 \times 10^9$ cellules mL⁻¹ (Figure IV-14). Cette mesure est peut-être sous-estimée car le comptage en microscopie optique sous épifluorescence est rendu difficile par la présence de

précipités de FeS qui masquent les corps bactériens (Figure IV-15). Sans coupon, la densité bactérienne n'augmente que d'un facteur 4 ($1,9 \times 10^8$ à $6,9 \times 10^8$ cellules mL^{-1} en trois jours) et est donc 2,5 fois plus faible (Figure IV-15). La concentration en SO_4^{2-} diminue bien dans les deux cas. Avec un coupon, 34 % du sulfate est consommé (soit 7,5 mM de sulfate apparemment réduits, i.e. de 20,6 mM au jour 0 à $13,5 \pm 1,4$ mM au jour 3). En absence de coupon, la consommation de sulfate est également partielle et est égale à 39 %, soit 8 mM de sulfate réduit, i.e. de 20,5 mM au jour 0 à $12,5 \pm 0,2$ mM au jour 3. Ces valeurs sont cohérentes avec la stœchiométrie de la réaction de réduction des sulfates par le lactate présent à raison de 15 mM, le sulfate étant en excès (22 mM) (1 mole de sulfate pour 2 moles de lactate ; cf. Équation 17).

La croissance, plus importante en présence d'un coupon de fonte, pourrait s'expliquer par l'effet toxique des sulfures lorsqu'ils s'accumulent dans un milieu. Ainsi, une concentration de 15 mM de sulfures entraîne chez *D. desulfuricans* une diminution de moitié du rendement cellulaire et de la vitesse spécifique de croissance (Okabe *et al.*, 1995). En présence d'un coupon, les sulfures pourraient précipiter avec le Fe^{II} issu de la réduction abiotique du Fe^{III} présent dans la couche native d'oxydes du coupon, réduisant ainsi la concentration de sulfures toxiques dans le milieu de culture de nos essais.

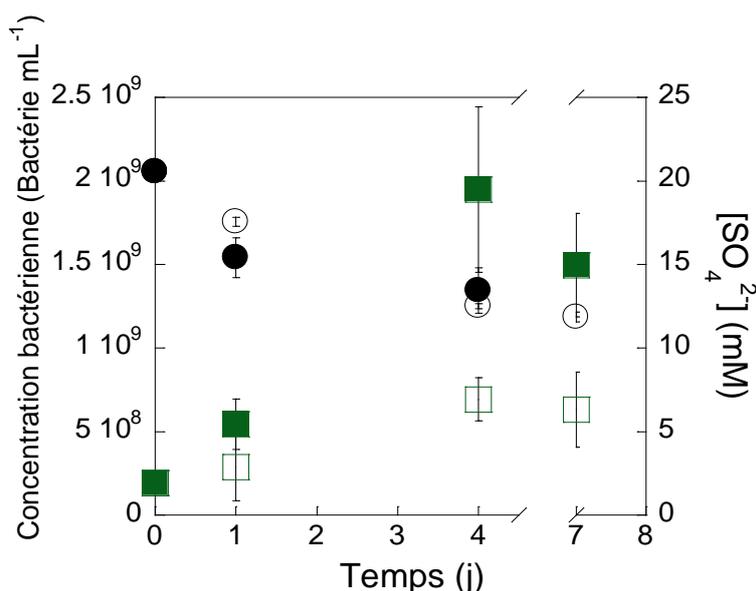


Figure IV-14 : Variation du nombre de cellules de *Desulfovibrio desulfuricans* (carré) et de la concentration en sulfate (rond) en fonction du temps d'incubation avec (symbole plein) ou sans coupon en fonte (symbole vide), à 30 °C dans le milieu M4-sulfate, (n = 3).

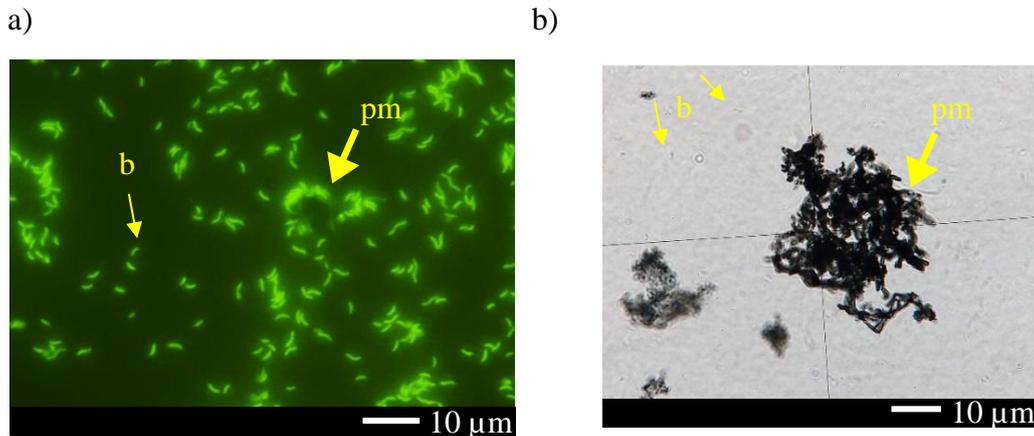


Figure IV-15 : Observations en microscopie optique ($\times 1000$) d'une suspension de *Desulfovibrio desulfuricans* (a) marquée au SYBR green (observation sous épifluorescence) et (b) à l'état frais après 2 jours d'incubation dans le milieu M4-sulfate avec coupon.

b = bactéries incurvées typique du genre ; pm = phase minérale.

Au cours de l'incubation en présence d'un coupon, aucune différence significative des indicateurs de corrosion n'a été détectée entre *D. desulfuricans* et le contrôle abiotique (Figure IV-2). Par ailleurs, il a été observé que la concentration en fer libéré diminue légèrement après 15 jours d'incubation. Cela peut traduire une précipitation en surface des espèces du fer détachées du coupon au cours de l'incubation. Et effectivement, visuellement, le milieu s'est assombri au cours du temps d'incubation, des particules noires en suspension ont clairement été visibles et la surface du coupon test a été noircie (Figure IV-16a et a'). A l'ouverture des flacons, une odeur d'œuf pourri s'est dégagée, caractéristique de la présence de sulfure sous forme d' H_2S . Quant au milieu et au coupon du contrôle abiotique, ils ne changent pas de couleur au cours de l'incubation (Figure IV-16b et b'). Donc, si l'estimation de la corrosion n'est significativement pas différente entre le contrôle abiotique et le test avec *D. desulfuricans* selon les indicateurs utilisés (perte de masse et quantité de fer total), visuellement il apparaît que des phénomènes différents se produisent entre les deux conditions suggérant un phénomène de MIC.

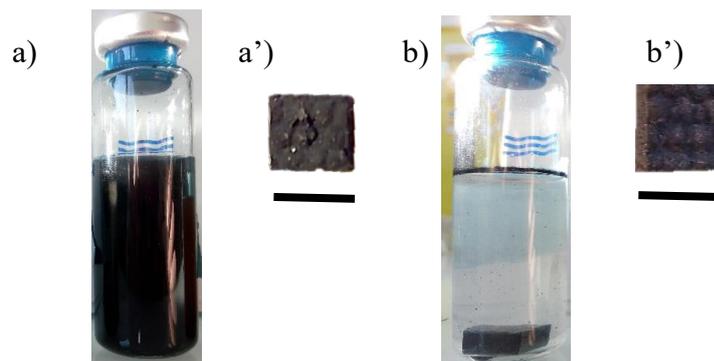


Figure IV-16 : Aspects des suspensions et des coupons au 30^e jour d'incubation dans le milieu M4-sulfate (a - a') avec *Desulfovibrio desulfuricans* et (b - b') sans bactéries. La barre représente 1 cm.

En MEB, des objets apparentés à des cellules bactériennes en forme de virgule de 1,5 μm de long sont visibles et en cohérence avec les caractéristiques du genre *Desulfovibrio* (Figure IV-17). Des micro-puits d'environ 2 μm de large sont observés (Figure IV-17c). Certains semblent avoir la même forme que les bactéries et se retrouveraient au même emplacement, un peu comme une empreinte, ce qui suggère que ces puits se formeraient à proximité des bactéries sous l'effet direct de leur métabolisme et formeraient potentiellement des piqûres de corrosion. À l'aide de la technique de microscopie à force atomique (AFM), Sheng *et al.* ont également observé ce phénomène sur l'acier (Sheng *et al.*, 2007). Cela serait dû à la production de sulfure d'hydrogène et aux produits métaboliques des SRB qui influencent directement le microenvironnement local de la surface. Sur le coupon témoin, aucun puits n'a été retrouvé.

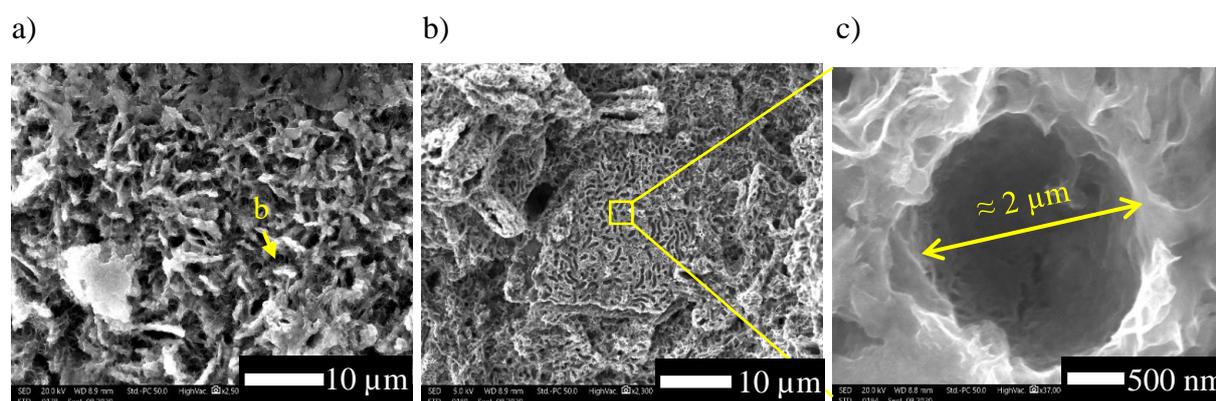


Figure IV-17 : Images en microscopie électronique à balayage de la surface d'un coupon à 30 jours d'incubation avec *Desulfovibrio desulfuricans* en milieu M4-sulfate à 30 °C ; (a) et (b) à deux endroits différents.

b = objet ayant l'apparence d'une cellule bactérienne et (c) zoom sur un micro-puits.

La spectroscopie Raman a révélé la présence d'un film de sulfure de fer ($\text{Fe}^{\text{II}}_x\text{S}_y$) (Figure IV-18b). Deux types de spectres ressortent et correspondent à la mackinawite Fe_{1+x}S . Le premier présente trois pics majoritaires à 208, 256 et 298 cm^{-1} et un minoritaire à 223 cm^{-1} qui correspond à S° . Il se situe où le coupon est le plus noir. Le second type présente deux pics à 208 et 282 cm^{-1} . Le nombre de pics est en fait lié au processus de cristallisation (Bourdoiseau *et al.*, 2008). Le spectre à 3 pics est caractéristique de la mackinawite cristalline. Le spectre à 2 pics est caractéristique de la mackinawite nanocristalline, auparavant décrite comme « amorphe » ou « désordonnée » (Bourdoiseau *et al.*, 2008). L'absence de mackinawite cristalline peut être liée à un blocage du processus de cristallisation. La cause peut être un excès de sulfure. La mackinawite nanocristalline, est en général obtenue avec un ratio $\text{Fe}^{\text{II}} / \text{S}^{\text{II}}$ de 0,5. Le sulfure alors en excès, peut être adsorbé empêchant alors le processus de cristallisation de se poursuivre (Bourdoiseau *et al.*, 2008).

Sur le coupon du contrôle abiotique (sans bactérie), la maghémite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) et l'hématite ($\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$) ont été détectés mais pas la mackinawite (Figure IV-18d), ce qui indique que la mackinawite est bien liée à la présence de *D. desulfuricans*.

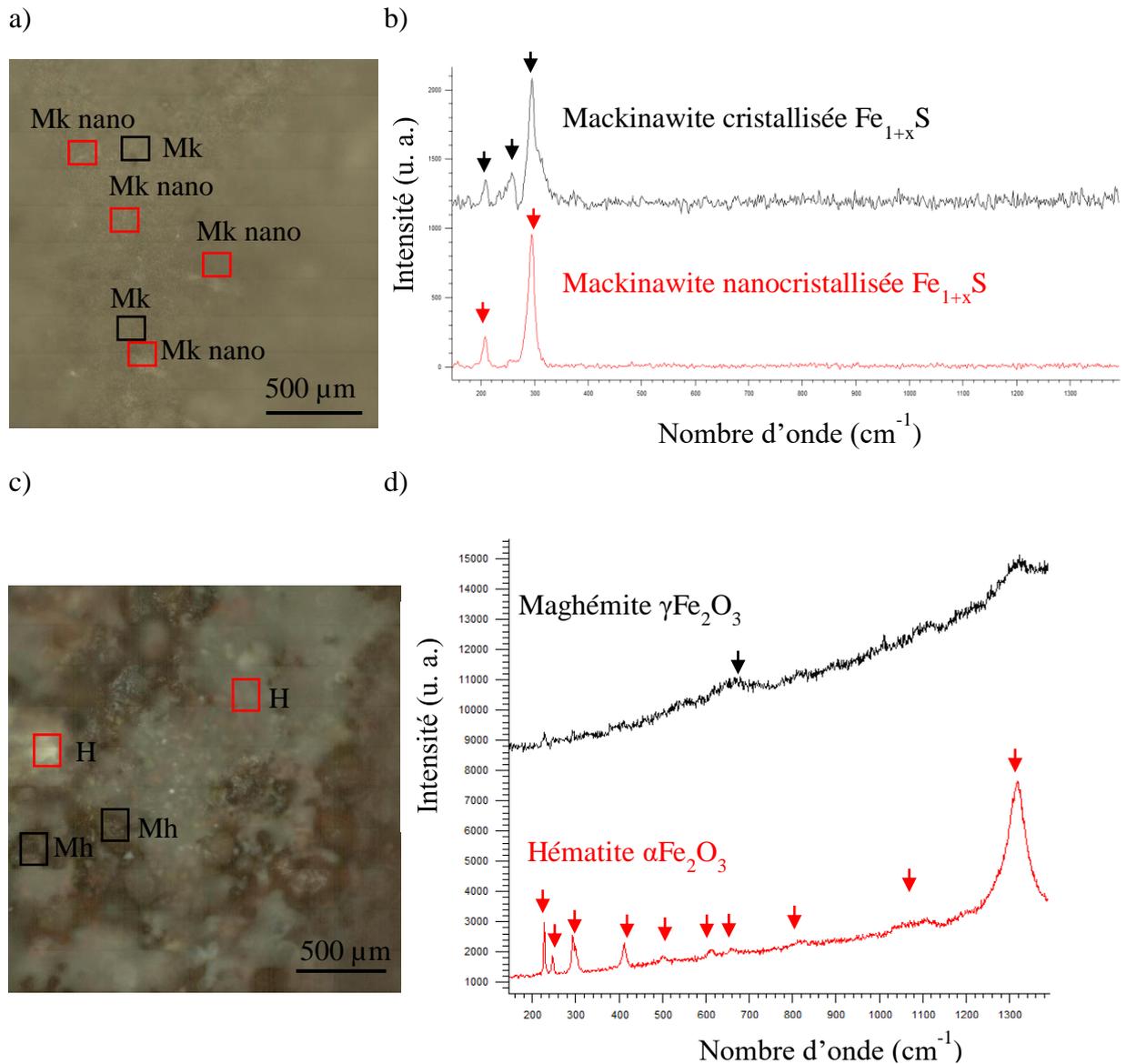


Figure IV-18 : (a) et (c) Surfaces des coupons en fonte brute balayées par spectroscopie Raman et (b) et (d) spectres correspondants enregistrés après 30 jours dans le milieu M4-sulfate avec *Desulfovibrio desulfuricans* (a - b) et sans bactéries (c - d).

Mk = mackinawite cristalline, Mk nano = mackinawite nanocristalline, Mh = maghémite et H = hématite.

La DRX révèle la présence d'hématite ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$) et de magnétite ($\text{Fe}^{\text{III,II}}_3\text{O}_4$) qui proviennent de toute évidence de la couche native d'oxydes et du Fe^0 qui provient de la fonte elle-même (Figure IV-19). La DRX confirme la présence de mackinawite Fe_{1+x}S . Il y a aussi détection de rouille verte 1 carbonatée $\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{CO}_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ qui n'avait pas été retrouvée en spectroscopie

Raman. Cela peut s'expliquer du fait que la DRX permet d'obtenir une analyse globale de la surface du coupon et non pas d'une surface localisée comme en spectroscopie Raman. La RV carbonatée a déjà été mise en évidence dans la corrosion de canalisation en fonte (face interne en contact avec l'eau) en réseau d'eau destinée à la consommation humaine (Sarin *et al.*, 2003 ; Swietlik *et al.*, 2011). Sa présence prouve donc qu'il y a bien eu un phénomène de corrosion. Le Fe^{II} provenant de la réduction abiotique du Fe^{III} qui coprécipite avec des espèces Fe^{III} (Refait *et al.*, 2003).

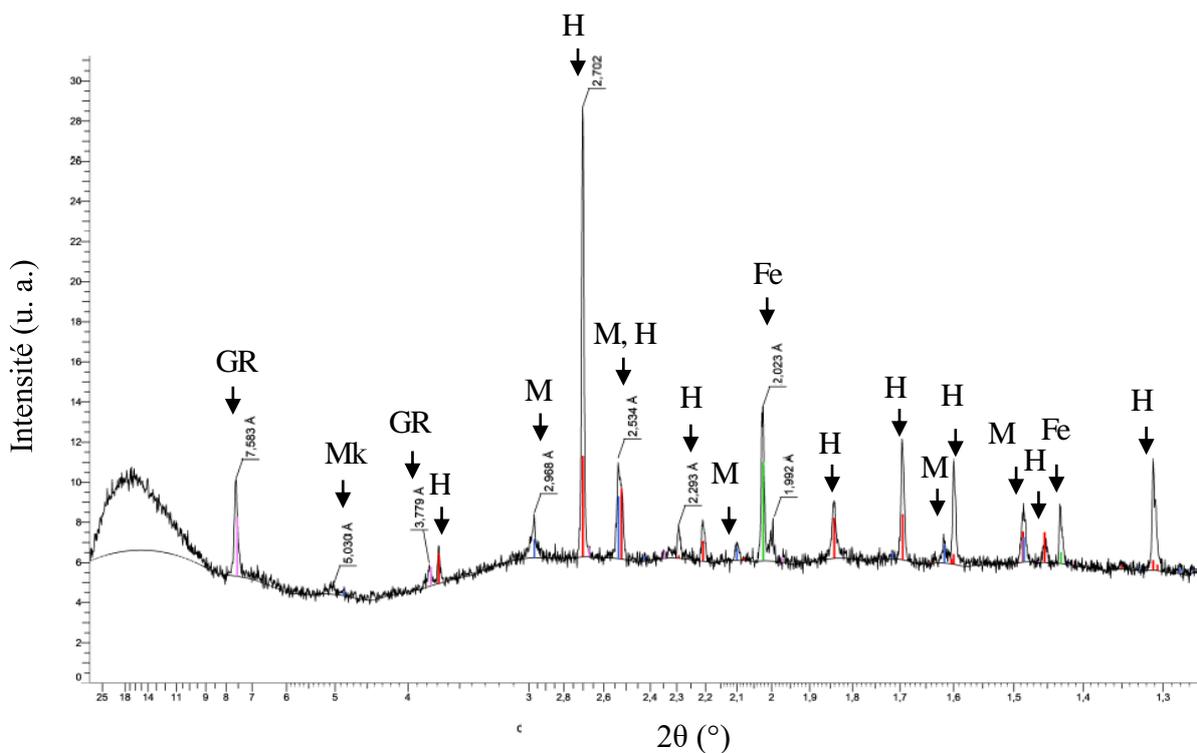


Figure IV-19 : Spectre de diffraction des rayons X d'un coupon en fonte brute incubé avec *Desulfovibrio desulfuricans* après 30 jours à 30 °C dans le milieu M4-sulfate.

GR= rouille verte, Mk = mackinawite, H = hématite, M = magnétite et Fe = Fe^0 .

IV-1.2.2. Effet des sulfures biogénérés par *Desulfovibrio desulfuricans* (surnageant d'une culture stérile) sur la corrosion de la fonte

Afin de déterminer si la biocorrosion observée au cours de la culture de *D. desulfuricans* était due à la bactérie elle-même ou aux métabolites et autres espèces chimiques retrouvées dans la culture (notamment les sulfures), *D. desulfuricans* a été incubée pendant une semaine dans le milieu M4-sulfate et a ensuite été stérilisée. C'est après une semaine que *D. desulfuricans* a consommé la totalité du donneur d'électrons, le lactate, et a donc réduit environ 7 mM de sulfates en sulfure. Un coupon en fonte (stérile) a alors été mis en contact avec le surnageant

stérilisé de cette culture et la corrosion a été suivie et comparée aux essais avec *D. desulfuricans* (culture « classique ») ou au contrôle abiotique dans le milieu de culture vierge.

Au 15^e jour d'incubation, les indicateurs de corrosion ne montrent pas de différences significatives entre les différents essais, exceptés pour le fer libéré. La concentration est significativement plus faible pour les essais avec le surnageant stérile que pour les essais avec *D. desulfuricans* ou le contrôle abiotique : $0,21 \pm 0,06 \text{ mg cm}^{-2}$ et $0,17 \pm 0,04 \text{ mg cm}^{-2}$ au jour 15 respectivement pour la culture avec *D. desulfuricans* et le contrôle abiotique ; contre $0,05 \pm 0,01 \text{ mg cm}^{-2}$ pour l'incubation avec le surnageant stérile (Figure IV-20c).

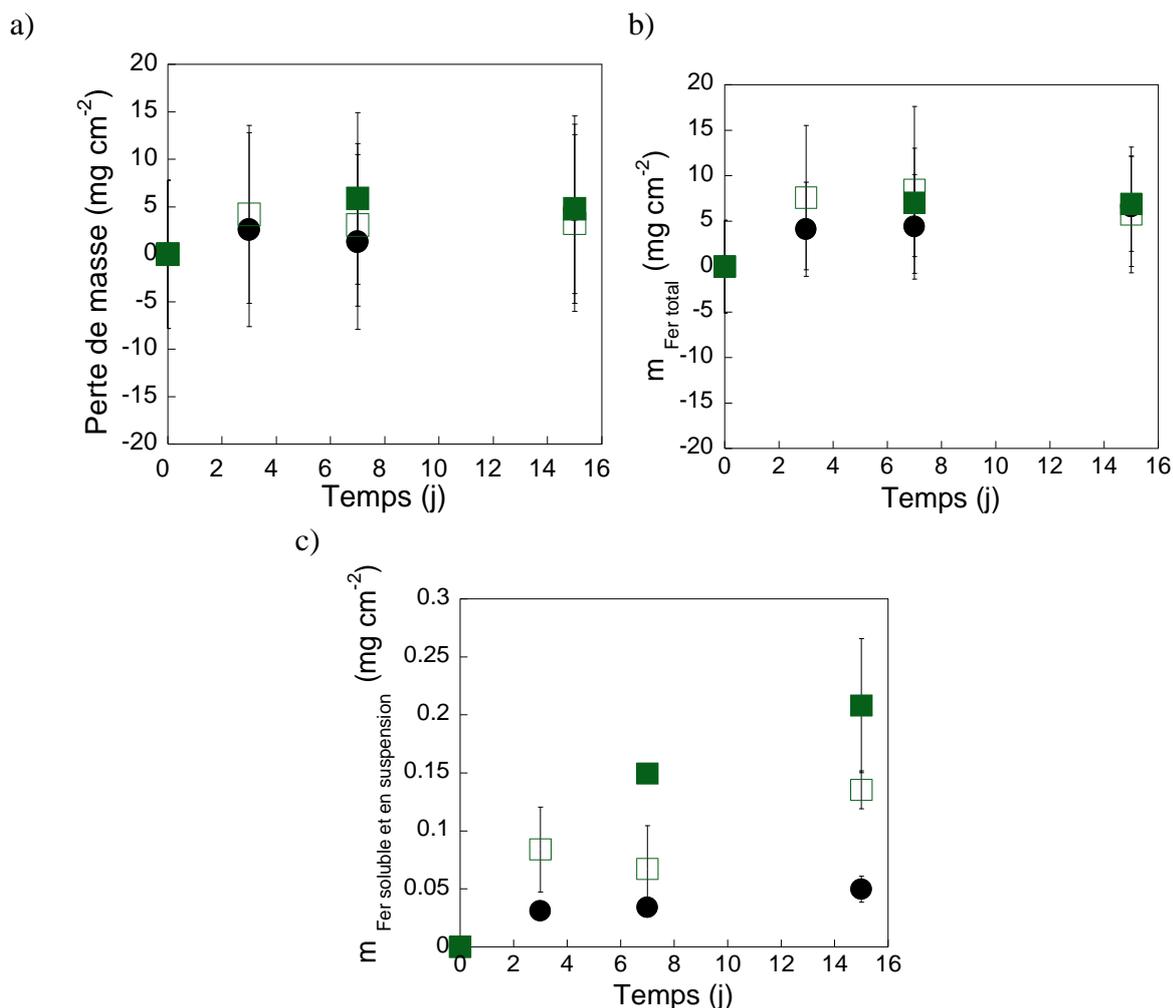


Figure IV-20 : Variation de (a) la perte de masse des coupons en fonte, (b) la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps d'incubation dans le milieu M4-sulfate avec un surnageant stérilisé d'une semaine de culture de *Desulfovibrio desulfuricans* (rond) ou *Desulfovibrio desulfuricans* (carré plein). Le contrôle abiotique (carré vide) correspond au milieu M4-sulfate stérile. Les incubations ont été réalisées à 30 °C dans le milieu M4-sulfate (n = 3).

Visuellement, au 30^e jour d'incubation, il est noté que le milieu avec le surnageant stérile et le coupon est devenu sombre avec des précipités noirs en suspension ou sous forme de pellicule

recouvrant le coupon, typique de la réduction des sulfates en sulfures qui donnent des précipités de FeS (Figure IV-21). Les sulfures biogénérés par *D. desulfuricans* ont donc vraisemblablement réagi avec le Fe^{II} du coupon même s'il n'y a pas de corrosion apparente. L'odeur caractéristique d'œuf pourri accompagnant le surnageant de culture traduit bien la présence de sulfure.

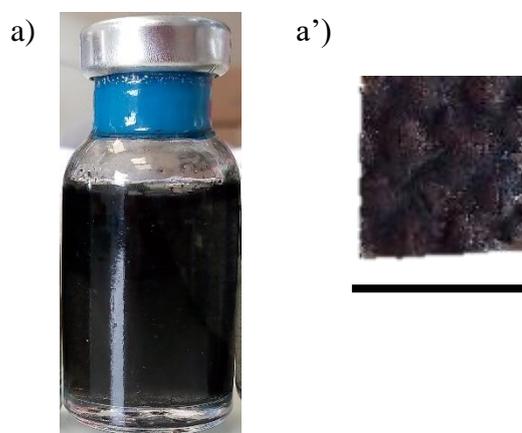


Figure IV-21 : (a) Aspect de la suspension et (a') d'un coupon au 30^e jour d'incubation avec le surnageant stérilisé de *Desulfovibrio desulfuricans* à 30 jours. La barre représente 1 cm.

Dans le surnageant stérilisé de *D. desulfuricans*, en MEB, aucune piqûre apparente n'a été observée, ni aucune différence avec la surface des coupons sains (Figure IV-22) contrairement aux essais avec la culture de *D. desulfuricans* (Figure IV-17).

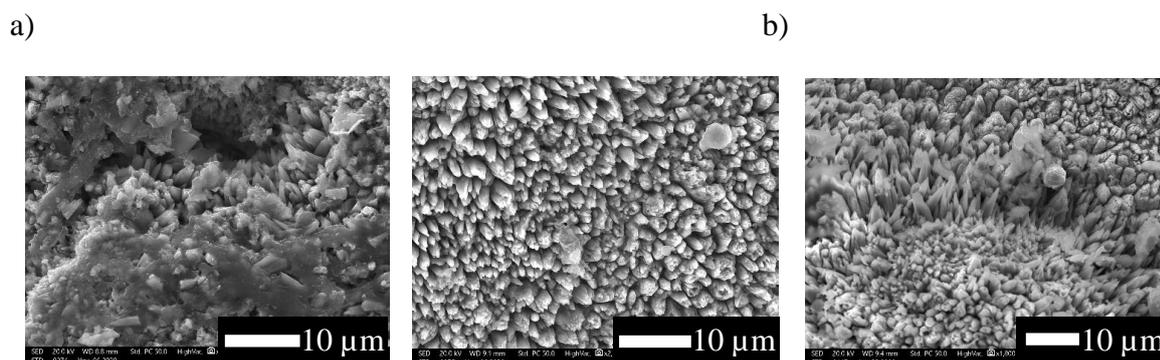


Figure IV-22 : Images en microscopie électronique à balayage de la surface (a) d'un coupon en fonte incubé avec le sulfure biogénéré par *Desulfovibrio desulfuricans* pendant 30 jours et (b) d'un coupon sain.

Cet essai confirme que les sulfures biogénérés par *D. desulfuricans* sont vraisemblablement responsables de la production de FeS mais qu'ils ne semblent pas provoquer de piqûres contrairement à l'essai en présence des bactéries.

IV-1.2.3. Corrosion par *Desulfovibrio desulfuricans* tuée par la chaleur dans le milieu M4-sulfate

Afin d'évaluer l'impact des composés chimiques constituants et/ou accompagnants les corps bactériens sur la corrosion de la fonte, une suspension de *Desulfovibrio desulfuricans* inactivée par la chaleur (autoclave de 15 min à 121 °C) a été incubée avec les coupons en fonte. Les indicateurs de la corrosion restent constants au cours du temps et ne montrent pas de différences significatives (Figure IV-23). La quantité de fer libéré diminue de moitié au cours du temps pour le test avec les bactéries « mortes », au jour 1 elle est de $0,51 \pm 0,07 \text{ mg cm}^{-2}$ et passe à $0,27 \pm 0,05 \text{ mg cm}^{-2}$ au jour 30 (Figure IV-23c). Des oxydes de fer ont certainement précipité à la surface des coupons ou sont devenus insolubles dans HCl 5 M. Au contraire, pour le contrôle abiotique le fer libéré est presque quatre fois plus élevé au bout de 30 jours ($0,05 \pm 0,01 \text{ mg cm}^{-2}$ au jour 1 et $0,19 \pm 0,06 \text{ mg cm}^{-2}$ au jour 30, Figure IV-23c). Pour s'assurer qu'il n'y a plus d'activité microbienne dans le test avec les bactéries « mortes », la quantité de sulfate a été vérifiée. Elle ne varie pas significativement et reste à environ $25 \pm 3 \text{ mM}$ au cours du temps (données non montrées).

La surface des coupons, analysée en spectroscopie Raman, indique la présence de deux oxydes : la maghémite ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$) et une rouille verte ($\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12} \text{X}_x \cdot n \text{H}_2\text{O}$) et également du phosphate (bande à 1000 cm^{-1} ; Figure IV-24). Comparé au contrôle abiotique, les oxydes sont bien différents (Figure IV-18). La présence de RV indique qu'il y a bien eu un phénomène de corrosion du fait du Fe^{II} qu'elles contiennent en majorité.

Les corps bactériens de *D. desulfuricans* ont eu un impact sur la corrosion de la fonte puisqu'ils ont changé la minéralogie des coupons en fonte.

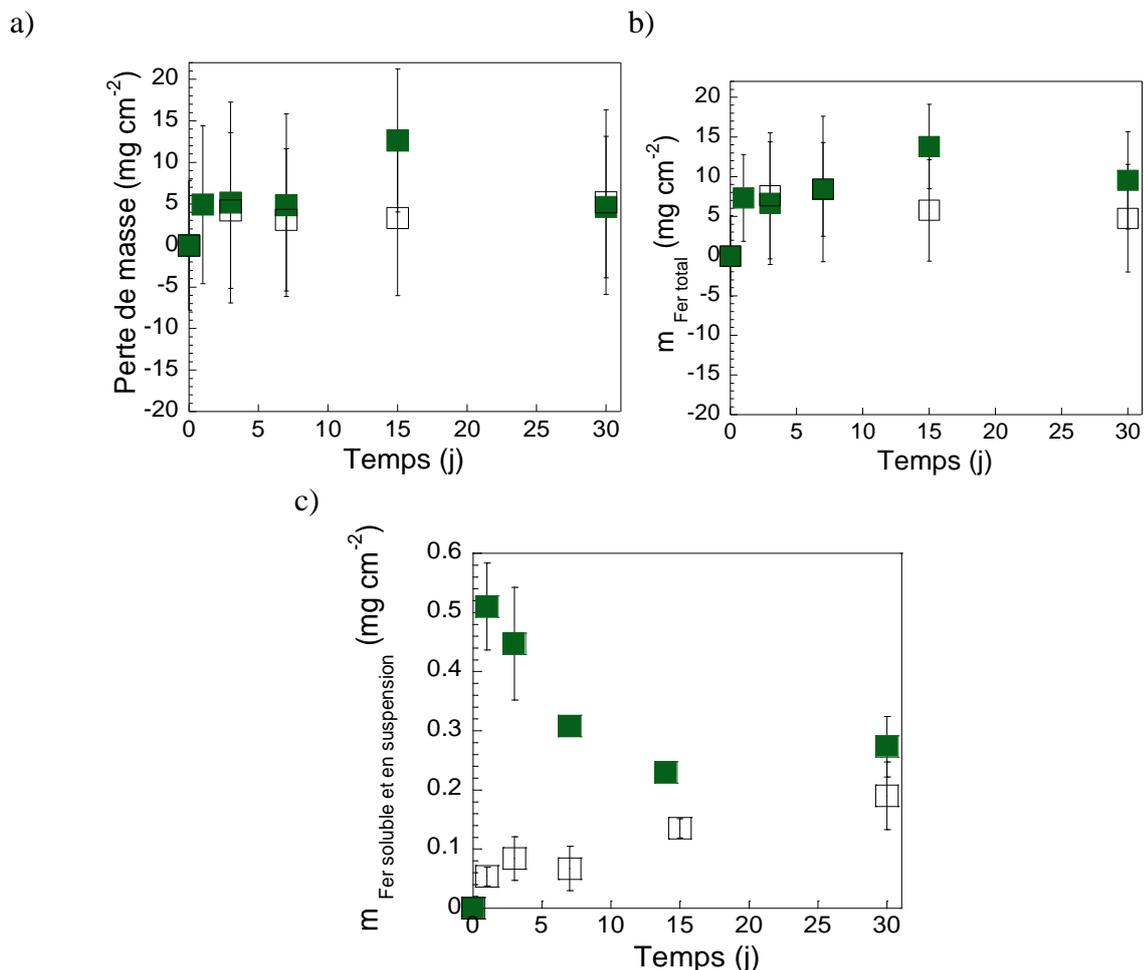


Figure IV-23 : Variation de (a) la perte de masse des coupons en fonte, (b) la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps d'incubation avec *Desulfovibrio desulfuricans* tuée par la chaleur (carré plein) et de son contrôle sans bactéries (carré vide). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-sulfate, ($n = 3$).

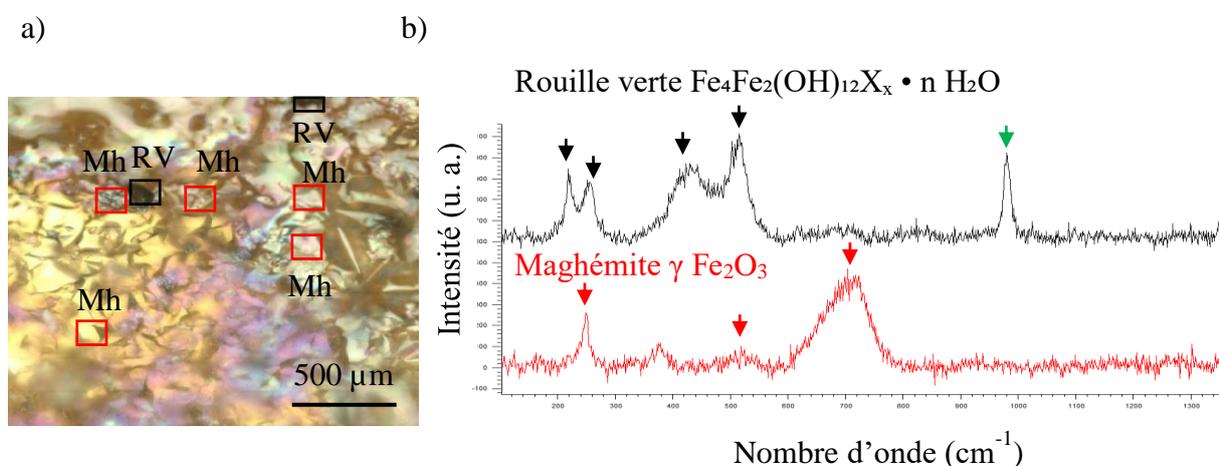


Figure IV-24 : (a) Surface d'un coupon en fonte brute balayée par spectroscopie Raman et (b) spectres correspondants enregistrés après 30 jours dans le milieu M4-sulfate avec *Desulfovibrio desulfuricans* tuée par la chaleur.

RV = rouille verte et Mh = maghémite.

IV-1.2.4. Effet de *Desulfovibrio desulfuricans* sur la corrosion de la fonte

Pour résumer, trois incubations différentes en présence d'un coupon en fonte ont été menées : i) avec la souche bactérienne active ; ii) avec le surnageant stérile ayant contenu la souche active et enfin iii) avec la souche bactérienne inactivée.

Nos analyses ont montré que notre approche quantitative (i.e. approche gravimétrique et dosage du fer total extractible par HCl) ne permet pas de mettre en lumière une accélération de la corrosion par la souche SRB. Ce résultat était inattendu puisqu'il est généralement bien documenté que les sulfures (S^{2-}) augmentent la corrosion du fer (King *et al.*, 1973). Cependant, contrairement au contrôle abiotique, avec la bactérie ou avec le surnageant (i.e. sulfures biogénérés), un film de sulfure de fer a été formé sur le coupon en fonte. Les ions sulfure, S^{2-} , ont donc bien réagi avec le fer ferreux formant un sulfure ferreux Fe_xS_y . Il a été rapporté dans la littérature la possibilité que ce film de sulfure de fer tel que la mackinawite ait un effet protecteur sur des coupons d'acier (Singer *et al.*, 2011). La mackinawite est une substance ferromagnétique qui est composée de grains de petites tailles ce qui lui confère une structure très compacte. C'est cette compaction qui lui procurerait cet effet protecteur sur l'acier et qui empêche certainement la mise en place d'une corrosion homogène (Hamilton, 2003 ; Singer *et al.*, 2011).

En revanche, nos analyses en MEB mettent en évidence, dans le cas de l'incubation avec la bactérie, la présence de trous pour certains ayant adopté une forme de virgule, caractéristique de la morphologie de *D. desulfuricans*. Il semblerait que les « piqûres » se forment à l'endroit même où devait se tenir une bactérie, entraînant alors une corrosion localisée. En effet, une seule rupture du film de FeS peut provoquer une corrosion par piqûre rapide et fulgurante (Enning et Garrelfs, 2014). En revanche, les coupons mis en présence du sulfure biogénéré par *D. desulfuricans* ne montrent aucune « piqûre ». La concentration en sulfure de la solution dans laquelle baignent les coupons semble donc ne pas être le seul facteur responsable des piqûres mais par ailleurs la présence de bactérie SRB semble bien être impliquée dans la corrosion, cela provoque alors une augmentation de la concentration en fer libéré. Le sulfure, qui provient de la bioréduction du sulfate, diffuse alors de la cellule bactérienne et il est probable, qu'à l'échelle d'une cellule, il atteigne localement des concentrations suffisamment élevées pour provoquer des piqûres par dissolution réductives du Fe^{III} . Il a été rapporté dans de nombreuses études que les SRB peuvent déclencher ce type de corrosion localisée (Feio *et al.*, 2000 ; Hamilton 2003 ; Cole *et al.*, 2011 ; Stipanicev *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2014 ; Javed *et al.*, 2015 ; Dec *et al.*,

2017 ; Loto *et al.*, 2017). De plus, les bactéries présentes en surface sont susceptibles de produire des EPS, dont certaines pourraient être acides et accentuer l'effet corrosif (Beech et Gaylarde, 1991), mais qui pourraient aussi limiter la diffusion des sulfures vers le « bulk aqueux » et contribuer ainsi à une concentration élevée dans l'environnement locale des bactéries accentuant la piqûration. Ces concentrations locales, aussi bien en sulfures qu'en acide ou autres métabolites, pourraient, de plus, ne pas être favorables à la précipitation d'un film FeS protecteur et/ou conduirait à la formation d'autres espèces FeS que celles observées lorsque les sulfures sont ajoutés dans le milieu. En effet, Newman *et al.* ont testé différentes concentrations en sulfures et ont conclu, grâce à des mesures électrochimiques, que le film de FeS se forme lorsque, à la surface du métal, la concentration en sulfure est supérieure à celle des ions dissous de fer ferreux (Newman *et al.*, 1992). Autrement dit, lorsque le rapport $\text{Fe}^{\text{II}} / \text{S}^{-\text{II}}$ est inférieur à 1, FeS devient alors protecteur. Or nos analyses en spectroscopie Raman ont montré la présence de mackinawite nano cristalline et de mackinawite cristallisée, ce qui signifie que le rapport $\text{Fe}^{\text{II}} / \text{S}^{-\text{II}}$ est tantôt supérieur à 1, tantôt inférieur. Le film de FeS en présence de *D. desulfuricans* n'est donc pas systématiquement protecteur. En absence de bactéries, le sulfure est au contraire dilué dans le milieu, il est réparti de façon homogène. C'est pour cela que pour une quantité de sulfures similaire, les observations en MEB sont bien différentes entre le contrôle sulfures biogénérés et le test avec les bactéries. Des tests avec des concentrations en sulfures croissantes aurait permis de valider que les sulfures jouent bien un rôle majeur dans la formation des piqûres de corrosion.

Avec *D. desulfuricans*, en plus du film de FeS, la rouille verte carbonatée a été retrouvée. La présence de RV était inattendue puisque ce minéral est métastable (Refait *et al.*, 2003). Sa présence est cependant assez bien documentée dans les produits de corrosion de matériaux en fer en présence de bactéries sulfato réductrices, aussi bien en milieu marin où il s'agit principalement de rouille verte 2 sulfatée (Olowe *et al.*, 1989 ; Olowe *et al.*, 1992 ; Refait *et al.*, 2003) ; que dans les eaux douces comme l'eau du réseau d'adduction publique. L'implication des bactéries dans leur formation reste tout de même discutable car leur présence n'est pas systématiquement associée aux bactéries même si leur formation est décrite au cours des cultures de bactéries ferriréductrices (Ona-Nguema *et al.*, 2002). Il a d'ailleurs été montré avec la bactérie *S. putrefaciens* en présence de lépidocrocite, la formation de RV carbonatée (Zegewe *et al.*, 2010) préférentiellement à d'autres oxydes. Il semblerait que la présence de corps bactériens et de polymères organiques stabiliserait les cristaux de rouilles vertes, empêchant alors la transformation en oxydes de fer (Jorand *et al.*, 2013). Avec les bactéries tuées à la

chaleur, la majorité des oxydes correspondent à la RV carbonatée. Cela conforte donc l'idée de la stabilisation de la RV par les polymères bactériens.

Pour conclure, la bactérie sulfatoréductrice a vraisemblablement un impact sur la corrosion de la fonte et semble provoquer une corrosion par piqûre. Ce type de corrosion est très destructeur (e.g. perforation).

IV-1.3. Corrosion de la fonte influencée par *Klebsiella mobilis*, une bactérie nitrate réductrice

K. mobilis est organotrophe et n'est donc pas capable d'obtenir de l'énergie en couplant l'oxydation du fer à la réduction du nitrate (Cruz-García *et al.*, 2007). Cette bactérie est par contre capable de générer du nitrite en couplant la réduction du nitrate à l'oxydation de composés organiques comme le lactate ou le formiate (Etique et Jorand, 2015). Le nitrite étant plus réactif que le nitrate, il peut réagir avec les espèces Fe^{II} selon l'Équation 23 ou encore avec les espèces de Fe⁰ selon l'Équation 24 :



La couche native de la fonte brute de nos échantillons est composée, entre autres, d'oxydes de Fe^{II} (i.e. magnétite qui est un mélange Fe^{II} Fe^{III}). L'hypothèse réactionnelle de la corrosion impliquant *K. mobilis* est donc ici reliée à la capacité des nitrites biogénérés à déstabiliser la couche native d'oxydes par oxydation du Fe^{II}. Il n'est pas à exclure aussi une réaction abiotique entre les nitrites et le Fe⁰ de la fonte qui aurait été mis à découvert par des réactions purement abiotiques.

IV-1.3.1. Corrosion par *Klebsiella mobilis* dans le milieu M4-nitrate

La croissance de *K. mobilis* a été suivie dans le milieu M4-nitrate en présence ou absence d'un coupon en fonte (Figure IV-25). Le nombre de cellules planctoniques augmente de manière similaire, avec une croissance de plus d'un logarithme après 1 jour d'incubation (i.e. de $(1,1 \pm 0,7) \times 10^8$ à $(1,1 \pm 0,2) \times 10^9$ avec coupon et de $(1,0 \pm 0,1) \times 10^8$ à $(1,4 \pm 0,2) \times 10^9$ sans coupon). En parallèle, sans coupon, la consommation de nitrate est pratiquement totale, i.e. de $28,6 \pm 0,1$ mM à $0,2 \pm 0,1$ mM et 69 % de NO₃⁻ sont réduits en NO₂⁻ après 72 h (i.e. production de $24,4 \pm 0,3$ mM de NO₂⁻). Lorsqu'un coupon de fonte est présent, la consommation de NO₃⁻ est également importante mais aussi plus rapide. La concentration passe de $25,1 \pm 1,7$ mM à

$3,0 \pm 3,2$ mM après seulement 24 h. D'après la stœchiométrie de la réaction de réduction des nitrates par le lactate, 1 mole de lactate réagit avec 2 moles de nitrates (Équation 19), dans nos expériences nous avons 12 mM de lactate, ce qui doit conduire à 24 mM de NO_3^- consommé, il était donc attendu d'avoir une réduction totale des nitrates. Nous expliquons donc bien ici le fait de la disparition totale des ions nitrate. En présence d'un coupon, l'analyse de la solution révèle la présence de $6,0 \pm 0,1$ mM de NO_2^- après 3 jours d'incubation au lieu des 24 mM attendus (Équation 19). On peut suggérer qu'une partie du NO_2^- a abiotiquement réagi avec le Fe^{II} de la couche native d'oxydes ou le Fe^0 de la fonte.

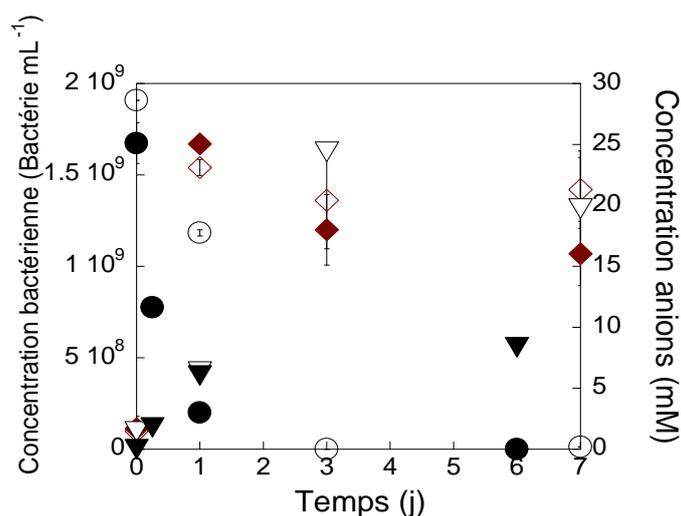


Figure IV-25 : Variation du nombre de cellules de *Klebsiella mobilis* (losange) en fonction du temps d'incubation avec ou sans coupon de fonte (respectivement losange plein et vide) et suivi de la concentration en NO_3^- (rond) et NO_2^- (triangle inversé), avec et sans coupon (respectivement noir et blanc). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-nitrate, (n = 3).

Le nombre total de cellules « mortes » diffère en fonction de la présence ou pas du coupon (Tableau IV-2). Sans coupon, le nombre de cellules « mortes » augmente au cours du temps, il est de 95 ± 1 % après 7 jours d'incubation. Lorsqu'un coupon est ajouté, le nombre de cellules « mortes » augmente moins rapidement et est plus faible. Il est de 77 ± 19 % après 7 jours d'incubation. La présence d'un coupon influence donc le nombre de bactéries qui restent « vivantes » au cours de l'expérience. La réduction de NO_3^- en NO_2^- pourrait en être la cause (Figure IV-25). Il est reconnu que les nitrites peuvent être toxiques pour les bactéries en portant atteinte à l'intégrité des cellules (Bollag et Henninger, 1978). Or la présence d'un coupon apporte du Fe^{II} au milieu et permet alors la consommation des ions NO_2^- (Équation 23). La diminution de la concentration en nitrite dans le milieu favorise ainsi la survie de *K. mobilis*.

Tableau IV-2 : Pourcentage de bactéries *Klebsiella mobilis* « vivantes » (i.e. avec membrane intègre) et « mortes » (i.e. avec membrane altérée) dans la suspension (caractérisées par le double marquage Syto 9 + iodure de propidium) au cours du temps avec ou sans coupon.

Temps (j)	Avec coupon		Sans coupon	
	« Vivantes »	« Mortes »	« Vivantes »	« Mortes »
3	70 ± 2	30 ± 25	60 ± 16	40 ± 9
7	23 ± 7	77 ± 19	5 ± 4	95 ± 1

Après 30 jours d'incubation, la suspension de la condition biotique présente une couleur orange/rouille ainsi que des tâches orange à la surface du coupon (Figure IV-26a et a'). Le milieu et le coupon de la condition abiotique sont, eux, restés inchangés (Figure IV-26b et b'). Il est donc permis de considérer qu'il y a une MIC apparente qui s'est produite sur les coupons en présence de *K. mobilis*. La quantité de fer libéré est très faible ($0,7 \pm 0,2 \text{ mg cm}^{-2}$, Figure IV-2) pour être un paramètre pertinent pour conclure à une corrosion. Nous montrerons que l'analyse de surface par spectroscopie Raman permet quant à elle de confirmer qu'une corrosion est bien mise en œuvre.

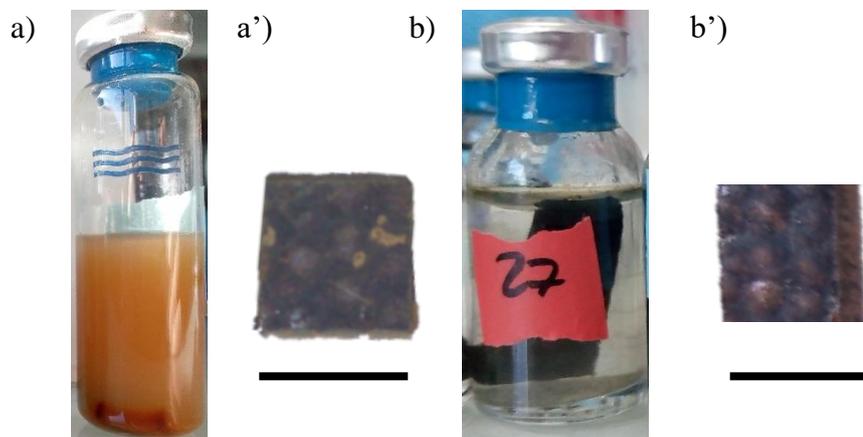


Figure IV-26 : Aspects des suspensions et des coupons au 30^e jour d'incubation dans le milieu M4-nitrate (a - a') avec *Klebsiella mobilis* et (b - b') sans bactéries. La barre représente 1 cm.

Des cellules bactériennes sont clairement visibles sur le coupon observé en microscopie optique sous épifluorescence après marquage des cellules au SYBR Green (Figure IV-27a). Les images MEB mettent également en évidence des objets semblables à des bactéries (Figure IV-27b). Ils ressemblent à des bacilles courts et mesurent environ $2,5 \pm 0,5 \text{ }\mu\text{m}$, caractéristiques correspondantes à celles de *K. mobilis*. Des cristaux sont également visibles, ils sont en forme de disque circulaire, forme typique de l'hématite et de la maghémite (Islam *et al.*, 2014). Aucune piqûre n'est observable contrairement à ce qui avait été observé avec *Bacillus*

licheniformis (une autre NRB) sur un acier C1018 après 7 jours seulement d'incubation en anaérobie (piqûres de 14,5 µm de profondeur ; Xu *et al.*, 2013).

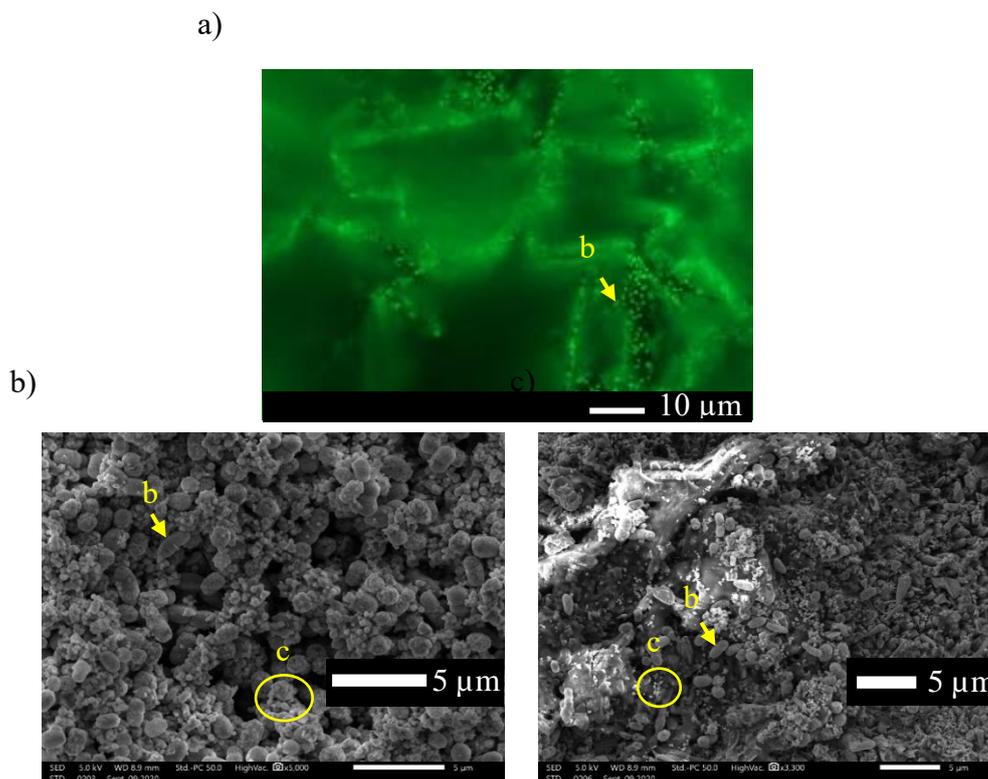


Figure IV-27 : Images en (a) microscopie optique sous épifluorescence et (b et c) microscopie électronique à balayage de la surface d'un coupon incubé avec *Klebsiella mobilis* pendant 30 jours.

b = objet ayant l'apparence d'une cellule bactérienne de morphologie et de taille en accord avec celles de *K. mobilis* et c = cristaux.

La présence d'hématite ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$) et de magnétite ($\text{Fe}^{\text{II,III}}_3\text{O}_4$) a été observée par la spectroscopie Raman (Figure IV-28b). Une suspicion quant à la présence de goéthite ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{O}(\text{OH})$) a été faite mais n'a pas pu être confirmée par DRX (Figure IV-29). Le témoin abiotique révèle la présence uniquement d'hématite et de maghémite (Figure IV-28d).

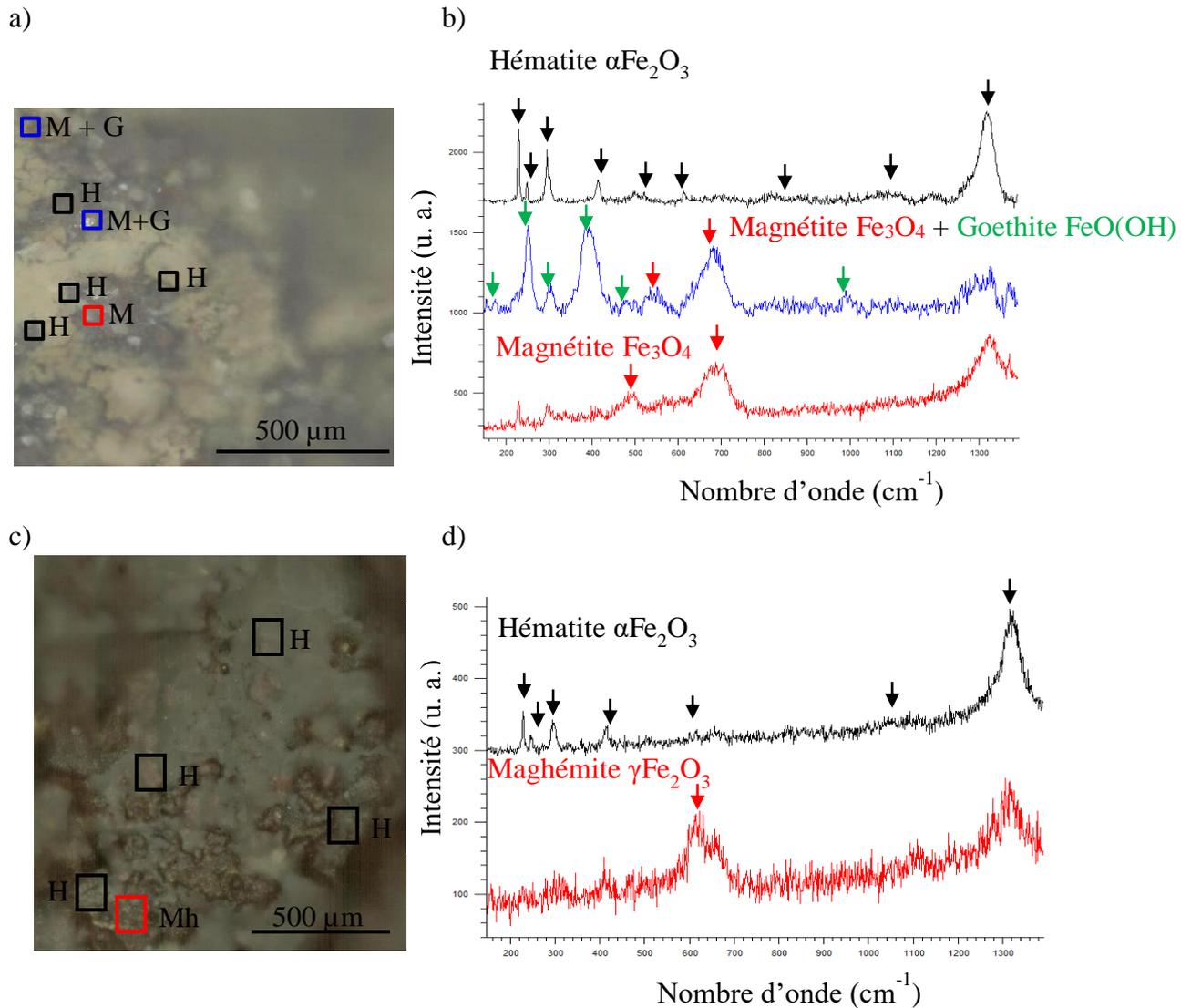


Figure IV-28 : (a) et (c) Surfaces balayées des coupons en fonte brute par spectroscopie Raman et (b) et (d) spectres correspondants enregistrés après 30 jours dans le milieu M4-nitrate avec *Klebsiella mobilis* (a – b) et sans bactéries (c – d) pendant 30 jours.

H = hématite, M= magnétite, Mh = maghémite et G = goethite.

La DRX a confirmé la présence d'hématite et de magnétite mais a également révélé la présence de rouille verte 1 carbonatée $\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{CO}_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Figure IV-29). La profondeur du faisceau de la DRX étant plus importante, cela peut expliquer pourquoi nous n'avons pas vu de rouille verte en spectroscopie Raman.

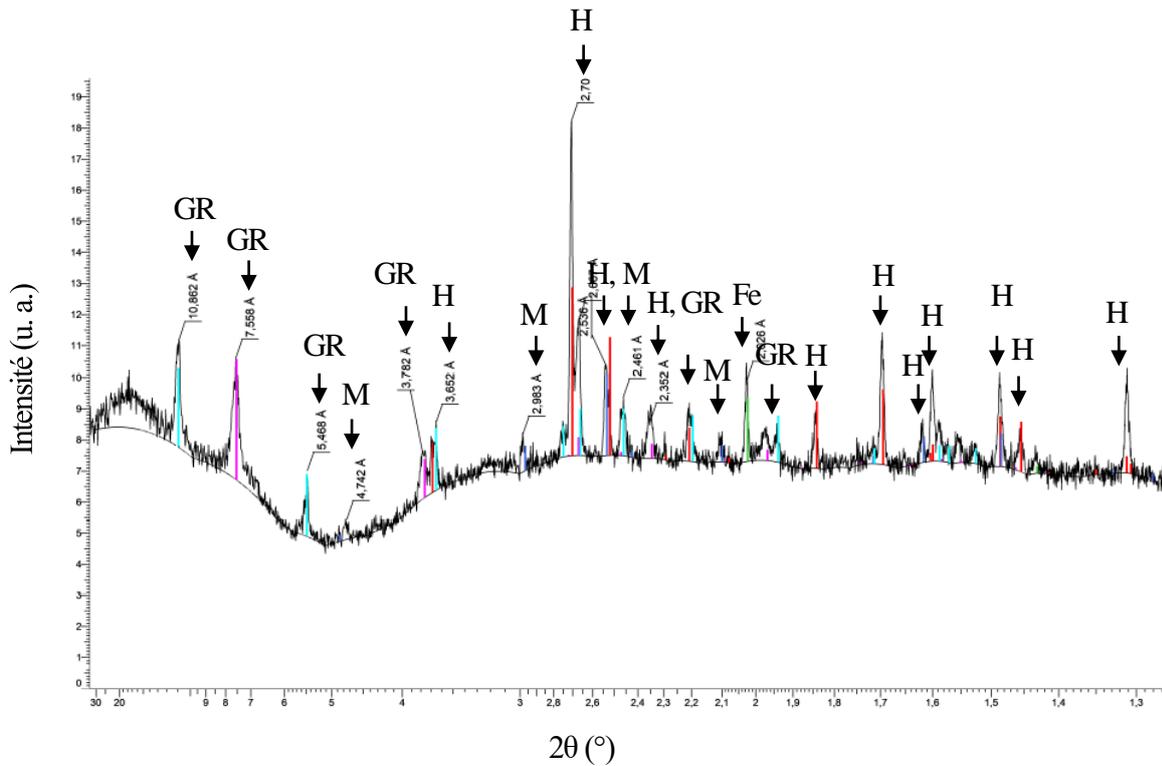


Figure IV-29 : Spectre de diffraction des rayons X d'un coupon en fonte brute incubé avec *Klebsiella mobilis* après 30 jours à 30 °C dans le milieu M4-nitrate.

GR1 = rouille verte 1, H = hématite, M = magnétite, et Fe = Fe⁰.

IV-1.3.2. Effet des nitrites biogénérés par *Klebsiella mobilis* (surnageant d'une culture stérile) sur la corrosion de la fonte

Si les nitrites sont responsables de l'impact de *K. mobilis* en milieu M4-nitrate sur la fonte, alors il devrait être possible de reproduire cet impact dans un milieu complété en nitrite. Pour s'en assurer, *K. mobilis* a été incubée une semaine dans le milieu M4-nitrate, la suspension a ensuite été stérilisée (121 °C – 15 min) puis un coupon en fonte a été placé dans ce milieu avec les nitrites ainsi biogénérés ($\text{NO}_2^- = 24,0 \text{ mM}$). Après 7 jours d'incubation en présence du coupon, on observe une diminution de $[\text{NO}_2^-]$ (Figure IV-30). D'après le test de Student, la différence de concentration en NO_2^- est significative à 80 %, elle passe de $24,0 \pm 0,1 \text{ mM}$ à $21,2 \pm 0,4 \text{ mM}$. Il y a donc 12 % des nitrites qui disparaissent. En parallèle, on ne détecte pas d'ions NO_3^- dans le milieu.

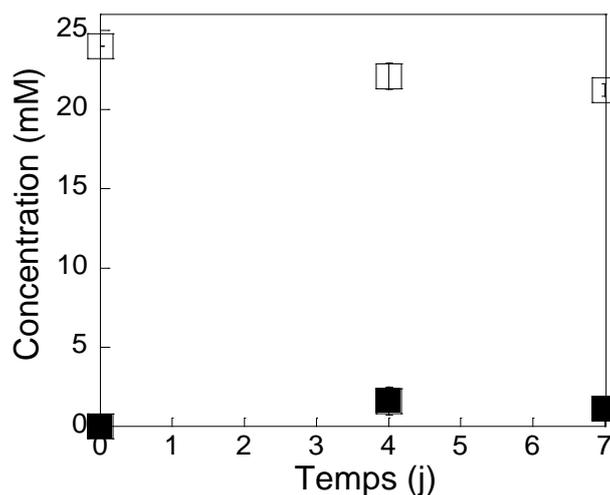


Figure IV-30 : Suivi de la concentration en NO₃⁻ (carré plein) et NO₂⁻ (carré vide) en présence de coupon dans la solution de nitrites biogénérés par *Klebsiella mobilis*. La culture a été réalisée à 30 °C, les barres d'erreurs sont cachées par les symboles (n = 3).

Nos indicateurs (perte de masse, quantité de fer libéré et quantité de fer total) ne sont pas assez sensibles pour mesurer des variations dans le cadre de cette expérience (Figure IV-31). On voit cependant une différence entre les expériences en présence de *K. mobilis* et celle après stérilisation avec des masses en fer libéré respectivement égales à $0,7 \pm 0,2 \text{ mg cm}^{-2}$ à comparer à $0,2 \pm 0,1 \text{ mg cm}^{-2}$ (Figure IV-31c). Il n'y a pas de différence marquée entre la condition abiotique et le milieu stérilisé.

Le coupon incubé dans le flacon contenant la culture riche en nitrite biogénéré par *Klebsiella mobilis* tuée présente des petits points blancs qui pourraient être associés à de la sidérite ou de la vivianite (Figure IV-32a'). Quant à la phase liquide, elle est légèrement orangée après 30 jours d'incubation (Figure IV-32a). Avec *K. mobilis* active, l'intensité de la couleur de la phase liquide était plus importante (Figure IV-26).

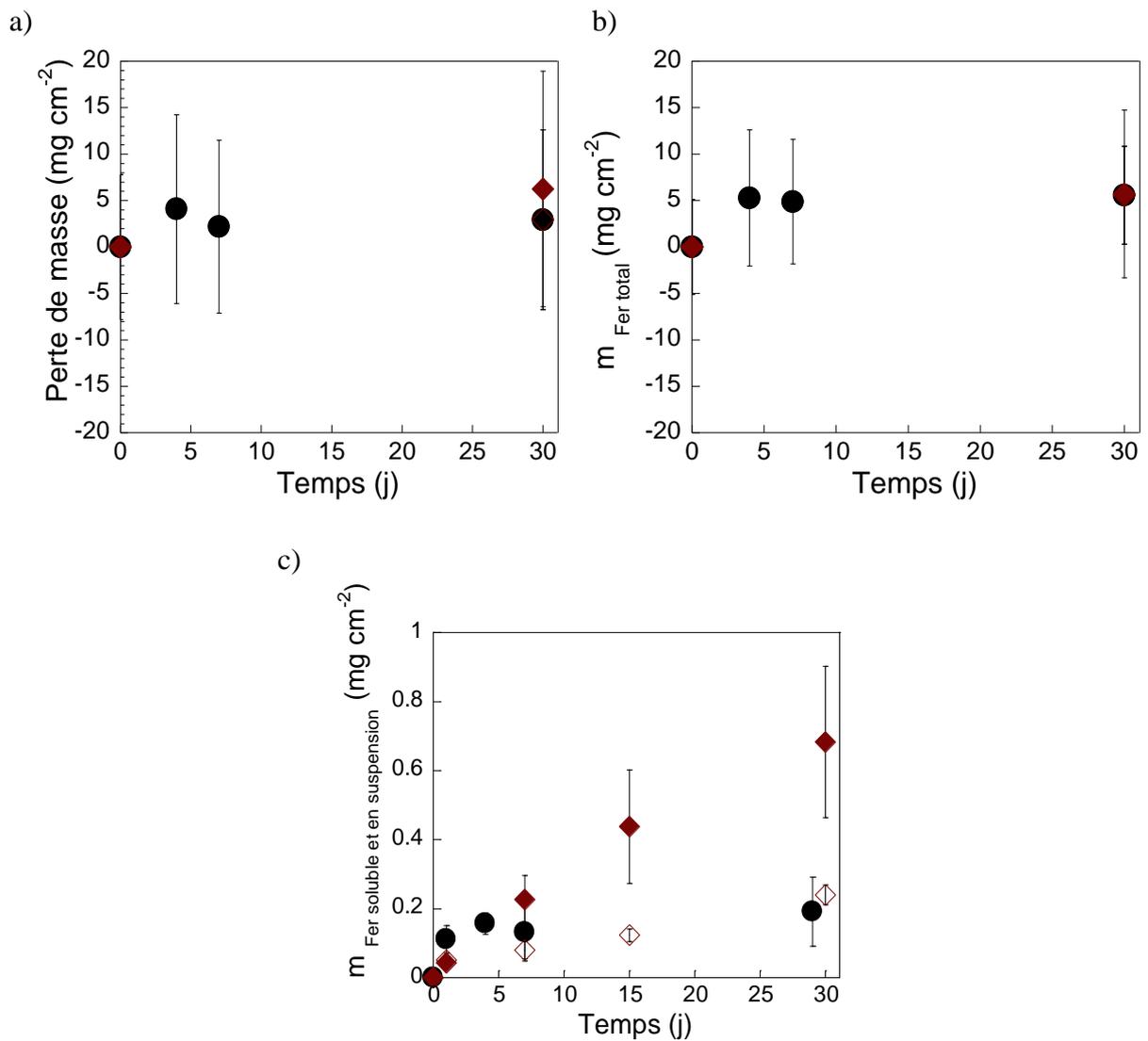


Figure IV-31 : Variation de (a) la perte de masse des coupons en fonte, (b) la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps d'incubation avec la culture de *Klebsiella mobilis* tuée (rond), *Klebsiella mobilis* (losange plein) et son contrôle abiotique (losange vide). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-nitrate, (n = 3).

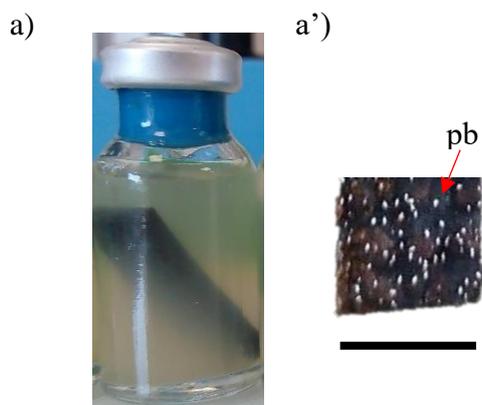


Figure IV-32 : Aspects de (a) la suspension et (a') du coupon au 30^e jour d'incubation avec un milieu de culture riche en nitrite et biogénéré préalablement par *Klebsiella mobilis*. La barre représente 1 cm et pb = point blanc.

IV-1.3.3. Effet de *Klebsiella mobilis* sur la corrosion de la fonte

Pour résumer, plusieurs différences sont notables à 30 jours entre les conditions testées. Les résultats sont rassemblés dans la Figure IV-33.

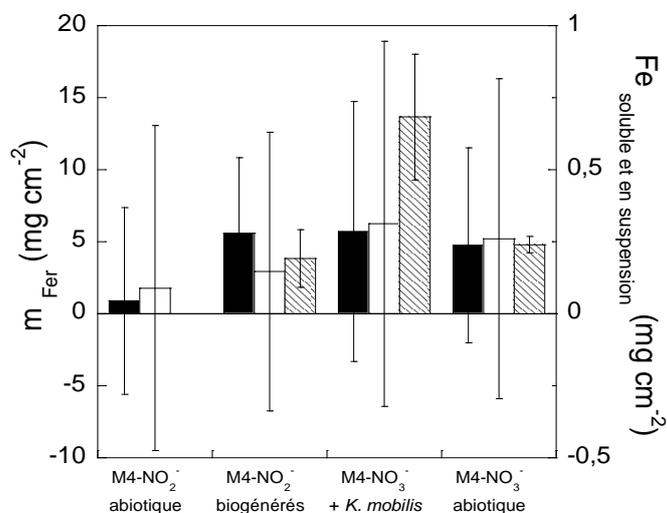


Figure IV-33 : Concentration en fer total (i.e. Fe libéré et HCl extractible) (noir), perte de masse (blanc) et les concentrations en fer libéré (hachuré) des coupons incubés 30 jours dans un milieu M4-nitrite stérile, M4-nitrite biogénéré par *K. mobilis*, M4-nitrate + *Klebsiella mobilis* et M4-nitrate stérile, (n = 3).

Il y a des différences significatives au niveau de la concentration en fer libéré (Figure IV-33). Elle était plus élevée dans le cas de l'incubation avec *K. mobilis* par rapport aux deux autres contrôles abiotiques (i.e. nitrites biogénérés par *K. mobilis* et milieu abiotique M4-nitrate). Les suivis de la perte de masse et de la quantité de fer total ne sont pas significativement différents.

La concentration en fer libéré est directement liée aux changements et à l'intensité de couleur des phases liquides. Avec *K. mobilis*, les suspensions sont devenues plus orange qu'avec le contrôle bactérie « mortes » et elles sont restées limpides avec le contrôle abiotique, ce qui témoigne donc de l'action de la NRB.

Les analyses de surface montrent que les transformations minérales sont bien différentes entre le contrôle abiotique et les expériences menées avec *K. mobilis*. En effet, la rouille verte carbonatée et la goethite ont été détectées seulement en présence de la NRB. La formation de rouilles vertes a d'ailleurs déjà été observée avec *K. mobilis* (Etique *et al.*, 2014 ; Etique et Jorand, 2016) où dans cette étude une suspension bactérienne avait été mise en contact de minéraux Fe^{II} (sidérite) pendant 4 jours, après culture en milieu riche. Selon la quantité de nitrite biogénéré (dépendant directement de l'apport en donneur d'électrons), la rouille verte carbonatée ($[\text{NO}_2^-] < 1,5 \text{ mM}$) ou la goethite ($[\text{NO}_2^-] > 1,5 \text{ mM}$) était le minéral secondaire

majoritairement présent. Les auteurs ont montré que la formation de rouille verte est en fait transitoire : elle est d'abord produite selon l'Équation 25 puis est transformée en goethite si l'apport en nitrite est suffisamment important (Équation 26) (Etique *et al.*, 2014).



Dans nos conditions expérimentales, un mélange d'oxydes de fer complexes (i.e. ceux présents dans la couche native du coupon) a été mis en contact avec les bactéries pendant 30 jours avec comme donneur d'électrons 15 mM de lactate et comme accepteur d'électrons 24 mM de nitrate. Même si les conditions sont différentes, nos résultats restent cohérents avec ce qui a déjà été montré par ces auteurs. D'une part, nous avons identifié de la goethite par spectroscopie Raman, ce qui est cohérent puisque $[\text{NO}_2^-] > 1,5 \text{ mM}$. D'autre part, la DRX a mis en évidence la présence de RV carbonatée. Cette méthode permet une analyse plus en profondeur et permet donc d'avancer l'hypothèse que la RV se soit développée en amont de la goethite, lorsque la concentration en nitrite était inférieure à 1,5 mM.

La seconde grande différence concerne la concentration en nitrite. En présence de *K. mobilis*, il était attendu d'avoir une concentration en nitrite de 24 mM au terme de l'incubation avec le coupon. Or, seulement 8 mM ont été retrouvés en solution après 30 jours. Avec le contrôle bactéries « mortes » qui présentait une concentration initiale de 24 mM de nitrite, il y a 20 mM de nitrite dosé au terme de l'incubation avec le coupon.

Une partie des nitrites n'est donc pas retrouvée dans ces essais, cela signifie qu'ils ont réagi avec le milieu environnement, peut-être est-ce le fer ?

- Dans le cas de l'essai en présence de *K. mobilis*, 17 mM (soit 68 %) de nitrite auraient réagi avec le Fe^{II} . En tenant compte de la stœchiométrie de la réaction (Équation n° 23) (1 mole de nitrite pour 6 moles de Fe^{II}), environ 102 mM de Fe^{II} sont nécessaires pour réagir avec ces 17 mM de nitrites. Or, la couche native d'oxydes contient approximativement 0,1 mM de Fe^{II} , soit 0,4 mM équivalent ramené au volume réactionnel et pour un coupon de 3 cm². Si nous considérons toutes les faces du coupon et en faisant l'hypothèse qu'elles soient constituées globalement de la même concentration en Fe^{II} , cela représente au maximum 2,5 mM de Fe^{II} disponible. Il « manque » clairement 99,1 mM de Fe^{II} , soit 5,5 g équivalent ! Autant dire que

l'oxydation d'autant de fer ne serait pas passée inaperçue avec la méthode gravimétrique.

- Même remarque avec l'essai de la culture stérilisée de *K. mobilis*, pour lequel, sur les 24 mM de nitrites initialement présents, 4 mM (soit 12 %) de NO_2^- ont été consommés. Il est donc nécessaire d'avoir environ 24 mM de Fe^{II} pour réagir avec les nitrites. Il « manque », dans ce cas-là, 21,1 mM de Fe^{II} pour justifier d'une consommation des ions nitrite par réaction avec Fe^{II} , soit 1,2 g équivalent.

Dans les deux cas, il est évident que d'autres réactions participent à cette élimination des nitrites. Nous avons pensé que le Fe^0 de la fonte pourrait éventuellement réagir avec les nitrites. D'après la stœchiométrie de la réaction (Équation n° 24) (1 mole de nitrite pour 3 moles de Fe^0), environ 47 mM de Fe^0 sont nécessaires pour réagir avec les 15,7 mM de nitrites restants si on admet qu'ils ont réagi avec le Fe^{II} de la couche native d'oxydes, soit l'équivalent de 2,63 g. Pour l'essai de la culture stérilisée de *K. mobilis*, environ 4,5 mM de Fe^0 sont nécessaires pour réagir avec les 1,5 mM de nitrites restants si on admet qu'ils ont réagi avec le Fe^{II} de la couche native d'oxydes, soit l'équivalent de 0,25 g. Cette hypothèse ne semble donc pas valide car, dans les deux cas, la perte de masse est vraiment conséquente et aurait été détectée par l'analyse gravimétrie.

Autres hypothèses pour expliquer cette perte de concentration en nitrite importante ; une réaction inconnue ; des nitrites qui précipitent en surface du coupon en fonte et qui ne sont donc plus mesurable. Enfin, l'hypothèse d'un problème analytique au niveau de la chromatographie ionique peut être exclue. En effet, nous avons suivi au cours du temps l'évolution des nitrates, nitrites mais également du sulfate. Nous n'attendions pas de variation de la concentration en sulfate, car il s'agit, dans ce cas précis, d'un étalon interne. Et effectivement, sa concentration est restée constante et égale à $13,8 \pm 1,1$ mM dans le cas de l'essai en présence de *K. mobilis* et à $15,9 \pm 0,8$ mM dans le cas de l'essai avec la culture stérilisée de *K. mobilis* (données non montrées).

Même si les mécanismes ne sont pas élucidés, les différences énumérées montrent qu'il y a bien eu un impact de la NRB sur la corrosion de la fonte même si, dans le temps de l'expérience, la corrosion n'est pas significative. Pour expliquer cela, nous avons émis 4 hypothèses :

- i) Il n'est pas à exclure que notre méthode de mise en évidence de la corrosion de la fonte brute n'est pas assez sensible ou que le temps imparti de la manipulation (i.e. 30 jours) n'est pas suffisamment long.

ii) La deuxième hypothèse est que la quantité de Fe^{II} disponible pour réagir avec les nitrites biogénérés n'est pas suffisante. Les nitrites réagissent bien avec le Fe^{II} au vu des couleurs des suspensions après 30 jours et de la nature des oxydes de fer adsorbés qui diffèrent de ceux du contrôle abiotique. Seulement une quantité limitée de Fe^{II} semble accessible (théoriquement au maximum 2,5 mM), limitant alors l'action des nitrites biogénérés sur la corrosion de la fonte.

iii) La troisième hypothèse est que les cristaux de goethite (mis en évidence par spectroscopie Raman) peuvent encroûter les bactéries (Kappler *et al.*, 2006 ; Etique *et al.*, 2014) et par conséquent limiter leur métabolisme. Les images MEB ne permettent pas de révéler l'encroûtement des bactéries (l'usage de la microscopie électronique à transmission aurait été nécessaire pour observer ce phénomène). En parallèle, nous avons montré que même en présence d'un coupon en fonte, environ 23 ± 7 % de bactéries restent seulement vivantes après 7 jours d'incubation. Un phénomène d'encroûtement a peut-être eu lieu, et a impacté le métabolisme bactérien limitant fortement le phénomène de corrosion.

iv) La quatrième hypothèse repose sur le fait que les ions Fe^{2+} sont capables de s'adsorber à la surface d'un oxyde de Fe^{III} . Ainsi, ils ne peuvent plus être oxydés par les nitrites contrairement au Fe^{II} soluble (William *et Scherer*, 2004 ; Tai *et Dempsey*, 2009).

IV-1.4. Conclusion sur l'effet des cultures mono-espèces sur la corrosion de la fonte

La démarche expérimentale retenue permet de mettre en évidence l'impact des bactéries choisies sur la fonte même si l'approche mériterait de gagner en sensibilité. Les trois souches testées, appartenant chacune à un groupe métabolique (*S. putrefaciens* pour les ferriréducteurs, *D. desulfuricans* pour les sulfatoréducteurs et *K. mobilis* pour les nitrate réducteurs) sont bien capables d'influencer la corrosion de la fonte brute de Saint-Gobain PAM. Les analyses MEB ont montré la colonisation de la fonte par les bactéries, ce qui a été confirmé par les analyses en microscopie optique sous épifluorescence. Les analyses du solide (spectroscopie Raman et DRX) ont permis d'identifier des oxydes de fer différents selon les espèces bactériennes et également différents de ceux obtenus avec les contrôles abiotiques. Même si le détail n'est pas encore connu, on retrouve les grandes lignes des mécanismes spécifiques à chaque groupe métabolique :

- *S. putrefaciens* (IRB) : utilise le Fe^{III} de la couche native d'oxydes comme accepteur d'électrons.

- *D. desulfuricans* (SRB) : mène à une corrosion par piqûres via la production de sulfure qui réagit avec le Fe^{II} de la couche native d'oxydes pour former un film de FeS.
- *K. mobilis* (NRB) : produit des nitrites qui réagissent avec le Fe^{II} de la couche native d'oxydes.

IV-2. Expérience en présence de cultures double-espèces bactériennes

In situ, les bactéries ne sont jamais isolées, elles interagissent avec d'autres espèces ce qui peut conduire à des réactions non présentes en souche pure. Pour se rapprocher de ces conditions réelles, des essais de corrosion avec le mélange deux à deux des métabolismes bactériens testés précédemment en monoculture ont été effectués. Étudier un phénomène lorsque plusieurs souches bactériennes sont impliquées est un véritable challenge. Plusieurs questionnements se sont donc posés ; que se passe-t-il lorsque l'on mélange ces souches ? Est-ce que les deux souches colonisent le coupon et si oui en même temps, dans les mêmes proportions ? Est-ce que les deux souches expriment le même niveau d'activité qu'en souche pure ou un niveau plus fort (synergie) ou plus faible (antagonisme) ? Les résultats des cocultures présentés dans ce Chapitre IV vont tenter de répondre à ces divers questionnements avec l'aide d'analyses microbiologiques, chimiques et spectroscopiques.

IV-2.1. Corrosion de la fonte influencée par les bactéries ferri-réductrice *Shewanella putrefaciens* et sulfatoréductrice *Desulfovibrio desulfuricans*

Kajiyama et Koyama ont publié en 1997 une étude sur un tuyau en fonte ductile enterré pendant 17 ans dans un sol sableux qui contenait, entre autres, des IRB et des SRB (Kajiyama et Koyama, 1997). Dans leur approche statistique, ils ont intégré plusieurs facteurs environnementaux qu'ils ont mesurés. Il s'avère que la présence de FeS, généré par les SRB et la présence de tubercules qui résultent de l'activité des IRB contribuent à aggraver le phénomène de corrosion. Il y aurait par conséquent un effet synergique des deux groupes métaboliques : l'IRB produisant du Fe^{II} qui réagit avec les sulfures biogénérés par la SRB. Notre étude s'est intéressée à ces deux groupes métaboliques SRB et IRB, incubés ensemble, afin de tenter de reproduire un effet corrosif sur la fonte ductile de Saint-Gobain PAM.

IV-2.1.1. Croissance et activité de *Shewanella putrefaciens* et *Desulfovibrio desulfuricans* en coculture

La croissance de la coculture *S. putrefaciens* + *D. desulfuricans* en milieu M4-fumarate/sulfate, le milieu de culture adapté aux deux bactéries, a été suivie en présence et en absence d'un coupon en fonte en microscopie optique sous épifluorescence. Dans les deux cas, le pic de croissance est atteint après 4 jours d'incubation. La croissance est significativement plus élevée en présence d'un coupon (environ 5 fois plus $4,3 \times 10^8$ à comparer avec $2,2 \times 10^9$ bactéries mL^{-1} respectivement pour l'essai sans coupon et l'essai avec coupon à 4 jours d'incubation) (Figure IV-34).

Sans coupon, il est probable que les sulfures provenant de la réduction des sulfates par *D. desulfuricans*, restent sous leur forme S^{2-} dans le milieu. Sous cette forme, ils sont toxiques pour les bactéries car ils impactent la membrane cellulaire en tant qu'agent découplant (Okabe *et al.*, 1995 ; Marchal *et al.*, 2001). En revanche, avec coupon, les sulfures biogénérés trouvent du Fe^{III} pour réagir ou du Fe^{II} issu de la bioréduction du Fe^{III} par *S. putrefaciens*. La concentration en sulfure descend ainsi sous le seuil toxique et la croissance des bactéries peut continuer.

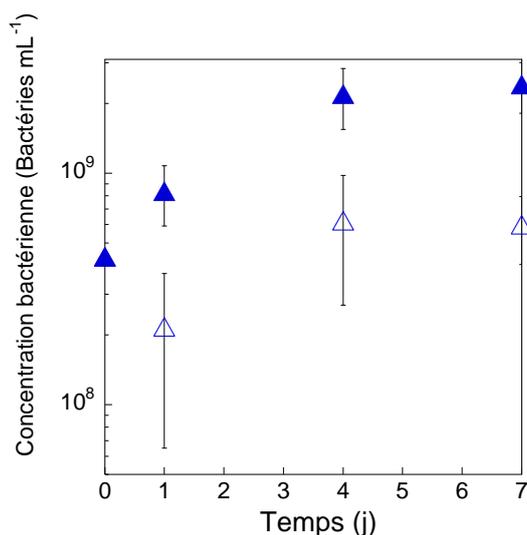


Figure IV-34 : Variation du nombre de cellules de *Shewanella putrefaciens* + *Desulfovibrio desulfuricans* en fonction du temps d'incubation avec ou sans coupon de fonte (respectivement triangle plein et vide). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-fumarate/sulfate, (n = 3). Les cellules ont été dénombrées en microscopie optique sous épifluorescence après marquage au SYBR green.

La microscopie optique n'a pas permis de différencier par leurs morphologies les deux espèces bactériennes. Il n'a donc pas été possible de déterminer si l'augmentation du nombre de cellules concernait les deux espèces de manière équivalente ou non. Nous avons donc utilisé la biologie

moléculaire pour apprécier l'abondance relative de séquences nucléiques spécifiques à chaque espèce.

IV-2.1.1.1. Dénombrement spécifique par approche moléculaire (qPCR)

Une étape de mise au point de l'approche moléculaire a été effectuée et est présentée en Annexe 5. Elle a permis de valider les programmes d'amplification et la spécificité des amorces.

En monoculture, la souche *S. putrefaciens* a un nombre de copies de génome qui diminue au cours du temps (i.e. de 3×10^9 à 1×10^9 au jour 4 pour une DO_{600} initiale de 1 et de 4×10^9 à 2×10^9 copies de génome au jour 4 à une DO_{600} initiale de 0,1 ; Figure IV-35a). Au contraire, en monoculture, la souche *D. desulfuricans* a une quantité d'ADN qui augmente au cours du temps (de plus d'un log pour une DO_{600} initiale de 1, i.e. de 1×10^9 à 2×10^{10} copies de génomes au jour 4, et de plus de 2 log pour une DO_{600} initiale de 0,1, i.e. de 2×10^8 à 2×10^{10} copies de génomes au jour 4 ; Figure IV-35b). En coculture, le nombre de copies de génome de *D. desulfuricans* augmente et passe en l'espace de 2 jours de 1×10^{10} à 5×10^{10} pour une DO_{600} initiale de 1 et de 3×10^8 à 1×10^{10} pour une DO_{600} initiale de 0,1 (Figure IV-35c). Celui de *S. putrefaciens*, augmente également, après 4 jours d'incubation pour une DO_{600} initiale de 1 (i.e. de 6×10^9 au jour 0 à 3×10^{10} copies de génome au jour 4). Avec une DO_{600} initiale de 0,1, la quantité de copies de génome augmente après deux jours d'incubation (i.e. de 1×10^8 au jour 0 à 10×10^8 copies de génome au jour 2).

Les quantités de copies de génome retrouvées au jour 0 sont cohérentes avec la densité optique initiale pour la souche *D. desulfuricans*, i.e. il y a $1,2 \times 10^9$ avec une DO_{600} initiale de 1 et $1,6 \times 10^8$ ADN avec une DO_{600} initiale de 0,1, le facteur 10 est donc bien retrouvé. Avec *S. putrefaciens*, environ 3×10^9 copies de génome sont retrouvés quelle que soit la DO_{600} initiale, il n'y a donc pas le facteur 10. Concernant la coculture, il y a, au jour 0, 1×10^{10} à DO_{600} 1 et 2×10^8 copies de génomes à DO_{600} 0,1 pour *D. desulfuricans* et pour *S. putrefaciens*, il y a 5×10^9 à DO_{600} 1 et 1×10^8 copies de génomes à DO_{600} 0,1. Le facteur 10 n'est pas retrouvé avec *D. desulfuricans* dans la coculture mais il l'est avec *S. putrefaciens*. Soit ces différences signifient qu'il y a eu une erreur de manipulation au niveau de la préparation des pré-cultures. Cette hypothèse peut être écartée car le facteur de 10 est retrouvé avec *S. putrefaciens* dans la coculture et *D. desulfuricans* en souche pure. Soit la qPCR serait faussée par d'éventuels inhibiteurs tel que le fer puisque nous travaillons en présence d'un coupon en fonte. Soit l'extraction de l'ADN n'a pas été totale, ce qui fausse alors les résultats. Pour pallier ce problème, les échantillons ont été normalisés à l'aide d'une troisième souche *E. coli* EDCM.

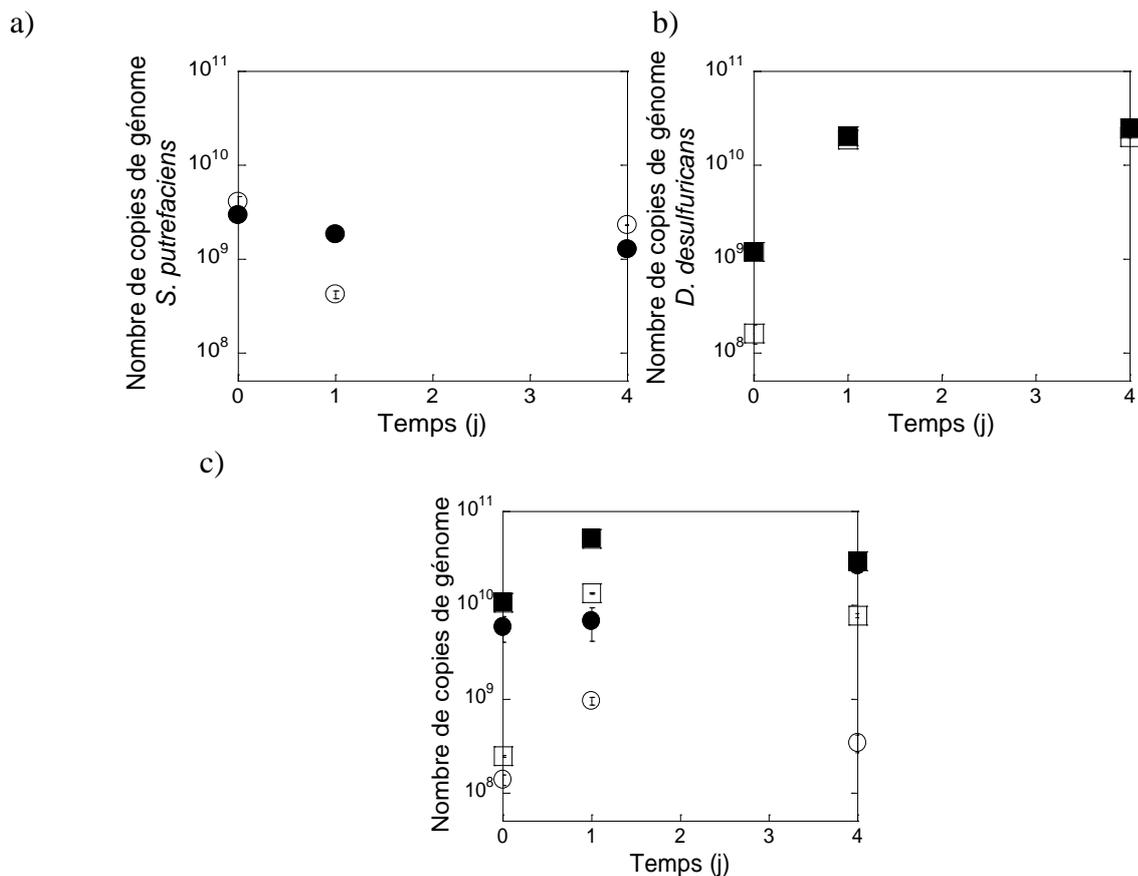


Figure IV-35 : Nombre de copies de génome de (a) *Shewanella putrefaciens* en monoculture, (b) *Desulfovibrio desulfuricans* en monoculture et (c) en coculture de *Shewanella putrefaciens* (rond) et *Desulfovibrio desulfuricans* (carré), pour des DO_{600} initiales de 1 (symboles pleins) ou 0,1 (symboles vides), ($n = 3$).

La souche EDCM est un contrôle interne qui a été placée en quantité constante dans tous les échantillons. Ce contrôle normalise les biais d'extraction et de contaminations par des inhibiteurs et permet de vérifier l'efficacité des qPCR. Un facteur de correction est calculé et appliqué à toutes les valeurs, il tient compte du rendement d'extraction. En normalisant à l'aide de la souche EDCM, avec *S. putrefaciens* en culture seule, quelle que soit la densité optique initiale, il n'y a pas d'augmentation (en moyenne 5×10^9 copies de génome) (Figure IV-36a). Avec *D. desulfuricans* en culture seule, avec une DO_{600} initiale de 1, le nombre de copies de génome n'augmente pas et reste à environ 4×10^{10} . Avec une DO_{600} initiale de 0,1, il y a une augmentation d'un log (i.e. de $4,9 \times 10^9$ au jour 0 à $5,4 \times 10^{10}$ au jour 1) (Figure IV-36b). Enfin, en coculture, la quantité de *S. putrefaciens* diminue quelle que soit la densité optique initiale (de $4,3 \times 10^{10}$ à $2,7 \times 10^{10}$ pour DO_{600} 1 et de $6,4 \times 10^9$ à $8,6 \times 10^8$ pour DO_{600} 0,1) (Figure IV-36c). Avec *D. desulfuricans*, seule la DO_{600} initiale 0,1 montre une légère augmentation (i.e. de $1,1 \times 10^{10}$ à $2,0 \times 10^{10}$ copies de génome). Avec la DO_{600} 1, il y a même une légère diminution au cours du temps (de $8,0 \times 10^{10}$ à $3,1 \times 10^{10}$ copies de génome).

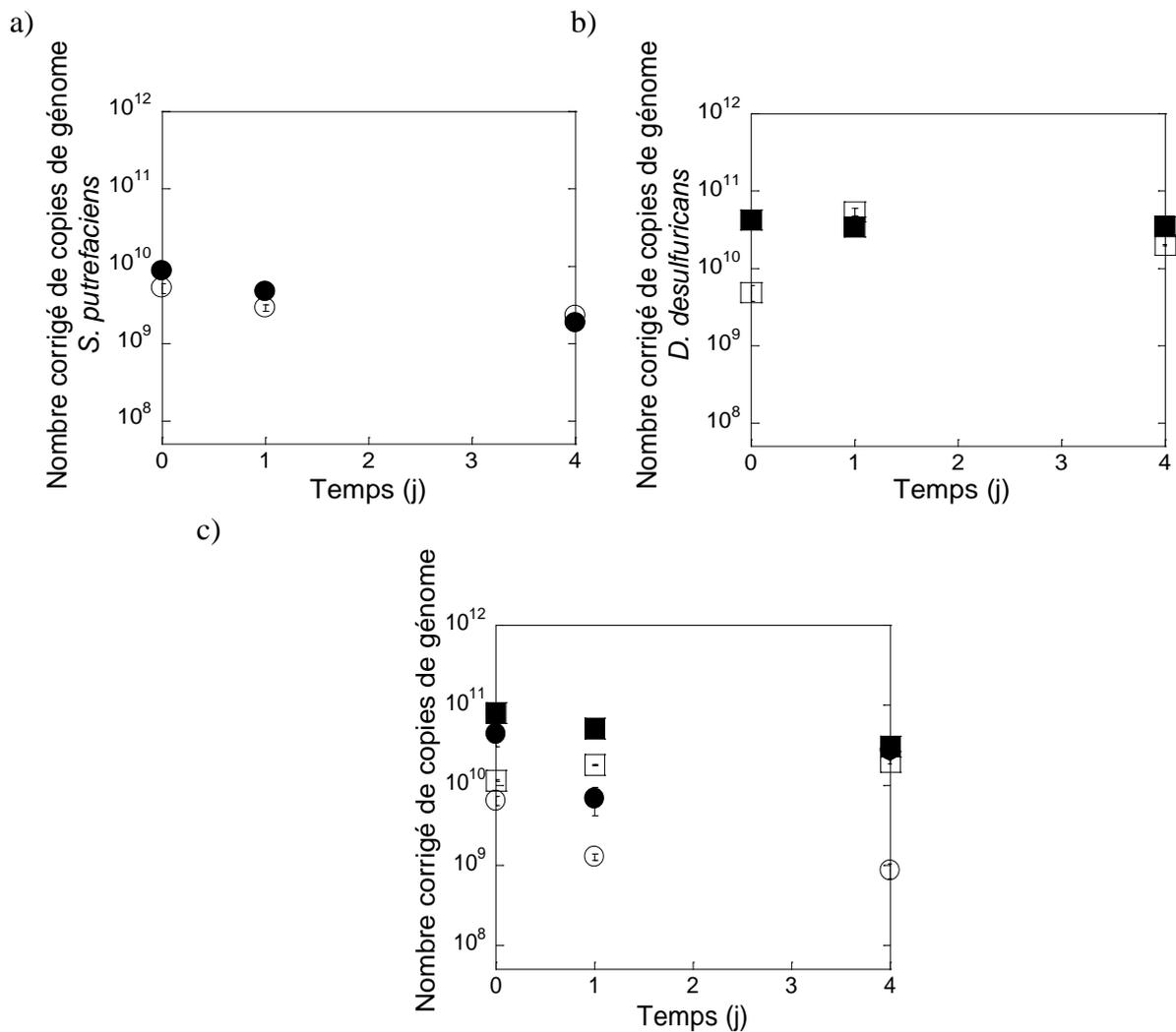


Figure IV-36 : Nombre corrigé par l'étalon interne *Escherichia coli* EDCM de copies de génome de (a) *Shewanella putrefaciens* en monoculture, (b) *Desulfovibrio desulfuricans* en monoculture et (c) en coculture de *Shewanella putrefaciens* (rond) et *Desulfovibrio desulfuricans* (carré), pour des DO_{600} initiales de 1 (symboles pleins) ou 0,1 (symboles vides), ($n = 3$).

Avec la souche *S. putrefaciens* cultivée seule, la qPCR ne met pas en évidence de croissance quelle que soit la quantité de bactérie introduite initialement ($DO_{600} = 1$ ou 0,1). Pourtant, en microscopie optique sous épifluorescence, en présence de coupon, une croissance d'un facteur $\times 10$ était observée (Figure IV-1). L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette différence est la formation d'un biofilm compacte par *S. putrefaciens* sur le coupon en fonte, les cellules sont donc moins nombreuses en suspension. En effet, pour cette expérience de qPCR, les bactéries en biofilm n'ont pas pu être entièrement décrochées du coupon car il n'a pas pu être sacrifié au contraire des expériences effectuées en microscopie. Pour confirmer les résultats obtenus en qPCR, l'idéal aurait été de suivre la croissance en microscopie optique sous épifluorescence et en qPCR avec strictement le même protocole. En culture seule,

D. desulfuricans a un nombre de copies de génome qui augmente au cours du temps. L'augmentation est plus importante avec la DO₆₀₀ initiale de 0,1 alors que la croissance est limitée lorsque la densité optique initiale est de 1. Cette observation est également faite lorsque *D. desulfuricans* est en coculture. Soit la densité bactérienne initiale trop importante ne permet pas une croissance significative, soit, comme avec *S. putrefaciens*, les bactéries sont fortement adhérentes au coupon. En coculture, il s'avère que *S. putrefaciens* n'a pas de croissance quelle que soit la DO₆₀₀ initiale. Comme le nombre de copies de génome n'augmente pas lorsque *S. putrefaciens* est en culture seule, nous pouvons penser que *D. desulfuricans* n'a pas d'effet inhibiteur sur *S. putrefaciens*. Par contre, en coculture, *D. desulfuricans* semble être inhibée lorsqu'elle est introduite à plus faible concentration (DO₆₀₀ = 0,1). Ce phénomène peut s'expliquer soit par une cinétique de consommation du donneur d'électrons favorable à *S. putrefaciens* et/ou par une compétition pour coloniser la fonte et/ou par un composé toxique produit par *S. putrefaciens*. Pour s'en assurer, une technique de microbiologie pasteurienne (i.e. étalements sur milieux solides) a été utilisée.

IV-2.1.1.2. Test d'inhibition par approche de microbiologie pasteurienne

Le test d'inhibition entre les deux bactéries a été effectué à l'aide de la microbiologie pasteurienne : *S. putrefaciens* a une croissance en présence de *D. desulfuricans*, des colonies rougeâtres sont observables. Pour *D. desulfuricans*, il est difficile de voir les colonies car elles sont petites et translucides. Néanmoins, un prélèvement de la gélose a été effectué pour être observé en microscopie optique sous épifluorescence. Nous retrouvons bien *D. desulfuricans* par l'aspect typique en virgule des cellules observées en présence de *S. putrefaciens*. Ce test rapide suggère l'absence d'antagonisme entre *S. putrefaciens* et *D. desulfuricans* en milieu riche TSA. Lee *et al.* ont obtenu des résultats similaires avec une autre espèce de *Shewanella* (*S. oneidensis*) cultivée en présence de *D. desulfuricans* et d'un coupon d'acier pendant 4 jours. Des croissances exponentielles ont été observées pour les deux souches *S. oneidensis* et *D. desulfuricans*, démontrant qu'il n'y a pas eu d'antagonisme apparent entre les souches (Lee *et al.*, 2006).

Les tests de qPCR et de microbiologie pasteurienne ne permettent pas d'affirmer que les deux souches sont bien actives. Pour vérifier l'activité de microorganismes, des analyses de qRT-PCR sont envisageables. Elles permettent de comparer le niveau d'expression d'un gène donné dans deux conditions différentes. L'activité des microorganismes peut également être vérifiée par des techniques de chimie analytique, c'est-à-dire en suivant les métabolites produits ou

consommés par les bactéries et libérés dans la suspension au cours du temps. C'est cette technique que nous avons choisie.

IV-2.1.1.3. Détermination de l'activité microbienne par approche de chimie analytique

Différents métabolites ont été suivis au cours du temps : les ions succinate ($^-OOC-CH_2-CH_2-COO^-$), sulfate (SO_4^{2-}) (Figure IV-37a) et le fer ferreux (Fe^{2+}) (Figure IV-37b). Pour cette expérience en coculture, la concentration du donneur d'électrons, le lactate, a été doublée, elle est de 30 mM. En considérant qu'environ 20 % du lactate sont consacrés à la biomasse (source de C), il y aurait donc 24 mM de disponibles pour les échanges d'électrons. D'autre part, les accepteurs d'électrons introduits dans le milieu de culture sont le sulfate pour la SRB, le fumarate du milieu de culture et le Fe^{III} de la couche native d'oxydes pour l'IRB.

On observe que la concentration en SO_4^{2-} diminue au cours du temps : 9 mM de sulfate ont été consommés en sept jours (Figure IV-37a). La SRB aurait donc consommé 18 mM de lactate sur les 24 mM disponibles d'après l'Équation n° 17 (2 moles de lactate réagissent avec 1 mole de sulfate). La concentration en succinate, quant à elle, est logiquement nulle au jour de l'inoculation, elle augmente au cours du temps pour atteindre $13,8 \pm 0,3$ mM au 7^e jour d'incubation (Figure IV-37a). La concentration initiale de fumarate était de $10,5 \pm 2,5$ mM. Le fumarate initialement présent a donc bien été réduit en succinate. Pour consommer les 10,5 mM de fumarate, il est nécessaire d'avoir approximativement 5 mM de lactate (Équation 21 ; 1 mole de lactate réagit avec 2 moles de fumarate). Ainsi, comme il restait 6 mM de lactate après la consommation de sulfate par *D. desulfuricans*, il ne reste plus que 1 mM de lactate après la consommation de fumarate par *S. putrefaciens*.

La Figure IV-37b montre une augmentation de la concentration en Fe^{II} au cours du temps dans la coculture, après 7 jours d'incubation, elle passe de 0 à $0,9 \pm 0,4$ mg cm^{-2} puis atteint $2,5 \pm 1,8$ mg cm^{-2} après 15 jours, soit l'équivalent de 4,5 mM. Or d'après l'Équation n° 16, la transformation d'une mole de lactate conduit à 4 moles de Fe^{II} , nous avons donc montré que *S. putrefaciens* a une activité ferriréductrice au sein de la coculture. De plus, la concentration en Fe^{II} évolue de la même manière en présence de la coculture et de *S. putrefaciens* seule.

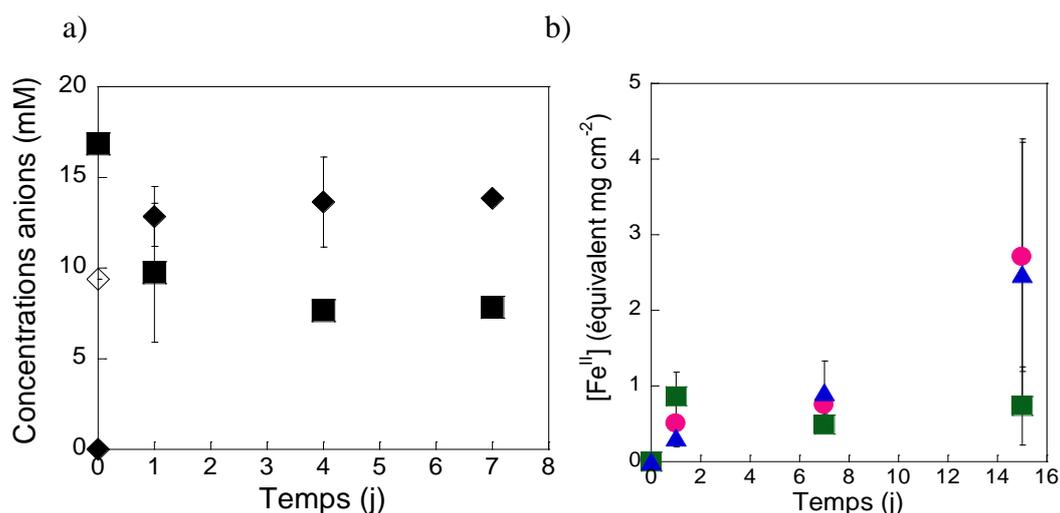


Figure IV-37 : (a) Suivi de la concentration en fumarate (losange vide), succinate (losange plein) et sulfate (carré) dans le milieu M4-fumarate/sulfate avec coupon et la coculture et (b) suivi de la concentration en Fe^{II} dans M4-fumarate avec coupon et *Shewanella putrefaciens* (rond), dans M4-sulfate avec coupon et *Desulfovibrio desulfuricans* (carré) et dans M4-fumarate/sulfate avec coupon et la coculture (triangle), (n = 3).

Plusieurs approches ont été utilisées et corrélées pour suivre la croissance et l'activité des souches en cocultures (i.e. suivis des morphologies par microscopie optique, des abondances relatives de séquences nucléiques spécifiques par biologie moléculaire, des UFC en cultures solides, et des substrats et métabolites par analyse chimique). Nos résultats suggèrent que la concentration cellulaire de *S. putrefaciens* et *D. desulfuricans* en coculture augmente d'un facteur 10 environ. Aucun antagonisme particulier n'a pu être mis en évidence entre les deux souches dans nos conditions expérimentales et celles-ci semblent être bien actives lorsqu'elles sont cultivées ensemble. En revanche, nos conditions expérimentales n'ont pas permis de démontrer une croissance similaire des deux souches lorsqu'elles sont en coculture. L'hypothèse la plus probable pour expliquer cela est que nous n'avons pas été capables de récupérer toutes les bactéries en biofilm sur le coupon en fonte, faussant alors l'estimation de la concentration bactérienne. Chapelle *et al.* ont montré que la réactivité des souches IRB et SRB dans les systèmes d'eaux souterraines dépendait du ratio Fe^{II}/H₂S. Ce ratio fournit des informations utiles concernant l'occurrence et la répartition de la réduction du fer et du sulfate. En effet, il a été montré que pour avoir une activité des IRB et des SRB au sein de la même culture, le ratio doit être équivalent à 1 (Chapelle *et al.*, 2009). Dans nos conditions, il aurait donc été utile de mesurer en parallèle les concentrations en Fe^{II} et en H₂S au cours du temps pour confirmer l'activité des souches.

IV-2.1.2. Corrosion de la fonte par *Shewanella putrefaciens* et *Desulfovibrio desulfuricans* en coculture

Au cours de la période d'incubation en présence d'un coupon, aucune différence significative en termes de perte de masse et de fer total n'a été détectée entre le contrôle abiotique et la coculture *S. putrefaciens* + *D. desulfuricans* (Figure IV-38). En revanche, une différence a été observée au jour 15 au niveau de la concentration en fer libéré dans le milieu (Figure IV-38c). En effet, $4,0 \pm 0,9$ mg cm⁻² de fer ont été libérés contre seulement $1,2 \pm 0,1$ mg cm⁻² pour le contrôle abiotique. Le fer du coupon en présence de la coculture est donc libéré dans le milieu jusqu'au 15^e jour d'incubation, puis atteint un plateau, ce qui signifie qu'il n'y a plus de libération de fer jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Sur la base de ces résultats, nous ne pouvons pas parler de biocorrosion. En revanche, visuellement, après 30 jours d'incubation, les flacons et les coupons sont bien d'apparences différentes. La phase aqueuse du test biotique présente une couleur noire intense et le coupon des tâches noires et rouges/orangées (Figure IV-39a). La coloration de la suspension est bien plus intense que celle obtenue avec *D. desulfuricans* seule (Figure IV-16), cela témoigne donc indirectement que *S. putrefaciens* a joué un rôle. Le témoin abiotique ne présente aucune variation de couleur au cours du temps d'incubation que ce soit au niveau du flacon ou du coupon (Figure IV-39b). Cette différence apparente entre le contrôle et la coculture amène à penser que des processus différents liés à des réactions vis-à-vis du coupon ont eu lieu.

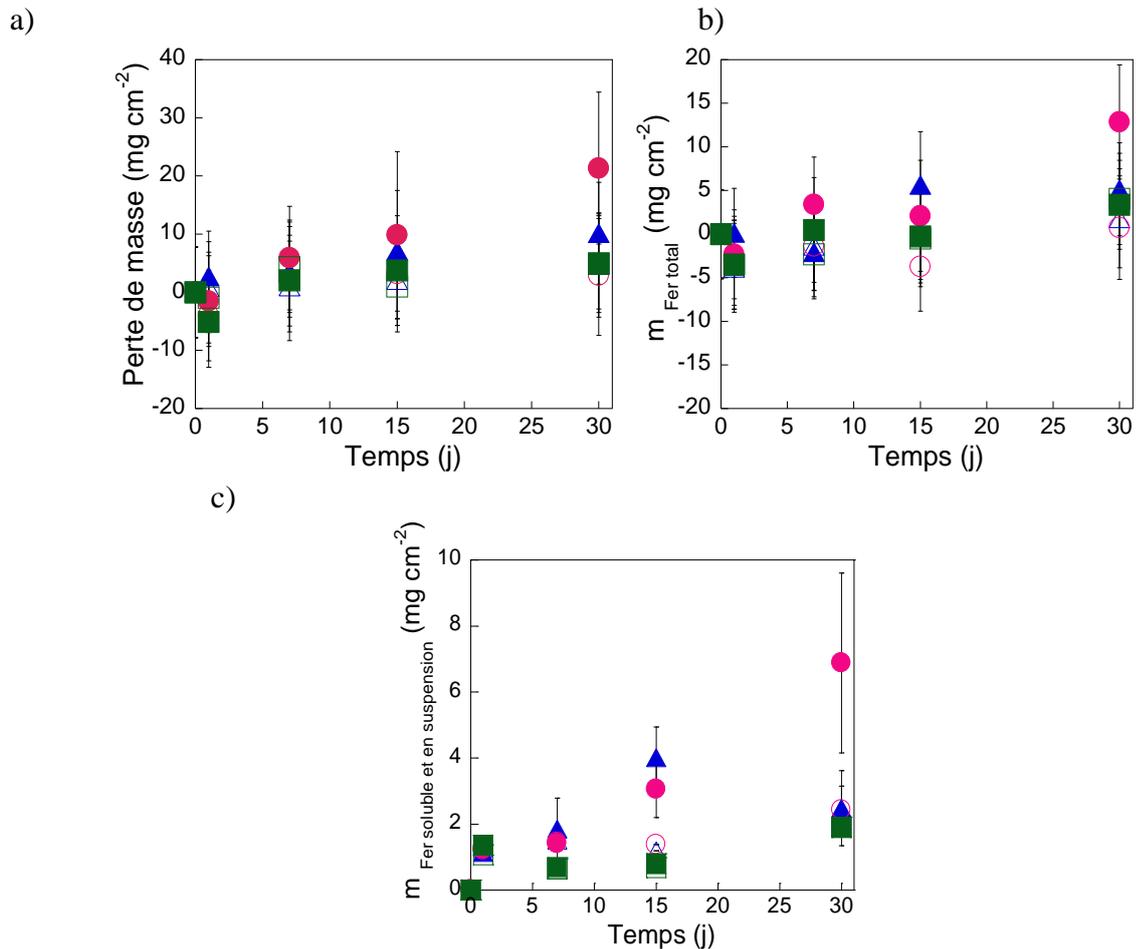


Figure IV-38 : Variation de (a) la perte de masse des coupons en fonte, (b) la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps d'incubation avec *Shewanella putrefaciens* - *Desulfovibrio desulfuricans* (triangle plein bleu), son contrôle abiotique (triangle vide bleu), *Shewanella putrefaciens* (rond plein rose), son contrôle abiotique (rond vide rose) et *Desulfovibrio desulfuricans* (carré plein vert) et son contrôle abiotique (carré vide vert). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-fumarate/sulfate, (n = 3).

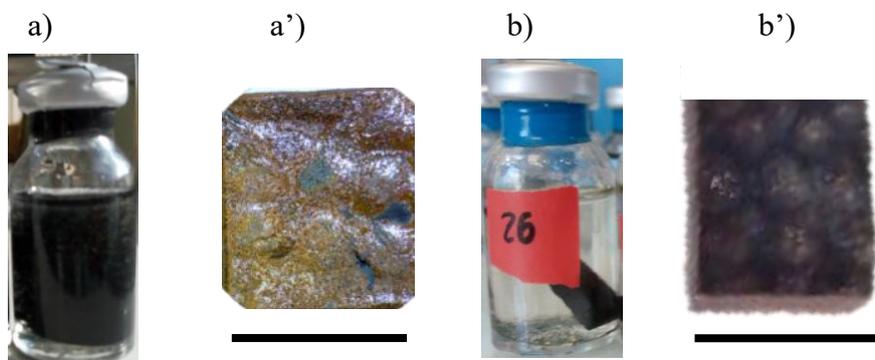


Figure IV-39 : Aspects des suspensions et des coupons au 30^e jour d'incubation dans le milieu M4-fumarate/sulfate (a - a') avec la coculture *Shewanella putrefaciens* – *Desulfovibrio desulfuricans* et (b - b') sans bactéries. La barre représente 1 cm.

L'observation en MEB et en microscopie optique des coupons en contact avec la coculture *S. putrefaciens* + *D. desulfuricans* montrent bien ce qui s'apparente à un biofilm bactérien (Figure IV-40). L'analyse MEB a mis en évidence des sortes de piqûres, la taille des trous varie entre 0,5 et 3,5 μm , soit du même ordre de grandeur que les cellules bactériennes. Les surfaces des coupons sont bien différentes de celles du contrôle abiotique (Figure IV-40c) et de celles après culture en monosouche (Figures IV-4 et IV-17). Cela signifie que les bactéries en coculture ont une action conjointe sur la fonte.

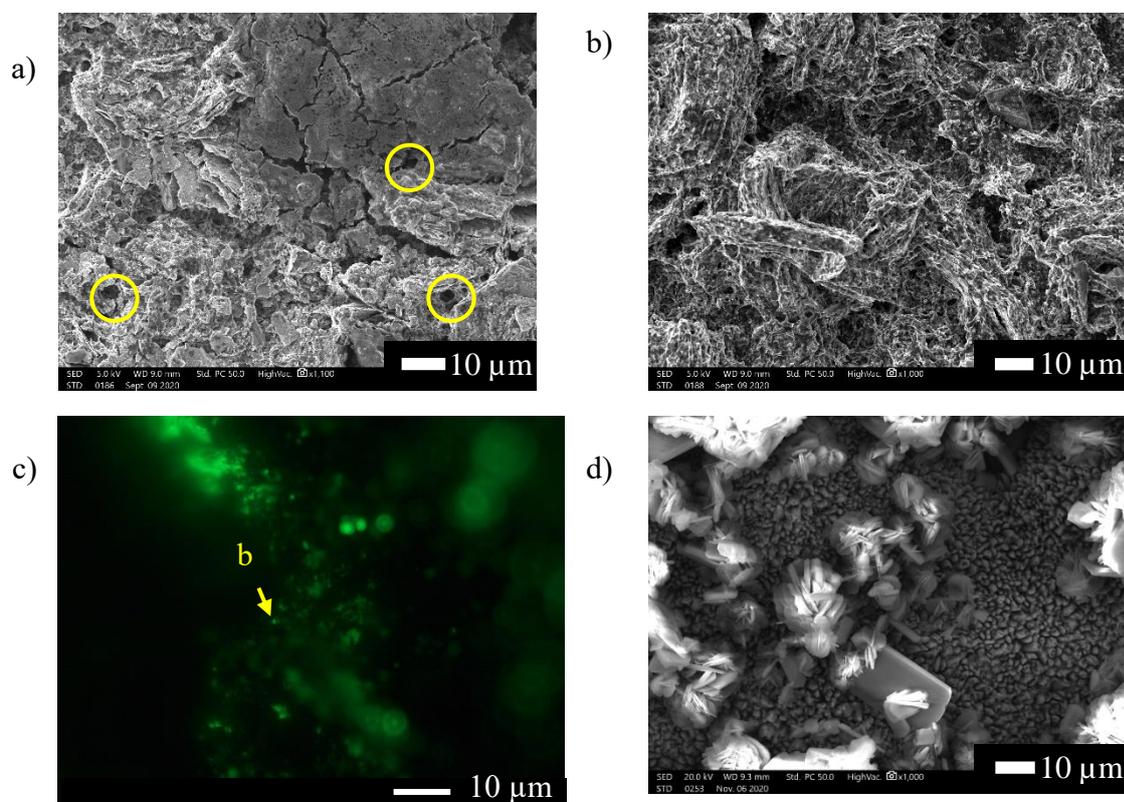


Figure IV-40 : Images en (a) et (b) microscopie électronique à balayage, (c) en microscopie optique sous épifluorescence de la surface d'un coupon incubé avec la coculture *Shewanella putrefaciens* - *Desulfovibrio desulfuricans* au 30^e jour d'incubation et (d) image en microscopie électronique à balayage de la surface d'un coupon incubé dans M4-fumarate/sulfate au 30^e jour d'incubation.

Les ronds montrent ce qui évoque des piqûres, *b* = objet ayant l'apparence d'une cellule bactérienne.

Un sulfure de fer a été détecté en spectroscopie Raman, il s'agit de mackinawite ($\text{Fe}^{\text{II}}_{1+x}\text{S}_y$) cristallisée (avec des bandes à 209 cm^{-1} , 256 cm^{-1} et à 294 cm^{-1}) et nanocristallisée (avec les deux bandes à 209 cm^{-1} et 294 cm^{-1}) (Figure IV-41a). Cet oxyde a été retrouvé en présence de la monosouche *D. desulfuricans* (c.f. IV-2.2). Ce sulfure de fer n'a pas été retrouvé avec le contrôle abiotique (Figure IV-41b).

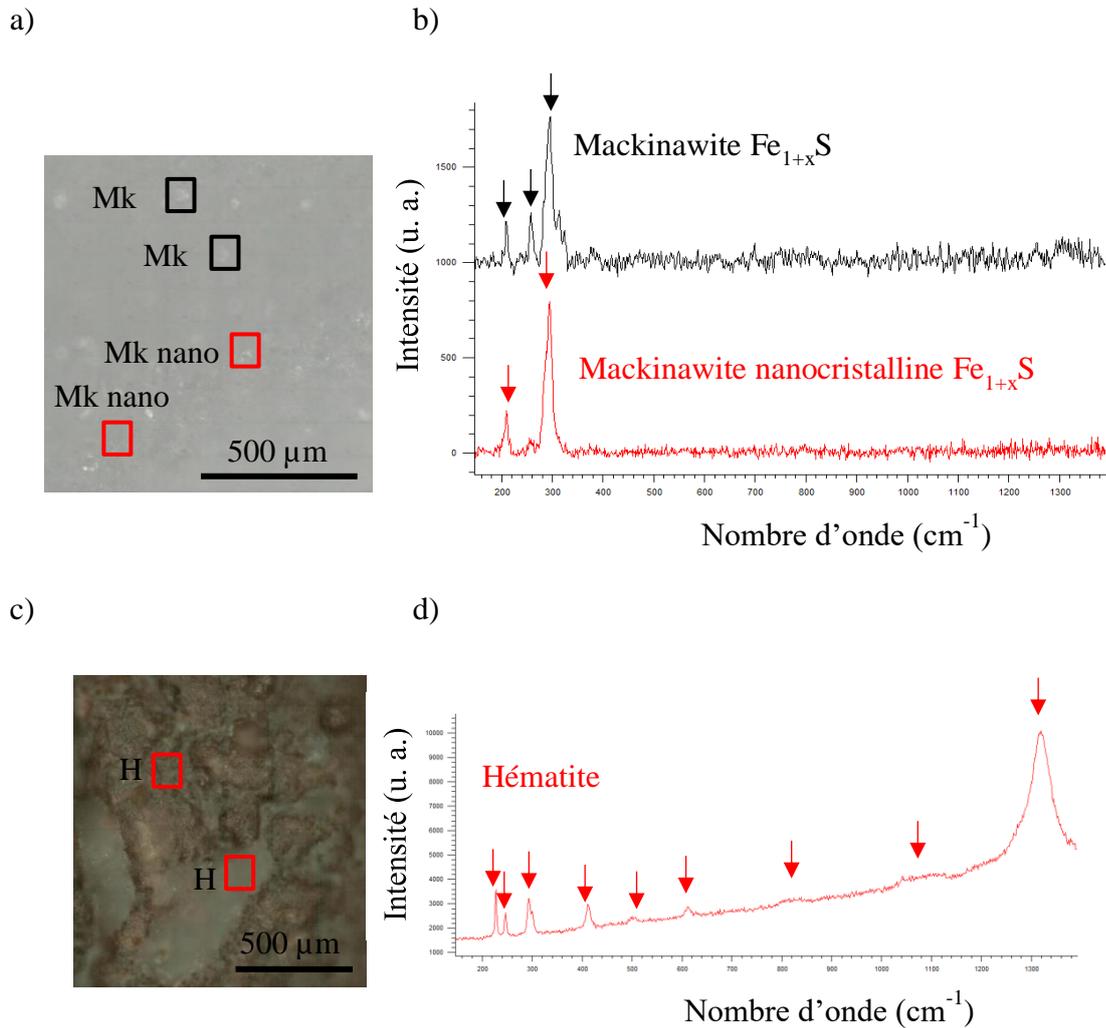


Figure IV-41 : (a) et (c) Surfaces des coupons en fonte brute balayées par spectroscopie Raman et (b) et (d) spectres correspondants enregistrés après 30 jours dans le milieu M4-fumarate/sulfate avec la coculture *Shewanella putrefaciens* - *Desulfovibrio desulfuricans* (a – b) et sans bactéries (c – d).

Mk = mackinawite et Mk nano = mackinawite nanocrystalline et H= hématite.

En DRX, la présence de mackinawite a été confirmée et d'autres oxydes ont été détectés (Figure IV-42). Il s'agit d'hématite, de magnétite et de Fe⁰. Ces oxydes sont typiquement retrouvés sur la couche native et ne sont donc pas forcément liés aux activités bactériennes.

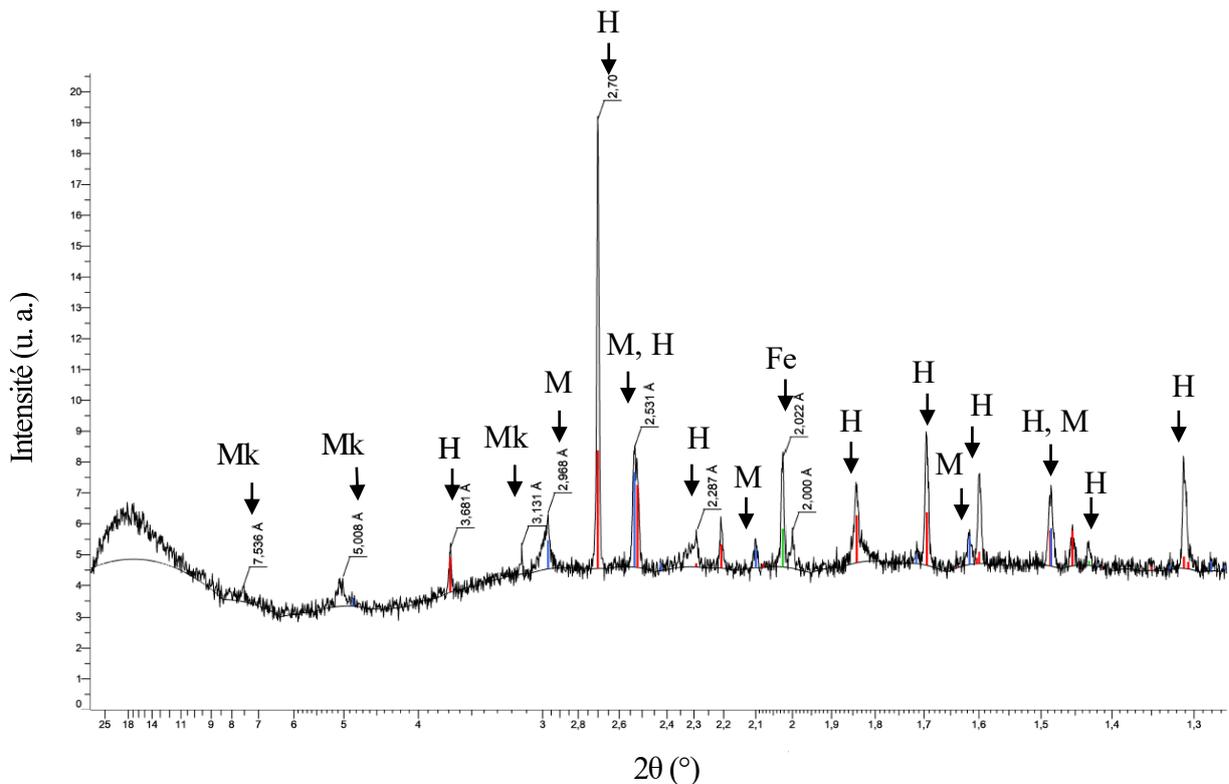


Figure IV-42 : Spectre de diffraction des rayons X d'un coupon en fonte brute incubé avec la coculture *Shewanella putrefaciens* - *Desulfovibrio desulfuricans* après 30 jours à 30 °C dans le milieu M4-fumarate/sulfate.

H = hématite, Mk = mackinawite, M = magnétite et Fe = Fe⁰.

En couplant le métabolisme SRB à IRB, on s'attendait à voir une accélération de la corrosion de la fonte comme cela a été montré avec une étude de Valencia-Cantero et Peña-Cabriales, 2014. Une communauté thermophile de bactéries ferri-réductrices et sulfato-réductrices ont augmenté la corrosion de l'acier dans des conditions microaérobies par déstabilisation du film de sulfure par les IRB. Les IRB ont été capables de fracturer le film protecteur et ont ainsi laissé l'acier accessible aux composés corrosifs tels que le sulfure (Valencia-Cantero et Peña-Cabriales, 2014). Dans notre étude, nous avons tout de même aussi observé des différences entre la coculture et le contrôle abiotique et entre la coculture et les monosouches. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer ces différences :

i) Pendant les 15 premiers jours d'incubation, *S. putrefaciens* déstabilise la couche native d'oxydes, conduisant à une augmentation de fer libéré, ce phénomène est celui observé en culture seule. La quantité de Fe^{II} disponible augmente donc dans le milieu et ce Fe^{II} peut réagir avec le sulfure produit par *D. desulfuricans* (réduction des ions sulfate). Il est vrai que les sulfures biogénérés par *D. desulfuricans* ont pu réagir directement avec le Fe^{III} de la couche native d'oxydes pour former Fe^{III}S et non pas avec le Fe^{II} produit par *S. putrefaciens*. En effet,

$\text{Fe}^{\text{III}}\text{S}$ est un composé qui n'est pas stable, et qui se dissout très rapidement en $\text{Fe}^{\text{II}}\text{S}$. C'est d'ailleurs ce qu'il s'est passé lorsque *D. desulfuricans* a été incubé seule : il y a bien une production de FeS . Cependant, les analyses MEB ont montré que la surface de la fonte en présence de *D. desulfuricans* seule est bien différente de celle en présence de la coculture. Il semblerait donc qu'il y ait un effet conjugué des deux souches lorsqu'elles sont incubées ensemble en présence d'un coupon en fonte. Seul du sulfure de fer, la mackinawite, a été retrouvé en surface du coupon. Ce composé se forme préférentiellement par rapport à la vivianite qui avait été retrouvée lors de la monoculture de *S. putrefaciens* (Rothe *et al.*, 2015 ; Berg *et al.*, 2020).

Après les 15 jours d'incubation, la quantité de fer libéré stagne et cela peut être expliqué par la formation d'un film protecteur de Fe_xS_y . Il est bien connu que les oxydes de fer peuvent avoir un effet protecteur dans le cas de cocultures bactériennes, comme il l'a été montré avec *S. oneidensis* MR-1 dans la coculture avec *D. desulfuricans* sur de l'acier en condition micro-aérobie (Lee *et al.*, 2006). Les produits de corrosion formés par MR-1 sur l'acier constituent une protection vis-à-vis du pouvoir corrosif de *D. desulfuricans*. Une autre étude réalisée sur de l'acier a mis en évidence, en présence d'un enrichissement en SRB issues d'eaux usées d'un gisement de pétrole, l'effet protecteur d'un film de FeS mackinawite (Liu *et al.*, 2000).

Dans cette première hypothèse, deux phénomènes ont lieu. *S. putrefaciens* est active dans un premier temps et permet une corrosion via la déstabilisation de la couche native d'oxydes. Mais son pouvoir corrosif est limité dans un second temps par la génération de FeS provenant de la réduction des sulfates par *D. desulfuricans* qui s'adsorbent en surface et qui viendrait protéger la fonte.

ii) La seconde hypothèse est liée à la compétition entre les deux souches pour former un biofilm. En MEB, aucune cellule bactérienne n'est visible mais des preuves indirectes semblent indiquer qu'un biofilm compact ait été formé et quelques piqûres ont été observées (Figure IV-40). Cela conforte donc l'idée de la formation d'un biofilm sur le coupon en fonte par *D. desulfuricans* puisque, comme nous l'avons montré au § IV-1.2, la présence de cellules bactérienne est indispensable à l'apparition de piqûres. Le biofilm de *D. desulfuricans* empêche alors la colonisation du coupon par *S. putrefaciens*. La SRB, en colonisant préférentiellement le coupon en fonte pourraient ralentir l'activité de l'IRB. Dans ces conditions, la quantité de sulfures solubles biogénérés par *D. desulfuricans* devient supérieure à la quantité de Fe^{II} biogénéré par *S. putrefaciens*. La formation de la vivianite, observée lors de culture monosouche, n'est alors

plus favorable due à la compétition pour le Fe^{II} (Rothe *et al.*, 2015 ; Berg *et al.*, 2020). Et dans notre cas, seul le film protecteur de mackinawite est retrouvé à la surface du coupon en fonte (Singer *et al.*, 2011). De ce fait, l'activité ferriréductrice de *S. putrefaciens* est limitée, ce qui expliquerait le phénomène intermédiaire observé en termes de perte de masse et de masse de fer total.

Pour confirmer l'une des deux hypothèses, il faudrait pouvoir suivre l'évolution de la surface du coupon au cours du temps d'incubation en Raman, DRX et par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). À notre connaissance, c'est la première fois que deux souches bactériennes ont été testées avec de la fonte, sans aucun traitement de surface préalable (i.e. sans polissage) et on observe bien que leur association conduit à d'autres effets et plus précisément à un effet intermédiaire par rapport aux cultures seules.

IV-2.1.3. Corrosion en séquentielle : Shewanella putrefaciens suivie de Desulfovibrio desulfuricans

Cette approche, dite « séquentielle », vise à discriminer le rôle des deux souches dans le processus de corrosion et à apporter des informations supplémentaires concernant l'impact de ces souches en coculture. Le coupon subit dans un premier temps l'action de *S. putrefaciens* (une semaine d'incubation dans le milieu M4-fumarate) puis dans un second temps, ce coupon est placé en présence de la coculture dans un milieu neuf M4-fumarate/sulfate. L'hypothèse de travail est que la bactérie ferriréductrice *S. putrefaciens* déstabilise la couche native d'oxydes de fer par bio-réduction du Fe^{III} (dissolution réductive), la fonte serait alors moins « protégée » et serait alors mieux exposée à l'action corrosive de la bactérie sulfatoréductrice.

Aucune différence significative en termes de corrosion (perte de masse, quantité de fer libéré ou fer total) n'a été observée entre le contrôle abiotique et la coculture (Figure IV-43). Cependant, du fait de l'activité sulfatoréductrice de *D. desulfuricans*, la concentration en SO₄²⁻ a diminué au cours du temps : 14,5 mM de sulfate ont été consommés en quatre jours sur les 21,4 mM disponibles (jour 0 ; Figure IV-43c). D'après l'Équation 17, 2 moles de lactate réagissent avec 1 mole de sulfate. Sur les 30 mM de lactate disponible, 29 mM ont donc été nécessaire pour réduire 14,5 mM de sulfate. La quantité de lactate est donc limitante et *S. putrefaciens* ne semble pas avoir été active lorsque les deux souches ont été mises ensemble. Le fer libéré correspond donc principalement à du fer ferreux provenant de la corrosion de la fonte et non pas de la bio-réduction de Fe^{III} par *S. putrefaciens*.

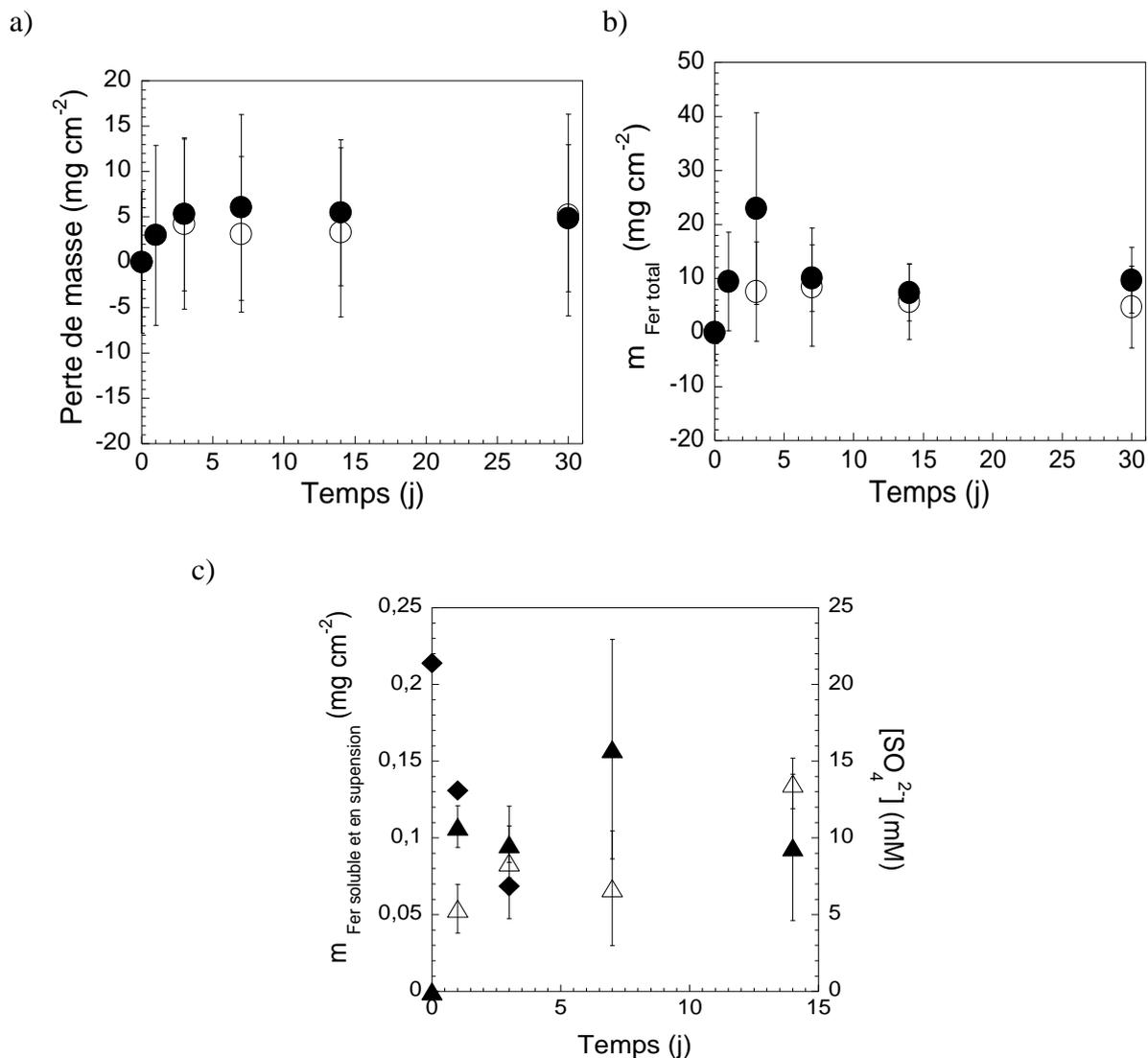


Figure IV-43 : Variation de (a) la perte de masse des coupons en fonte, (b) la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ (triangle) et en SO_4^{2-} (losange) en fonction du temps d'incubation avec *Shewanella putrefaciens* - *Desulfovibrio desulfuricans* (symboles plein) et de leur contrôle abiotique (symbole vide). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-fumarate/sulfate, (n = 3).

Si aucune différence significative n'a pu être mise en évidence par les analyses entre les essais en coculture séquentielle et coculture simultanée, visuellement les suspensions et coupons sont différents. Après 30 jours d'incubation, le milieu et le coupon sont plus noirs en coculture séquentielle par rapport à la coculture simultanée. Il y a présence de petites tâches orangées d'environ 0,5 mm de diamètre et de points blanc de 0,1 mm sur les coupons des cocultures séquentielles (Figure IV-44).

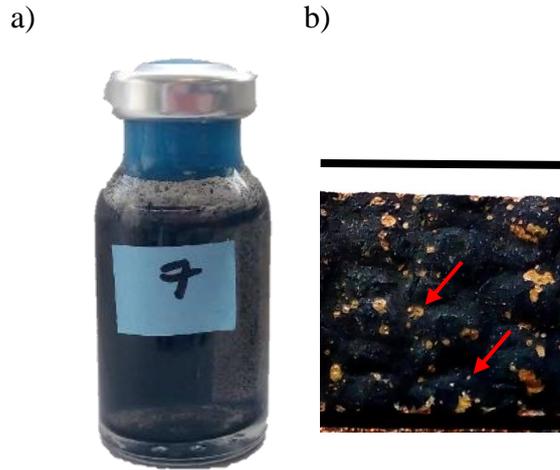


Figure IV-44 : Aspects de (a) la suspension et (b) du coupon au 30^e jour d'incubation de la coculture séquentielle avec *Shewanella putrefaciens* (sept premiers jours) puis *Desulfovibrio desulfuricans* les jours suivants dans le milieu M4-fumarate/sulfate. La barre représente 1 cm, les flèches montrent les tâches orangées et blanches.

Les minéraux identifiés par spectroscopie Raman correspondent à l'hématite, à la mackinawite nano cristalline et à la vivianite (il y a trois bandes à 209 cm⁻¹, 294 cm⁻¹ et 256 cm⁻¹ qui correspondent à la mackinawite et les autres bandes sont associées à la vivianite à 198 cm⁻¹, 230 cm⁻¹, 460 cm⁻¹, 536 cm⁻¹, 575 cm⁻¹, 950 cm⁻¹ et 1050 cm⁻¹ ; Figure IV-45). D'autres points correspondent à un mélange de mackinawite cristallisée et de soufre élémentaire (avec des bandes à 151 cm⁻¹, 218 cm⁻¹ et à 474 cm⁻¹).

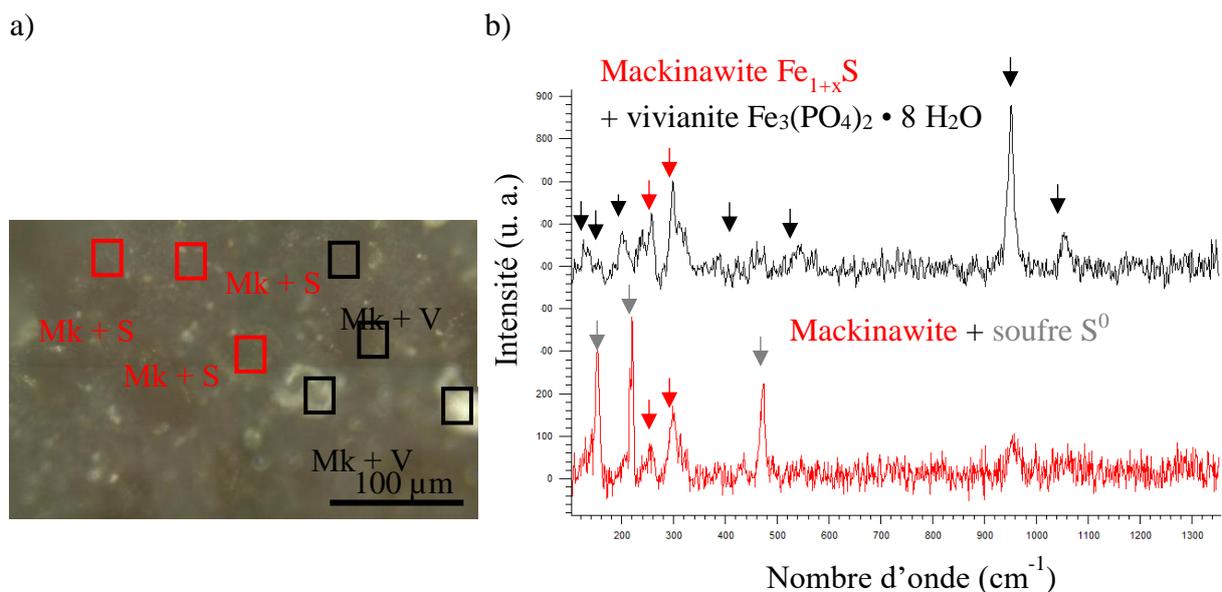


Figure IV-45 : (a) Surface d'un coupon en fonte brute balayée par spectrométrie Raman et (b) spectres correspondants enregistrés après 30 jours dans le milieu M4-fumarate/sulfate avec la coculture séquentielle *Shewanella putrefaciens* suivie de *Desulfovibrio desulfuricans*.

Mk = mackinawite, Mk nano = mackinawite nanocristalline, V = vivianite et S = soufre.

Les composés retrouvés sur les coupons incubés avec la coculture séquentielle sont différents de ceux des cocultures simultanées ou des contrôles abiotiques bien que les cinétiques de corrosion apparentes soient similaires. Seule la mackinawite avait été retrouvée dans l'essai de coculture simultanée (Figure IV-41) mais non la vivianite et le soufre. Comment expliquer la présence de la vivianite et du soufre élémentaire dans l'essai en coculture séquentielle ?

La pré-incubation de *S. putrefaciens* seule conduit à la précipitation d'un film de vivianite. Il a été montré que la production de vivianite en présence de *D. desulfuricans* nécessitait un milieu riche en phosphate, i.e. 10 mM (Weimer *et al.*, 1988). Or, dans nos conditions expérimentales, seulement 1,2 mM de phosphate sont disponibles. La vivianite a donc été synthétisée au cours de la première semaine. A l'introduction de *D. desulfuricans*, le Fe^{II} produit par *S. putrefaciens* réagit préférentiellement avec le sulfure produit par *D. desulfuricans* pour donner FeS. Il a été montré que le sulfure de fer se forme préférentiellement à la vivianite (Rothe *et al.*, 2015 ; Berg *et al.*, 2020). Ceci explique que l'on observe de la mackinawite à la surface du coupon. Après 30 jours d'incubation, la vivianite est toujours identifiable, il semble donc que la vivianite soit restée stable malgré la production des sulfures suite à l'arrivée de la SRB. La présence de soufre élémentaire pourrait s'expliquer par une quantité de sulfure produite supérieure à celle de fer. Le soufre formé précipite à la surface du coupon et conduit à une sorte de stabilité dans le système. Il n'est pas à exclure que l'accumulation des ions sulfure dans le milieu réactionnel a limité l'activité ferriréductrice de *S. putrefaciens*.

Malgré la présence de *S. putrefaciens*, qui, comme nous l'avons montré en monoculture, est un accélérateur de corrosion de la fonte, la dégradation de la fonte, dans cette configuration, est similaire à celle obtenue avec le contrôle abiotique. Il a été montré dans la littérature que la vivianite peut avoir un effet protecteur (Volkland *et al.*, 2000). Le sulfure de fer et en particulier la mackinawite a également été reconnu comme ayant un effet protecteur (Hamilton, 2003 ; Singer *et al.*, 2011).

IV-2.1.4. Corrosion en séquentielle : Desulfovibrio desulfuricans suivie de Shewanella putrefaciens

Dans cette nouvelle approche, un coupon en fonte a été mis en présence de *D. desulfuricans* pendant une semaine dans le milieu M4-sulfate. Ce même coupon a ensuite été placé dans un milieu M4-fumarate/sulfate neuf contenant *S. putrefaciens* et *D. desulfuricans*. Herrera et Videla ont montré que l'introduction de bactéries ferriréductrices dans des eaux industrielles contenant des SRB provoque une exfoliation des produits de corrosion et une protection de la

surface métallique contre la corrosion. Dans ce cas d'étude, les SRB installées en biofilm sur les surfaces métalliques sont reconnues pour être corrosives et les IRB provoquent en réalité une destruction de la niche écologique (i.e. les SRB). Il y a alors un ralentissement de la corrosion (Herrera et Videla, 2009).

L'analyse du coupon à 15 jours montre une perte de masse de la fonte et une quantité de fer total correspondant à une biocorrosion. La quantité de fer total est 3 fois plus importante dans le cas de l'expérience en milieu biotique ($8 \pm 6 \text{ mg cm}^{-2}$ pour le contrôle contre $22 \pm 8 \text{ mg cm}^{-2}$ pour l'essai). De même, la concentration en fer libéré du test biotique augmente au cours du temps pour atteindre $0,4 \pm 0,2 \text{ mg cm}^{-2}$ au jour 14 alors que pour le contrôle abiotique elle était de $0,10 \pm 0,01 \text{ mg cm}^{-2}$ (Figure IV-46c).

En parallèle, la concentration en SO_4^{2-} diminue, initialement à $21,4 \pm 0,5 \text{ mM}$, elle passe à $4 \pm 5 \text{ mM}$ au jour 7 (Figure IV-46c) soit une consommation par *D. desulfuricans* de 17 mM environ de sulfate en sept jours. D'après l'Équation 17, 2 moles de lactate réagissent avec 1 mole de sulfate. Dans cette expérience, 30 mM de lactate ont été ajoutés autorisant donc la réduction en théorie de 15 mM de sulfate. Or au minimum 17 mM ont été réduits, il est probable que des sources endogènes d'électrons aient été utilisées par la souche pour expliquer cet écart ou que cela provienne des incertitudes sur les mesures. Cela indique que *S. putrefaciens* n'a pas pu utiliser le lactate comme source d'électrons car entièrement consommé par la souche SRB pour la réduction des sulfates.

Visuellement, le flacon et le coupon présentent une couleur noire intense, caractéristique du sulfure de fer et des taches orangées caractéristiques d'oxydes ferriques (Figure IV-47).

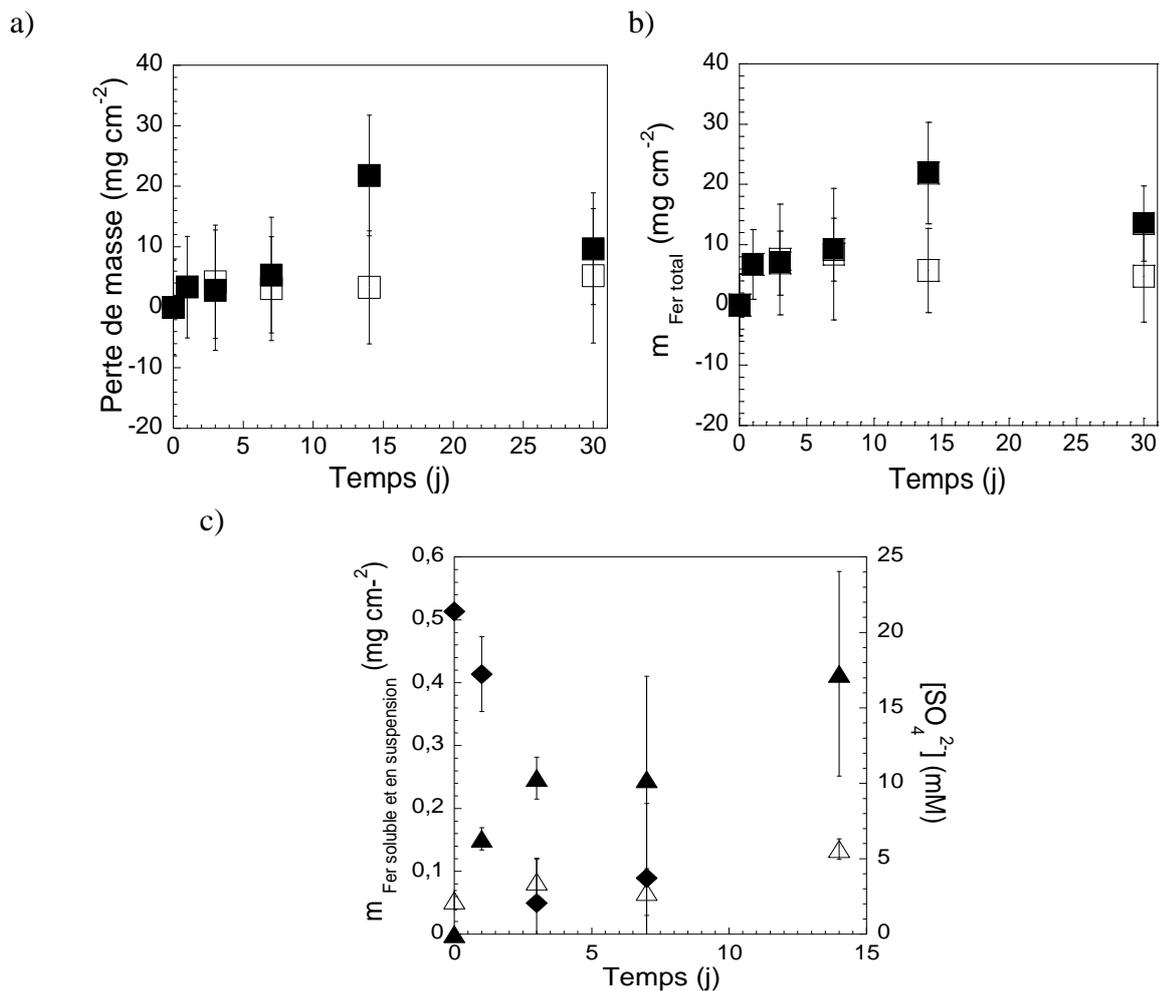


Figure IV-46 : Variation de (a) la perte de masse des coupons en fonte, (b) la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ (triangle) et en SO_4^{2-} (losange) en fonction du temps d'incubation des coupons pré-incubés une semaine avec *Desulfovibrio desulfuricans* puis avec *Shewanella putrefaciens* et *Desulfovibrio desulfuricans* (symboles pleins) et leur contrôle abiotique (symboles creux). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-fumarate/sulfate.

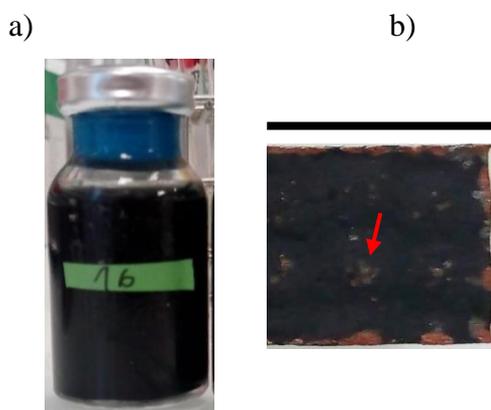


Figure IV-47 : Aspects de (a) la suspension et (b) du coupon au 30^e jour d'incubation de la coculture séquentielle avec *D. desulfuricans* (sept premiers jours) puis *Shewanella putrefaciens* les jours suivants dans le milieu M4-fumarate/sulfate. La barre représente 1 cm, la flèche indique une tâche orangée.

La mackinawite (Fe^{II}S) et un mélange de mackinawite nanocristalline et de greigite (Fe^{II}Fe^{III}₂S₄) ont été identifiés en spectroscopie Raman (Figure IV-48a). La présence de pyrite a également été soupçonnée par les bandes caractéristiques à 342 cm⁻¹ et 382 cm⁻¹. Les tâches orangées correspondent à de la maghémite nanocristalline (Figure IV-48b). Enfin, du soufre élémentaire a été retrouvé proche de la mackinawite (Figure IV-48c).

La synthèse des sulfures de fer varie en fonction de divers facteurs comme le pH, le donneur d'électrons, l'excès ou non de sulfure (Zhou *et al.*, 2014) et la concentration en Fe^{II}. La mackinawite est le sulfure de fer qui se forme en premier dans des conditions de réduction des sulfates (Abdelouas *et al.*, 1999 ; Williams *et al.*, 2009). C'est en fonction du rapport [Fe^{II}]/[S^{II-}] et donc des arrangements des atomes de Fe, qu'il y aura transformation de la mackinawite FeS (rapport de 1) en greigite Fe₃S₄ (rapport de ¾) et en pyrite FeS₂ (rapport de ½) (Bourdoiseau *et al.*, 2010). Dans nos conditions expérimentales, un mélange de différents sulfures de fer a été détecté par spectroscopie Raman. Il s'agit de la mackinawite, de la greigite et éventuellement de la pyrite. La transformation de la mackinawite montre que le rapport [Fe^{II}]/[S^{II-}] a diminué ; la concentration en sulfure a augmenté au dépend de celle en fer. La forte concentration en sulfure aurait contribué à la transformation de la mackinawite en greigite, par une réaction directe entre le sulfure biogénéré et le FeS selon l'Équation 27) (Zhou *et al.*, 2014).



De plus, la surface des cellules bactériennes et les EPS seraient favorables à la croissance et l'agrégation de la mackinawite selon Picard *et al.* (2018). En effet, un encroûtement des cellules bactériennes par précipitation du minéral à la surface des cellules favorise la nucléation des sulfures de fer.

Au 20^e jour d'incubation, une augmentation significative de la perte de masse et de la concentration en fer total par rapport au contrôle abiotique a eu lieu. Avec la coculture, nous avons mis deux fois plus de lactate qu'avec la culture mono-souche, ce qui a permis une plus forte activité de *D. desulfuricans* par rapport à lorsqu'elle est seule et donc à une déstabilisation du système plus conséquente et à une production accrue de sulfure. Une forte concentration en sulfure a probablement permis de déstabiliser le film dense et protecteur de mackinawite (King et Miller, 1971 ; Mara et Williams, 1972). De plus, les piqures, provoquées par la bactérie sulfatoréductrice, ont certainement permis un accès plus important à la fonte et ont contribué à une hausse du taux de corrosion via le pouvoir corrosif du milieu de culture.

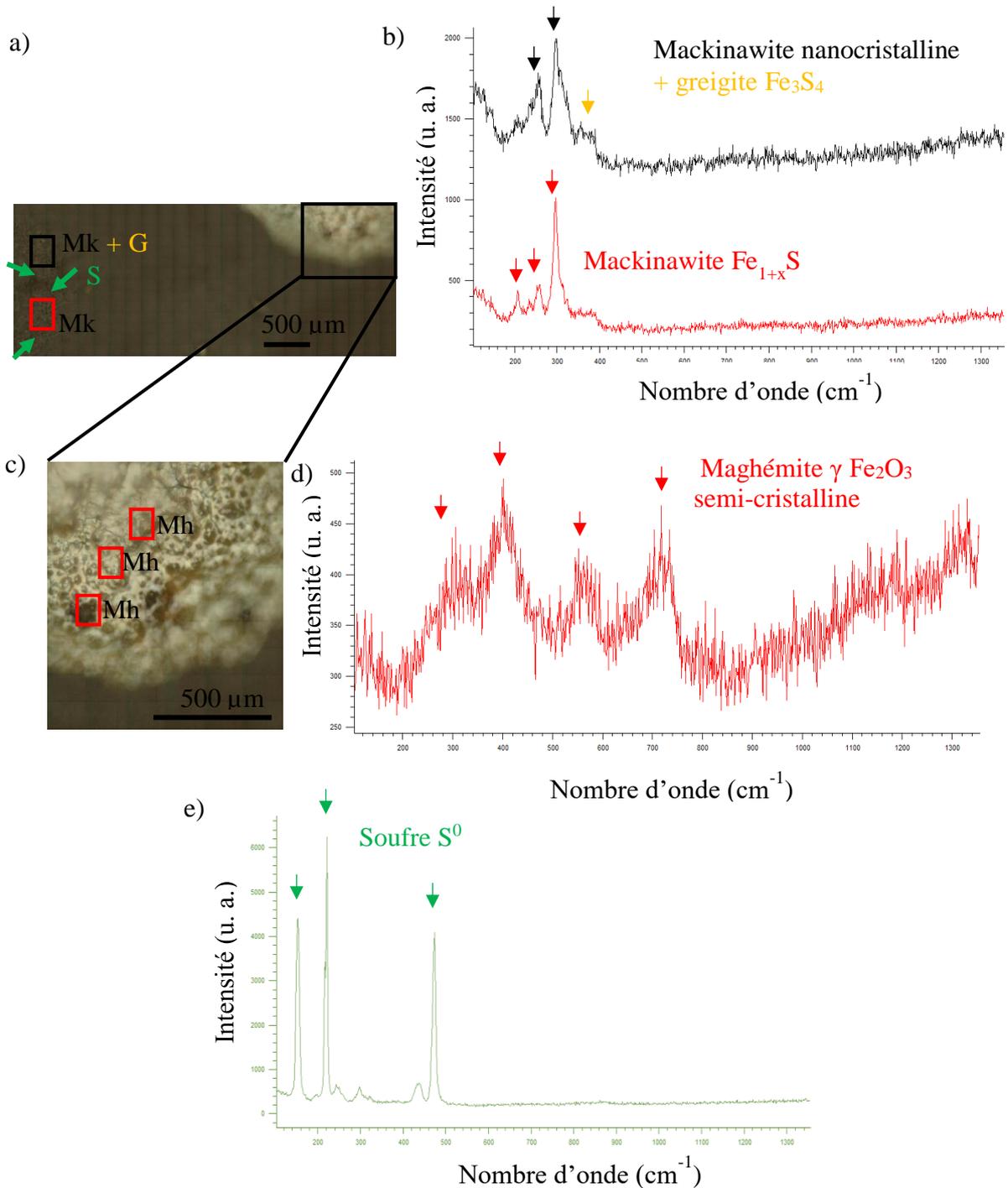


Figure IV-48 : (a) et (c) Surfaces des coupons en fonte brute balayées par spectroscopie Raman et (b), (d) et (e) spectres correspondants enregistrés après 30 jours dans le milieu M4-fumarate/sulfate avec la coculture *Shewanella putrefaciens* - *Desulfovibrio desulfuricans* incubée en différé.

La zone (c) et son spectre correspondant (d) correspondent à une zone de (a) et le spectre (e) à la flèche verte de la zone (a).

Mk = mackinawite, Mk nano = mackinawite nanocrystalline Mh = maghémite et S = soufre.

Contrairement à *D. desulfuricans*, *S. putrefaciens* n'a pas eu d'activité. Nous avons avancé deux hypothèses. Soit les oxydes de fer de la couche native n'ont plus été accessibles pour

S. putrefaciens. En effet, *D. desulfuricans* a colonisé le coupon en fonte pendant sa semaine de pré-incubation et a formé un film de sulfure de fer compact. Par conséquent, *D. desulfuricans* a pu utiliser tout le lactate au détriment de *S. putrefaciens*. Soit la concentration en sulfure produit par *D. desulfuricans* dans le milieu d'incubation a rendu le milieu toxique pour *S. putrefaciens*.

IV-2.1.5. Synthèse sur l'effet de la coculture Shewanella putrefaciens et Desulfovibrio desulfuricans sur la corrosion de la fonte

Les trois expérimentations menées avec les cocultures de *S. putrefaciens* et *D. desulfuricans* ont mis en évidence des réactions différentes avec le support en fonte selon les modes de culture.

- Lorsque les souches sont incubées simultanément *S. putrefaciens* réduit le Fe^{III} en Fe^{II} qui semble aussitôt réagir avec le sulfure biogénéré par *D. desulfuricans* (Figure IV-49a ①). La mackinawite précipite en un film qui serait « protecteur » du reste de la fonte (Figure IV-49a ②). Dans cette configuration, la mackinawite est le seul minéral retrouvé, ce qui suggère que le rapport [Fe^{II}]/[S^{-II}] est resté constant au cours des 30 jours d'incubation. En effet, lorsque la concentration en S^{-II} augmente, de la greigite ou de la pyrite sont retrouvés (Bourdoiseau *et al.*, 2008). Cela suggère que *S. putrefaciens* est restée active et a donc produit le Fe^{II} nécessaire à la réaction avec le S^{-II}.
- Lorsque *S. putrefaciens* est pré-incubée une semaine avant la coculture, le Fe^{II} biogénéré par *S. putrefaciens* précipite en vivianite avec le phosphate présent (Figure IV-49b ①). Une fois *D. desulfuricans* ajoutée, le sulfure produit réagit avec le Fe^{II} disponible (et sans doute aussi du Fe^{III}) et forme un film de sulfure de fer (e.g. la mackinawite) (Figure IV-49b ②). Il n'est pas à exclure que la vivianite produite par *S. putrefaciens* ait entraîné un effet protecteur comme l'ont montré Volkland *et al.*, (2000) ou que l'accumulation de sulfure ait impacté l'activité de *S. putrefaciens*.
- Enfin, lorsque *D. desulfuricans* est incubée avant la coculture, le même phénomène que ci-dessus semble se produire, à savoir la production d'un film, ici du sulfure de fer, qui protège la surface du coupon de la réaction avec *S. putrefaciens* (Figure IV-49c ①). *S. putrefaciens* ne pourrait pas avoir accès au Fe^{III} du fait de ce film protecteur de FeS ou bien elle est dans un environnement toxique (trop de sulfure) qui ne lui permet pas d'avoir une activité (Figure IV-49c ②). *D. desulfuricans* génère, quant à elle, des ions

sulfures tant que les ions sulfates sont présents ce qui permet aux minéraux d'évoluer en greigite (Figure 49c ③).

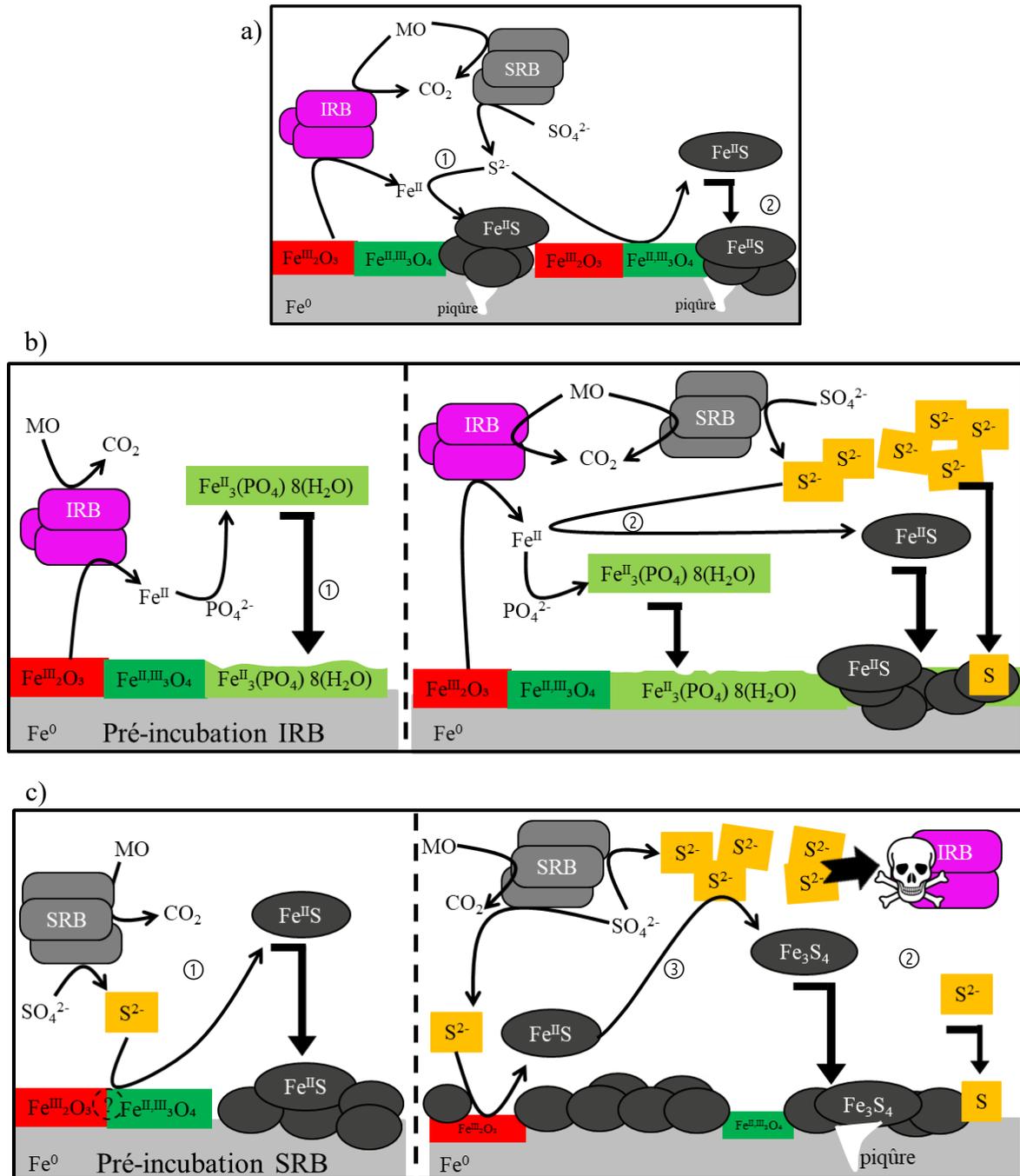


Figure IV-49 : Schématisation des mécanismes de corrosion de la fonte à 30 °C, en anaérobie (N₂ 100 %) et en milieu M4 en présence de (a) la coculture simultanée, (b) la coculture séquentielle *Shewanella putrefaciens* (7 jours) suivie de *Desulfovibrio desulfuricans* et (c) la coculture séquentielle *Desulfovibrio desulfuricans* (7 jours) suivie de *Shewanella putrefaciens*. IRB = bactérie ferriréductrice, SRB = bactérie sulfatoréductrice, MO = matières organiques.

IV-2.2. Corrosion de la fonte influencée par les bactéries ferri-réductrice *Shewanella putrefaciens* et nitrate réductrice *Klebsiella mobilis*

La corrosion de la fonte a été suivie en présence de *S. putrefaciens* et *K. mobilis*. Les nitrites biogénérés par des NRB peuvent en effet contribuer à augmenter le phénomène de corrosion de matériaux à base de fer en mobilisant le Fe^{II} produit par des IRB. D'un autre côté, les interactions entre les IRB et NRB ne mènent pas forcément à une augmentation de la corrosion. En effet, il a été montré qu'un rapport nitrite/fer ferreux élevé entraîne la formation de monoxyde d'azote, qui est un composé toxique pour les bactéries (Kielemoes *et al.*, 2000). L'environnement devient alors nuisible pour les microorganismes et l'impact des bactéries sur la corrosion est donc limité.

IV-2.2.1. Croissance et activité de Shewanella putrefaciens et Klebsiella mobilis en coculture

La concentration bactérienne de chaque souche dans le milieu M4-nitrate sans coupon en fonte a été suivie par la densité optique ($\text{DO}_{600\text{nm}}$). Il s'est avéré que la respiration sur nitrate avec le lactate comme donneur d'électrons permet à *S. putrefaciens* d'assurer sa croissance (Figure IV-50a) et son activité (Figure IV-12). *K. mobilis* et *S. putrefaciens* ont donc toutes les deux la capacité de réduire les nitrates en nitrites et devraient donc être en compétition dans le milieu M4-nitrate. La quantité initiale de nitrate a donc été doublée dans le milieu (47 mM) pour éviter qu'elle ne devienne limitante. Les concentrations en NO_3^- et NO_2^- ont été suivies dans la coculture en présence d'un coupon en fonte (Figure IV-50b). La concentration en NO_3^- diminue au cours du temps ; de $47,0 \pm 0,4$ mM à $1,8 \pm 0,4$ mM en 7 jours parallèlement à l'augmentation de la quantité de NO_2^- qui atteint 28 ± 5 mM en 7 jours. La quasi-totalité des nitrates est donc consommée (< 4 % restant à sept jours). D'après la stœchiométrie de la réduction des nitrates par le lactate, 1 mole de lactate réagit avec 2 moles de nitrates (Équation 19) et comme on considère que 20 % du lactate sont consacrés à l'assimilation du carbone par la biomasse (d'après une étude de Caccavo *et al.*, 1994 sur *Geobacter sulfurreducens* en conditions similaires), la concentration en lactate disponible était donc de 24 mM. Ainsi, la totalité du lactate a été consommée pour la réduction des nitrates.

Pour savoir si l'une des deux souches a pris l'avantage sur l'autre, nous avons quelques pistes. D'une part, on a observé en monoculture et dans le milieu de culture M4-nitrate que la croissance de *K. mobilis* est plus importante car, après 72 h, la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atteinte est le double de celle obtenue pour *S. putrefaciens* ($0,20 \pm 0,02$ contre $0,11 \pm 0,01$; Figure IV-50a) et le temps

de génération de *K. mobilis* est de 12 h, alors que celui de *S. putrefaciens* est de 17 h. D'autre part, la vitesse de consommation de nitrate par *K. mobilis* en présence de coupon est deux fois plus élevée que pour *S. putrefaciens* : $0,9 \text{ mM h}^{-1}$ (Figure IV-25) contre $0,4 \text{ mM h}^{-1}$ (Figure IV-12). La coculture a, par ailleurs, une consommation de $0,9 \text{ mM h}^{-1}$ en présence de coupon qui correspond bien à la vitesse d'utilisation du nitrate de *K. mobilis* (Figure IV-50b). Il est donc très vraisemblable que ce soit *K. mobilis* qui ait pris l'avantage sur *Shewanella*, en tout cas pour ce qui concerne la réaction avec les nitrates.

En parallèle, on observe que la concentration en Fe^{II} libérée augmente pour atteindre un maximum après 3 jours quelle que soit les conditions expérimentales. C'est avec *S. putrefaciens* que la quantité maximale est dosée ($0,6 \pm 0,1 \text{ mg cm}^{-2}$). Elle est 2 fois supérieure à celle retrouvée lorsque *K. mobilis* est cultivée seule ($0,3 \pm 0,1 \text{ mg cm}^{-2}$). Avec la coculture, la quantité est assez peu différente et égale à $0,4 \pm 0,1 \text{ mg cm}^{-2}$. Ces résultats sont donc fortement en faveur d'une activité ferriréductrice par *S. putrefaciens* limitée au sein de cette coculture. De plus, lors de la respiration des nitrates par *Shewanella*, il y a répression de l'expression de ses cytochromes, limitant ainsi la possibilité de réduire le fer ferrique (Pelmont, 2005).

Comme la quantité de nitrites retrouvée dans la coculture des bactéries nitrate réductrices n'est pas stœchiométrique (i.e seulement 28 mM comparée à la quantité attendue égale à la quantité initiale de NO_3^- qui est de 47 mM), que tout le nitrate a été consommé et que l'assimilation de l'azote par la biomasse peut être exclue car négligeable ($< 1 \mu\text{M}$), alors il est possible d'avancer l'hypothèse que les 19 mM d'azote manquant ont été transformés en d'autres espèces azotés ou ammonium, probablement NO, N_2O voire N_2 . Ni *Shewanella* ni *Klebsiella* n'étant capables d'assurer une dénitrification complète, ces réactions pourraient résulter d'une interaction avec le Fe^{II} présent à la surface du coupon, mais là encore, les quantités de fer ayant réagi ne sont pas en accord, du fait de la stœchiométrie, avec les 19 mM d'azote manquants comme le confirment les suivis des indicateurs de corrosion (perte de masse et le fer total) ci-après (cf. § IV-2.2.2).

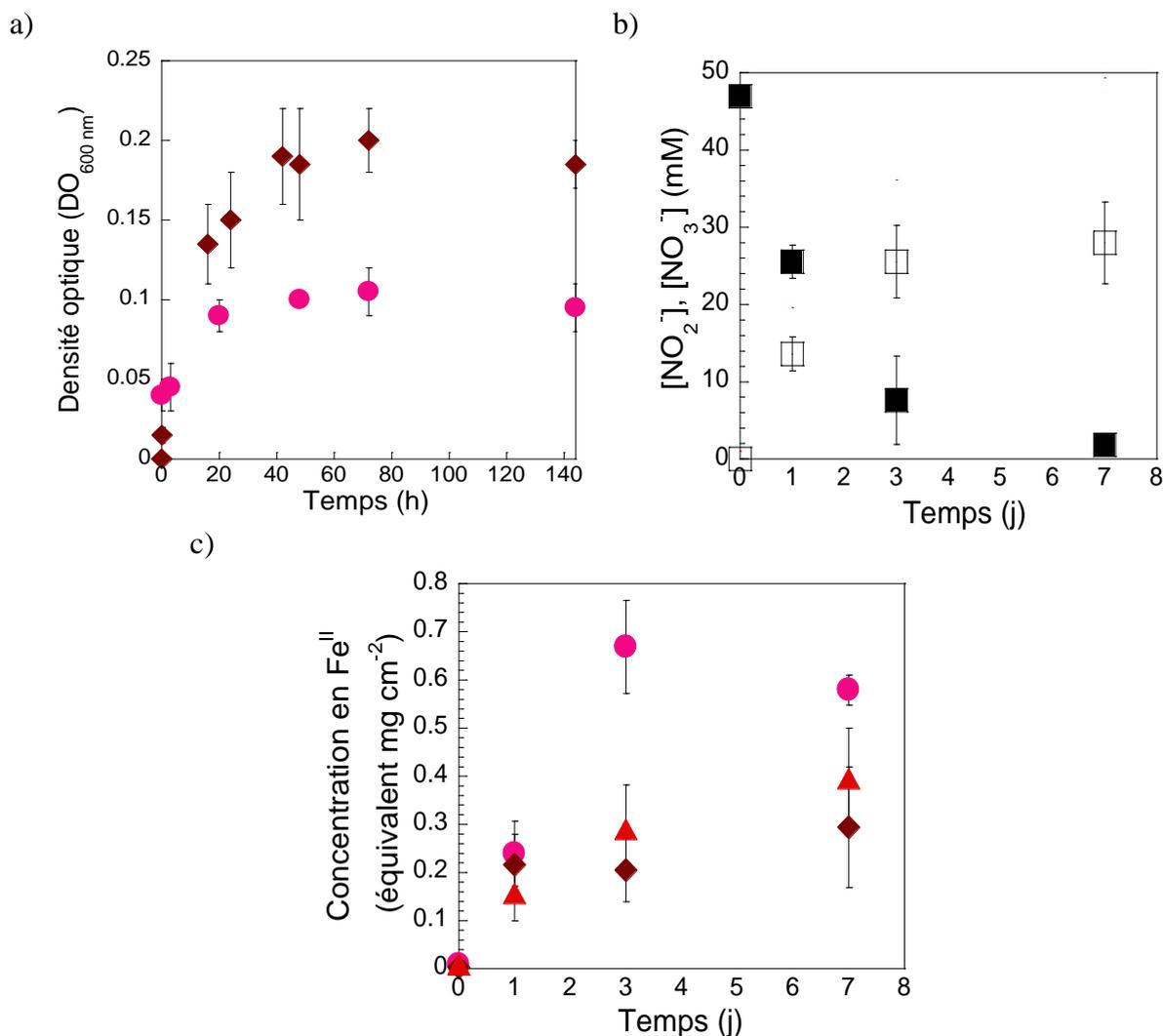


Figure IV-50 : (a) Variation de la DO₆₀₀ de la culture de *Shewanella putrefaciens* (rond) et *Klebsiella mobilis* (losange) en fonction du temps d'incubation sans coupon en fonte à 30 °C dans le milieu M4-nitrate, (b) suivi de la concentration en NO₃⁻ (carré plein), NO₂⁻ (carré vide) dans la coculture avec coupon en fonte à 30 °C dans le milieu M4-nitrate et c) suivi de la concentration en Fe^{II} avec *Klebsiella mobilis* (losange), *Shewanella putrefaciens* (rond) et la coculture (triangle) avec coupon en fonte à 30 °C dans le milieu M4-nitrate, (n = 3).

IV-2.2.2. Corrosion de la fonte en coculture de *Shewanella putrefaciens* et *Klebsiella mobilis*

En présence de la coculture de *K. mobilis* et *S. putrefaciens*, la perte de masse et le fer total sont identiques à ceux des contrôles abiotiques (Figure IV-51). La corrosion, qui peut être qualifiée de très légère dans les deux cas, ne peut pas être qualifiée de « biocorrosion ». De plus, la concentration en fer libéré est significativement plus élevée pour le contrôle abiotique que pour le test biotique ($0,6 \pm 0,1$ mg cm⁻² contre $0,2 \pm 0,1$ mg cm⁻² au trentième jour d'incubation)

(Figure IV-51c), ce qui laisse supposer que la coculture est associée à la formation de produits protecteurs des coupons.

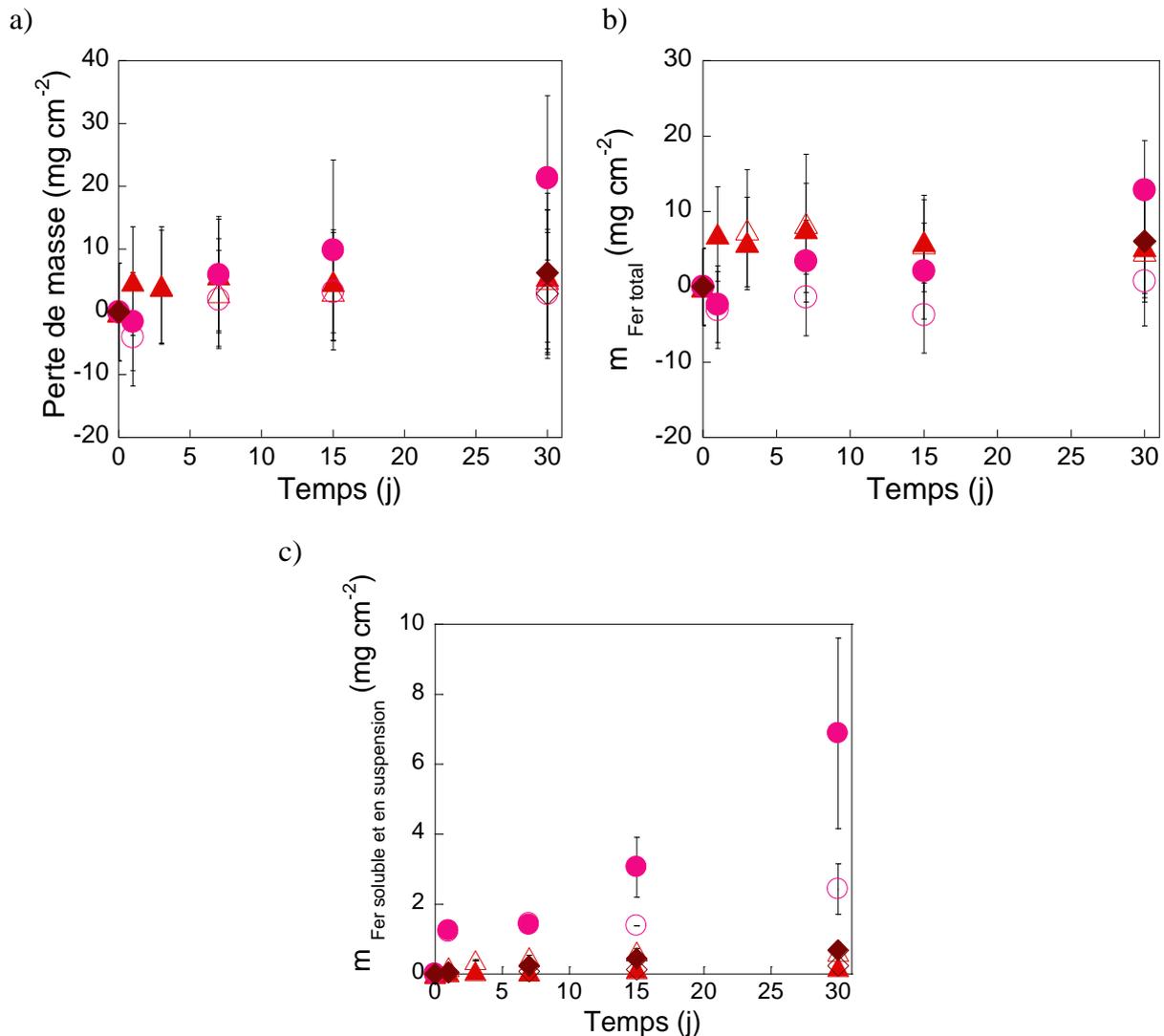


Figure IV-51 : Variation de (a) la perte de masse des coupons en fonte, (b) la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps d'incubation avec *Shewanella putrefaciens* – *Klebsiella mobilis* (triangle plein rouge), son contrôle abiotique (triangle vide rouge), *Shewanella putrefaciens* (rond plein rose), son contrôle abiotique (rond vide rose) et *Klebsiella mobilis* (losange plein brun) et son contrôle abiotique (losange vide brun). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-nitrate, (n = 3).

Les suspensions en présence de la coculture sont devenues de couleur rouille (Figure IV-52) comme pour la culture pure de *K. mobilis* (Figure IV-26). En revanche, la couleur apparente du contrôle abiotique n'a pas varié.

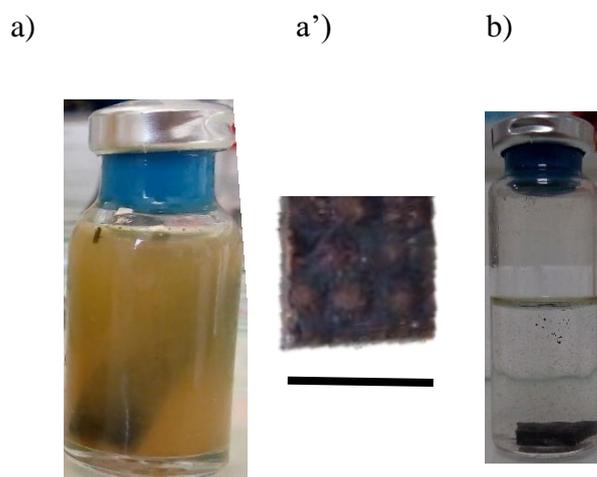


Figure IV-52 : Aspects des suspensions et du coupon au 30^e jour d'incubation dans le milieu M4-nitrate (a - a') avec la coculture *Shewanella putrefaciens* – *Klebsiella mobilis* et (b) sans bactéries. La barre représente 1 cm.

L'analyse MEB des coupons après 30 jours d'incubation montre deux types d'objets s'apparentant à des bactéries en présence de la coculture, d'une part des bâtonnets d'environ 3 - 4 μm en accord avec la morphologie de *S. putrefaciens* et, d'autre part des bâtonnets courts plus arrondis d'environ 1 μm , plutôt en accord avec celle de *K. mobilis* (Figure IV-53a). L'analyse en microscopie optique sous épifluorescence a confirmé la colonisation bactérienne du coupon (Figure IV-53b) mais il n'a pas été possible de savoir si l'une des deux souches a pris le dessus sur l'autre. Pour le vérifier, il aurait fallu faire des tests de qPCR, avec des amorces spécifiques de chaque souche.

L'analyse de surface par spectroscopie Raman a révélé la présence d'hématite ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$), et de maghémite ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$) (Figure IV-54). Cette observation est similaire à celle obtenue avec la souche pure *K. mobilis* (Figure IV-28).

La DRX confirme la présence d'hématite. De la magnétite ainsi que du Fe^0 ont été caractérisés, ils proviennent probablement de la couche native d'oxydes et de la fonte (Figure IV-55).

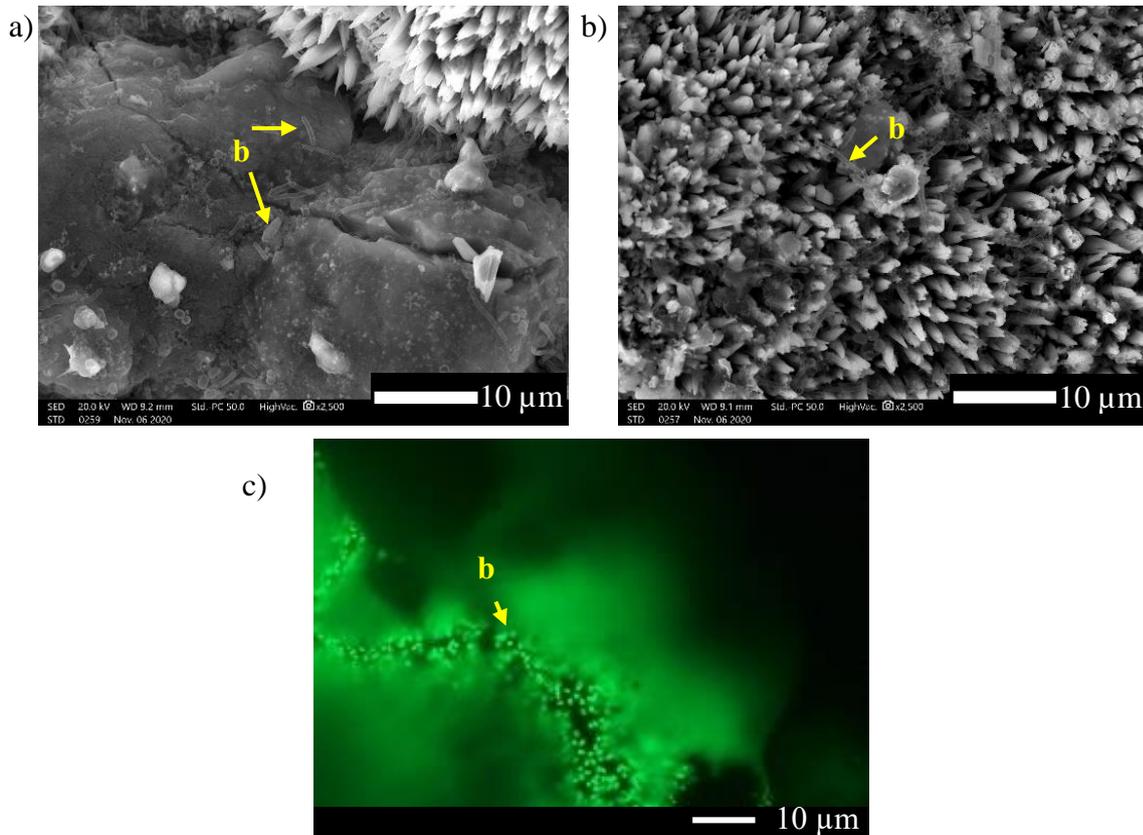


Figure IV-53 : Images (a) et (b) en microscopie électronique à balayage et (c) en microscopie optique sous épifluorescence de la surface d'un coupon incubé avec la coculture *Shewanella putrefaciens* - *Klebsiella mobilis* pendant 30 jours, *b* = objet ayant l'apparence d'une cellule bactérienne.

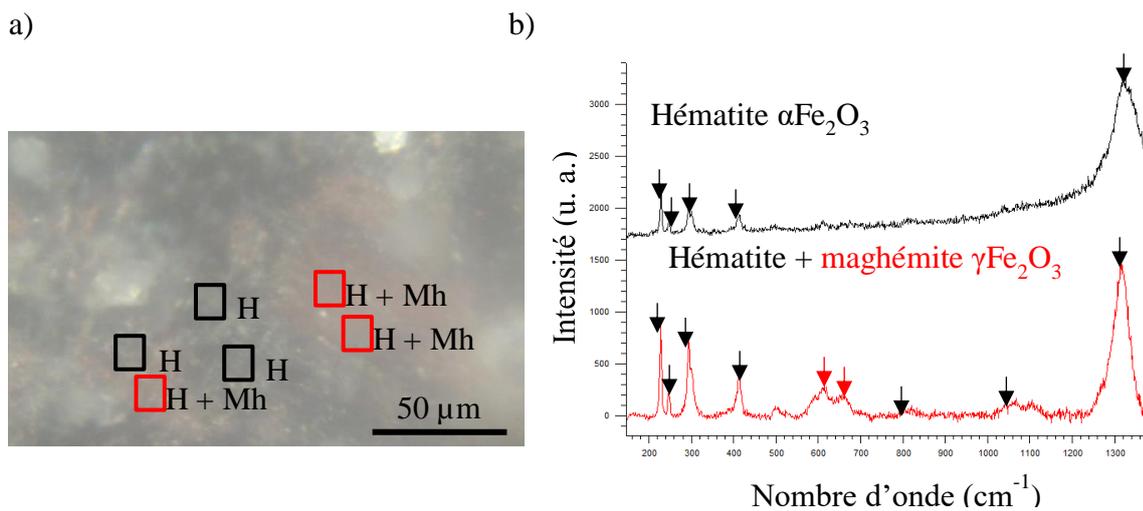


Figure IV-54 : (a) Surface d'un coupon en fonte brute balayée par spectrométrie Raman et (b) spectres correspondants enregistrés après 30 jours dans le milieu M4-nitrate avec la coculture *Shewanella putrefaciens* - *Klebsiella mobilis*.

H = hématite et Mh = maghémite.

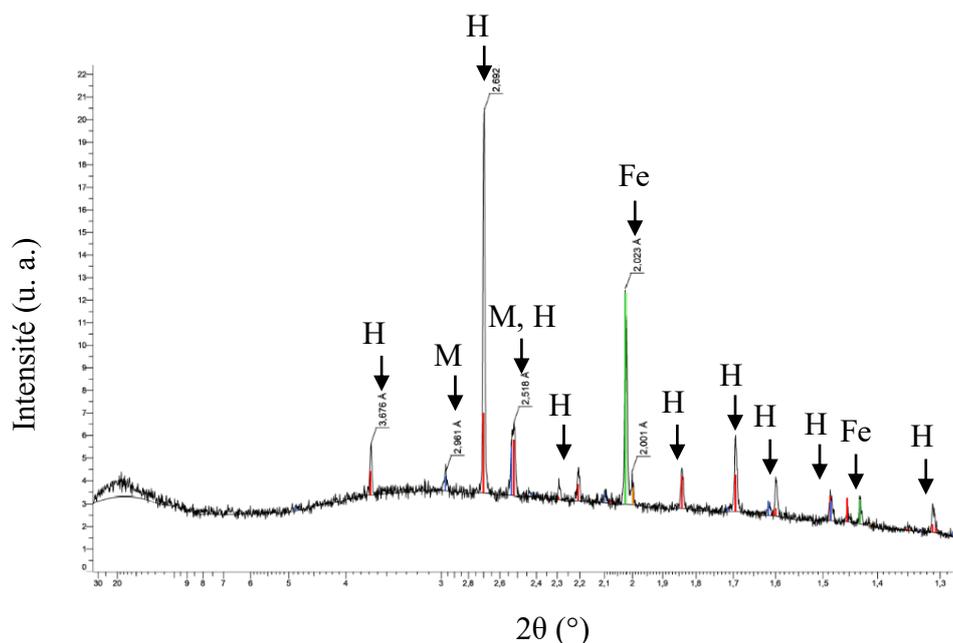


Figure IV-55 : Spectre de diffraction des rayons X d'un coupon en fonte brute incubé avec la coculture *Shewanella putrefaciens* - *Klebsiella mobilis* après 30 jours à 30 °C dans le milieu M4-nitrate.

H = hématite, M = magnétite et Fe = Fe⁰.

IV-2.2.3. La compétition entre *Shewanella putrefaciens* et *Klebsiella mobilis*

La corrosion de la fonte en contact avec la coculture *K. mobilis* + *S. putrefaciens* dans nos conditions expérimentales implique plusieurs mécanismes. Il probable que *K. mobilis* ait eu une croissance au dépend de *S. putrefaciens*. De plus, une quantité de nitrites biogénérés inférieure à la quantité de nitrate initialement disponible est retrouvée après 3 jours d'incubation. Cela signifie que les nitrites ont réagi avec le Fe^{II}. Comme les nitrites sont reconnus pour être toxiques, leur élimination par la réaction abiotique avec le Fe^{II} a bien permis aux deux souches d'avoir une croissance. Pour conforter l'hypothèse de la réaction des nitrites avec le Fe^{II}, la quantité de Fe^{II} a été mesurée et elle stagne également après 3 jours d'incubation ; Il y a donc bien une réaction entre NO₂⁻ et Fe^{II} (Équation 20).

La quantité de Fe^{II} retrouvée dans la coculture est intermédiaire par rapport à la quantité mesurée dans les cultures seules de *S. putrefaciens* et de *K. mobilis*. De plus, une faible quantité de lactate est encore disponible après 3 jours d'incubation. Ces observations laissent penser que la souche *S. putrefaciens* a réduit le Fe^{III} en Fe^{II}. Ce Fe^{II} restant a certainement réagit avec les nitrites. En effet, les analyses de solide ont mis en évidence la présence essentiellement d'oxydes de Fe^{III}.

La perte de masse et la concentration en fer total ne révèlent pas de corrosion par rapport aux contrôles abiotiques et à *S. putrefaciens* seule. La souche *S. putrefaciens* est très certainement limitée dans son activité ferriréductrice et ne peut donc accélérer le phénomène de corrosion. Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec *K. mobilis*. Soit la quantité de Fe^{II} disponible pour réagir avec les nitrites est limitante. Soit c'est dû au rapport nitrite/fer ferreux qui est devenu élevé lorsque les deux souches sont actives. Cela permet la formation de monoxyde d'azote qui est un composé toxique pour les bactéries (Kielemoes *et al.*, 2000).

L'interaction des deux bactéries ne mène pas à une corrosion importante, elles sont en compétition pour l'accepteur d'électrons. Pour observer des effets plus importants, la quantité de donneur d'électrons pourrait être augmentée, ce qui permettrait à *S. putrefaciens* d'avoir une activité ferriréductrice plus conséquente.

IV-2.3. Corrosion de la fonte influencée par les bactéries sulfatoréductrice *Desulfovibrio desulfuricans* et nitrate-réductrice *Klebsiella mobilis*

Les cocultures de bactéries nitrate réductrices et sulfatoréductrices sont étudiées car ces bactéries sont souvent retrouvées dans les eaux et les champs à proximité de gisements pétrolifères et d'agriculture et donc potentiellement de canalisations enterrées. La littérature montre des résultats controversés. En effet, il a été montré que leur impact sur la corrosion peut provoquer d'importants dommages (Kamarisima *et al.*, 2018) ou au contraire, que leur impact est moindre car la présence de NRB peut conduire à une inhibition de l'activité corrosive des SRB sur l'acier (Jia *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2018). Notre étude va s'intéresser à ce qu'il se passe lorsqu'une NRB et une SRB sont mises ensemble en présence d'un coupon en fonte ductile de Saint-Gobain PAM.

IV-2.3.1. Croissance et activité de *Desulfovibrio desulfuricans* et *Klebsiella mobilis* en coculture.

Un coupon en fonte a été incubé dans le milieu M4-nitrate/sulfate avec une coculture de *D. desulfuricans* et *K. mobilis* et l'activité bactérienne a été suivie au cours du temps (Figure IV-56). La quantité de NO_3^- diminue au cours du temps, elle passe de 23,9 mM à $1,1 \pm 0,1$ mM en l'espace de 7 jours parallèlement à l'apparition des NO_2^- ($12 \pm 0,1$ mM après 7 jours). La concentration en SO_4^{2-} , quant à elle, ne varie pas au cours du temps (en moyenne de $17,6 \pm 1,2$ mM). Sachant que 1 mole de lactate réagit avec 2 moles de nitrates (Équation 19) et que la quantité de nitrate ajoutée est de 23 mM, on attend une consommation de 12 mM de lactate. Or

24 mM de lactate sont disponibles, laissant alors 12 mM pour la réduction des sulfates par *D. desulfuricans*.

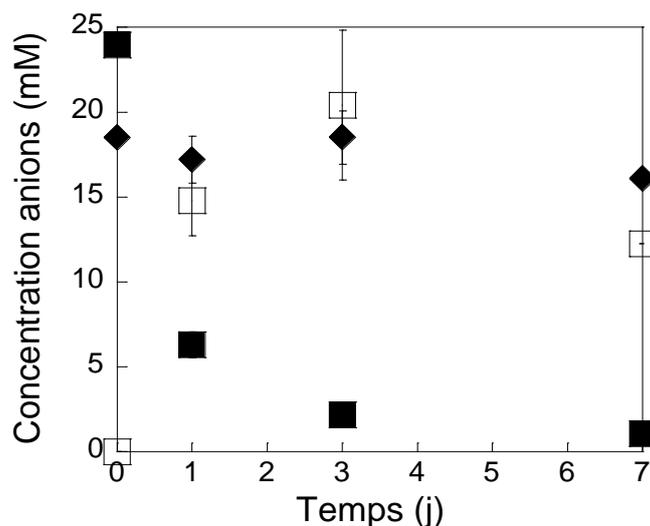


Figure IV-56 : Suivi de la concentration en SO_4^{2-} (losange), NO_3^- (carré plein) et NO_2^- (carré vide) dans le milieu M4-nitrate/sulfate à 30 °C avec la coculture *Desulfovibrio desulfuricans* - *Klebsiella mobilis* avec coupon, (n = 3).

Afin d'étudier l'effet des nitrites sur *D. desulfuricans*, sa croissance a été suivie dans les milieux M4-sulfate, M4-sulfate enrichi en nitrite (nommé « M4-sulfate-nitrite », enrichi par 24 mM de nitrite de sodium) et M4-sulfate supplémenté par le surnageant de la culture de la souche nitrate réductrice *K. mobilis* (nommé « milieu M4-sulfate-bionitrite »). Dans le M4-sulfate, la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ augmente au cours du temps de 0,01 au jour 0 à $0,30 \pm 0,01$ au jour 7 (Figure IV-57). Dans les deux autres milieux, M4-sulfate-nitrite et M4-sulfate-bionitrite, aucune croissance significative n'est observée ce qui suggère que la présence de nitrites (biogénérés ou pas) empêche la croissance de *D. desulfuricans*. Cela explique donc pourquoi nous n'avons pas vu de consommation des sulfates dans la coculture. Les nitrites produits par *K. mobilis* inhibe la croissance et l'activité de *D. desulfuricans*. En effet, selon Marietou *et al.* (2009), une concentration en nitrite supérieure à 5 mM est toxique pour *D. desulfuricans subsp. desulfuricans* DSM 6949 (ATCC 27774). Les nitrites bloquent la réaction dissimilatrice de la sulfite réductase (Dsr), qui est l'enzyme clef de la chaîne respiratoire des sulfates (Kaster *et al.*, 2007).

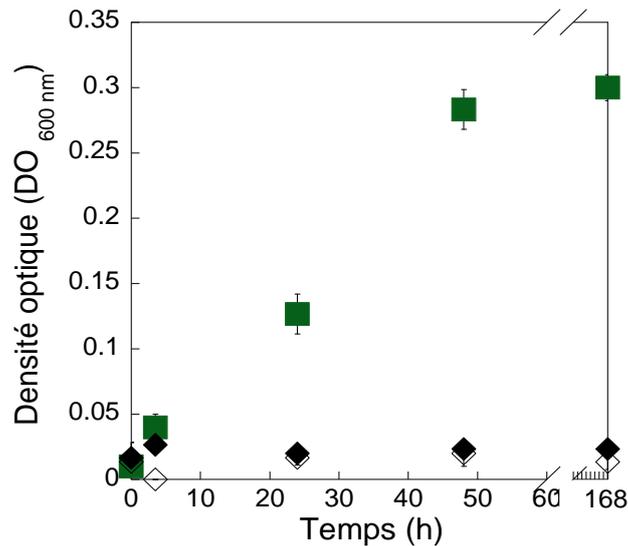


Figure IV-57 : Variation de la DO₆₀₀ de la culture de *Desulfovibrio desulfuricans* dans le milieu M4-sulfate (carré plein), M4-sulfate/nitrite (losange plein) ou M4-sulfate dans une culture stérilisée de *Klebsiella mobilis* (losange vide), (n = 3).

IV-2.3.2. Corrosion de la fonte par Desulfovibrio desulfuricans et Klebsiella mobilis en coculture

Au cours de la période d'incubation en présence d'un coupon, aucune différence en termes de perte de masse et de fer total n'a été détectée entre le contrôle abiotique et la coculture *D. desulfuricans* + *K. mobilis* (Figure IV-58). La concentration en fer libéré est plus importante pour le contrôle abiotique ($0,4 \pm 0,1 \text{ mg cm}^{-2}$) que pour le test biotique ($0,2 \pm 0,1 \text{ mg cm}^{-2}$) au 30^e jour d'incubation (Figure IV-58c).

La couleur des suspensions est, encore cette fois, nettement différente entre celle issue de la coculture, qui présente une couleur légèrement orangée, et le contrôle abiotique dont la couleur n'a pas évolué pendant l'incubation (Figure IV-59). L'intensité de la couleur de la suspension issue de la coculture est de plus différente de celle obtenue avec *K. mobilis* seule (Figure IV-26), elle est moins orangée.

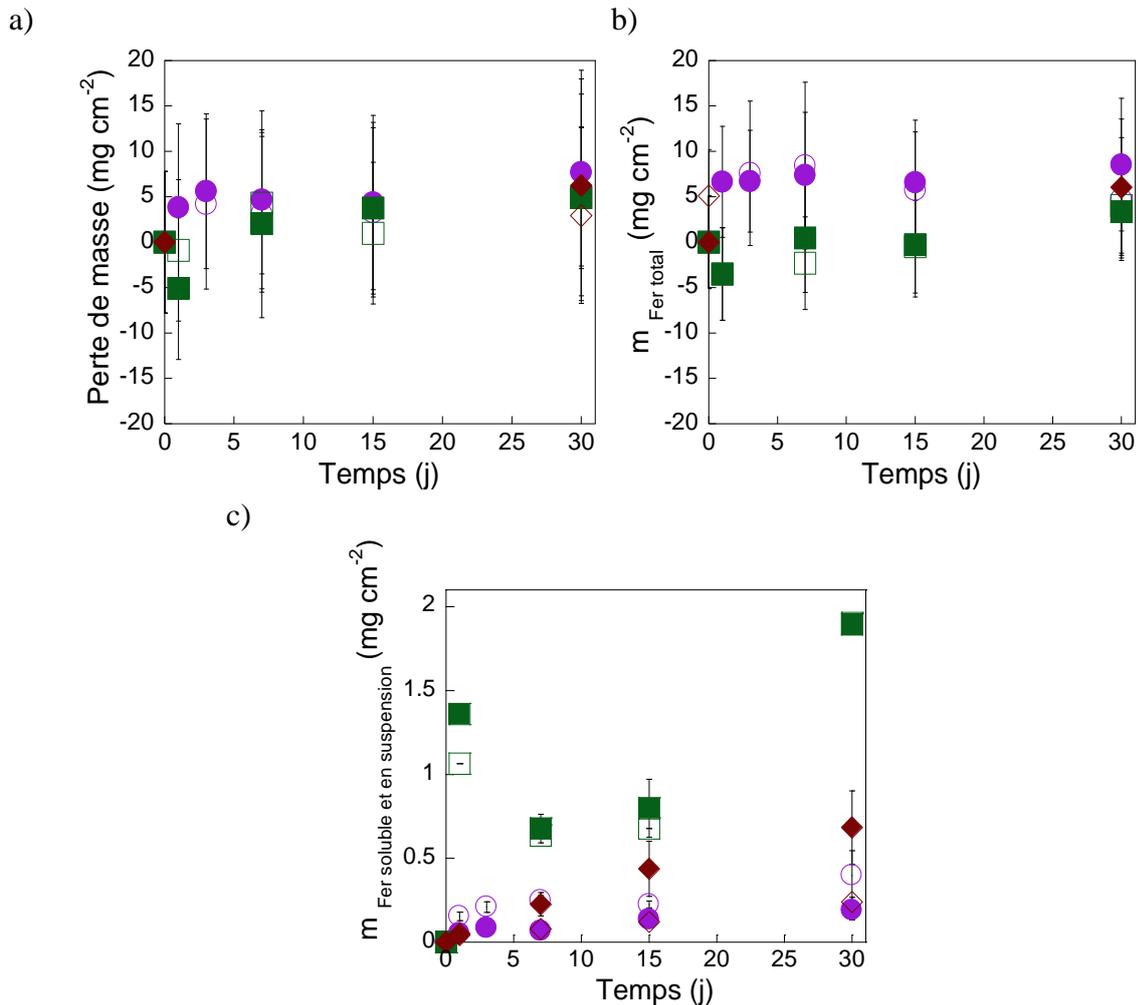


Figure IV-58 : Variation de (a) la perte de masse des coupons en fonte, (b) la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps d'incubation avec *Desulfovibrio desulfuricans* – *Klebsiella mobilis* (rond plein violet), son contrôle abiotique (rond vide violet), *Desulfovibrio desulfuricans* (carré plein vert), son contrôle abiotique (carré vide vert) et *Klebsiella mobilis* (losange plein brun) et son contrôle abiotique (losange vide brun). La culture a été réalisée à 30 °C dans le milieu M4-nitrate/sulfate, (n = 3).

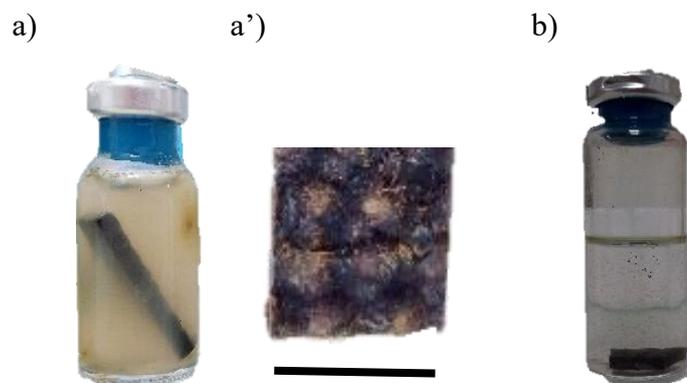


Figure IV-59 : Aspects des suspensions et du coupon au 30^e jour d'incubation dans le milieu M4-nitrate/sulfate (a - a') avec la coculture *Desulfovibrio desulfuricans* – *Klebsiella mobilis* et (b) sans bactéries. La barre représente 1 cm.

L'observation en MEB du coupon en présence de la coculture montre peu d'objets semblables à des bactéries (Figure IV-60). Les images indiquent en revanche la présence de divers précipités en apparence bien différents de ceux observés avec *K. mobilis* en culture pure (Figure IV-60 et Figure IV-27). Les plaquettes entourées pourraient correspondre à de la rouille verte sulfatée (Refait *et al.*, 2006).

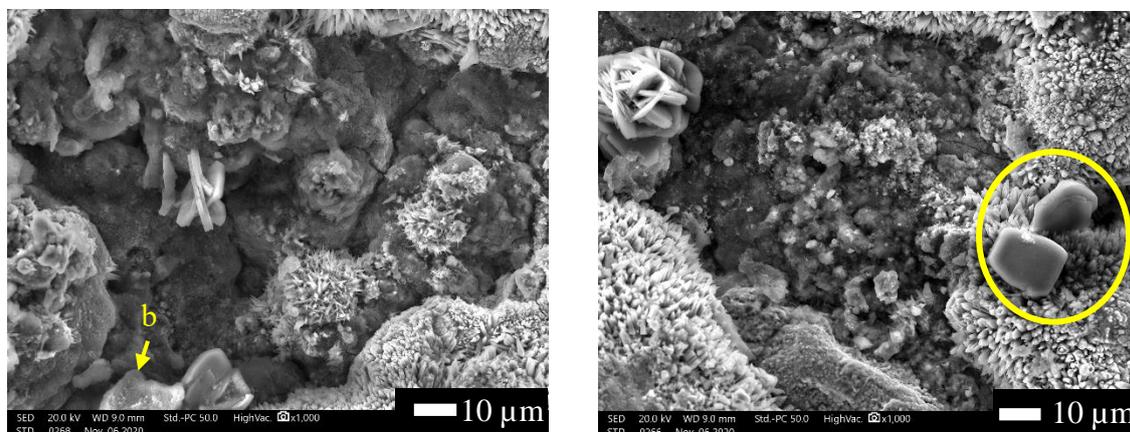


Figure IV-60 : Images en microscopie électronique à balayage à deux endroits de la surface d'un coupon incubé avec la coculture *Desulfovibrio desulfuricans* - *Klebsiella mobilis* pendant 30 jours.

b = objet ayant l'apparence d'une cellule bactérienne. Le cercle correspond à des plaquettes hexagonales suggérant des cristaux de rouilles vertes.

La présence d'hématite ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$), de magnétite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{O}_4$), de maghémite ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$) et de rouille verte ($\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{X}_x \cdot n\text{H}_2\text{O}$) ont été mise en évidence en spectroscopie Raman (Figure IV-61).

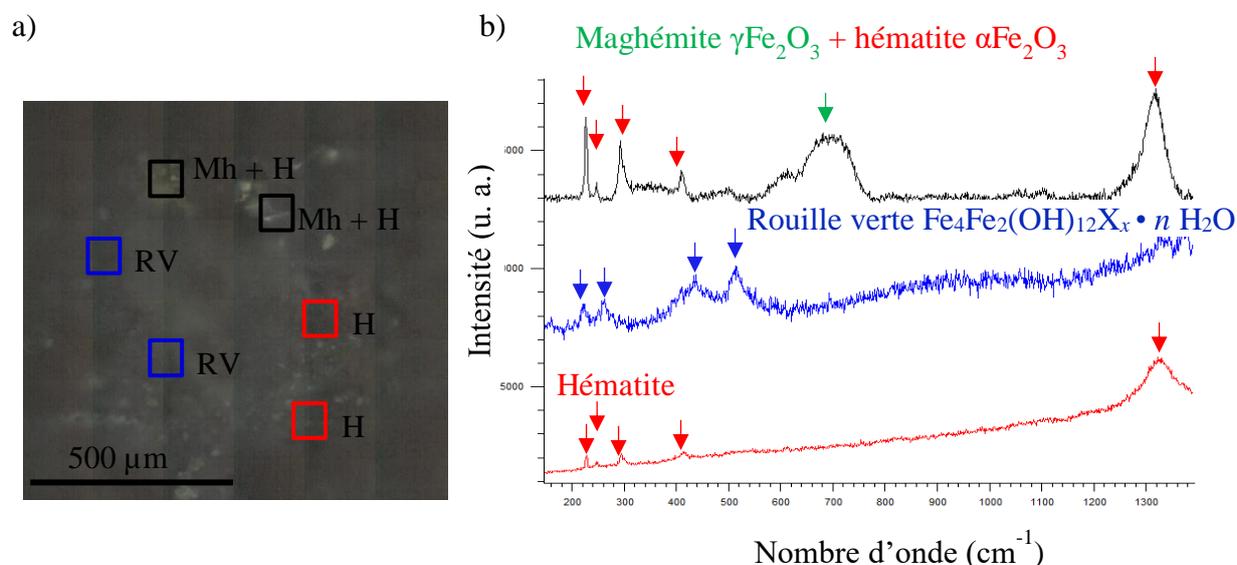


Figure IV-61 : (a) Surface d'un coupon en fonte brute balayée par spectrométrie Raman et (b) spectres correspondants enregistrés après 30 jours dans le milieu M4-nitrate/sulfate avec la coculture *Desulfovibrio desulfuricans* - *Klebsiella mobilis*.

H = hématite, Mh = maghémite et RV = rouille verte.

En DRX, la présence de magnétite et d'hématite a été confirmée, ils proviennent de la couche native d'oxydes et du Fe⁰ de la fonte a été également retrouvé (Figure IV-62). Aucun sulfure de fer n'a été identifié en spectroscopie Raman et en DRX, ce qui va dans le sens d'une absence d'activité sulfatoréductrice.

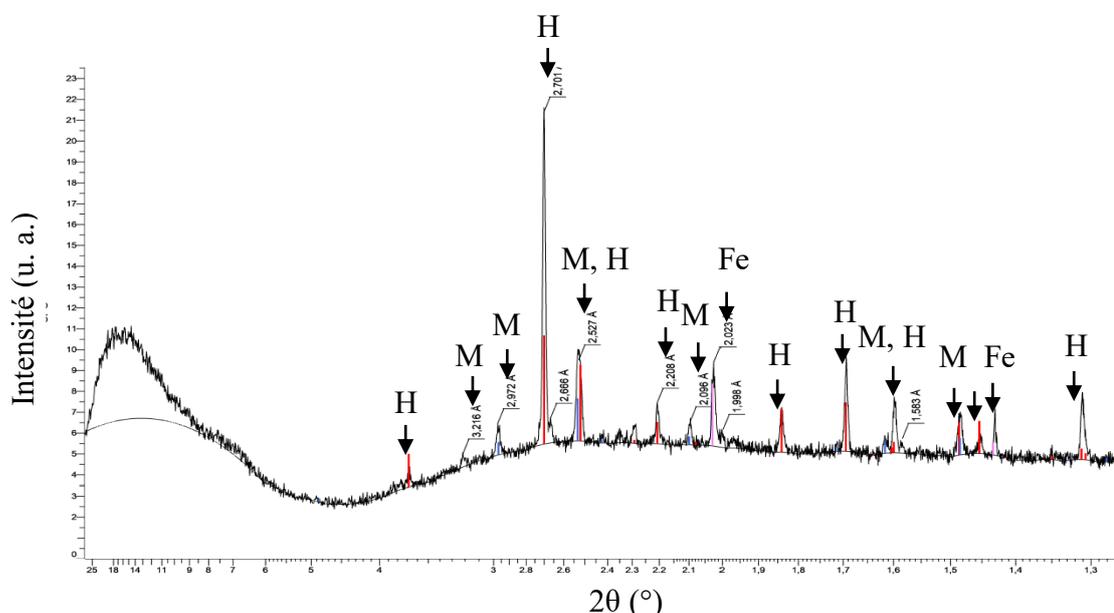


Figure IV-62 : Spectre de diffraction des rayons X d'un coupon en fonte brute avec la coculture *Desulfovibrio desulfuricans* - *Klebsiella mobilis* après 30 jours à 30 °C dans le milieu M4-nitrate/fumarate.

H = hématite, M = magnétite et Fe = Fe⁰.

IV-2.3.3. Impact de *Klebsiella mobilis* sur *Desulfovibrio desulfuricans*

Dans la coculture *D. desulfuricans* + *K. mobilis*, seule *K. mobilis* est active. On a en effet montré que les nitrites biogénérés affectent l'activité sulfatoréductrice de *D. desulfuricans*. On peut cependant s'interroger car si on regarde les produits d'oxydation retrouvés, ils ne sont pas tous identiques à ce qui a été vu en culture seule de *K. mobilis*. En effet, la goethite, l'hématite, la maghémite et la rouille verte ont été identifiées en présence de *K. mobilis* seule. Par contre, dans la coculture, la goethite n'est pas retrouvée mais une rouille verte a été détectée. Rappelons aussi que la rouille verte a été retrouvée dans le test avec *D. desulfuricans* tuées par la chaleur (cf. § IV-1.2.3). Cela suggère que la formation de ce composé mixte Fe^{II}, Fe^{III} en tant que produit de corrosion, peut se produire indépendamment de la présence de bactéries actives. Étant donné que *D. desulfuricans* ne génère pas de sulfures, il reste tous les ions sulfate dans le milieu, soit 17 mM. Dans les conditions où la concentration en carbonate est assez faible ou épuisée, la formation de RV sulfatée Fe^{II}₄Fe^{III}₂(OH)₁₂SO₄ • 8 H₂O est alors envisageable (Refait *et al.*, 2003 ; Zegeye *et al.*, 2010).

Les SRB sont reconnues pour jouer un rôle majeur dans la corrosion des matériaux. Limiter leur activité a donc été proposé afin de ralentir la biocorrosion (Okabe *et al.*, 1994). Une piste retenue, et actuellement appliquée, est d'ajouter des composés antagonistes tels que le nitrate. Plusieurs études ont montré des résultats encourageants dans des contextes différents (boues activées et eau de mer) (Jenneman *et al.*, 1986 ; Pillays et Lin, 2014). L'ajout de nitrate favorise l'activité nitrate réductrice et donc augmente la concentration en nitrites. Ces nitrites seraient alors toxiques pour la majorité des SRB, ce qui entraînerait une diminution de la concentration en sulfure avec une diminution de l'activité sulfatoréductrice (Haveman *et al.*, 2004 ; He *et al.*, 2010). Dans notre cas, l'association de *K. mobilis* et *D. desulfuricans* mène effectivement à une absence d'activité sulfatoréductrice. La souche *D. desulfuricans* DSM 12129 retenue dans notre étude ne possède par l'enzyme Nrf (nitrite réductase périplasmique) (Day *et al.*, 2019). Cette enzyme mène à la réduction des nitrites en ammonium à l'extérieur de la cellule, ce qui limite l'inhibition de l'enzyme Dsr (Greene *et al.* 2003). En effet, en absence de Nrf, la Dsr réagit avec les nitrites au détriment des sulfites et empêche alors la croissance de SRB. Cependant, certaines SRB possèdent cette enzyme, telle que *Desulfovibrio vulgaris* (Greene *et al.*, 2003). Dans des sols, qui souvent présentent une large diversité microbienne, une injection de nitrate pourrait donc mener :

i) à une sélection de SRB capables de survivre en présence de nitrites car possédant le gène Nrf. Ces SRB seraient alors favorisées et l'activité sulfatoréductrice toujours présente (Pereira *et al.*, 2000 ; Haveman *et al.*, 2005) et il n'y aura donc pas de limitation de la corrosion.

ii) à favoriser les NRB. Or les NRB ont également été reconnues comme agent accélérateur de la corrosion de l'acier (Fida *et al.*, 2016) selon le mécanisme suggéré § IV-2.3.

L'injection de nitrate pour limiter le développement des SRB et donc la corrosion des canalisations en fonte enterrées dans les sols ne serait donc pas la « solution miracle ». Même si, dans nos conditions expérimentales, la coculture *D. desulfuricans* + *K. mobilis* n'impacte pas considérablement l'état de la fonte.

IV-3. Conclusion du Chapitre IV

Ce Chapitre IV visait à étudier l'influence de souches pures de laboratoire dans des conditions contrôlées sur la corrosion de la fonte brute. Pour cela nous avons mené des expériences à deux niveaux : en monosouche à l'aide de bactéries représentantes des trois groupes métaboliques choisis pour cette étude : IRB, SRB et NRB. Puis nous avons fait des cocultures deux à deux

afin de mettre en évidence d'éventuels effets combinés des souches pures de laboratoire sur la corrosion. A notre connaissance, c'est la première fois que plusieurs souches bactériennes ont été testées avec de la fonte, sans aucun traitement de surface préalable (i.e. sans polissage).

Toutes ces expériences ont montré la difficulté de travailler avec la fonte brute qui est déjà oxydée. Nous n'avons, par conséquent, pas pu dégager de réelles tendances au niveau du taux de corrosion mais notre approche (suivi des métabolites en solution, MEB, spectrométrie Raman et DRX) nous permet de montrer des différences de comportement et d'émettre des hypothèses sur l'action des souches sélectionnées :

En monosouche :

- L'IRB *S. putrefaciens* est capable de réduire le Fe^{III} solide de la couche native d'oxydes pour former de la vivianite. Cette déstabilisation entraîne une accélération de la corrosion de la fonte brute (i.e. 1,5 fois plus important par rapport à son contrôle abiotique).
- En réduisant le sulfate, la SRB *D. desulfuricans* produit des sulfures qui viennent réagir avec le fer de la couche native d'oxydes de la fonte pour former de la mackinawite. Cela provoque alors des piqûrations qui sont reconnues, dans des délais bien supérieurs à nos temps de manipulation qui étaient de 1 mois, pour provoquer des dégâts très importants.
- La NRB *K. mobilis*, quant à elle, produit des nitrites qui réagissent avec le fer ferreux de la couche native d'oxydes pour former de la goethite et des RV. Malgré une déstabilisation de cette couche, nous n'avons pas mis en évidence d'accélération de la corrosion de la fonte dans le temps des expériences menées. Il faut aussi ajouter que la concentration en fer ferreux n'est sûrement pas assez importante pour déstabiliser le système et que celui-ci est déjà impliqué dans des solides.

En coculture :

- En coculture, *D. desulfuricans* et *S. putrefaciens* ont toutes les deux été actives. Elles ont conduit à la précipitation de mackinawite FeS du fait des activités ferriréductrices et sulfato-réductrices produisant respectivement Fe^{II} et S²⁻. La couche native d'oxydes a donc été déstabilisée. Malgré la double activité, nous n'avons pas montré d'accélération de la corrosion. Deux hypothèses mécanistiques peuvent être établies. La première est la présence d'un film de FeS produit par *D. desulfuricans* protecteur, ce qui ralentirait le phénomène de corrosion. La seconde est la compétition entre les

deux souches pour la formation d'un biofilm sur la fonte, le biofilm de *D. desulfuricans* se formant préférentiellement par rapport à celui de *S. putrefaciens*.

- Les bactéries *S. putrefaciens* et *K. mobilis*, cultivées ensemble, ont une biocompétition pour la source d'accepteur d'électrons (nitrates) qu'elles réduisent en nitrites. *S. putrefaciens* n'a donc pas exprimé son activité ferriréductrice et *K. mobilis* semble avoir pris le dessus sur *S. putrefaciens*. Une quantité substantielle de nitrite a été produite et contrairement à ce qui était attendu, ces nitrites biogénérés n'ont pas eu de fort impact sur le taux de corrosion. L'hypothèse est identique à celle effectuée avec la monosouche NRB ; la quantité de Fe^{II} disponible sur la couche native d'oxydes est limitante.
- Nos tests en présence de *K. mobilis* et *D. desulfuricans* révèlent le pouvoir toxique des nitrites issus du métabolisme de la NRB *K. mobilis* vis-à-vis de la SRB. Les nitrites biogénérés ont induit une répression de l'activité de *D. desulfuricans* et seule l'activité nitrate réductrice a été retrouvée, tout comme avec la NRB seule ou avec la coculture *K. mobilis* + *S. putrefaciens*, nous n'avons pas mis en évidence d'accélération de la corrosion.

Pour améliorer nos connaissances sur la corrosion de la fonte, davantage d'analyses peuvent être effectuées. La biologie moléculaire et en particulier la RT qPCR est un outil fiable et pourrait apporter des réponses sur la croissance et l'activité des souches en coculture ; sont-elles capables de pousser en même temps, de la même façon ? Des techniques de microscopies tel que la FISH permettrait de répondre à la question ; les bactéries vont-elles coloniser le coupon en fonte en même temps, ou être en compétition ?

Pour apporter d'autres éléments de réponses et afin de se rapprocher au maximum des conditions d'enfouissement des canalisations en fontes, des tests avec des sols ont été imaginés et menés. En effet, dans l'environnement des tuyaux (i.e. les sols), il y a une forte diversité microbienne et utiliser des souches pures de laboratoire ne reflète pas cette réalité. Les tests avec les sols constituent le Chapitre V et contribuent à répondre aux questions : est-on capable de mettre en évidence la MIC dans les sols ? Observe-t-on les mêmes phénomènes qu'avec les souches de laboratoire ?

Chapitre V : Expériences en environnements complexes

Si parfois les entreprises utilisent du sable comme remblai pour l'installation des tuyaux, les évolutions de terrain mènent le plus souvent à un contact direct des tuyaux avec le sol. C'est le cas notamment pour l'entreprise Saint-Gobain PAM. Pour nous rapprocher au maximum des conditions réelles d'enfouissement des canalisations en fonte de Saint-Gobain PAM, nous devons donc mener des études avec des échantillons de sols pour prendre en compte à la fois, leurs compositions chimiques et la diversité microbiologique que l'on peut y trouver.

Chaque sol a sa propre composition ce qui lui confère des caractéristiques physicochimiques particulières. C'est une interface vivante qui évolue donc au cours du temps sous l'effet de différents facteurs naturels (érosion, lessivage, dégradation de matière organique, ruissellement, infiltration d'eau...) et/ou de l'activité humaine (agricole, industrielle, urbaine). Il a été montré que de nombreux paramètres physicochimiques influencent la corrosion de la fonte, dont certains comme la concentration en sulfure, le pH, le potentiel redox (Bhattacharai, 2013), la concentration en sulfate et en nitrate (Asadi et Melchers, 2017), et la teneur en matière organique. Mais peu d'études se sont réellement intéressées à ce qu'il se passe en termes de microbiologie. Les microorganismes du sol sont, en effet, évoqués, sans jamais vraiment que leur action ne soit mesurée sur la corrosion des canalisations (Cole et Marney, 2012). Pourtant, les sols sont de véritables réservoirs de microorganismes d'une grande diversité avec plus de 33 000 espèces bactériennes et archées détectées dans un seul échantillon de sol (Vos *et al.*, 2013). Et certains paramètres physicochimiques des sols peuvent leur apporter, par exemple, des nutriments (e.g. azote, phosphate). Les microorganismes peuvent également affecter les réactions d'oxydoréduction, de dissolution/précipitation, faire évoluer le pH de la solution de sol, etc. (Dassonville et Renault, 2002). De plus, puisque les microorganismes sont principalement associés à des agrégats microbiens ou à des biofilms dont certains sont capables de favoriser des transferts d'électrons extracellulaires (par contact direct, par des navettes solubles, avec des porteurs ou des particules, ou entre les cellules bactériennes voisines), on s'attend à ce que la biocorrosion soit le résultat de l'action simultanée de plusieurs groupes métaboliques (Valencia-Cantero *et al.*, 2003 ; Pitonzo *et al.*, 2004). Parmi les bactéries largement rapportées dans la littérature, on va trouver les bactéries sulfatoréductrices, ferriréductrices, et/ou, à moindre mesure, nitrate réductrices. Il est donc logique de penser que les activités microbiennes peuvent affecter la corrosion et conduire à des taux de corrosion bien différents en fonction de la nature des populations microbiennes mais aussi du sol.

Afin d'avoir des réponses à l'échelle du laboratoire, nous avons choisi de travailler avec des suspensions de sol et non pas de tester directement le sol ré-humidifié. L'approche par

« suspensions » nous a permis de choisir et d'être en présence d'un volume de phase liquide suffisamment important et donc de mieux contrôler la nature et la teneur en nutriments pendant l'expérience. Afin de réaliser les contrôles abiotiques correspondant, nous avons dû développer dans un premier temps une méthode de stérilisation des suspensions de sols car le procédé par autoclave classiquement utilisé ne s'est pas révélé efficace. Les premiers tests de biocorrosion ont consisté à préparer les suspensions de sol en milieu LB, l'idée étant d'avoir un milieu suffisamment riche et non discriminatoire pour permettre le développement des différentes familles de bactéries pouvant se trouver naturellement dans les sols choisis. D'autres tests ont ensuite été menés en choisissant un milieu de croissance propice au développement de groupes métaboliques sélectionnés et particulièrement les trois groupes sur lesquels notre étude s'est concentrée : les IRB, les SRB et le NRB.

Dans un second temps, nous avons étudié le comportement de coupons de fonte revêtus avec les différents revêtements de Saint-Gobain PAM en y simulant des blessures. Les expériences ont été menées sur une période de plusieurs mois et avec des suspensions de sols préparées dans le milieu de culture M4 contenant le mélange de donneurs et accepteurs d'électrons adéquates à nos familles de bactéries. En parallèle, une série de manipulation a été réalisée en présence de *Shewanella putrefaciens* dans son milieu M4 optimal. Son action sur la corrosion de la fonte a été démontrée au chapitre IV et cela a constitué ici un contrôle positif.

Toutes les expériences ont été réalisées en anaérobie, à 30 °C et à pH = 7,0 ± 0,1.

V-1. Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des sols

Pour cette étude, nous disposons de trois échantillons de sols prélevés, respectivement, à Pau, à Saint Firmin et à Lesménils (Tableau V-1). Il s'agit de trois terrains d'essai de Saint-Gobain PAM qui sont reconnus pour entraîner une accélération de la corrosion de la fonte. En effet, le prélèvement de Pau a été réalisé très proche d'un tuyau défectueux après seulement 43 ans de service et enterré près d'un terrain exposé à l'épandage de lisier dont la forte proportion d'azote ammoniacal peut servir de nutriments aux bactéries du sol. Les deux autres sols étaient proches de terrains cultivés potentiellement soumis à des traitements d'engrais riches en azote, phosphore et potasse. Par exemple, un tuyau enterré dans le sol de Lesménils présentait des perforations allant de 45 à 65 mm après 7 années d'enfouissement (Figure V-1).

Tableau V-1 : Origine des échantillons des sols.

Lieu de prélèvement	
Pau (Pyrénées atlantiques, 64)	Proche d'un terrain exposé à l'épandage de lisiers
Saint Firmin (Meurthe et Moselle, 54)	Proche de sols cultivés
Lesménils (Meurthe et Moselle, 54)	Proche de sols cultivés, au niveau de sources

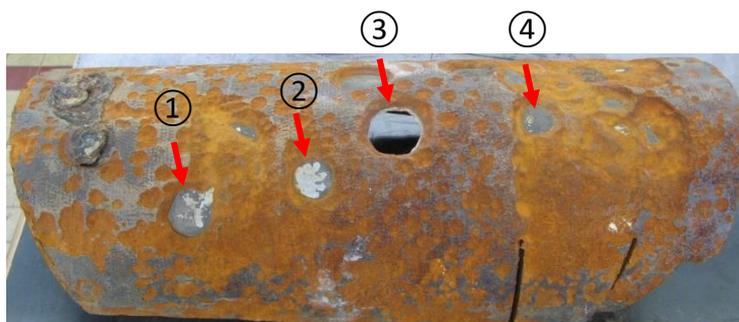


Figure V-1 : Aspect d'un tuyau DN 200 non zingué après son excavation du sol après 7 ans d'enfouissement. On y observe des trous dont les diamètres sont de ① 60 mm, ② 55 mm, ③ 65 mm et ④ 45 mm. Données de Saint-Gobain PAM.

Différentes analyses ont été effectuées sur les suspensions de chacun des sols retenus. Pour cela, un gramme de sol (équivalent matière sèche) a été placé dans 10 mL d'eau ultrapure. Cette suspension a été agitée puis soumise à des ultrasons (2×15 min, cf Chapitre II, §II-3) pour disperser les agrégats, permettre à tous les sels solubles de se dissoudre et aussi désorber les bactéries des particules du sol. Les résultats sont regroupés dans le Tableau V-2.

Tableau V-2 : Données physico-chimiques et densité bactérienne des sols. *Source : Analyses internes Saint-Gobain PAM.*

	Pau	Saint Firmin	Lesménils
Nature du sol	Argile compactée brune et grise	Argile verte et grise	Argile non compacte
pH* (eau)	6,8	7,3	7,5
Humidité (%)	22,4	24,2	N/D
Résistivité à réception (ohm cm)	1850 – 890	640	300
Matière sèche* (% de la matière humide)	22,9 ± 0,1	24,2 ± 0,9	16,6 ± 1,8
Matière sèche sans cendres (% de la matière sèche)	8,70	12,09	N/D
Teneur en eau (%)	83,31 ± 0,58	N/D	79,50 ± 1,10
Perte au feu 600 °C (%)	8,32	11,27	N/D
Perte au feu 1000 °C (%)	8,70	12,09	N/D
Soufre total (%)	0,86	0,15	0,04
Sulfates (%)	0,66	0,15	0,03
Sulfures (%)	0,20	< 0,01	0,01
Fe* (%)	1,87	5,24	4,15
Densité bactérienne * (bactéries g ⁻¹ de sol)	(1,9 ± 0,6).10 ¹²	(4,7 ± 1,4).10 ¹²	(1,8 ± 0,5).10 ¹²

N/D = non-déterminé

* = données issues de la présente étude

Les trois sols sont de nature argileuse et caractérisés par une résistivité minimale en cellule de de 300 ohm cm pour Lesménils, 640 ohm cm pour Saint Firmin, et de 1850 à 890 ohm cm pour Pau. Les basses valeurs de résistivité peuvent favoriser la formation de piles de corrosion si les sols sont en contact avec un matériel métallique. Le pH est proche de la neutralité pour les trois sols : 6,8 pour Pau, 7,3 pour le sol de Saint Firmin et 7,5 pour Lesménils. Les taux d'humidité sont assez similaires pour Pau et Saint Firmin avec respectivement 22,4 % et 24,2 % (il n'a pas été déterminé pour le sol de Lesménils). L'analyse qualitative a mis en évidence une teneur en soufre total plus élevée pour le sol de Pau (i.e. 0,86 % à comparer à 0,15 %, 0,04 % pour les sols de Saint Firmin et Lesménils). Une partie du soufre se trouve sous la forme de sulfure, respectivement égale à 0,20 % pour Pau, 0,01 % pour Lesménils et < 0,01 % pour Saint Firmin. La présence de soufre et de matières organiques couplées aux conditions d'anaérobioses favorisées par la nature argileuse des sols est particulièrement favorable à une prolifération de microorganismes et notamment les bactéries sulfatoréductrices (Doyle *et al.*, 2003).

D'après le système de score *American Water Works Association and the American National Standards Institute* (ANSI/AWWA (1999) C105/A21.5–99 standards – cf. Chapitre I), les trois sols testés obtiennent un score supérieur à 10, ils sont donc considérés comme corrosifs. Ce système de score n'est pas vraiment spécifique car il considère uniquement la physico-chimie

des sols. Or il a été démontré, au cours de ces cinq dernières décennies, que les microorganismes jouent un rôle non négligeable sur la corrosion des canalisations enterrées (Usher *et al.*, 2014), les microorganismes devraient donc être considérés dans ces systèmes de score.

Pour estimer la population microbiologique de nos sols, 10 μ L de chacune des suspensions de sol préalablement préparées dans l'eau ont étéensemencées sur gélose TSA. Après 24 h d'incubation en anaérobie, à 30 °C, des microorganismes sont visibles, essentiellement des organismes filamenteux. De ce fait, nous n'avons pas pu dénombrer les unités formant colonies (UFC) (Figure V-2).

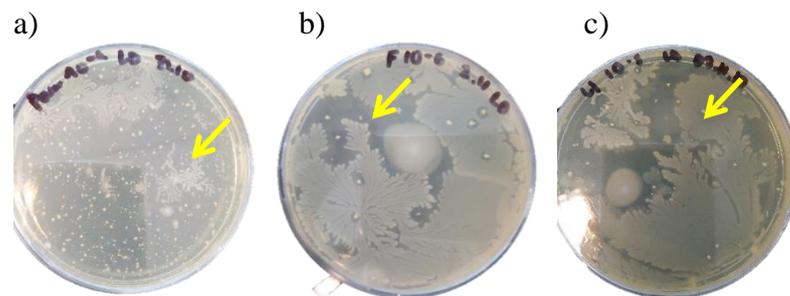


Figure V-2 : Photographie des cultures solides sur gélose TSA des suspensions de sols de (a) Pau, (b) Saint Firmin et (c) Lesménils. La flèche montre des colonies filamenteuses.

Un comptage par microscopie sous épifluorescence a été effectué le jour de l'incubation (noté J0) et le 20^e jour d'incubation (noté J20). Il s'agit d'une estimation car, comme le montre la Figure V-3, certains microorganismes ont une fluorescence importante, d'autres forment des agrégats et peuvent dissimuler d'autres microorganismes. Les images de microscopie révèlent la présence d'une grande diversité microbienne de par les différentes morphologies identifiables (Figure V-3). On reconnaît par exemple la forme en virgule typique des *vibrio* qui incluent des SRB, mais également des bâtonnets ou bacilles. La croissance bactérienne a été calculée comme le rapport du nombre de microorganismes dénombrés par microscopie sous épifluorescence au 20^e jour d'incubation (J20) sur le nombre de microorganismes dénombrés au jour de l'incubation (J0) (Tableau V-3). Il est clair que les microorganismes des sols ont une croissance limitée due à la consommation rapide de substrat (i.e. croissance inférieure à 1 pour les sols de Pau et Lesménils et croissance de $1,4 \pm 0,1$ % pour le sol de Saint Firmin). Il n'y a pas de variation du pH au cours de l'incubation, les microorganismes cultivables dans nos conditions expérimentales ne seraient donc pas des acidogènes (ou *acid producing bacteria*).

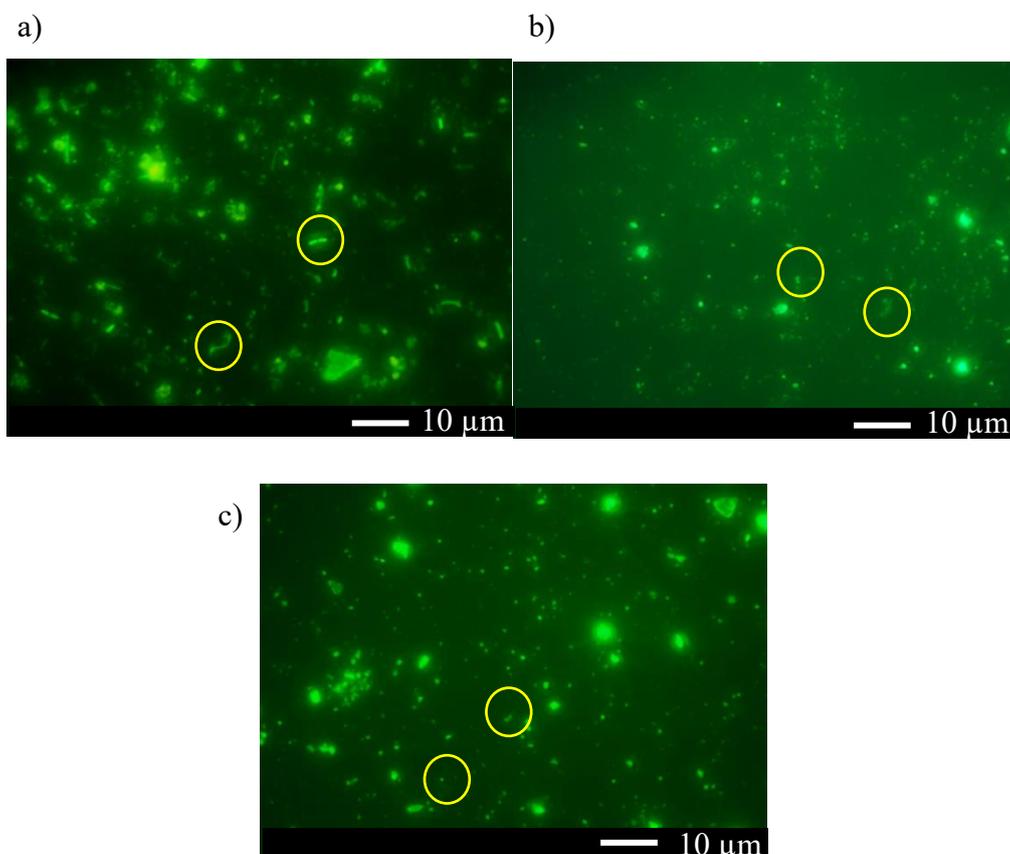


Figure V-3 : Observation en microscopie sous épifluorescence des cultures des suspensions du sol de (a) Pau, (b) Saint Firmin et (c) Lesménils.

Les cercles montrent des microorganismes de différentes morphologies.

Tableau V-3 : Croissance bactérienne et mesure de pH dans les suspensions de sols, (n = 3).

Condition	Croissance (%) $\left(\frac{J_{20}}{J_0}\right) \times 100$	pH	
		J0	J20
Sol de Pau	$0,7 \pm 0,3$	$7,9 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,2$
Sol de Saint Firmin	$1,4 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,4$	$7,8 \pm 0,1$
Sol de Lesménils	$0,8 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,6$	$7,8 \pm 0,2$

Les sols de Pau et de Lesménils ayant des caractéristiques plutôt opposées en termes de résistivité et de concentration en soufre et en Fe, ils ont été choisis pour la suite des expériences.

Comme les analyses effectuées nous renseignent uniquement sur la présence de microorganismes cultivables, et ne permettent pas de savoir à quel groupe métabolique ils appartiennent, nous nous sommes intéressés à suivre les traceurs chimiques du métabolisme des groupes ciblés. Par exemple, les ions sulfates pour les SRB, les nitrates pour les NRB et le fer(II) pour les IRB. Quel que soit le sol, les contrôles abiotiques ne montrent pas de variation,

ce qui indique l'absence d'activité bactérienne significative. En présence des microorganismes, dans les deux sols, nous notons des variations (Figure V-4).

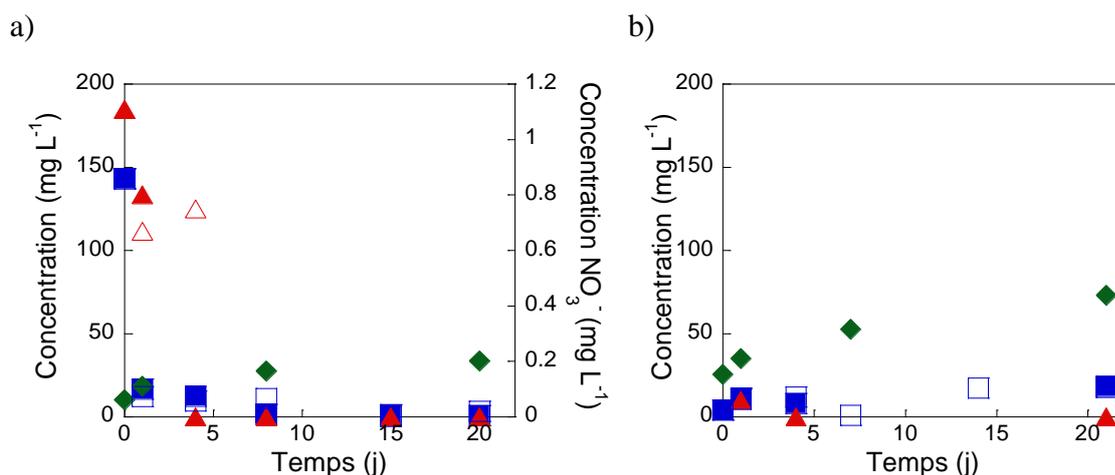


Figure V-4 : Suivi de la concentration en ions SO_4^{2-} (carré plein), son contrôle (carré vide) ; NO_3^- (triangle plein), son contrôle (triangle vide) et des ions Fe^{II} (losange plein) pour les sols de (a) Pau et (b) Lesménils.

La solution en contact avec le sol de Pau montre, à la fois, une diminution importante des ions sulfate (diminution de 143 mg L^{-1} (jour 0) à 17 mg L^{-1} (jour 1), Figure V-4a) et celle, un peu moins rapide, des ions nitrate (perte de 20 % en un jour). La concentration en Fe^{II} augmente au cours du temps d'un facteur 3,4 (i.e. de 10 mg L^{-1} (jour 0) à 34 mg L^{-1} au jour 20). De ces informations et des caractéristiques intrinsèques énumérées dans le Tableau V-2 (i.e. pourcentage de soufre), on peut avancer l'hypothèse que le sol de Pau est plutôt riche en bactéries sulfatoréductrices et nitrate réductrices par rapport à Lesménils.

Pour le sol de Lesménils, la concentration en sulfate ne varie pas au cours du temps (en moyenne $10 \pm 6 \text{ mg L}^{-1}$, Figure V-4b). En revanche, la concentration en Fe^{II} augmente, elle passe de 25 mg L^{-1} au jour 0 à 73 mg L^{-1} au 20^e jour d'incubation et correspond au double de celle mesurée dans le sol de Pau. Ces résultats suggèrent que le sol de Lesménils est plutôt riche en bactéries ferriréductrices comparé à Pau. Les caractéristiques intrinsèques énumérées dans le Tableau V-2 avaient d'ailleurs montré une quantité en fer plus importante pour Lesménils par rapport à Pau.

Afin de vérifier la colonisation des bactéries sur une surface, une solution de SYBR® Green a été appliquée sur des coupons en fonte ayant été immergés 3 jours (Figure V-5). La fonte étant une surface très hétérogène, seul un point de focus est montré. La surface a bien été colonisée par les microorganismes issus des suspensions des sols de Pau et de Lesménils.

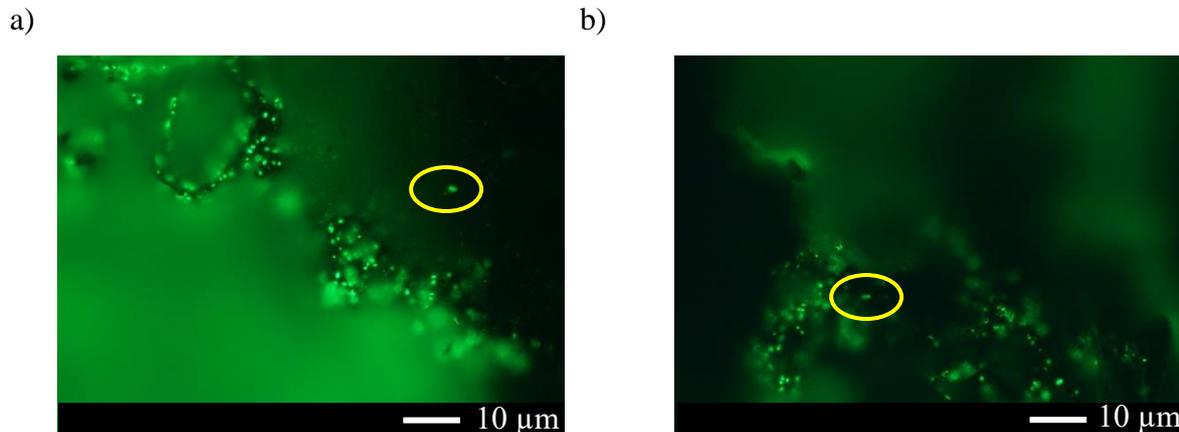


Figure V-5 : Observation en microscopie sous épifluorescence de la surface des coupons incubés pendant 3 jours dans les suspensions du sol de (a) Pau et (b) Lesménils. Les cercles montrent des microorganismes.

V-2. Préparation des suspensions de sols et stérilisation

Avant toute expérience en présence d'un coupon, il nous fallait vérifier les deux points suivants : i) l'échantillon de sol utilisé en laboratoire est suffisamment homogène pour que d'une préparation de suspension à l'autre, nous obtenions un milieu comparable et donc des résultats pouvant être discutés les uns par rapport aux autres, et ii) obtenir des suspensions stériles pour mener des contrôles abiotiques tout en gardant toutes les conditions physico-chimiques imposées par ces suspensions de sol.

Le premier point a été vérifié en plaçant 1 gramme (équivalent matière sèche) d'échantillon de sol de Pau ou de Lesménils dans 10 mL d'eau ultrapure avant de lui faire subir un traitement aux ultrasons. Nous avons ensuite quantifié les éléments fer et silicium solubilisés par ICP AES. Pour chaque sol, deux mêmes préparations ont été réalisées, appelées respectivement préparation 1 et préparation 2.

Afin de pouvoir comparer les résultats, la concentration en fer a été normalisée par celle en silicium, qui est un élément naturellement présent dans les sols, les quantités de fer de chaque sol sont équivalentes quelle que soit la préparation (Figure V-6). Les données pourront donc être comparables entre elles.

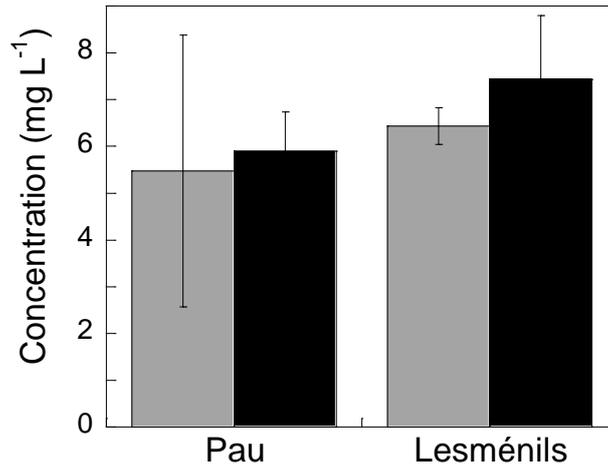


Figure V-6 : Concentration en mg L⁻¹ de Fe normalisé par rapport à la concentration en Si dans deux préparations différentes (gris ou noir) de la suspension du sol de Pau et Lesménils, (n = 3).

Le second point concerne la mise au point d'un protocole de stérilisation des échantillons de sol. Le défi est réel au regard de la densité et de la diversité bactérienne. En effet, nous avons dénombré dans nos suspensions de sols $(3 \pm 1) \times 10^{12}$ bactéries par g de sol. De plus, certains microorganismes ont la capacité de sporuler, d'autres sont enchevêtrés dans les particules solides de sol, difficiles à disloquer avec certitude par onde ultrasonore. Divers protocoles existent pour tuer les microorganismes (i.e. méthodes chimiques, irradiation par les UV, etc.) mais peuvent impacter les particules de sols et la composition physico-chimique de celui-ci (Trevors, 1996). Le protocole que nous avons retenu correspond à des traitements par la chaleur qui a été considéré, dans notre étude, comme étant le moins invasif. Ainsi, les traitements à la chaleur classiquement proposés correspondent à une chauffe de 121 °C pendant 30 min à une pression de 3 bars. Ce traitement a été testé malheureusement sans succès sur nos suspensions de sol. Nous avons donc cherché à l'optimiser en proposant trois autres traitements, regroupés dans le Tableau V-4. Dix grammes (équivalent matière sèche) d'échantillon de sol ont été placés dans 100 mL d'eau ultrapure puis un traitement ultrason de 2 fois 15 min a été appliqué. Les échantillons de sols ont ensuite été mis en suspension dans le milieu LB dilué 10 fois pendant 30 min avant de subir les traitements afin d'initier la croissance microbienne. Ces suspensions ont ensuite subi plusieurs autoclaves successifs (nombre et durée différentes). Le temps d'attente entre chacun des autoclaves a été fixé à 15 h afin de pouvoir laisser germer les éventuels organismes qui ont sporulé. Pour valider ou pas le traitement, un contrôle de stérilité a été effectué en prélevant et incubant des aliquotes de 100 µL de suspensions ainsi traitées en gélose nutritive TSA en duplicata pendant 4 jours en anaérobie à 30 °C. S'il n'y aucune colonie

sur gélose capable de se développer alors le traitement de décontamination est validé. Les résultats détaillés sont présentés dans l'Annexe 6.

Tableau V-4 : Traitements de stérilisation testés sur les suspensions de sols.

Essai	Sol	Milieu de culture	Nombre d'autoclaves	Durée de l'autoclave (min)	T °C	Position du flacon dans l'autoclave	Résultats
#1.1	Pau	LB 1 : 10	2	20	121	vertical	×
#1.1						horizontal	×
#2.1	Pau		3	30		vertical	×
#2.2						horizontal	×
#3	Saint Firmin		3	60		horizontal	✓
	Lesménils						

(n = 2 pour chaque test)

× signifie qu'il y a eu plus d'une colonie dénombrée et ✓ qu'il n'y en a pas eu quelle que soit la condition.

Des microorganismes étaient encore capables de se développer à la suite des essais #1 et #2. Après l'essai #3, quelle que soit la suspension de sol, aucun microorganisme ne s'est développé. Ainsi, le protocole retenu correspond à 3 traitements à la chaleur de 1 h à 121 °C avec 15 h de pause.

Les suspensions de sols subissant une chaleur de 121 °C et une pression de 3 bars pour leur stérilisation, il nous fallait nous assurer de l'intégrité des particules des suspensions de sols post-traitement. Pour cela, nous avons choisi de suivre les concentrations de l'élément fer en solution et suspension après traitement HCl. En supposant que les agrégats de sol ne soient pas impactés par le traitement, la quantité de fer solubilisé doit rester la même (Figure V-7). Il n'y a pas de différence significative de concentration en fer après chaque autoclave quel que soit le sol. Les concentrations en fer en solution et suspension sont en moyenne de $2,9 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$ pour Pau et $3,6 \pm 0,9 \text{ mg L}^{-1}$ pour Lesménils.

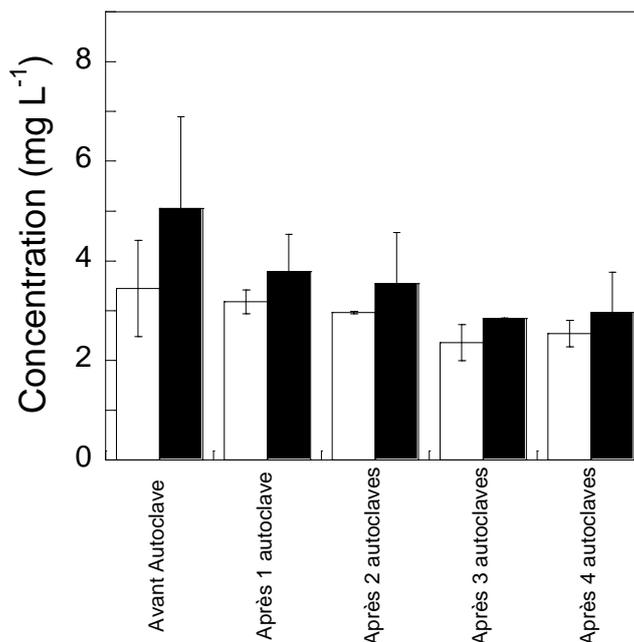


Figure V-7 : Concentration en fer dans le sol de Pau (blanc) et Lesménils (noir) après chaque traitement autoclave (n = 2).

V-3. Évaluation du caractère corrosif sur des coupons en fonte nue

V-3.1. Suspensions de sols

Des premiers tests ont été effectués en préparant les suspensions de sol dans de l'eau stérile. Aucune activité n'a été mise en évidence et aucune biocorrosion n'a été observée (données non montrées). Les résultats étaient similaires aux contrôles abiotiques, c'est-à-dire aux suspensions de sols décontaminées.

Afin de permettre une activité et une croissance des microorganismes dans un temps compatible avec une étude en laboratoire, de nouvelles expériences de corrosion ont été menées en préparant les suspensions de sol dans le milieu de culture LB dilué 10 fois. Le choix de ce milieu de culture riche et complet, « non sélectif », a été fait de manière à autoriser la croissance d'un nombre suffisamment grand de microorganismes. Pour chaque temps de mesure, les coupons ont été sacrifiés. Les contrôles abiotiques correspondent aux sols stérilisés.

Les variations de perte de masse et des quantités de fer total issu des coupons ne sont pas significatives et ne le sont pas non plus entre les différentes conditions expérimentales, il n'apparaît donc pas de corrosion de la fonte en présence des sols et de sols stérilisés dans le temps de l'expérience selon les critères mesurés (Figure V-8 a et b). Si nous suivons l'évolution

de la quantité de fer libéré, on observe qu'elle augmente au cours du temps pour atteindre un maximum à 15 jours. Cependant les valeurs restent faibles (1 à 2 mg cm⁻²) pour l'essai biotique (Figure V-8c), ce qui est cohérent avec une dégradation peu avancée à 1 mois.

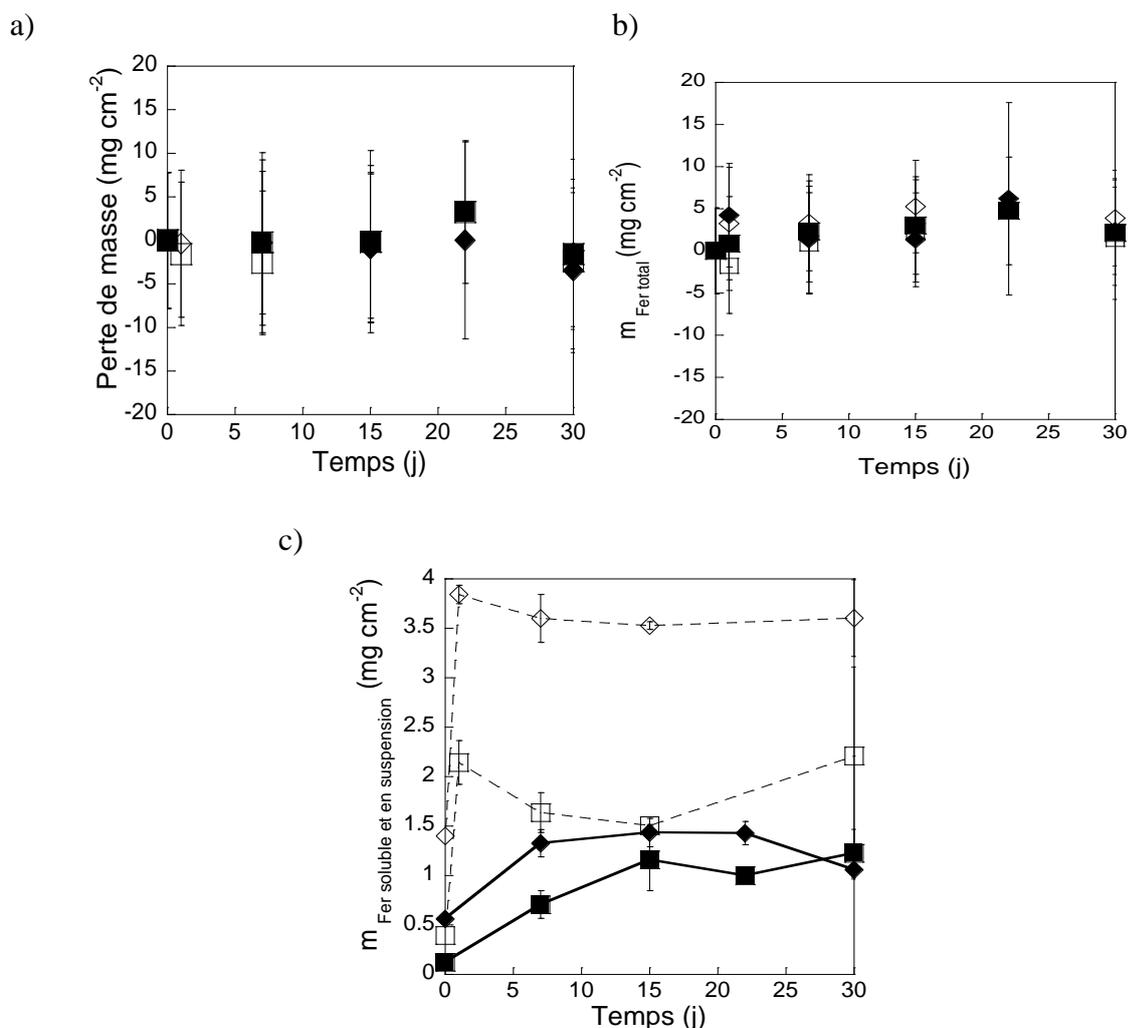
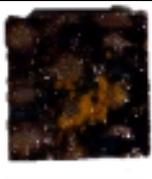


Figure V-8 : (a) Variation de la perte de masse des coupons en fonte, (b) de la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) et (c) de la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps de contact avec le sol de Pau (losange plein), son contrôle (losange vide), le sol de Lesménils (carré plein), et son contrôle Lesménils (carré vide). Les expériences se sont faites à 30 °C, pH = 7 et 10 g de sol ont été mis en suspension dans 100 mL du milieu LB 1/10^e (n = 3).

L'observation visuelle des flacons montre cependant qu'il y a eu réaction. Avec le sol de Pau, le milieu vire au noir après 5 jours et le coupon est très noirci alors qu'en présence du sol de Lesménils, la solution vire au brun/noir après 7 jours et le coupon est de couleur rouille (Tableau V-5). La couleur orangée de départ de la suspension de sol de Lesménils suggère la présence de fer en quantité plus importante que dans l'autre sol (cf. §V-1).

Tableau V-5 : Aspect des suspensions et des coupons après 30 jours d'incubation en fonction des conditions. La barre = 1 cm.

Conditions	Moment du changement de couleur	Couleur	Aspect visuel		
			J0	J30	J30
Sol de Pau	Jour 5	Noir			
Sol de Lesménils	Jour 7	Noir - brun			

L'aspect différent des suspensions et coupons entre les deux sols pouvait être attendu et est logique avec l'hypothèse émise que le sol de Pau contient une forte activité SRB, et celui de Lesménils d'IRB (cf. §V-1).

Les trop faibles variations des paramètres suivis (quantité de fer libéré, de fer total ou perte de masse des coupons) peuvent s'expliquer par les faits que :

i) la corrosion est plutôt localisée (Hardly et Brown, 1984 ; Li *et al.*, 2001). En effet, avec une corrosion localisée, la perte de masse n'est pas assez importante pour être mesurée et être significative dans le temps de l'étude (1 mois).

ii) le milieu de culture est trop dilué et n'a pas autorisé une croissance suffisante des bactéries. En effet, pour éviter que la corrosion physicochimique provoquée par les composés du milieu LB (i.e. riboflavine, extrait de levure, vitamines et autres éléments traces, etc. ; Little *et al.*, 2020a) ne soit trop prépondérante, le milieu LB a été dilué 10 fois dans de l'eau ultrapure stérile. Un autre effet a pu être induit par cette dilution. Il s'agit de l'augmentation de la teneur en eau ce qui a pu privilégier le développement de certains microorganismes telles que des actinomycètes ou des champignons au dépend d'autres (Pitonzo *et al.*, 2004).

iii) Seuls les microorganismes cultivables sur le milieu LB ont eu une activité au détriment des microorganismes non cultivables sur ce milieu, qui pourraient être ceux qui ont réellement une influence sur la corrosion.

V-3.2. Suspensions de sols enrichis

Comme nous venons de le montrer, la biocorrosion de la fonte en contact avec des suspensions de sol préparées dans le milieu LB n'est pas significative. Pour cette nouvelle série de manipulations, nous avons voulu privilégier l'expression des trois groupes métaboliques sur lesquels nous avons portés notre intérêt : IRB, SRB et NRB. L'idée ici est d'enrichir les suspensions préalablement ensemencées avec un sol, par une population microbienne exprimant un métabolisme ciblé (IRB, SRB et NRB). Pour ce faire, un milieu de culture nutritif spécifique à l'un ou l'autre de ces 3 groupes bactériens a été ensemencé tous les mois par un aliquot de culture précédente.

V-3.2.1. Milieu sélectif sur la base du milieu M4

Les nouvelles suspensions de sols ont été préparées par dilution des suspensions de sol de Pau et de Lesménils initialement préparées dans l'eau, 2,5 mL ou 10 mL de ces suspensions ont été placées dans 100 mL de milieu de culture M4 additionné des accepteurs d'électrons spécifiques comme le fer(III) pour les IRB (nommé M4-Fe^{III}), les ions sulfate pour les SRB (nommé M4-SO₄²⁻) et les ions nitrate pour les NRB (nommé M4-NO₃⁻). Un coupon en fonte ductile, préalablement pesé, a été ajouté dans les suspensions.

Tous les mois, 2,5 % ou 10 % de cette suspension de sol ont été prélevées et additionnées à un volume de milieu M4 fraîchement re préparé pour assurer l'apport de nutriments. Le coupon de fonte a lui aussi été transféré dans le nouveau tube⁶. Des prélèvements de la phase aqueuse ont été effectués afin de doser le fer libéré. Au bout de 13 mois pour M4-Fe^{III} et M4-SO₄²⁻ et 4 mois pour M4-NO₃⁻, l'expérience est arrêtée, les coupons ont été prélevés afin de faire les analyses gravimétriques et traités à HCl + HMT afin de doser le fer total. En parallèle, des contrôles abiotiques ont été effectués, il s'agit des suspensions de sol stériles sans renouvellement de milieu. Toutes les expériences ont été menées à 30 °C en anaérobie et en triplicata.

Pour M4-Fe^{III}, il y a déjà 4 mg cm⁻² de Fe^{III} dans le milieu d'incubation afin de forcer le développement des bactéries ferriréductrices (Figure V-9). Avec les deux sols, l'évolution du fer libéré est lente. A 8 mois, il y a un plateau (Figure V-9a). Cette évolution est similaire à celle observée dans le cas des souches pures (cf. Chapitre IV). Les concentrations en fer total et la perte de masse sont supérieures pour le sol de Lesménils en comparaison avec celui de Pau

⁶ Exceptés aux 5^e et 6^e mois où du fait de la crise sanitaire de la Covid-19, les milieux n'ont été revouelés qu'après 2 mois.

(respectivement $120 \pm 2 \text{ mg cm}^{-2}$ et $52 \pm 16 \text{ mg cm}^{-2}$ de fer libéré au 13^e mois d'incubation). Cela va dans le sens où une activité d'IRB existe dans le sol de Lesménils, ce qui appuie l'observation effectuée en §V-1. Les taux de renouvellement des suspensions pour Lesménils (2,5 % et 10 %) n'influent pas alors qu'avec les suspensions de sol de Pau, moins on dilue les bactéries, plus le métabolisme ferri réducteur est exprimé (i.e. $67,5 \pm 1,1 \text{ mg cm}^{-2}$ avec 10 % contre seulement $37,2 \pm 0,2 \text{ mg cm}^{-2}$ à 2,5 %). Les effets des microorganismes issus du sol de Pau sont cependant sans réel impact sur le processus de corrosion de la fonte car les données reportées sont au même niveau que le contrôle abiotique. Pour conclure, cette série de manipulation montre indirectement que le sol de Lesménils contient des bactéries appartenant au groupe métabolique IRB et que ces bactéries participent à la corrosion de la fonte car la concentration en fer total est significativement différente de celle du contrôle abiotique.

Pour les deux autres milieux M4 enrichis (M4-SO₄²⁻, avec M4-NO₃⁻), la perte de masse et la quantité de fer total issues des coupons sont faibles et de l'ordre de grandeur des contrôles abiotiques (Figure V-10). Elles ne sont pas significativement différentes ni entre les deux sols ni entre les ensemencements à 2,5 % et 10 %. Néanmoins, avec le milieu M4-SO₄²⁻, le milieu de culture a noirci au cours du temps, ce qui est typique d'une activité SRB en présence de Fe^{II}. De plus, un coupon issu de ces enrichissements issus du sol de Lesménils s'est visuellement détaché des autres, il était fortement abimé.

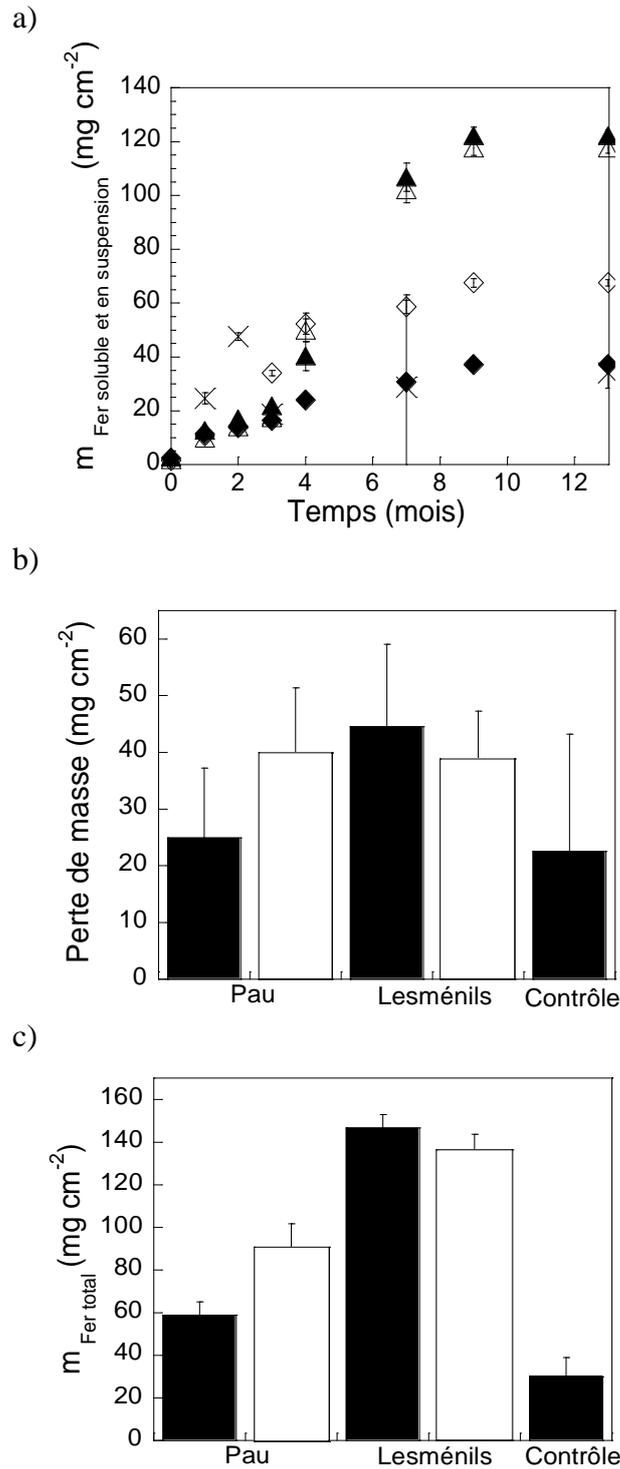


Figure V-9 : Suivi de la corrosion au cours des enrichissements en bactéries ferriréductrices (sur milieu M4-Fe^{III}). Un coupon a été placé dans un milieu M4-Fe^{III} qui est renouvelé tous les mois à 90 % (symbole ou histogramme noir) ou à 98,5 % (symbole ou histogramme vide). La corrosion a été suivie par : (a) mesure du fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ dans des enrichissements ensemencés par les sols de Pau (losange) ou Lesménils (triangle) ou un contrôle abiotique (croix) ; (b) mesure de la perte de masse et (c) mesure de la quantité de fer total $m_{\text{Fer total}}$ au 13^e mois d'incubation. Les contrôles correspondent à des essais en milieu M4-Fe^{III} stériles. Les incubations ont été faites à l'obscurité à 30 °C. Chaque point ou valeur représente la moyenne de trois essais indépendants (3 flacons) avec l'écart-type correspondant (barres verticales).

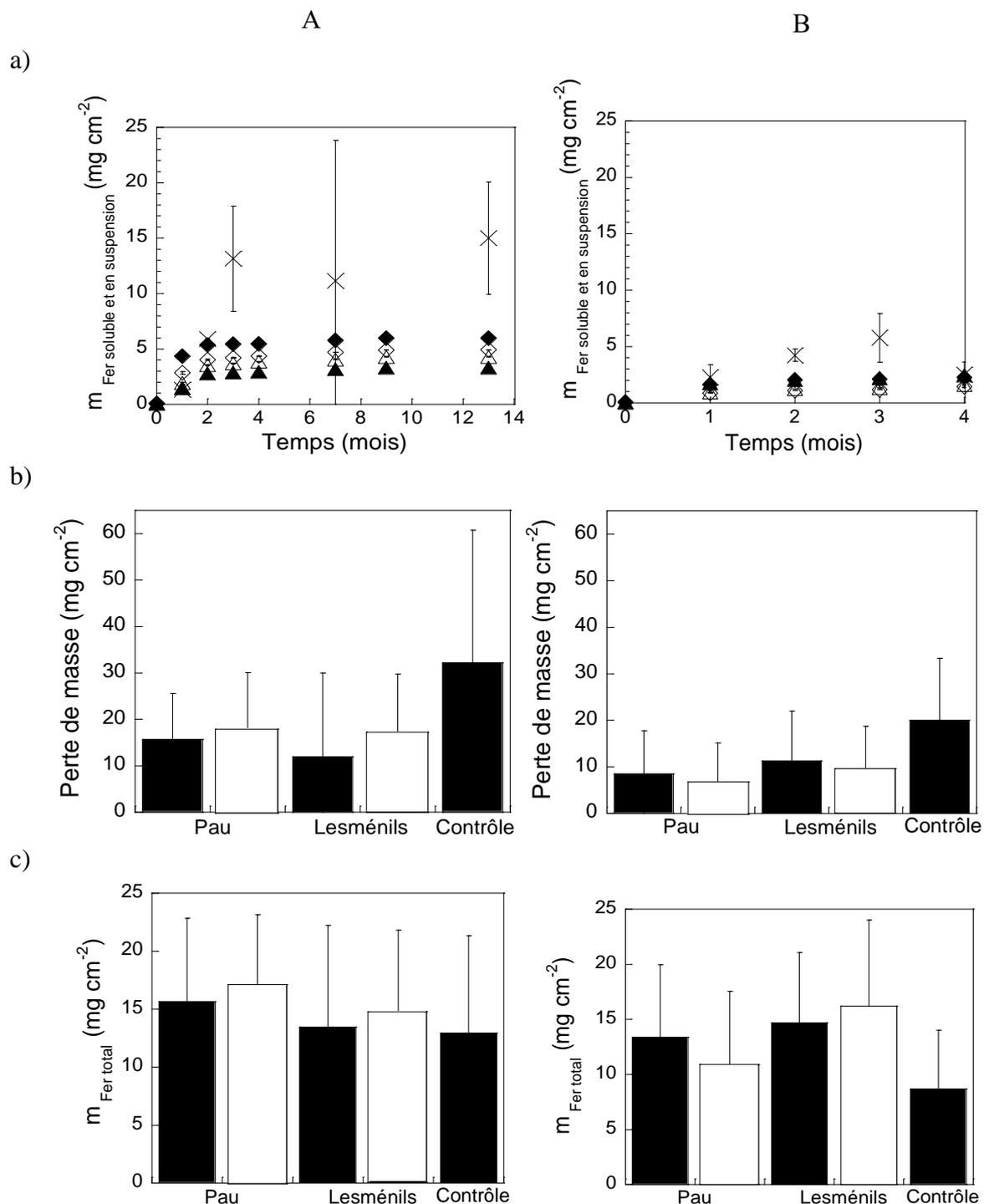


Figure V-10 : Suivi de la corrosion au cours des enrichissements en bactéries (A) sulfatoréductrices (sur milieu M4- SO_4^{2-}) et (B) nitrate réductrice (sur milieu M4- NO_3^-). Un coupon a été placé dans un milieu M4- SO_4^{2-} ou M4- NO_3^- qui est renouvelé tous les mois à 90 % (symbole ou histogramme noir) ou à 98,5 % (symbole ou histogramme vide). La corrosion a été suivie par : (a) mesure du fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ dans des enrichissements ensemencés par les sols de Pau (losange) ou Lesménils (triangle) ou un contrôle abiotique (croix) ; (b) mesure de la perte de masse et (c) mesure de la quantité de fer total $m_{\text{Fer total}}$ au 13^e ou 4^e mois d'incubation. Les contrôles correspondent à des essais en milieu M4 stériles. Les incubations ont été faites à l'obscurité à 30 °C. Chaque point ou valeur représente la moyenne de trois essais indépendants (3 flacons) avec l'écart-type correspondant (barres verticales).

V-3.2.2. Bactéries issues d'enrichissements

À partir des résultats qui viennent d'être présentés, deux conditions opératoires ont conduit à une corrosion significative du solide. Pour s'assurer que cette corrosion est spécifique à la présence de bactéries issues des enrichissements, celles-ci ont été récoltées en totalité par centrifugation. Les culots obtenus ont été remis en suspension dans 10 mL de milieu M4-Fe^{III} + NO₃⁻ + SO₄²⁻ en présence d'un nouveau coupon. L'expérience a été conduite 30 jours, en triplicata, à 30 °C et sous anoxie. Les culots proviennent des enrichissements ensemencés par le sol de Lesménils dans les tubes de milieux M4-Fe^{III} et M4-SO₄²⁻, nommés respectivement « culot 1 » et « culot 2 ».

Nous avons cherché à connaître la ou les population(s) bactérienne(s) présente(s) dans ces échantillons particuliers à l'aide de la biologie moléculaire. Nous avons choisi une approche par séquençage dont la procédure est présentée au § II-5.2.4. Nous avons analysé les deux culots bactériens en triplicata avant qu'ils soient mis en présence du milieu M4 tout accepteur d'électrons. Tout d'abord, la concentration en acide nucléique a été appréciée par le rapport des absorbances à 260 et 280 nm (Annexe 7). Bien que ces ratios indiquent la présence de contaminants, les échantillons restent exploitables. Le séquençage d'ADN et l'analyse de la diversité alpha ont ensuite été effectués (Annexe 7). La distribution des phyla est cohérente entre les triplicats. Pour les deux culots, le phylum majoritaire est celui des firmicutes. Le phylum des Desulfobacterota est majoritaire pour le culot 2. Seul le culot 1 montre la présence de protéobactéries. Quant à la proportion d'halobactéries, elle semble identique quel que soit le culot. Il y a clairement une grande diversité de famille de bactéries dans les deux culots. Globalement, les mêmes familles sont retrouvées dans les deux culots mais elles sont distribuées différemment comme le montre l'histogramme réalisé sur base des familles les plus abondantes (Figure V-11). On y distingue d'ailleurs principalement des IRB et des SRB dont ce dernier groupe métabolique est le plus prépondérant. On dénombre 267 et 199 familles appartenant aux SRB, 170 et 107 familles représentantes des IRB, respectivement dans les culots 1 et 2. Sur la base de données bibliographiques (Gupta *et al.*, 2018), parmi les IRB, ont été clairement identifiées, les familles *Christensenellaceae*, *Gracilibacteraceae* et *Lachnospiraceae*. Côté SRB, ce sont *Desulfobacteriaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Lachnospiraceae* et *Clostridiaceae*. Dans les deux culots, une fraction non négligeable de familles correspond à des méthanogènes (i.e. 27 familles de méthanogène pour le milieu M4-Fe^{III} et 8 pour le milieu M4-SO₄²⁻).

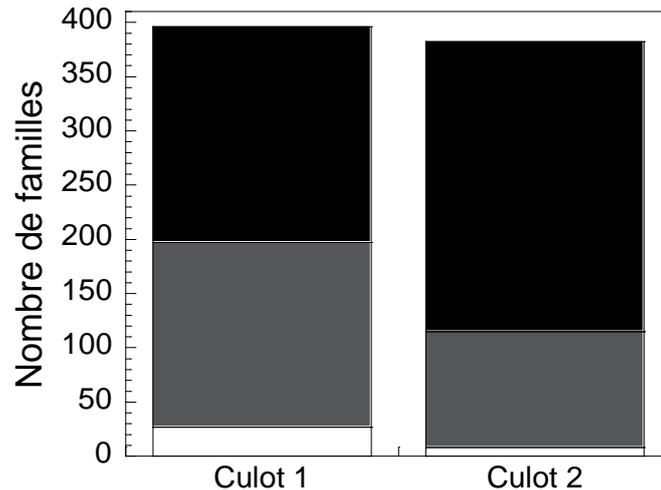


Figure V-11 : Nombre de familles appartenant aux SRB (noir), aux IRB (gris) et aux méthanogènes (blanc) en fonction du culot.

Pendant 1 mois (à 30 °C, anaérobie, en triplicata), nous avons suivi l'évolution de la perte de masse, des quantités de fer total et de fer libéré de coupons en fonte (coupons sacrifiés pour point de mesure) dans le milieu « M4-tout accepteur d'électrons » ensemencé par le culot 1 (moitié de la quantité récupérée de la manipulation précédente), le culot 2 (moitié de la quantité récupérée de la manipulation précédente) ou le mélange restant des deux culots (50 % culot 1 + 50 % culot 2). Les résultats obtenus ne montrent pas de biocorrosion significative (Figure V-12).

Les observations visuelles des suspensions et coupons indiquent pourtant des modifications (Tableau V-6). Après 1 mois, en présence du culot bactérien 1, le milieu est devenu plus trouble et le coupon est gris. Le milieu contenant le culot 2 avec le coupon a viré au noir, signe d'une activité sulfatoréductrice. Dans le cas du mélange des deux culots, des particules noires en suspension et le coupon devenu gris avec des tâches plus claires sont observés.

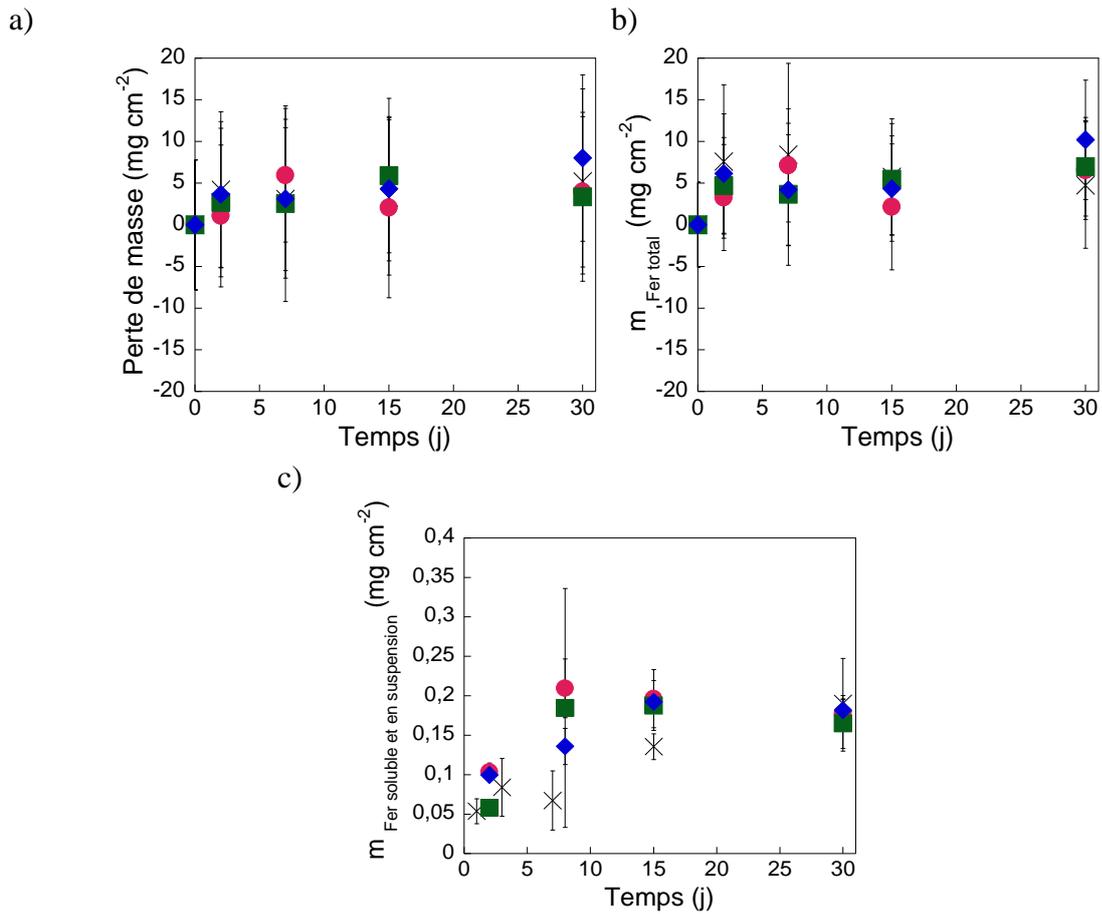
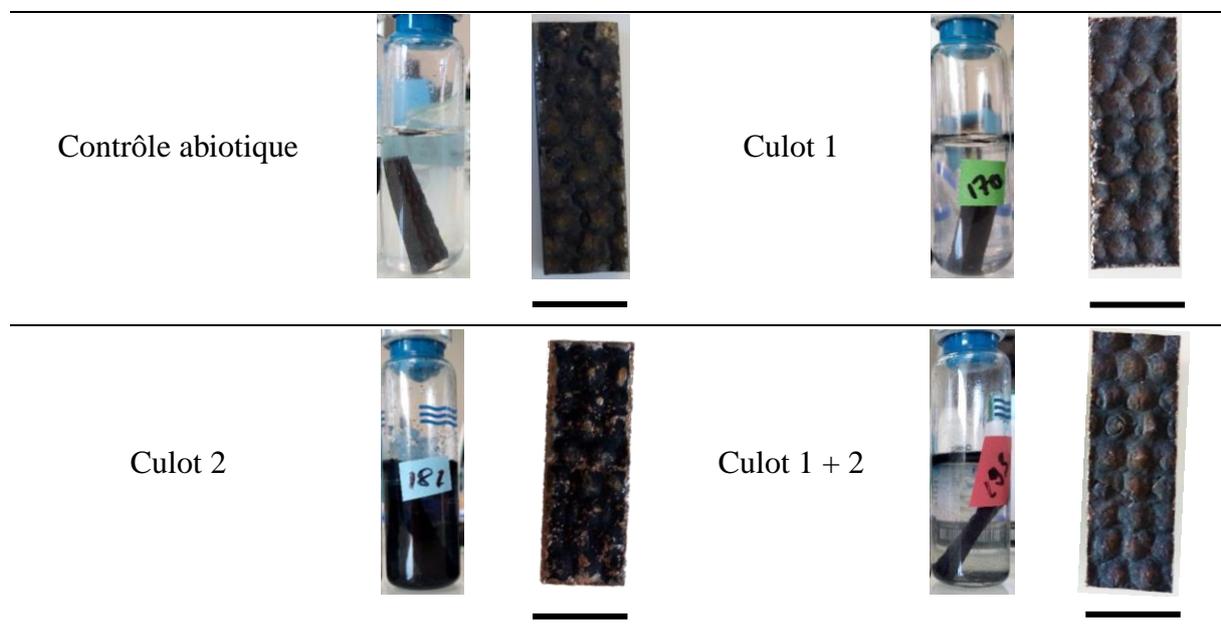


Figure V-12 : Variation de la perte de masse des coupons en fonte (a), de la teneur en fer total $m_{\text{Fer total}}$ (i.e. Fe libéré + HCl extractible) (b) et de la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ (c) en fonction du temps d'incubation avec le culot 1 (rond), le culot 2 (carré), les culots 1 + 2 (losange) et avec le contrôle abiotique (croix). Les incubations se sont faites à 30 °C dans le milieu M4-tout accepteur d'électrons (n = 3).

Tableau V-6 : Aspect des flacons et des coupons au 30^e jour d'incubation. Barre noire = 1 cm.



L'observation par MEB et l'analyse par spectrométrie Raman révèlent une évolution des échantillons solides et des différences en fonction des conditions expérimentales et du contrôle abiotique (Figure V-13). Par exemple, pour le culot 2, sont distingués des dépôts ayant des formes de plaquettes (Figure V-13c). Pour le culot 1, nous avons des morphologies similaires à celles de la coculture *S. putrefaciens* + *D. desulfuricans* (Figures V-13b et IV-40). Dans les deux culots, peu d'objets s'apparentant à des bactéries ont été observés (cercles jaunes). Une désorption des microorganismes a pu se faire lors de la mise sous vide des échantillons pour la réalisation de clichés MEB. Il faut également rappeler que la densité bactérienne dans ces expériences est plus faible que celles des tests en souches pures en raison de la double dilution des sols à l'origine de cette série de manipulation (suspension de sol réalisée dans l'eau puis dilution dans le milieu M4).

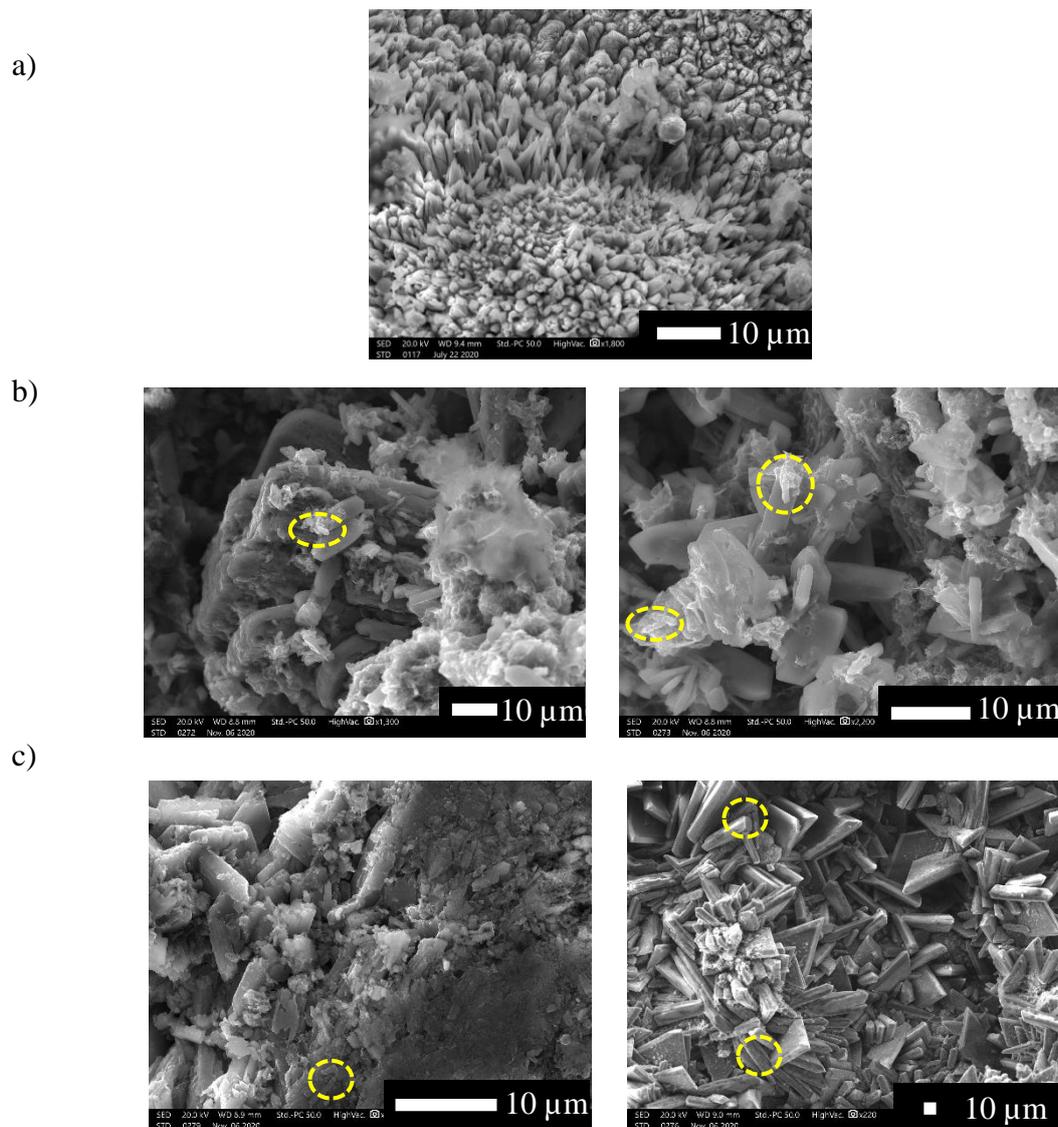


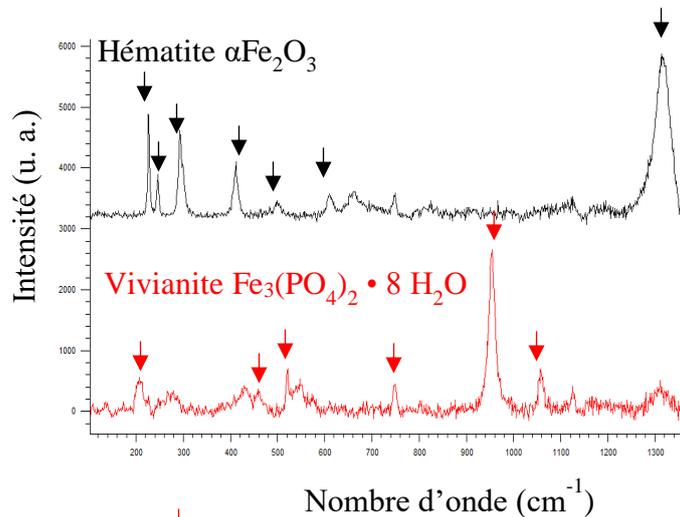
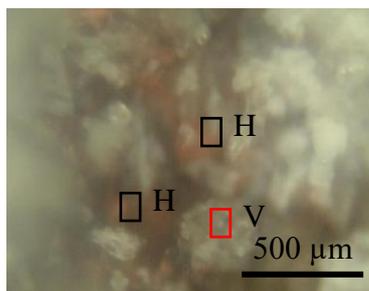
Figure V-13 : Images en microscopie électronique à balayage du coupon avant et après 30 jours d'incubation dans (a) le coupon sain, (b) le culot 1 et (c) le culot 2 pour 2 zones différentes.

Des objets évoquant des cellules bactériennes sont entourés.

Par spectrométrie Raman, l'hématite ($\alpha\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$) et la vivianite ($\text{Fe}^{\text{II}}(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$) sont retrouvés sur le coupon après contact avec le culot 1 (Figure V-14a). Sur le coupon du culot 2, la mackinawite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{S}$), la greigite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{S}_4$), la maghémite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) et une rouille verte ($\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{X}_x, n \text{H}_2\text{O}$) ont été identifiés (Figure V-14b et c). On remarque que l'hématite et la maghémite sont déjà présentes dans la couche native d'oxydes mais par contre la synthèse de vivianite, mackinawite, greigite et rouille verte nous indique bien qu'une corrosion de surface des coupons a été mise en œuvre.

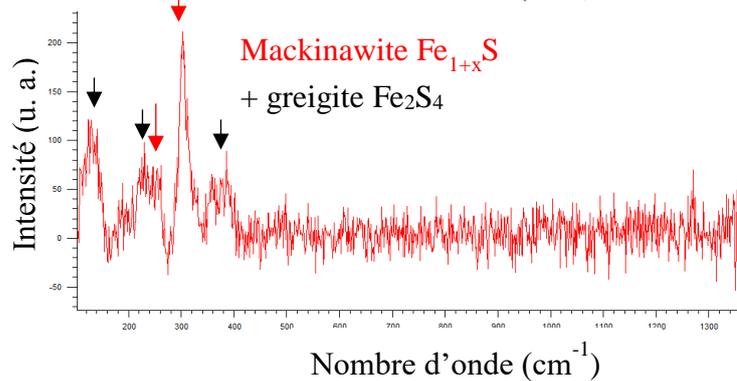
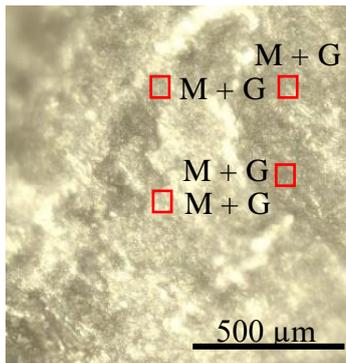
Avec le culot 1, les mêmes produits de corrosion qu'avec *S. putrefaciens* en souche pure ont été retrouvés (cf. Chapitre IV-4.1.1.1), ce qui est cohérent car nous attendions d'avoir une activité ferriréductrice puisque le culot est issu d'une culture en milieu M4- Fe^{III} . Avec le culot 2, ce sont des sulfures de fer (i.e. mackinawite et greigite) qui ont été retrouvés en accord avec une activité sulfatoréductrice, le culot 2 provient d'une culture en milieu M4- SO_4^{2-} . De la rouille verte (RV) a également été détectées, ce que nous n'avions pas observé auparavant avec les monocultures de laboratoire. Il ne faut pas oublier que le culot est un mélange de divers groupes métaboliques et que les souches mises en évidence par la biologie moléculaire sont différentes de celles utilisées comme modèle. La génération de Fe^{II} suite à l'oxydation de la fonte combinée à la présence ou la production d'ions Fe^{III} est une voie de synthèse des RV. Géhin *et al.* (2002) ont démontré que des RV peuvent être obtenues à partir d'un mélange de sels de Fe^{II} et de Fe^{III} et pas seulement en contrôlant l'oxydation d'une solution d'ions ferriques.

A



B

a)



b)

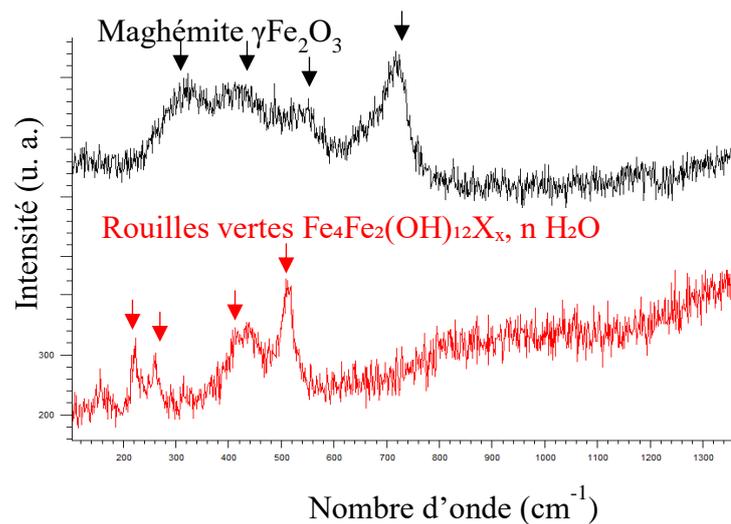
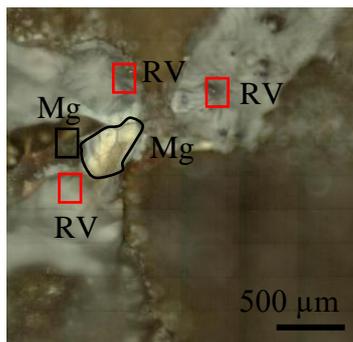


Figure V-14 : Spectroscopie Raman des coupons incubés pendant 30 jours en présence A) du culot 1 et B) du culot 2 avec une analyse de deux zones (a et b).

H = hématite, V = vivianite, M = mackinawite, G = greigite, Mg = maghémite et RV = rouilles vertes.

V-4. Évaluation du caractère corrosif sur les coupons en fonte revêtue

Les surfaces externes des tuyaux en contact avec les sols ne sont pas directement de la fonte mais sont en réalité recouvertes de différents revêtements conçus pour les protéger le plus

longtemps possible de la corrosion. Pendant l'installation des tuyaux, les revêtements peuvent être endommagés. Nous avons donc voulu voir le comportement d'échantillons de tuyaux revêtus, avec et sans blessure, en présence de microorganismes.

Pour faire ces premiers tests, des tests préliminaires, nous avons choisi un milieu correspondant à la suspension du sol de Pau préparées dans le milieu M4 avec tous les accepteurs d'électrons (fumarate, nitrate et sulfate). En parallèle, toute chose étant par ailleurs égale, nous avons mené un test avec *S. putrefaciens* (densité bactérienne : 10^8 bactéries mL^{-1}) car cette bactérie avait induit une biocorrosion visible sur fonte nue (cf. Chapitre IV). C'est en quelque sorte un contrôle positif pour cette série. Des contrôles abiotiques et des expériences avec des coupons bruts ont également été ajoutés. Comme coupons revêtus, nous disposions de certains revêtus avec uniquement le revêtement actif barrière Zn Al Cu ou le revêtement Aquacoat® et d'autres avec la superposition Zn Al Cu /Aquacoat®. La blessure a été réalisée en marquant les coupons à l'aide d'une perceuse équipée d'une mèche (cf. Figure II-5). La profondeur moyenne déterminée par profilométrie était de $315 \pm 2 \mu\text{m}$ et le diamètre du trou de 1,8 mm, ce qui permet d'assurer la mise à nu de la fonte. Les faces des coupons ont été enrobées d'une résine excepté la face externe. Les expériences ont été menées pendant 7 mois à 30 °C en anaérobiose, en triplicata et tous les mois, le milieu de culture a été renouvelé.

Pour cette série d'analyse, le suivi de la perte de masse n'est pas pertinent. En effet, nous avons testé le traitement HCl + HMT destiné à solubiliser les produits de corrosion adsorbés sur des coupons parfaitement revêtus et les revêtements ont été abîmés et ont donc conduit à une perte de masse non fiable à un phénomène de corrosion. Nous n'avons pas fait d'études supplémentaires pour en connaître l'origine.

V-4.1. Suivi du fer oxydé

Pour estimer le degré de corrosion de cette série d'échantillons, nous avons uniquement pris en compte l'évolution des quantités de fer libéré au cours du temps (Figure V-15). Les échelles ont été ajustées en fonction de l'ordre de grandeur pour plus de lisibilité. Globalement et comme attendu, la concentration en ions fer retrouvée dans la phase aqueuse est bien moins importante pour les échantillons revêtus (revêtements Zn Al Cu et Aquacoat®) par rapport aux échantillons nus. Dans nos conditions opératoires et délai d'expérience, l'ordre de grandeur de $0,8 \text{ mg cm}^{-2}$ de fer ce qui est environ 10 fois moins important qu'avec le contrôle de fonte brute (environ 9 mg cm^{-2}). La concentration en fer libéré est plus élevée avec les contrôles abiotiques qu'avec

les tests biotiques et elle augmente linéairement. Cette linéarité a aussi été observée en milieu NaCl 30 g L⁻¹ (cf. Chapitre III). Pour les tests biotiques, il y a une augmentation suivie d'un plateau. Il existerait donc une protection de la fonte mise en place grâce aux microorganismes. Il n'y a globalement pas de différence significative entre les coupons revêtus blessés et non blessés. Cela n'est pas surprenant puisque la blessure réalisée est petite (environ 1 mm). Compte tenu d'une part que la corrosion se fait généralement par piqûre et, d'autre part, que la densité bactérienne n'est pas ici très importante puisque nous travaillons avec des suspensions de sols diluées, il n'est pas étonnant que dans ce temps d'expérience (7 mois), nous n'ayons pas ici observé un franc phénomène. Cela peut aussi sous-entendre que les revêtements ont bien eu un effet protecteur : après une blessure, l'ion zinc issu du revêtement actif Zn Al Cu vient précipiter au niveau de la blessure et forme un oxyde de zinc qui protège alors la fonte (Annexe 1).

Les résultats de l'échantillon avec le double revêtement Zn Al Cu / Aquacoat® sont surprenants et incompréhensibles car l'ordre de grandeur de la concentration en fer libéré est identique à celui du contrôle fonte brute sur les premiers 3 - 4 mois. Ce sont des premiers tests et il nous faudrait mieux contrôler certains points comme l'enrobage (peut-être moins régulier pour cette condition) ou bien l'intégrité du double revêtement après la décontamination des coupons.

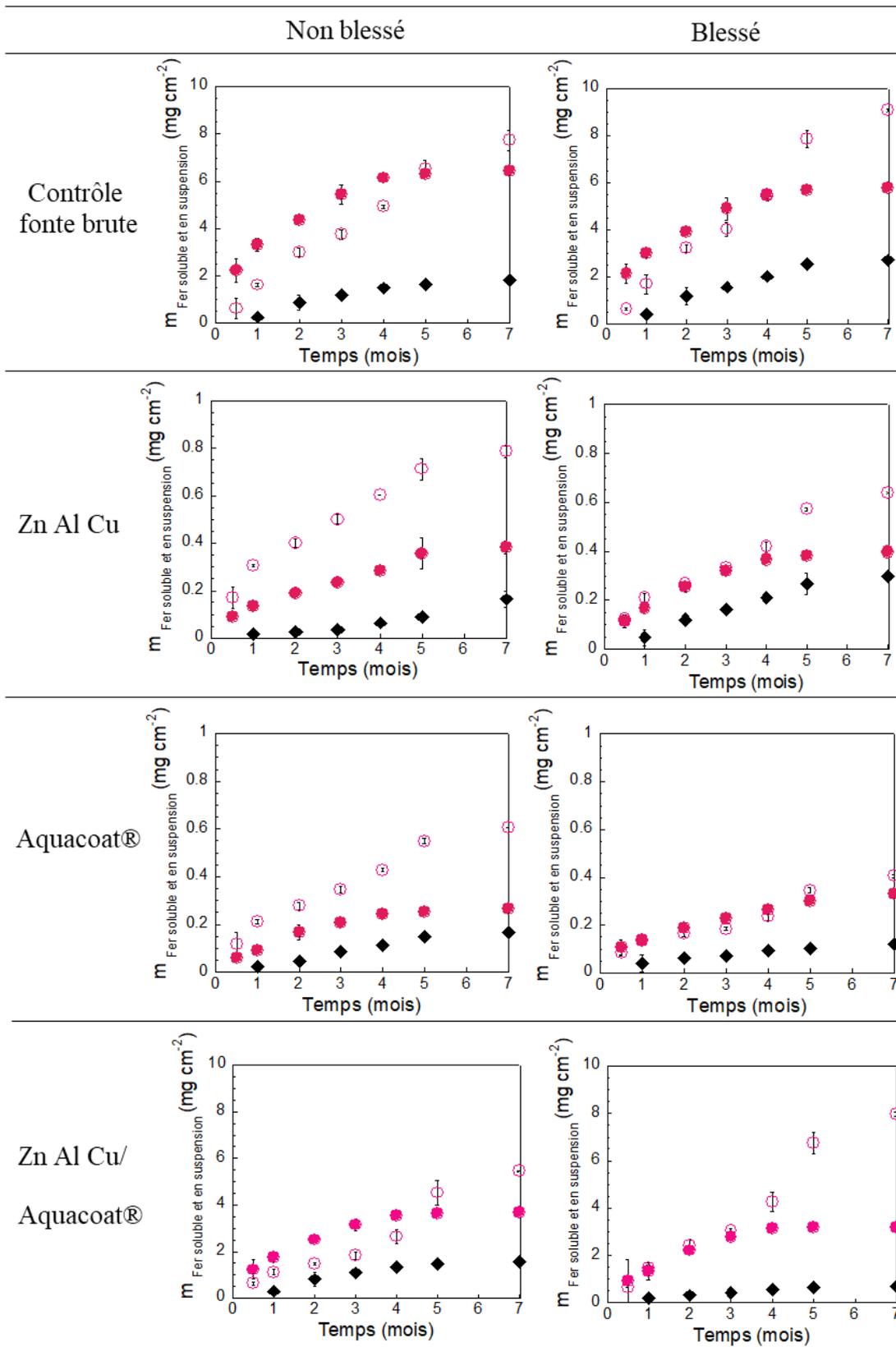


Figure V-15 : Variation de la teneur en fer libéré $m_{\text{Fer soluble et en suspension}}$ en fonction du temps de contact d'un coupon de fonte, revêtu ou non, blessé ou non, avec le sol de Pau (losange), *Shewanella putrefaciens* (rond plein) et le témoin abiotique (rond vide) ($n = 3$, les cultures ont été faites à 30 °C dans M4-tout accepteurs).

Pour les expériences en présence de coupons non revêtus, la concentration de fer total a pu être mesurée puisque le traitement acide a pu être réalisé (Figure V-16). Seule la quantité de fer total pour les coupons en fonte brute incubés en présence de *S. putrefaciens* est supérieure à 0 et est donc significativement plus élevée que la masse de la couche native d'oxydes. C'est cohérent avec ce qui a été démontré avec *S. putrefaciens* dans le Chapitre IV.

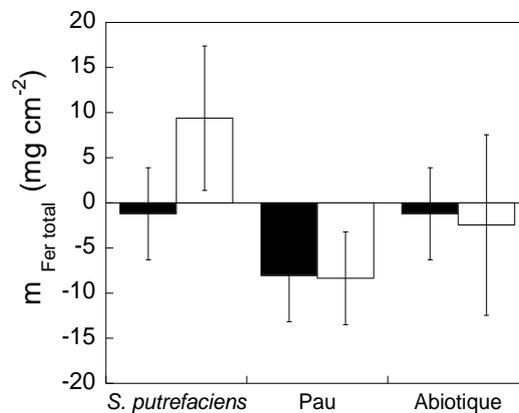


Figure V-16 : Masse de fer total $m_{\text{Fer total}}$ issu des coupons en fonte brute non blessés (noir) et blessés (blanc) après 7 mois d'incubation après soustraction de la couche native d'oxydes, (n = 3).

V-4.2. Détection des produits de corrosion adsorbés/précipités

Les coupons contrôles en fonte brute ont été analysés en spectroscopie Raman (Figure V-17). En présence de *S. putrefaciens*, la surface est recouverte d'hématite, oxyde naturellement présent dans la couche native d'oxydes. On y observe de la vivianite dont la présence ne peut être expliquée que par la production de Fe^{II} liée à l'activité bactérienne de *S. putrefaciens* qui respire le Fe^{III} en Fe^{II} et qui précipite en $\text{Fe}^{\text{II}}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$ avec le phosphate présent dans le milieu. Ce résultat est tout à fait cohérent avec ce qui a déjà été observé après 30 jours d'incubation avec *S. putrefaciens* dans son milieu de culture au Chapitre IV. Avec le sol de Pau (Figure V-17b), il y a plusieurs types de composés. La présence d'hématite est tout ou partie liée à la couche native d'oxydes. La présence de mackinawite Fe_{1+x}S est en cohérence avec la couleur noire des flacons (Annexe 8). Nous avons d'ailleurs observé ce produit d'oxydation lorsque *D. desulfuricans* (souche pure) a été incubée dans son milieu de culture propice (M4-sulfate) avec la fonte brute pendant 1 mois (cf. Chapitre IV §IV-1.2.). Nous retrouvons aussi un composé mixte $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ de type rouilles vertes $\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{X}_x \cdot n\text{H}_2\text{O}$, pouvant découler d'activités microbiennes variées puisque tous les accepteurs sont présents. Cela permet, après les 7 mois d'incubation, d'obtenir un mélange de divers groupes métaboliques, menant à une action conjointe des bactéries du sol de Pau.

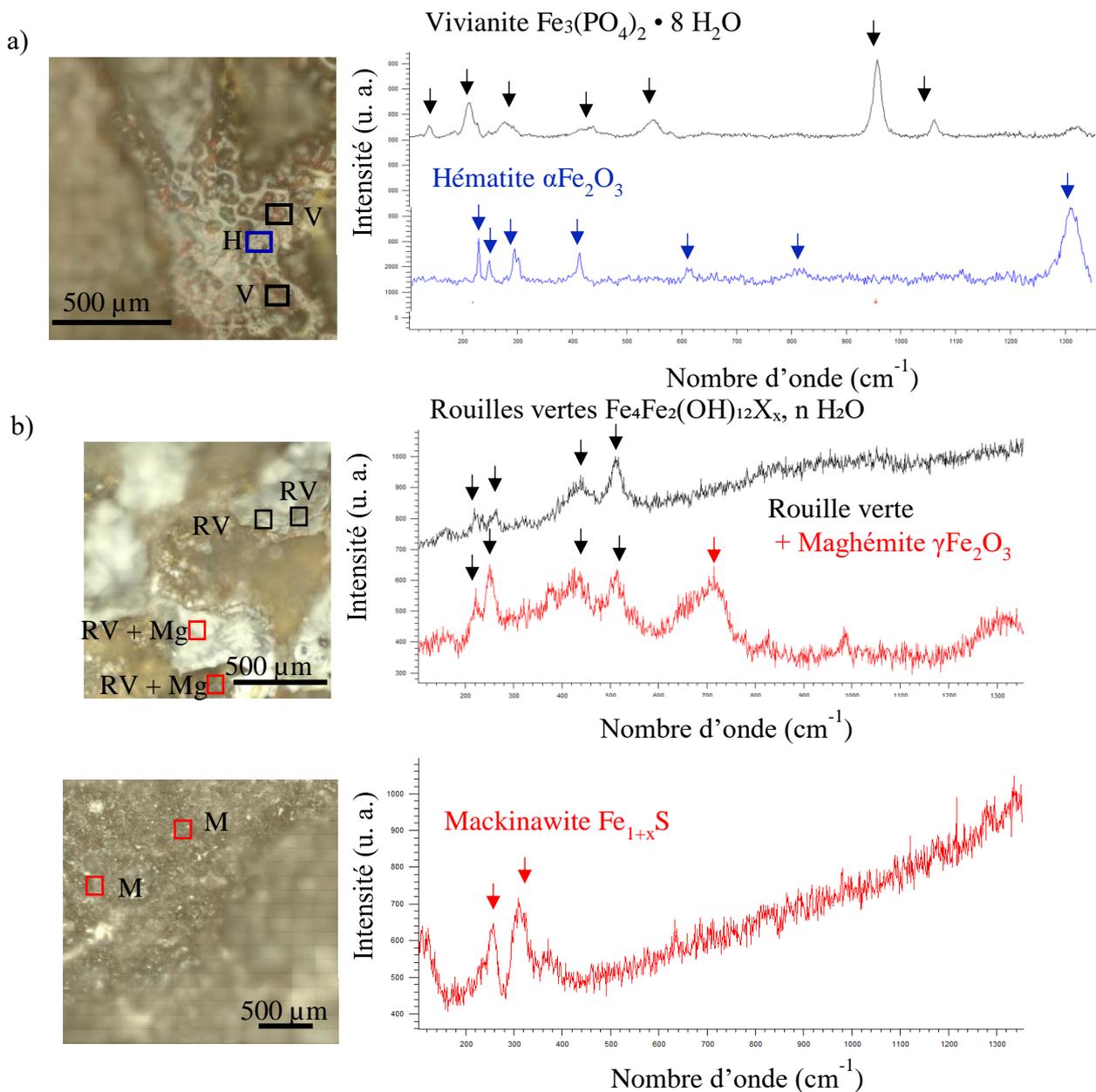


Figure V-17 : Spectroscopie Raman de la surface du coupon nu non blessé incubé avec a) *Shewanella putrefaciens*, b) le sol de Pau.

H = hématite, V = vivianite, M = mackinawite, G = greigite, Mg = maghémite, RV = rouilles vertes et Mix = mélange.

V-4.3. Évaluation de la population microbologique à 7 mois

La population microbologique présente dans la phase aqueuse après les 7 mois en contact avec le coupon a été évaluée car nous voulons rendre compte de ce qu'il a pu se passer pendant les 7 mois d'incubation. En effet, au cours du développement microbien, il y a génération et consommation de composés, le milieu change et la population microbienne issue du sol évolue. La même approche que précédemment a été mise en place (détails au Chapitre II § II-5.2.4). Dans un premier temps, la concentration en acide nucléique a été vérifiée pour confirmer

l'exploitabilité des résultats. Ensuite, nous avons procédé au séquençage d'ADN. Les résultats sont détaillés dans l'Annexe 9.

Le phylum majoritaire est celui des actinobactéries, on retrouve également des firmicutes. Il y a 44 familles inconnues dont 42358 espèces bactériennes. Cette observation peut être liée à la présence de pollution dans les extraits d'ADN. Les familles identifiées les plus prépondérantes après ces 7 mois d'incubation sont *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Sedimentibacteraceae*. En considérant les familles les plus abondantes, un histogramme a été réalisé (Figure V-18). Comme fraction la plus abondante, on trouve les bactéries réductrices de thiosulfate (96 familles donc 188604 espèces), ces souches sont d'ailleurs reconnues pour réduire le thiosulfate en sulfure en condition d'anaérobiose et cette famille a déjà été citée comme responsable de piqûres sur de l'acier dans un environnement marin en milieu anaérobiose (Bermont-Bouis *et al.*, 2006). Il n'est pas surprenant de trouver ce groupe puisque le sol de Pau est proche d'un terrain agricole et le thiosulfate, $S_2O_3^{2-}$ se trouve dans des formulations d'engrais. Le groupe métabolique IRB est de seconde importance avec 63 familles dont 37097 espèces différentes. On observe à moindre mesure des SRB (21 familles dont 3828 espèces).

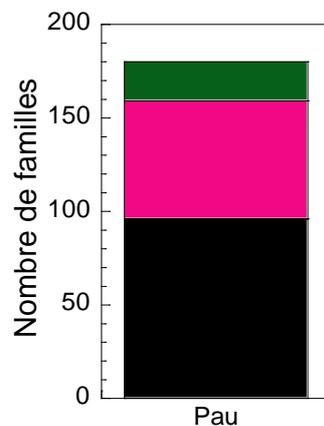


Figure V-18 : Nombre de familles en fonction de l'enrichissement appartenant aux SRB (vert), aux IRB (rose) et aux bactéries thiosulfate-réductrices (noir).

La présence d'IRB explique pourquoi nous avons de la rouille verte en surface des coupons. Les SRB et la proportion importante de bactéries thiosulfate-réductrices peuvent toutes deux expliquer la coloration noire des flacons du sol de Pau et une production de mackinawite, un minéral de sulfure ferreux de couleur noire.

V-5. Conclusion du Chapitre V

Ce Chapitre V a présenté les premiers tests nous permettant de nous rapprocher des conditions réelles, c'est-à-dire l'enfouissement des tuyaux revêtus dans les sols.

La première approche a été de tester, pendant 1 mois, le potentiel corrosif de milieuxensemencés par des suspensions de sol (et non pas directement de sols) préparées dans un milieu de culture riche sur des coupons de fonte nue. Les deux sols choisis de Pau et de Lesménils ont des traits de caractères différents notamment en termes de résistivité et de concentrations en sulfure et en fer. Le temps d'incubation et la densité microbienne apparemment faible n'ont pas permis de mettre en évidence une corrosion marquée. Il n'y a pas eu d'expression particulière de métabolites impliqués dans la MIC.

Nous avons testé une seconde approche en essayant de privilégier l'action des groupes métaboliques bactériens présents dans les sols et en cohérence avec la première partie du travail de thèse : les IRB, SRB et NRB. Pour cela, les expériences ont été menées dans le milieu M4 dopé en accepteurs d'électrons spécifiques à chacun de ces trois groupes. Les coupons en fonte nue ont été laissés plusieurs mois en présence de suspensions des sols de Pau et de Lesménils avec le souci de renouveler périodiquement le milieu pour assurer la présence suffisante de nutriments. En enrichissant le milieu avec des ions ferriques (milieu M4-Fe^{III}), nous avons bien vu une activité ferriréductrice avec la présence de produits de corrosion cohérents, à base de Fe^{II} (vivianite) (Tableau V-7). La fonte nue a subi une corrosion similaire qu'avec *S. putrefaciens* (où le taux était de $6,8 \pm 2,7$ mg cm⁻² mois⁻¹, Chapitre IV). En travaillant avec le milieu M4-SO₄²⁻, nous avons bien mis en évidence la signature d'activité sulfatoréductrice avec la présence de mackinawite sans qu'il y ait de véritable accélération de la corrosion, phénomène qui avait déjà été observé avec la souche *D. desulfuricans* (où le taux était de $1,9 \pm 0,1$ mg cm⁻² mois⁻¹, Chapitre IV).

Tableau V-7 : Taux de corrosion calculés à partir du fer libéré, exprimé en mg cm⁻² mois⁻¹, (n = 3).

	Taux de corrosion (mg cm ⁻² mois ⁻¹)		
	Pau	Lesménils	Contrôle
M4-Fe ^{III}	4,0 ± 1,6	9,2 ± 0,3	2,6 ± 0,4
M4-SO ₄ ²⁻	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,4

En parallèle, des tests avec des coupons revêtus ont été menés pendant 7 mois. Nous n'avons pas observé de phénomène particulier de corrosion ce qui est en bonne cohérence avec l'aspect

protecteur des revêtements. Des tests ont été menés en provoquant des blessures, comme cela peut avoir lieu sur le terrain au moment de l'installation des tuyaux et nous n'avons pas non plus observé d'effets probants. Soit les revêtements permettent effectivement de réparer les blessures, soit le temps de cette expérience n'était pas suffisamment important pour voir de probables effets corrosifs.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif général de cette thèse visait à étudier l'influence des bactéries sur la corrosion de la fonte ductile brute de Saint-Gobain PAM en milieu anoxique. Plusieurs stratégies ont été retenues pour mener à bien cette étude. La première a été de mettre en place un protocole de mise en évidence de la MIC sur la fonte brute de Saint-Gobain PAM (**Chapitre III**). Ce protocole nous a permis de tester l'impact de bactéries modèles des activités de différents groupes métaboliques : les bactéries réductrices du fer ferrique (IRB) avec *Shewanella putrefaciens*, des sulfates (SRB) avec *Desulfovibrio desulfuricans* et des nitrates (NRB) avec *Klebsiella mobilis* (**Chapitre IV.1**). Pour tenter de se rapprocher des conditions réelles (i.e. un sol, riche en diversité microbienne), deux approches ont été retenues, i) les souches pures de laboratoire ont été mise en coculture deux à deux et leur impact a été évalué sur la fonte (**Chapitre IV.2**) ; ii) des suspensions de sols ont été utilisées, soit en présence d'un milieu de culture riche, soit avec des milieux spécifiques afin d'enrichir les sols en microorganismes IRB, SRB ou NRB. Enfin, pour compléter nos recherches, des coupons en fonte revêtus de Saint-Gobain PAM ont été soumis à différentes cultures microbiennes afin de s'assurer du rôle protecteur des revêtements dans un contexte de corrosion (**Chapitre V**).

Dans le contexte de la corrosion de matériaux métalliques, les études rapportées dans la littérature utilisent des coupons métalliques polis pour faciliter les interprétations. Dans notre cas, la fonte ductile présente à son extrême surface une couche hétérogène d'oxydes qui constitue une caractéristique importante dans notre système car nous avons montré qu'elle affecte fortement le comportement des coupons vis-à-vis de la corrosion. Nous avons donc dû, dans un premier temps, adapter une démarche expérimentale pour mettre en évidence la corrosion d'un coupon en fonte tel que sorti d'usine en réacteur fermé (milieu anoxique). Pour cela nous avons mis en place i) un protocole d'extraction des produits insolubles déposés sur le coupon ainsi que de ceux déjà naturellement présents sur la fonte ; ii) une approche solide/solution qui couple différentes techniques et qui s'est révélée très importante car elle apporte des résultats complémentaires et cohérents (i.e. couplage d'analyses chimiques, microbiologiques, de surface, etc.) et iii) des milieux d'incubation optimisés afin de mener des expérimentations avec des souches bactériennes. Ces milieux doivent en effet permettre d'une part, aux souches bactériennes d'avoir une activité et d'autre part d'être le moins corrosif possible.

Dans un second temps, nous avons évalué la capacité de souches de laboratoire à corroder la fonte ductile de Saint-Gobain PAM. Une suspension de *Shewanella putrefaciens* préalablement cultivée en milieu complet a été incubée en présence d'un coupon en fonte. Le milieu

d'incubation, en conditions anoxiques, contenait un pool d'accepteurs d'électrons : une quantité limitante de fumarate pour initier l'activité bactérienne et le fer ferrique de la couche native d'oxydes. Durant la période d'incubation de quatre semaines, la couche native d'oxydes a été consommée et donc déstabilisée, de la vivianite $\text{Fe}^{\text{II}}_3(\text{PO}_4) \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ a été formée, ce qui a déjà été rapporté dans des cultures d'IRB en présence de fer ferrique (Fredrickson *et al.*, 1998 ; Dong *et al.*, 2000 ; Jorand *et al.*, 2000). La corrosion de la fonte a alors été accélérée (avec un taux de corrosion $\text{CR} = 0,35 \text{ mm an}^{-1}$) par rapport à la corrosion dans le milieu abiotique ($\text{CR} = 0,05 \text{ mm an}^{-1}$) (Figure 1-①). Les souches sulfatoréductrices représentées par *Desulfovibrio desulfuricans* dans notre étude ont conduit à la formation d'un film de mackinawite Fe_{1+x}S en surface du coupon en fonte et ont ralenti le processus de corrosion par rapport à un contrôle abiotique. Ce processus se déroulerait en deux étapes : la première, biotique, consisterait en une réduction des sulfates par *Desulfovibrio desulfuricans* en sulfures ; la seconde, abiotique, les sulfures biogénérés réagiraient spontanément avec des oxydes de fer ferreux et/ou ferrique de la couche native d'oxydes pour conduire à la formation d'un film de mackinawite, qui serait alors protecteur (Singer *et al.*, 2011). La corrosion n'est certes pas accélérée par la souche, mais pourrait devenir fulgurante à terme puisque nous avons montré la présence de piqûres (Loto *et al.*, 2017) (Figure 1-②). Enfin, la bactérie nitrate réductrice *Klebsiella mobilis* n'a pas montré d'effet sur la cinétique de corrosion de la fonte. Seule la production de goethite $\alpha\text{-Fe}^{\text{III}}\text{O}(\text{OH})$ a été observée. Un mécanisme hybride de réactions biotique et abiotique permet une oxydation du fer ferreux comme l'ont observé Etique *et al.*, 2014. La bactérie, par son métabolisme respiratoire, réduit les nitrates en nitrites. Les nitrites biogénérés réagissent avec le fer ferreux qu'elles oxydent entraînant la formation de goethite. Nous avons montré que le système est déstabilisé car il y a la formation d'un nouvel oxyde de fer mais il n'y a pas d'augmentation significative de la corrosion dans le temps d'étude. Il semblerait aussi que la quantité de fer ferreux disponible dans la couche native d'oxydes ne soit pas suffisante pour entraîner une corrosion significative (Figure 1-③).

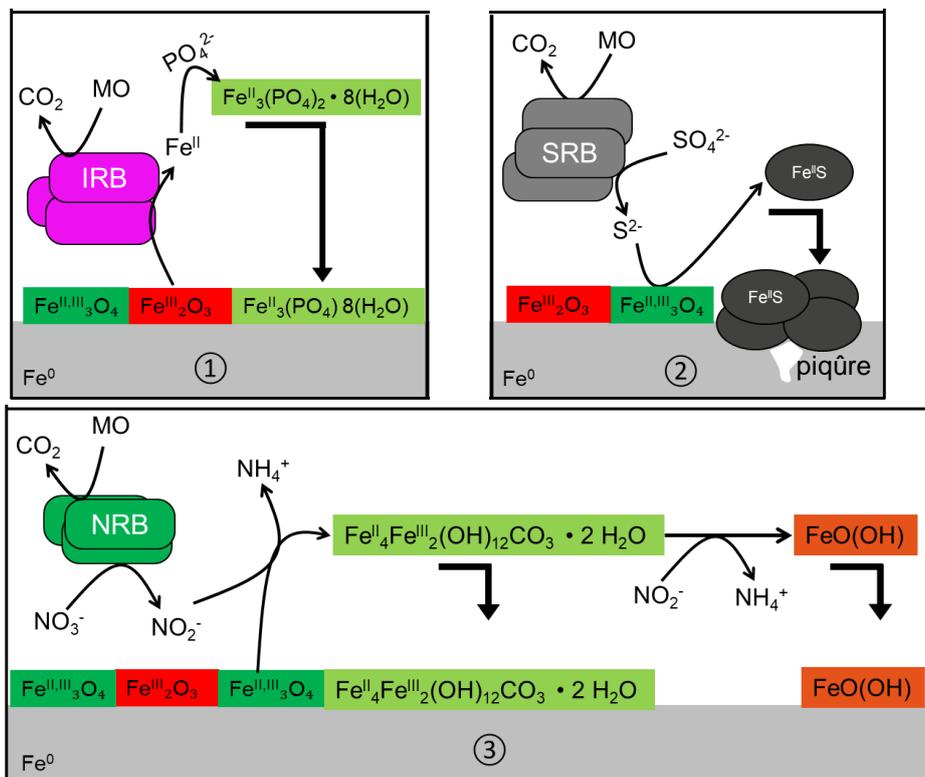


Figure 1 : Schéma de conclusion de l'impact de souches pures sur les réactions de corrosion de la fonte à 30 °C, en anaérobie (N₂ 100 %) et en milieu M4, avec ① la bactérie ferriréductrice (IRB) *Shewanella putrefaciens*, ② la bactérie sulfatoréductrice (SRB) *Desulfovibrio desulfuricans* et ③ la bactérie nitrate réductrice (NRB) *Klebsiella mobilis*. MO = matières organiques.

Les souches pures de laboratoire nous ont permis de tester notre démarche expérimentale, il est bien possible de mettre en évidence la MIC de la fonte ductile et l'intensité de corrosion est fonction du métabolisme bactérien mis en jeu. Dans la nature, les microorganismes ne sont jamais isolés donc pour se rapprocher au maximum des conditions réelles, nous avons incubé les cocultures de ces souches bactériennes deux à deux en présence d'un coupon en fonte.

Les bactéries *S. putrefaciens* (bactérie ferriréductrice) et *D. desulfuricans* (bactérie sulfatoréductrice) en coculture ont mené à une corrosion intermédiaire : entre celle provoquée par *S. putrefaciens* seule et par *D. desulfuricans* seule. Il y a production de mackinawite Fe_{1+x}S par *D. desulfuricans* et production de fer ferreux par *S. putrefaciens*. Seul le sulfure de fer est identifié car i) soit il y a formation d'un film de Fe_{1+x}S qui a un effet protecteur, ce qui ralentirait le phénomène de corrosion (Lee *et al.*, 2006) ; ii) soit il y a une compétition entre les deux souches pour la formation d'un biofilm sur la fonte, le biofilm de *D. desulfuricans* se formant préférentiellement par rapport à celui de *S. putrefaciens* (Figure 2a). Nous avons ensuite montré que les bactéries *S. putrefaciens* et *K. mobilis* en coculture sont en compétition pour l'accepteur d'électrons (nitrates) qu'elles réduisent en nitrites. *S. putrefaciens* n'a donc pas eu d'activité

ferriréductrice. Contrairement à ce qui était attendu, les nitrites biogénérés n'ont pas eu de fort impact sur le taux de corrosion. Les hypothèses sont soit que la quantité de Fe^{II} disponible est limitante, soit qu'il y a formation de monoxyde d'azote, un composé toxique (Kielemoes *et al.*, 2009) (Figure 2b). Enfin, la bactérie nitrate réductrice *K. mobilis* a produit des nitrites qui ont empêché *D. desulfuricans* d'avoir une activité sulfatoréductrice (Kaster *et al.*, 2007), seule l'activité nitrate réductrice a donc été maintenue (Figure 2c). Étant donné que *D. desulfuricans* n'a pas généré de sulfures, il restait une quantité substantielle de SO_4^{2-} (i.e. 17 mM), qui a pu favoriser la formation de RV sulfatée $\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{SO}_4 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ si la concentration en carbonate était assez faible ou épuisée (Refait *et al.*, 2003 ; Zegeye *et al.*, 2010).

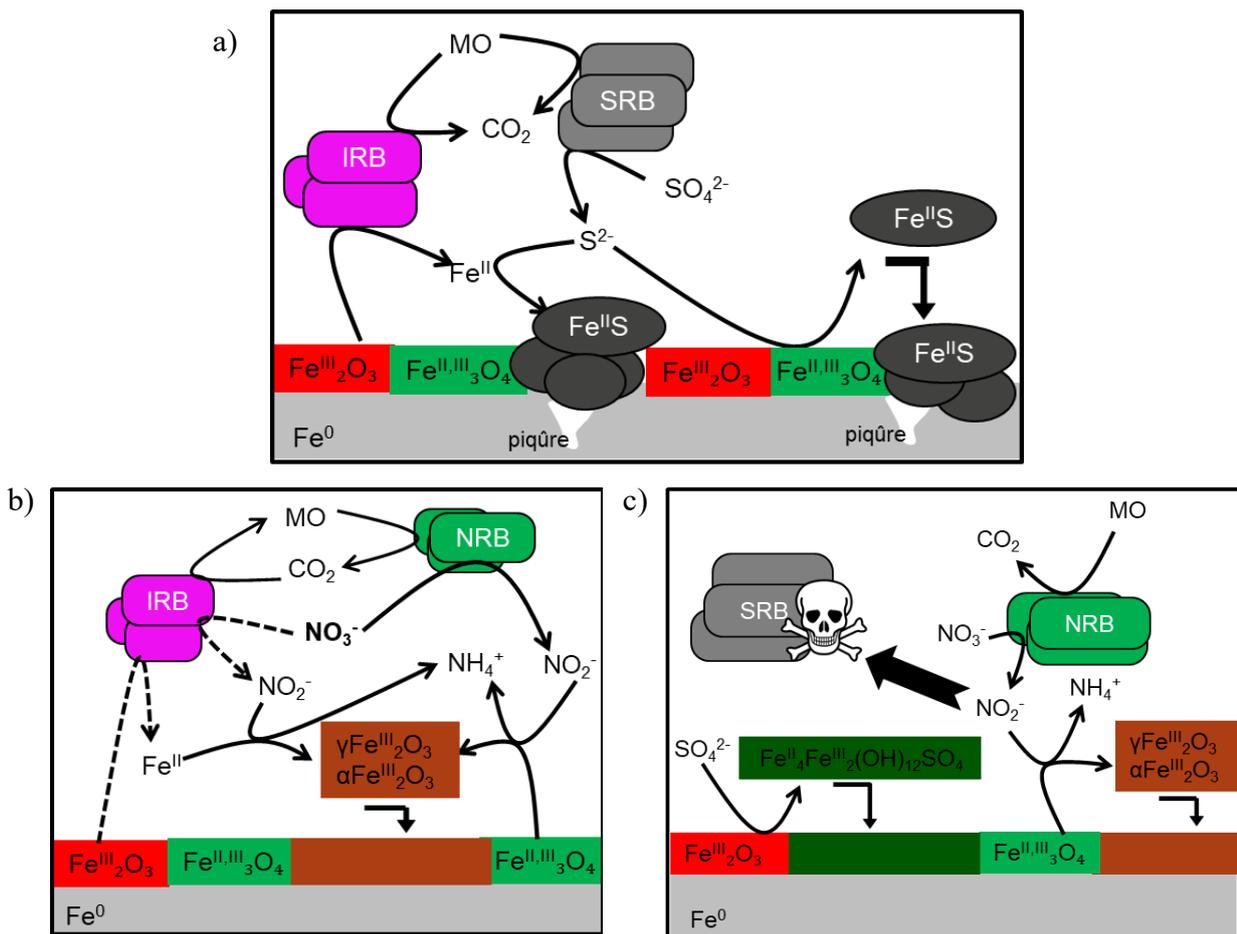


Figure 2 : Schéma de conclusion de l'impact de souches pures en coculture deux à deux sur les réactions de corrosion de la fonte à 30 °C, en anaérobie (N₂ 100 %) et en milieu M4, avec la coculture (a) IRB + SRB, (b) IRB + NRB et (c) SRB + NRB. IRB = bactérie ferriréductrice, SRB = bactérie sulfatoréductrice, NRB = bactérie nitrate réductrice, MO = matières organiques.

Les activités microbiennes anaérobies étudiées en souches pures dans le Chapitre IV sont répandues parmi les communautés bactériennes du sol. Pour savoir si ces réactions peuvent se produire dans les conditions d'enfouissements des tuyaux en fonte, la démarche expérimentale des souches pures a été adaptée et utilisée pour effectuer de premiers tests sur le potentiel

corrosif de sols. En milieu de culture riche, nous n'avons pas mis en évidence de MIC, probablement à cause du temps d'incubation et de la densité microbienne apparemment faible. De plus, l'utilisation d'un milieu de culture riche ne permet pas le développement de certains groupes métaboliques qui pourraient avoir un effet considérable sur la corrosion (Little *et al.*, 2020a). Pour pallier ce problème, nous avons privilégié l'action de groupes métaboliques bactériens présents dans les sols et en cohérence avec la première partie du travail de thèse : les IRB, SRB et NRB. Les résultats dévoilent que les consortia en bactéries IRB donnent une réponse similaire à la souche pure *S. putrefaciens* et les consortia de SRB à la bactérie *D. desulfuricans*. Cela montre la possibilité de mettre en évidence des actions précises pour chaque groupe métabolique.

Afin de démontrer l'efficacité des revêtements de Saint-Gobain PAM contre la corrosion microbienne, des essais ont été menés sur le long terme. Qu'il y ait présence ou pas de microorganismes, nous n'avons pas observé de phénomène de corrosion, ce qui est en cohérence avec l'aspect protecteur des revêtements.

A l'échelle du laboratoire, nous avons mis en évidence par ce travail de thèse que les microorganismes influencent bien la corrosion de la fonte issue directement des usines de Saint-Gobain PAM. Nous avons pris en considération différents groupes métaboliques mais également l'importance des cultures multi espèces (en souches pures et avec des sols). L'originalité de ce travail de thèse réside donc dans ce large panel de tests, dans la prise en compte de la couche native d'oxydes de la fonte et dans les multiples analyses, i.e. chimiques, microbiologiques et de surface. A notre connaissance, c'est la première fois que plusieurs souches bactériennes ont été testées avec de la fonte, sans aucun traitement de surface préalable (i.e. sans polissage).

Ce travail permet d'ouvrir de nombreuses perspectives pour la suite. Dans un premier temps, nous avons soupçonné, tout comme Philips *et al.*, 2018, que la souche *S. putrefaciens* serait capable de consommer directement le Fe^0 en absence de donneur organique d'électrons. Cette piste mériterait d'être exploitée car elle permettrait de mettre en évidence une nouvelle forme de biocorrosion en présence de fonte. Il serait donc envisageable de faire varier la concentration en donneur d'électrons. Avec *D. desulfuricans* et *K. mobilis*, nous avons montré que ce sont bien, indirectement, les accepteurs d'électrons (SO_4^{2-} et NO_3^- respectivement), qui sont responsables des variations de surface de la fonte. Cependant, leurs faibles concentrations ne nous ont pas permis d'accélérer la corrosion, il serait donc désormais essentiel d'augmenter

leurs concentrations. Dans un deuxième temps, pour aller plus loin dans nos interprétations sur l'impact des souches pures en coculture sur la corrosion de la fonte, nous devons continuer à comprendre ce qu'il se passe au sein des cocultures. La biologie moléculaire et en particulier la RT qPCR semble être un outil intéressant pour suivre les activités microbiennes mises en jeu. L'électrochimie est également un outil envisageable puisqu'il permet de comprendre ce qui se déroule à la surface du matériau. Enfin, dans un troisième temps, comme cette étude a été menée en fixant certains paramètres (i.e. pH, densité cellulaire, etc.), il serait envisageable de faire varier davantage ces paramètres afin de pouvoir extrapoler nos résultats à la réalité et donc à une échelle plus importante. En effet, l'ultime challenge de ce projet est de mettre en place un réacteur rapide, robuste, répétable et pertinent, qui, utopiquement, nous dirait si tel sol est susceptible d'engendrer une MIC. Pour parvenir à ce test idéal, les études avec les sols devraient être approfondies. Par exemple, une des voies que nous pourrions proposer pour la suite serait de préparer des suspensions de sol plus concentrée pour augmenter la quantité de bactéries. Connaissant également maintenant mieux les souches bactériennes présentes dans les sols considérés, les milieux de culture pourraient être optimisés pour développer les activités de bactéries choisies. Sur la base des travaux de Wasim *et al.* qui ont montré que la réponse est différente en fonction de la matrice de sol dans laquelle *D. desulfuricans* était cultivée (Wasim et Djukic, 2020), il peut être intéressant d'incuber des souches pures dont nous connaissons leur impact sur la corrosion dans un sol stérile et d'étudier l'effet sur la corrosion de la fonte. Inclure d'autres souches modèles pour avoir davantage de réactions synergiques ou inhibitrices, faire varier les ratios entre les groupes métaboliques, sont d'autres pistes à explorer. Ces différents tests contribueraient alors à la mise en place d'un outil de détection de la MIC dans les sols.

Bibliographie

- Abdelouas, A., Lutze, W., & Nuttall, H. E. (1999). Oxidative dissolution of uraninite precipitated on Navajo sandstone. *Journal of Contaminant Hydrology*, 36(3-4), 353-375.
- Akinribide, O. J., Akinwamide, S. O., Olarewaju, O., Ajibolaa, B. A. O., Oluwagbenga Olusunle, S. O., & Olubambia, P. A. (2019). Corrosion behavior of ductile and austempered ductile cast iron in 0.01 M and 0.05 M NaCl Environments. *Procedia Manufacturing*, 30, 167-172.
- Amin, M. A., Khaled, K. F., Mohsen, Q., & Arida, H. A. (2010). A study of the inhibition of iron corrosion in HCl solutions by some amino acids. *Corrosion Science*, 52(5), 1684-1695.
- Angus HT. (1976). Cast iron physical and engineering properties, 2nd ed. *London: Butterworth and Co.*; chapter 1.
- ANSI/AWWA. (1999). C105/A21.5-99: American national standard for polyethylene encasement for ductile-iron pipe systems. American Water Works Association, Denver, Colo.
- Asadi, Z. S., & Melchers, R. E. (2017). Extreme value statistics for pitting corrosion of old underground cast iron pipes. *Reliability Engineering & System Safety*, 162, 64-71.
- ASTM, American Society for Testing and Materials. (2004). ASTM G1-03. Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens. ASTM, Philadelphia, Pennsylvania.
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2002). Student Solutions Manual to accompany Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2e. *John Wiley & Sons*, 100-104.
- Barton, L. L., & Hamilton, W. A. (2007). Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems. *Cambridge University Press*.
- Bayol, E., Kayakırmaz, K., & Erbil, M. (2007). The inhibitive effect of hexamethylenetetramine on the acid corrosion of steel. *Materials Chemistry and Physics*, 104(1), 74-82.
- Beech, I. B., & Gaylarde, C. C. (1991). Microbial polysaccharides and corrosion. *International Biodeterioration*, 27(2), 95-107.
- Beech, I. B., & Gaylarde, C. C. (1999). Recent advances in the study of biocorrosion: an overview. *Revista de Microbiologia*, 30(3), 117-190.
- Beech, I. B., & Coutinho, C. L. M. (2003). Biofilms on corroding materials. *Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology-Characteristics, Analysis and Control*, 115-131.
- Beech, I. B., & Sunner, J. (2004). Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3), 181-186.
- Berg, J. S., Duverger, A., Cordier, L., Laberty-Robert, C., Guyot, F., & Miot, J. (2020). Rapid pyritization in the presence of a sulfur/sulfate-reducing bacterial consortium. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
- Bermont-Bouis, D., Janvier, M., Grimont, P. A. D., Dupont, I., & Vallaey, T. (2007). Both sulfate-reducing bacteria and Enterobacteriaceae take part in marine biocorrosion of carbon steel. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 161-168.
- Berns, A. E., Philipp, H., Narres, H. D., Burauel, P., Vereecken, H., & Tappe, W. (2008). Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy. *European Journal of Soil Science*, 59(3), 540-550.
- Berthelin, J., Ona-Nguema, G., Stemmler, S., Quantin, C., Abdelmoula, M., & Jorand, F. (2006). Bioreduction of ferric species and biogenesis of green rusts in soils. *Comptes Rendus de Geosciences*, 338(6-7), 447-455.
- Beverkog, B., & Puigdomenech, I. (1996). Revised Pourbaix diagrams for iron at 25-300 °C. *Corrosion Science*, 38(12), 2121-2135.
- Bhattarai, J. (2013). Study on the corrosive nature of soil towards the buried-structures. *Scientific World*, 11(11), 43-47.

- Bhola, R., Bhola, S. M., Mishra, B., & Olson, D. L. (2010). Microbiologically influenced corrosion and its mitigation : (A review). *Material Science Research India*, 7(2), 407-412.
- Bird, L. J., Bonnefoy, V., & Newman, D. K. (2011). Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends in microbiology*, 19(7), 330-340.
- Biswas, S., & Bose, P. (2005). Zero-valent iron-assisted autotrophic denitrification. *Journal of Environmental Engineering*, 131(8), 1212-1220
- Blackwood, D. J. (2020). An electrochemist perspective of microbiologically influenced corrosion. *Corrosion and Materials Degradation*, 1(1), 59-76.
- Bollag, J. M., & Henninger, N. M. (1978). Effects of nitrite toxicity on soil bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 10(5), 377-381.
- Bonds, R. W., Barnard, L. M., Horton, A. M., & Oliver, G. L. (2005). Corrosion and corrosion control of iron pipe: 75 years of research. *Journal-American Water Works Association*, 97(6), 88-98.
- Bonneville, S., Behrends, T., Van Cappellen, P., Hyacinthe, C., & Röling, W. F. (2006). Reduction of Fe (III) colloids by *Shewanella putrefaciens*: a kinetic model. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(23), 5842-5854.
- Bourdoiseau, J. A., Jeannin, M., Sabot, R., Rémazeilles, C., & Refait, P. (2008). Characterisation of mackinawite by Raman spectroscopy: effects of crystallisation, drying and oxidation. *Corrosion Science*, 50(11), 3247-3255.
- Brown, D. A., Kamineni, D. C., Sawicki, J. A., & Beveridge, T. J. (1994). Minerals associated with biofilms occurring on exposed rock in a granitic underground research laboratory. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(9), 3182-3191.
- Bryant, R. D., Jansen, W., Boivin, J., Laishley, E. J., & Costerton, J. W. (1991). Effect of hydrogenase and mixed sulfate-reducing bacterial populations on the corrosion of steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10), 2804-2809.
- Caccavo, F., Schamberger, P. C., Keiding, K., & Nielsen, P. H. (1997). Role of hydrophobicity in adhesion of the dissimilatory Fe (III)-reducing bacterium *Shewanella alga* to amorphous Fe (III) oxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3837-3843.
- Calvet, R. (2003). Le sol: propriétés et fonctions. Constitution, structure, phénomènes aux interfaces (Vol. 1). *France Agricole Editions*.
- Chantereau, J., & Bouffard, A. M. (1980). Corrosion bactérienne : Bactéries de la corrosion. *Technique et Documentation Lavoisier*, Paris.
- Chapelle, F. H., Bradley, P. M., Thomas, M. A., & McMahon, P. B. (2009). Distinguishing iron-reducing from sulfate-reducing conditions. *Groundwater*, 47(2), 300-305.
- Chen, Y., Howdyshell, R., Howdyshell, S., & Ju, L. K. (2014). Characterizing pitting corrosion caused by a long-term starving sulfate-reducing bacterium surviving on carbon steel and effects of surface roughness. *Corrosion*, 70(8), 767-780.
- Cole, I. S., Muster, T. H., Azmat, N. S., Venkatraman, M. S., & Cook, A. (2011). Multiscale modelling of the corrosion of metals under atmospheric corrosion. *Electrochimica Acta*, 56(4), 1856-1865.
- Cole, I. S., & Marney, D. (2012). The science of pipe corrosion: A review of the literature on the corrosion of ferrous metals in soils. *Corrosion Science*, 56, 5-16.
- Corish, N., Durham, R., Lacaze, J., Muntean, A., & Pieraggi, B. (2003). Microstructural observations of the oxide scale growth during short-term heat treatment of cast irons. *International Journal of Cast Metals Research*, 16(1-3), 143-148.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711-745.

- Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(3-4), 217-221.
- Cragolino, G., & Tuovinen, O. H. (1984). The role of sulphate-reducing and sulphur-oxidizing bacteria in the localized corrosion of iron-base alloys. A review. *International Biodeterioration*, 20(1), 9-26.
- Crawford, R. J., Webb, H. K., Truong, V. K., Hasan, J., & Ivanova, E. P. (2012). Surface topographical factors influencing bacterial attachment. *Advances in Colloid and Interface Science*, 179, 142-149.
- Cruz-García, C., Murray, A. E., Klappenbach, J. A., Stewart, V., & Tiedje, J. M. (2007). Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 656-662.
- Daniels, L., Belay, N., Rajagopal, B. S., & Weimer, P. J. (1987). Bacterial methanogenesis and growth from CO₂ with elemental iron as the sole source of electrons. *Science*, 237(4814), 509-511.
- Dassonville, F., & Renault, P. (2002). Interactions between microbial processes and geochemical transformations under anaerobic conditions: a review. *Agronomie*, 22(1), 51-68.
- Day, L. A., De León, K. B., Kempfer, M. L., Zhou, J., & Wall, J. D. (2019). Complete Genome Sequence of *Desulfovibrio desulfuricans* IC1, a Sulfonate-Respiring Anaerobe. *Microbiology Resource Announcements*, 8(31), e00456-19.
- De Faria, D. L., Venâncio Silva, S., & De Oliveira, M. T. (1997). Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides. *Journal of Raman Spectroscopy*, 28(11), 873-878.
- Dec, W., Mosiałek, M., Socha, R. P., Jaworska-Kik, M., Simka, W., & Michalska, J. (2017). Characterization of *Desulfovibrio desulfuricans* biofilm on high-alloyed stainless steel: XPS and electrochemical studies. *Materials Chemistry and Physics*, 195, 28-39.
- DeLong, E. F. (2000). Resolving a methane mystery. *Nature*, 407(6804), 577-579.
- Denison, I. A., & Darnielle, R. B. (1939). Observations on the behavior of steel corroding under cathodic control in soils. *Transactions of the Electrochemical Society*, 76(1), 199-214.
- DiChristina, T. J. (1992). Effects of nitrate and nitrite on dissimilatory iron reduction by *Shewanella putrefaciens* 200. *Journal of Bacteriology*, 174(6), 1891-1896.
- Dong, H., Fredrickson, J. K., Kennedy, D. W., Zachara, J. M., Kukkadapu, R. K., & Onstott, T. C. (2000). Mineral transformations associated with the microbial reduction of magnetite. *Chemical Geology*, 169(3-4), 299-318.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Doyle, G., Seica, M. V., & Grabinsky, M. W. (2003). The role of soil in the external corrosion of cast iron water mains in Toronto, Canada. *Canadian Geotechnical Journal*, 40(2), 225-236.
- Dubiel, M., Hsu, C. H., Chien, C. C., Mansfeld, F., & Newman, D. K. (2002). Microbial iron respiration can protect steel from corrosion. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1440-1445.
- Eid, M. M., Duncan, K. E., & Tanner, R. S. (2018). A semi-continuous system for monitoring microbially influenced corrosion. *Journal of Microbiological Methods*, 150, 55-60.
- El Houari, A., Ranchou-Peyruse, M., Ranchou-Peyruse, A., Bennisse, R., Bouterfas, R., Goni Urriza, M. S., Guyoneaud, R. (2020). Microbial communities and sulfate-Reducing microorganisms abundance and diversity in municipal anaerobic sewage sludge digesters from a wastewater treatment plant (Marrakech, Morocco). *Processes*, 8(10), 1284.
- Ellwood, B. B., Chrzanowski, T. H., Hrouda, F., Long, G. J., & Buhl, M. L. (1988). Siderite formation in anoxic deep-sea sediments: A synergetic bacteria controlled process with important implications in paleomagnetism. *Geology*, 16(11), 980-982.
- Emerson, D. (2018). The role of iron-oxidizing bacteria in biocorrosion: a review. *Biofouling*, 34(9), 989-1000.

- Enning, D., & Garrelfs, J. (2014). Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1226-1236.
- Esnault, L., Jullien, M., Mustin, C., Bildstein, O., & Libert, M. (2011). Metallic corrosion processes reactivation sustained by iron-reducing bacteria: Implication on long-term stability of protective layers. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 36(17-18), 1624-1629.
- Etique, M. (2014). *Effets de l'activité bactérienne réductrice du fer ferrique et des nitrates sur les transformations des produits de corrosion magnetite et sidérite de l'acier non allié* (Thèse de doctorat de l'Université de Lorraine).
- Etique, M., Jorand, F. P. A., Zegeye, A., Grégoire, B., Despas, C., & Ruby, C. (2014). Abiotic process for Fe (II) oxidation and green rust mineralization driven by a heterotrophic nitrate reducing bacteria (*Klebsiella mobilis*). *Environmental Science & Technology*, 48(7), 3742-3751.
- Etique, M., & Jorand, F. P. A. (2016). Fuzzy limit between green rust and goethite biomineralization from a nitrate-reducing bacterium (*Klebsiella mobilis*): the influence of organic electron donors. *Current Inorganic Chemistry*, 6(2), 119-126.
- Fadrus, H., & Malý, J. (1975). Suppression of iron (III) interference in the determination of iron (II) in water by the 1, 10-phenanthroline method. *Analyst*, 100(1193), 549-554.
- Favre, F., Tessier, D., Abdelmoula, M., Génin, J. M., Gates, W. P., & Boivin, P. (2002). Iron reduction and changes in cation exchange capacity in intermittently waterlogged soil. *European Journal of Soil Science*, 53(2), 175-183.
- Feio, M. J., Rainha, V., Fonseca, I. T., Reis, M. A., & Lino, A. R. (2000). The influence of the *Desulfovibrio desulfuricans* 14 ATCC 27774 on the corrosion of mild steel. *Materials and Corrosion*, 51(10), 691-697.
- Féron, D., Compère, C., Dupont, I., & Magot, M. (2002). Biodétérioration des matériaux métalliques ou biocorrosion. In G. Béranger & H. Mazille (Eds.) *Corrosion des métaux et alliage*, Lavoisier, Paris, 385-405.
- Ferrer, K. S., & Kelly, R. G. (2001). Comparison of methods for removal of corrosion product from AA2024-T3. *Corrosion*, 57(2), 110-117.
- Feugeas, F., Chakri, S., Belhaj, E., Sutter, E., Vivier, V., Meylheuc, T., & Tribollet, B. (2016). Mechanisms of Inhibition of Corrosion of Metal Reinforcements for Eco Friendly Concrete Containing a Biological Admixture. In *Meeting Abstracts*, 23, 1692-1692. The 230th Electrochemical Society Meeting (2016-10-02, 2016-10-07: Honolulu, HI, US.
- Fida, T. T., Chen, C., Okpala, G., & Voordouw, G. (2016). Implications of limited thermophilicity of nitrite reduction for control of sulfide production in oil reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14), 4190-4199.
- Flemming, H. C. (1996). Biofouling and microbiologically influenced corrosion (MIC)-an economical and technical overview. In: E. Heitz, W. Sand & H.C. Flemming (Eds.) *Microbial Deterioration of Materials*, Springer, Heidelberg, 1996, 514.
- Flemming, H. C. (2002). Biofouling in water systems—cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 629-640.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
- Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*, 35(1), 439-468.
- Géhin, A., Ruby, C., Abdelmoula, M., Benali, O., Ghanbaja, J., Refait, P., & Génin, J. M. R. (2002). Synthesis of Fe (II-III) hydroxysulphate green rust by coprecipitation. *Solid State Sciences*, 4(1), 61-66.
- Génin, J. M. R., Bourrié, G., Trolard, F., Abdelmoula, M., Jaffrezic, A., Refait, P., Herbillon, A. (1998). Thermodynamic equilibria in aqueous suspensions of synthetic and natural Fe (II)– Fe (III) green rusts: Occurrences of the mineral in hydromorphic soils. *Environmental Science & Technology*, 32(8), 1058-1068.

- Gerke, T. L., Maynard, J. B., Schock, M. R., & Lytle, D. L. (2008). Physiochemical characterization of five iron tubercles from a single drinking water distribution system: Possible new insights on their formation and growth. *Corrosion Science*, *50*(7), 2030-2039.
- Ghafari, S., Hasan, M., & Aroua, M. K. (2008). Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater—a review. *Bioresource Technology*, *99*(10), 3965-3974.
- Ginner, J. L., Alvarez, P. J., Smith, S. L., & Scherer, M. M. (2004). Nitrate and nitrite reduction by Fe⁰: influence of mass transport, temperature, and denitrifying microbes. *Environmental Engineering Science*, *21*(2), 219-229.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., ... & Culley, D. E. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(30), 11358-11363.
- Gosselin, F., Mathieu, L., Block, J. C., Carteret, C., Muhr, H., & Jorand, F. P. A. (2018). Assessment of an anti-scale low-frequency electromagnetic field device on drinking water biofilms. *Biofouling*, *34*(9), 1020-1031.
- Gottschalk, G. (1986). Regulation of bacterial metabolism. In *Bacterial Metabolism* (pp. 178-207). Springer, New York, NY.
- Gralnick, J. A., & Newman, D. K. (2007). Extracellular respiration. *Molecular Microbiology*, *65*(1), 1-11.
- Grandpierre, L., & Moline, A. (1988). *U.S. Patent No. 4,756,194*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Greene, E. A., Hubert, C., Nemati, M., Jenneman, G. E., & Voordouw, G. (2003). Nitrite reductase activity of sulphate-reducing bacteria prevents their inhibition by nitrate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria. *Environmental microbiology*, *5*(7), 607-617.
- Grooters, M., Harneit, K., Wöllbrink, M., Sand, W., Stadler, R., & Fürbeth, W. (2007). Novel steel corrosion protection by microbial extracellular polymeric substances (EPS)—biofilm-induced corrosion inhibition. *Advanced Materials Research*, *20*, 375-378.
- Gu, T., Jia, R., Unsal, T., & Xu, D. (2019). Toward a better understanding of microbiologically influenced corrosion caused by sulfate reducing bacteria. *Journal of Materials Science & Technology*, *35*(4), 631-636.
- Gupta, A., Dutta, A., Sarkar, J., Panigrahi, M. K., & Sar, P. (2018). Low-abundance members of the Firmicutes facilitate bioremediation of soil impacted by highly acidic mine drainage from the Malanjkhand Copper Project, India. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2882.
- Hamilton, W. A. (1985). Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Annual Review of Microbiology*, *39*(1), 195-217.
- Hamilton W. A., Lee W. (1995). Biocorrosion. In: Barton L.L. (Eds) Sulfate-Reducing Bacteria. Biotechnology Handbooks, vol 8. Springer, Boston, MA.
- Hamilton, W. A. (1998). Sulfate-reducing bacteria: Physiology determines their environmental impact. *Geomicrobiology Journal*, *15*(1), 19-28.
- Hamilton, W. A. (2003). Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling*, *19*(1), 65-76.
- Hansel, C. M., Fendorf, S., Jardine, P. M., & Francis, C. A. (2008). Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(5), 1620-1633.
- Hansen, H. C. B., Borggaard, O. K., & Sørensen, J. (1994). Evaluation of the free energy of formation of Fe (II)-Fe (III) hydroxide-sulphate (green rust) and its reduction of nitrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *58*(12), 2599-2608.
- Hansen, H. C. B., & Poulsen, I. F. (1999). Interaction of synthetic sulphate “green rust” with phosphate and the crystallization of vivianite. *Clays and Clay Minerals*, *47*(3), 312-318.

- Hardy, J. A., & Bown, J. L. (1984). The corrosion of mild steel by biogenic sulfide films exposed to air. *Corrosion*, 40(12), 650-654.
- Haveman, S. A., Greene, E. A., & Voordouw, G. (2005). Gene expression analysis of the mechanism of inhibition of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough by nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(9), 1461-1465.
- He, Q., He, Z., Joyner, D. C., Joachimiak, M., Price, M. N., Yang, Z. K., & Zhou, J. (2010). Impact of elevated nitrate on sulfate-reducing bacteria: a comparative study of *Desulfovibrio vulgaris*. *The ISME journal*, 4(11), 1386-1397.
- Heakal, F. E. T., Fouda, A. S., & Radwan, M. S. (2011). Inhibitive effect of some thiadiazole derivatives on C-steel corrosion in neutral sodium chloride solution. *Materials Chemistry and Physics*, 125(1-2), 26-36.
- Heron, G., Crouzet, C., Bourg, A. C., & Christensen, T. H. (1994). Speciation of Fe (II) and Fe (III) in contaminated aquifer sediments using chemical extraction techniques. *Environmental Science & Technology*, 28(9), 1698-1705.
- Herrera, L. K., & Videla, H. A. (2009). Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(7), 891-895.
- Hidaka, K., Miyanaga, K., & Tanji, Y. (2018). The presence of nitrate-and sulfate-reducing bacteria contributes to ineffectiveness souring control by nitrate injection. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 129, 81-88.
- Huang, Y. H., & Zhang, T. C. (2006). Nitrite reduction and formation of corrosion coatings in zerovalent iron systems. *Chemosphere*, 64(6), 937-943.
- Huang, Y., Zhou, E., Jiang, C., Jia, R., Liu, S., Xu, D., Wang, F. (2018). Endogenous phenazine-1-carboxamide encoding gene PhzH regulated the extracellular electron transfer in biocorrosion of stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa*. *Electrochemistry Communications*, 94, 9-13.
- Huang Y., Xu D., Huang L. Y., Lou Y. T., Muhadesi J. B., Qian H. C., Zhou E. Z., Wang B. J., Li X. T., Jiang Z., Liu S. J., Zhang D. W., Jiang C. Y. (2021) Responses of soil microbiome to steel corrosion. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 7(1):6.
- Ikehata, M., Woolcock, J., Murphy, M. E., Merrifield, R., Stephan, C., & Woodbridge, O. (2018). Iron content measurement in individual bacterial cells using SC-ICP-MS. *PerkinElmer, application note*.
- Ilbert, M., & Bonnefoy, V. (2013). Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(2), 161-175.
- Islam, M. S., Khan, A., Rahman, G. S., Aftab, H., & Kusumoto, Y. (2014). Simple Hydrothermal Synthesis and Morphological Study of Magnetic Nanoparticles. *Journal of NanoScience, NanoEngineering & Applications*, 4, 14-22.
- Issa, H. M., & Alshatteri, A. H. (2018). Corrosion prevention of cast iron industrial water pipes: a preliminary comparative study of hexamine and aniline inhibitors. *Journal of Garmian University*, 5(2), 67-83.
- Jakobs, J. A., & Hewes, F. W. (1987). Underground corrosion of water pipes in Calgary, Canada. *Materials Performance*, 36(5), 42-49.
- Javed, M. A., Stoddart, P. R., Palombo, E. A., McArthur, S. L., & Wade, S. A. (2014). Inhibition or acceleration: Bacterial test media can determine the course of microbiologically influenced corrosion. *Corrosion Science*, 86, 149-158.
- Javed, M., Borges, B., Cirino, V., Osman, A., & Wade, S. (2015). Effect of metal substrate on initial attachment of *E. coli* bacteria and subsequent microbiologically influenced corrosion. *Corrosion and Prevention. Australasian Corrosion Association (Adelaide, Australia)*.
- Javed, M. A., Neil, W. C., McAdam, G., & Wade, S. A. (2017). Effect of sulphate-reducing bacteria on the microbiologically influenced corrosion of ten different metals using constant test conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125, 73-85.

- Jayaraman, A., Cheng, E. T., Earthman, J. C., & Wood, T. K. (1997). Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of SAE 1018 steel through oxygen depletion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(1), 11-17.
- Jayaraman, A., Mansfeld, F. B., & Wood, T. K. (1999). Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms by expressing the antimicrobial peptides indolicidin and bactenecin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22(3), 167-175.
- Jenneman, G. E., Mcinerney, M. J., & Knapp, R. M. (1986). Effect of nitrate on biogenic sulfide production. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(6), 1205-1211.
- Jia, R., Yang, D., Xu, J., Xu, D., & Gu, T. (2017). Microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing *Pseudomonas aeruginosa* biofilm under organic carbon starvation. *Corrosion Science*, 127, 1-9.
- Jiang, X., Mingchao, M. A., Jun, L. I., Anhuai, L. U., & Zhong, Z. (2008). Bacterial diversity of active sludge in wastewater treatment plant. *Earth Science Frontiers*, 15(6), 163-168.
- Jin, Y., Li, Z., Zhou, E., Lebkach, Y., Xu, D., Jiang, S., & Wang, F. (2019). Sharing riboflavin as an electron shuttle enhances the corrosivity of a mixed consortium of *Shewanella oneidensis* and *Bacillus licheniformis* against 316L stainless steel. *Electrochimica Acta*, 316, 93-104.
- Jorand, F., Appenzeller, B. M. R., Abdelmoula, M., Refait, P., Block, J. C., & Génin, J. M. (2000). Assessment of vivianite formation in *Shewanella putrefaciens* culture. *Environmental Technology*, 21(9), 1001-1005.
- Jorand, F. P. A., Sergent, A. S., Remy, P. P., Bihannic, I., Ghanbaja, J., Lartiges, B., ... & Zegeye, A. (2013). Contribution of anionic vs. neutral polymers to the formation of green rust 1 from γ -FeOOH bioreduction. *Geomicrobiology Journal*, 30(7), 600-615.
- Jorand F. P. A. (2017). La cellule bactérienne : unité fonctionnelle du biofilm, *In* : Interactions matériaux – microorganismes. Bétons et métaux et métaux plus résistants à la biodétérioration. C. Lors, F. Feugéas, B. Tribollet (Eds), *EDP Sciences*, Paris, 67 – 96.
- Kajiyama, F., & Koyama, Y. (1997). Statistical analyses of field corrosion data for ductile cast iron pipes buried in sandy marine sediments. *Corrosion*, 53(2), 156-162.
- Kappler, A., & Straub, K. L. (2005). Geomicrobiological cycling of iron. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 59(1), 85-108.
- Kappler, A., Schink, B., & Newman, D. K. (2005). Fe (III) mineral formation and cell encrustation by the nitrate-dependent Fe (II)-oxidizer strain BoFeN1. *Geobiology*, 3(4), 235-245.
- Kaster, K. M., Grigoriyan, A., Jenneman, G., & Voordouw, G. (2007). Effect of nitrate and nitrite on sulfide production by two thermophilic, sulfate-reducing enrichments from an oil field in the North Sea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(1), 195-203.
- Keiluweit, M., Gee, K., Denney, A., & Fendorf, S. (2018). Anoxic microsites in upland soils dominantly controlled by clay content. *Soil Biology and Biochemistry*, 118, 42-50.
- Kiani Khouzani, M., Bahrami, A., Hosseini-Abari, A., Khandouzi, M., & Taheri, P. (2019). Microbiologically influenced corrosion of a pipeline in a petrochemical plant. *Metals*, 9(4), 459.
- Kielemoes, J., De Boever, P., & Verstraete, W. (2000). Influence of denitrification on the corrosion of iron and stainless steel powder. *Environmental Science & Technology*, 34(4), 663-671.
- Kim, J. S., Chowdhury, N., Yamasaki, R., & Wood, T. K. (2018). Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state. *Environmental Microbiology*, 20(6), 2038-2048.
- King, R. A., & Miller, J. D. A. (1971). Corrosion by the sulphate-reducing bacteria. *Nature*, 233(5320), 491-492.
- King, R. A., Miller, J. D. A., & Smith, J. S. (1973). Corrosion of mild steel by iron sulphides. *British Corrosion Journal*, 8(3), 137-141.

- King, R. A., Dittmer, C. K., & Miller, J. D. A. (1976). Effect of ferrous ion concentration on the corrosion of iron in semicontinuous cultures of sulphate-reducing bacteria. *British Corrosion Journal*, 11(2), 105-107.
- King, R.A., Skerry, B.S., Moore, D.C.A., Stott, J.F.D., Dawson, J.L., (1986). Corrosion behavior of ductile and grey iron pipes in environments containing sulphate reducing bacteria. *In: International Corrosion Conference Series, vol. 8. NACE, National Association of Corrosion Engineers, Gaithersburg, Maryland*, 83-91.
- Kip, N., & Van Veen, J. A. (2015). The dual role of microbes in corrosion. *The ISME journal*, 9(3), 542-551.
- Kondo, R., Shigematsu, K., & Butani, J. (2008). Rapid enumeration of sulphate-reducing bacteria from aquatic environments using real-time PCR. *Plankton and Benthos Research*, 3(3), 180-183.
- Kostka, J. E., & Nealson, K. H. (1998). Isolation, cultivation and characterization of iron-and manganese-reducing bacteria. *Techniques in Microbial Ecology*. In R. S. Burlage et al. (Ed.), *Techniques in microbial ecology*. Oxford University Press, New York, N.Y, 58-78.
- Kwok, C. T., Cheng, F. T., & Man, H. C. (2000). Synergistic effect of cavitation erosion and corrosion of various engineering alloys in 3.5% NaCl solution. *Materials Science and Engineering: A*, 290(1-2), 145-154.
- Lagacherie, P., Baret, F., Feret, J. B., Netto, J. M., & Robbez-Masson, J. M. (2008). Estimation of soil clay and calcium carbonate using laboratory, field and airborne hyperspectral measurements. *Remote Sensing of Environment*, 112(3), 825-835.
- Lee, W., Lewandowski, Z., Nielsen, P. H., & Hamilton, W. A. (1995). Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: a review. *Biofouling*, 8(3), 165-194.
- Lee, A. K., & Newman, D. K. (2003). Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(2-3), 134-139.
- Lee, A. K., Buehler, M. G., & Newman, D. K. (2006). Influence of a dual-species biofilm on the corrosion of mild steel. *Corrosion Science*, 48(1), 165-178.
- Li, S. Y., Kim, Y. G., Jeon, K. S., Kho, Y. T., & Kang, T. (2001). Microbiologically influenced corrosion of carbon steel exposed to anaerobic soil. *Corrosion*, 57(9), 815-828.
- Li, B., & Logan, B. E. (2004). Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces Bointerfaces*, 36(2), 81-90.
- Li, B. B., Cheng, Y. Y., Fan, Y. Y., Liu, D. F., Fang, C. Y., Wu, C., ... & Yu, H. Q. (2018). Estimates of abundance and diversity of *Shewanella* genus in natural and engineered aqueous environments with newly designed primers. *Science of The Total Environment*, 637, 926-933.
- Li, X., Wang, H., Hu, X., Hu, C., & Liao, L. (2016). Characteristics of corrosion sales and biofilm in aged pipe distribution systems with switching water source. *Engineering Failure Analysis*, 60, 166-175.
- Li, Y., Xu, D., Chen, C., Li, X., Jia, R., Zhang, D., ... & Gu, T. (2018). Anaerobic microbiologically influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: a review. *Journal of Materials Science & Technology*, 34(10), 1713-1718.
- Libert, M. F., & Bildstein, O. (2015). La biocorrosion : nouvelles approches. *L'actualité chimique*, 400-401.
- Linhardt, P. (1997). Corrosion of metals in natural waters influenced by manganese oxidizing microorganisms. *Biodegradation*, 8(3), 201-210.
- Little, B., Wagner, P., & Mansfeld, F. (1991). Microbiologically influenced corrosion of metals and alloys. *International Materials Reviews*, 36(1), 253-272.
- Little, B., Wagner, P., Hart, K., Ray, R., Lavoie, D., Nealson, K., & Aguilar, C. (1997). The role of metal-reducing bacteria in microbiologically influenced corrosion. *In Corrosion 1997*. NACE International.
- Little, B., Wagner, P., Hart, K., Ray, R., Lavoie, D., Nealson, K., & Aguilar, C. (1998). The role of biomineralization in microbiologically influenced corrosion. *Biodegradation*, 9(1), 1-10.

- Little, B. J., Blackwood, D. J., Hinks, J., Lauro, F. M., Marsili, E., Okamoto, A., & Flemming, H. C. (2020a). Microbially influenced corrosion—Any progress? *Corrosion Science*, *170*, 108641.
- Little, B. J., Hinks, J., & Blackwood, D. J. (2020b). Microbially influenced corrosion: Towards an interdisciplinary perspective on mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *154*, 105062.
- Liu, H., Xu, L., & Zeng, J. (2000). Role of corrosion products in biofilms in microbiologically induced corrosion of carbon steel. *British Corrosion Journal*, *35*(2), 131-135.
- Liu, H., & Cheng, Y. F. (2017). Mechanism of microbiologically influenced corrosion of X52 pipeline steel in a wet soil containing sulfate-reduced bacteria. *Electrochimica Acta*, *253*, 368-378.
- Liu, H., Gu, T., Zhang, G., Liu, H., & Cheng, Y. F. (2018). Corrosion of X80 pipeline steel under sulfate-reducing bacterium biofilms in simulated CO₂-saturated oilfield produced water with carbon source starvation. *Corrosion Science*, *136*, 47-59.
- Lloyd, J. R. (2003). Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiology Reviews*, *27*(2-3), 411-425.
- Lobo, S. A., Melo, A. M., Carita, J. N., Teixeira, M., & Saraiva, L. M. (2007). The anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 grows at nearly atmospheric oxygen levels. *FEBS Letters*, *581*(3), 433-436.
- Loto, C. A. (2017). Microbiological corrosion: mechanism, control and impact—a review. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, *92*(9-12), 4241-4252.
- Lovley, D. R., & Phillips, E. J. (1988). Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(6), 1472-1480.
- Lovley, D. R. (2000). Anaerobic benzene degradation. *Biodegradation*, *11*(2), 107-116.
- Lower, S. K., Hochella, M. F., & Beveridge, T. J. (2001). Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between *Shewanella* and α -FeOOH. *Science*, *292*(5520), 1360-1363.
- Ma, H., Cheng, X., Li, G., Chen, S., Quan, Z., Zhao, S., & Niu, L. (2000). The influence of hydrogen sulfide on corrosion of iron under different conditions. *Corrosion Science*, *42*(10), 1669-1683.
- Maillacheruvu, K. Y., Parkin, G. F., Peng, C. Y., Kuo, W. C., Oonge, Z. I., & Lebduschka, V. (1993). Sulfide toxicity in anaerobic systems fed sulfate and various organics. *Water Environment Research*, *65*(2), 100-109.
- Manz, W., Eisenbrecher, M., Neu, T. R., & Szewzyk, U. (1998). Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology*, *25*(1), 43-61.
- Mara, D. D., & Williams, D. J. A. (1972). Polarisation of Pure Iron in the Presence of Iron Sulphide Minerals. *British Corrosion Journal*, *7*(2), 94-95.
- Marchal, R., Chaussepied, B., & Warzywoda, M. (2001). Effect of ferrous ion availability on growth of a corroding sulfate-reducing bacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *47*(3), 125-131.
- Marciales, A., Peralta, Y., Haile, T., Crosby, T., & Wolodko, J. (2019). Mechanistic microbiologically influenced corrosion modeling—A review. *Corrosion Science*, *146*, 99-111.
- Marietou, A., Griffiths, L., & Cole, J. (2009). Preferential reduction of the thermodynamically less favorable electron acceptor, sulfate, by a nitrate-reducing strain of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* 27774. *Journal of Bacteriology*, *191*(3), 882-889.
- Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., & Bond, D. R. (2008). *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(10), 3968-3973.

- McCartney, D. M., & Oleszkiewicz, J. A. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Research*, 25(2), 203-209.
- Mehanna, M., Basséguy, R., Délia, M. L., & Bergel, A. (2010). *Geobacter sulfurreducens* can protect 304L stainless steel against pitting in conditions of low electron acceptor concentrations. *Electrochemistry Communications*, 12(6), 724-728.
- Melchers, R. E. (2007). The effects of water pollution on the immersion corrosion of mild and low alloy steels. *Corrosion Science*, 49(8), 3149-3167.
- Melchers, R. E. (2019). Predicting long-term corrosion of metal alloys in physical infrastructure. *npj Materials Degradation*, 3(1), 1-7.
- Merchant, H. D. (1968). Solidification of cast iron. In: H. Merchant, Recent Research on Cast Iron, Gordon and Breach (Eds), *Science Publishers*, New York, 1, 100.
- Meroufel, A., Ayashi, M., Touzain, S., & Al-Sahari, A. (2019). Microbial activity involvement on soil corrosion of ductile iron—Electrochemical & microscopic study. *Materials and Corrosion*, 70(5), 897-905.
- Meshulam-Simon, G., Behrens, S., Choo, A. D., & Spormann, A. M. (2007). Hydrogen metabolism in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1153-1165.
- Meulepas, R. J., Jagersma, C. G., Khadem, A. F., Stams, A. J., & Lens, P. N. (2010). Effect of methanogenic substrates on anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction by an anaerobic methanotrophic enrichment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(4), 1499-1506.
- Miller, R. B., Lawson, K., Sadek, A., Monty, C. N., & Senko, J. M. (2018). Uniform and pitting corrosion of carbon steel by *Shewanella oneidensis* MR-1 under nitrate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(12).
- Miot, J., Li, J., Benzerara, K., Sougrati, M. T., Ona-Nguema, G., Bernard, S., ... & Guyot, F. (2014). Formation of single domain magnetite by green rust oxidation promoted by microbial anaerobic nitrate-dependent iron oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 139, 327-343.
- Miot, J., & Etique, M. (2016). Formation and transformation of iron-bearing minerals by iron (II)-oxidizing and iron (III)-reducing bacteria. *Iron Oxides*, 53-98.
- Myers, C. R., & Nealon, K. H. (1988). Microbial reduction of manganese oxides: interactions with iron and sulfur. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52(11), 2727-2732.
- Myers, C. R., & Myers, J. M. (1993). Ferric reductase is associated with the membranes of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *FEMS Microbiology Letters*, 108(1), 15-22.
- Myers, C. R., & Myers, J. M. (1997). Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome c required for reduction of iron (III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology*, 179(4), 1143-1152.
- NACE International impact study (s. d.). Economic impact. Consulté le 14 mai 2020 : <http://impact.nace.org/economic-impact.aspx>.
- Nembrini, G. P., Capobianco, J. A., Viel, M., & Williams, A. F. (1983). A Mössbauer and chemical study of the formation of vivianite in sediments of Lago Maggiore (Italy). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 47(8), 1459-1464.
- Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2002). Mechanisms for Fe (III) oxide reduction in sedimentary environments. *Geomicrobiology Journal*, 19(2), 141-159.
- Newman, R. C., Rumash, K., & Webster, B. J. (1992). The effect of pre-corrosion on the corrosion rate of steel in neutral solutions containing sulphide: relevance to microbially influenced corrosion. *Corrosion Science*, 33(12), 1877-1884.

- Ng, W. L., & Bassler, B. L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 43, 197-222.
- O'Day, D. K. (1989). External corrosion in distribution systems. *Journal-American Water Works Association*, 81(10), 45-52.
- Oguzie, E. E., Agochukwu, I. B., & Onuchukwu, A. I. (2004). Monitoring the corrosion susceptibility of mild steel in varied soil textures by corrosion product count technique. *Materials Chemistry and Physics*, 84(1), 1-6.
- Okabe, S., Nielsen, P. H., & Characklis, W. G. (1992). Factors affecting microbial sulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans* in continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(6), 725-734.
- Okabe, S., & Jones, W. L. (1994). Water Systems: A Process Analysis. *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, 189.
- Okabe, S., Nielsen, P. H., Jones, W. L., & Characklis, W. G. (1995). Sulfide product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *Water Research*, 29(2), 571-578.
- Olowe, A. A., Rezel, D., & Génin, J. M. R. (1989). Mechanism of formation of magnetite from ferrous hydroxide in aqueous corrosion processes. *Hyperfine Interactions*, 46(1), 429-436.
- Olowe, A. A., Benbouzid-Rollet, N. D., Génin, J. M., Prieur, D., & Confente, M. (1992). La présence simultanée de rouille verte 2 et de bactéries sulfato-réductrices en corrosion perforante de palplanches en zone portuaire. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 2, Mécanique, Physique, Chimie, Sciences de l'Univers, Sciences de la Terre*, 314(11), 1157-1163.
- Ona-Nguema, G., Abdelmoula, M., Jorand, F., Benali, O., Géhin, A., Block, J. C., & Génin, J. M. R. (2002). Iron (II, III) hydroxycarbonate green rust formation and stabilization from lepidocrocite bioreduction. *Environmental Science & Technology*, 36(1), 16-20.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304.
- Pankhania, I. P. (1988). Hydrogen metabolism in sulphate-reducing bacteria and its role in anaerobic corrosion. *Biofouling*, 1(1), 27-47.
- Pelhan, G., (1976). Comparison between the oxidation of unalloyed and low-alloy cast iron with lamellar and spheroidal graphite, *Proceedings of the 2nd International Symposium on Science Metallic Cast Iron*. 841-860.
- Pelmont, J. (2005). Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences.
- Pereira, I. A., LeGall, J., Xavier, A. V., & Teixeira, M. (2000). Characterization of a heme c nitrite reductase from a non-ammonifying microorganism, *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1481(1), 119-130.
- Pérez, E. J., Cabrera-Sierra, R., González, I., & Ramírez-Vives, F. (2007). Influence of *Desulfovibrio* sp. biofilm on SAE 1018 carbon steel corrosion in synthetic marine medium. *Corrosion Science*, 49(9), 3580-3597.
- Petersen, R. B., Wells, T., Melchers, E. (2020). Development of long-term localised corrosion of cast iron pipes in backfill soils based on time of wetness. *Corrosion Engineering, Science and Technology, Science and Technology*, 55(7), 550-561.
- Philips, J., Van den Driessche, N., De Paepe, K., PrévotEAU, A., Gralnick, J. A., Arends, J. B., & Rabaey, K. (2018). A novel *Shewanella* isolate enhances corrosion by using metallic iron as the electron donor with fumarate as the electron acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(20).
- Picard, A., Gartman, A., Clarke, D. R., & Girguis, P. R. (2018). Sulfate-reducing bacteria influence the nucleation and growth of mackinawite and greigite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 220, 367-384.

- Pillay, C., & Lin, J. (2014). The impact of additional nitrates in mild steel corrosion in a seawater/sediment system. *Corrosion Science*, 80, 416-426.
- Pitonzo, B. J., Castro, P., Amy, P. S., Southam, G., Jones, D. A., & Ringelberg, D. (2004). Microbiologically influenced corrosion capability of bacteria isolated from Yucca Mountain. *Corrosion*, 60(1), 64-74.
- Qiu, W., Li, W., He, J., Zhao, H., Liu, X., & Yuan, Y. (2018). Variations regularity of microorganisms and corrosion of cast iron in water distribution system. *Journal of Environmental Sciences*, 74, 177-185.
- Raja, P. B., & Sethuraman, M. G. (2008). Natural products as corrosion inhibitor for metals in corrosive media—a review. *Materials Letters*, 62(1), 113-116.
- Refait, P., Géhin, A., Abdelmoula, M., & Génin, J. M. (2003). Coprecipitation thermodynamics of iron (II–III) hydroxysulphate green rust from Fe (II) and Fe (III) salts. *Corrosion Science*, 45(4), 659-676.
- Refait, P., Memet, J. B., Bon, C., Sabot, R., & Génin, J. M. (2003). Formation of the Fe (II)–Fe (III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel. *Corrosion Science*, 45(4), 833-845.
- Refait, P., Abdelmoula, M., Génin, J. M. R., & Sabot, R. (2006). Green rusts in electrochemical and microbially influenced corrosion of steel. *Comptes Rendus Geoscience*, 338(6-7), 476-487.
- Refait, P., Grolleau, A. M., Jeannin, M., François, E., & Sabot, R. (2016). Localized corrosion of carbon steel in marine media: Galvanic coupling and heterogeneity of the corrosion product layer. *Corrosion Science*, 111, 583-595.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045), 1098.
- Remazeilles, C., Saheb, M., Neff, D., Guilminot, E., Tran, K., Bourdoiseau, J. A., ... & Refait, P. (2010). Microbiologically influenced corrosion of archaeological artefacts: characterisation of iron (II) sulfides by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41(11), 1425-1433.
- Rickard, D. (1995). Kinetics of FeS precipitation: Part 1. Competing reaction mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(21), 4367-4379.
- Robinson, W. C. (1993). Testing soil for corrosiveness. *Materials Performance;(United States)*, 32(4).
- Roels, J., & Verstraete, W. (2001). Biological formation of volatile phosphorus compounds. *Bioresource Technology*, 79(3), 243-250.
- Romanoff, M. (1964). Exterior Corrosion of Cast-Iron Pipe. *Journal-American Water Works Association*, 56(9), 1129-1143.
- Romer, A. E., & Bell, G. E. (2001). Causes of external corrosion on buried water mains. In *Pipelines 2001: Advances in Pipelines Engineering and Construction*, 1-9.
- Rossum, J. R. (1969). Prediction of pitting rates in ferrous metals from soil parameters. *Journal-American Water Works Association*, 61(6), 305-310.
- Rothe, M., Kleeberg, A., Grüneberg, B., Friese, K., Pérez-Mayo, M., & Hupfer, M. (2015). Sedimentary sulphur: iron ratio indicates vivianite occurrence: a study from two contrasting freshwater systems. *Plos One*, 10(11), e0143737.
- Saint Gobain PAM. (2017). « M171 La peau d'oxydes » Rapport technique interne, Pont à Mousson, France, (données non publiées).
- Saint-Gobain PAM (s. d.). Ductile iron pipe. Consulté le 20 novembre 2019 : <https://www.pamline.com/saint-gobain-pam/ductile-iron-pipe>.
- Saint-Gobain PAM (s. d.). Revêtement biozinalium. Consulté le 20 novembre 2019 : <https://www.pamline.fr/biozinalium>.

- Salgar-Chaparro, S. J., Lepkova, K., Pojtanabuntoeng, T., Darwin, A., & Machuca, L. L. (2020). Microbiologically influenced corrosion as a function of environmental conditions: A laboratory study using oilfield multispecies biofilms. *Corrosion Science*, 108595.
- Sancy, M., Gourbeyre, Y., Sutter, E. M. M., & Tribollet, B. (2010). Mechanism of corrosion of cast iron covered by aged corrosion products: Application of Electrochemical impedance spectrometry. *Corrosion Science*, 52(4), 1222-1227.
- Sarin, P., Snoeyink, V. L., Lytle, D. A., & Kriven, W. M. (2004). Iron corrosion scales: model for scale growth, iron release, and colored water formation. *Journal of Environmental Engineering*, 130(4), 364-373.
- Sheng, X., Ting, Y. P., & Pehkonen, S. O. (2007). The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316. *Corrosion Science*, 49(5), 2159-2176.
- Singer, M., Brown, B., Camacho, A., & Nešić, S. (2011). Combined effect of carbon dioxide, hydrogen sulfide, and acetic acid on bottom-of-the-line corrosion. *Corrosion*, 67(1), 015004-1.
- Singh, D. D. N., Singh, T. B., & Gaur, B. (1995). The role of metal cations in improving the inhibitive performance of hexamine on the corrosion of steel in hydrochloric acid solution. *Corrosion Science*, 37(6), 1005-1019.
- Singh, D. D. N., & Kumar, A. (2003). A fresh look at ASTM G 1-90 solution recommended for cleaning of corrosion products formed on iron and steels. *Corrosion*, 59(11), 1029-1036.
- Stampfl, P. P. (1969). A basic iron (2, 3)-carbonate formed during corrosion. *Corrosion Science*, 9(3), 185.
- Stipaničev, M., Turcu, F., Esnault, L., Schweitzer, E. W., Kilian, R., & Basseguy, R. (2013). Corrosion behavior of carbon steel in presence of sulfate-reducing bacteria in seawater environment. *Electrochimica Acta*, 113, 390-406.
- Stott, J. F. D. (1993). What progress in the understanding of microbially induced corrosion has been made in the last 25 years? A personal viewpoint. *Corrosion Science*, 35(1-4), 667-673.
- Straub, K. L., Benz, M., Schink, B., & Widdel, F. (1996). Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1458-1460.
- Stumm, W. (1956). Calcium carbonate deposition at iron surfaces. *Journal of American Water Works Association*, 48(3), 300-310.
- Stumper, R. (1923). Inorganic chemistry: the corrosion of iron in the presence of iron sulphuret. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 176, 1316-1317.
- Suma, M. S., Basheer, R., Sreelekshmy, B. R., Riyas, A. H., Bhagya, T. C., Sha, M. A., & Shibli, S. M. A. (2019). Synergistic action of *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Shewanella putrefaciens* along with *Pseudomonas putida* on inhibiting mild steel against oxygen corrosion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(14), 5891-5905.
- Sunger, N., & Bose, P. (2009). Autotrophic denitrification using hydrogen generated from metallic iron corrosion. *Bioresource Technology*, 100(18), 4077-4082.
- Świetlik, J., Raczyk-Stanisławiak, U., Piszora, P., & Nawrocki, J. (2012). Corrosion in drinking water pipes: The importance of green rusts. *Water Research*, 46(1), 1-10.
- Tai, Y. L., & Dempsey, B. A. (2009). Nitrite reduction with hydrous ferric oxide and Fe (II): Stoichiometry, rate, and mechanism. *Water Research*, 43(2), 546-552.
- Tang, Z., Hong, S., Xiao, W., & Taylor, J. (2006). Characteristics of iron corrosion scales established under blending of ground, surface, and saline waters and their impacts on iron release in the pipe distribution system. *Corrosion Science*, 48(2), 322-342.
- Tang, H. Y., Holmes, D. E., Ueki, T., Palacios, P. A., & Lovley, D. R. (2019). Iron corrosion via direct metal-microbe electron transfer. *mBio*, 10(3), e00303-19.

- Teng, F., Guan, Y. T., & Zhu, W. P. (2008). Effect of biofilm on cast iron pipe corrosion in drinking water distribution system: corrosion scales characterization and microbial community structure investigation. *Corrosion Science*, 50(10), 2816-2823.
- Teplitski, M., Merighi, M., Gao, M., & Robinson, J. (2011). Integration of Cell-to-Cell Signals in Soil Bacterial Communities. In: *Biocommunication in Soil Microorganisms*. Springer, Berlin, Heidelberg, 369-401.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41(1), 100.
- Till, B. A., Weathers, L. J., & Alvarez, P. J. (1998). Fe (0)-supported autotrophic denitrification. *Environmental Science & Technology*, 32(5), 634-639.
- Trevors, J. T. (1996). Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods*, 26(1-2), 53-59.
- Trolard, F., Bourrié, G., Abdelmoula, M., Refait, P., & Feder, F. (2007). Fougérite, a new mineral of the pyroaurite-iowaite group: description and crystal structure. *Clays and Clay Minerals*, 55(3), 323-334.
- Uchiyama, T., Ito, K., Mori, K., Tsurumaru, H., & Harayama, S. (2010). Iron-corroding methanogen isolated from a crude-oil storage tank. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1783-1788.
- Usher, K. M., Kaksonen, A. H., Cole, I., & Marney, D. (2014). Critical review: microbially influenced corrosion of buried carbon steel pipes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, 84-106.
- Valencia-Cantero, E., Peña-Cabriales, J. J., & Martínez-Romero, E. (2003). The corrosion effects of sulfate-and ferric-reducing bacterial consortia on steel. *Geomicrobiology Journal*, 20(2), 157-169.
- Valencia-Cantero, E., & Peña-Cabriales, J. J. (2014). Effects of iron-reducing bacteria on carbon steel corrosion induced by thermophilic sulfate-reducing consortia. *Journal of Microbiol Biotechnology*, 24(2), 280-6.
- Vega, E. (2004). Altération des objets ferreux archéologiques du site de Glinet (Seine-maritime, France, XVII^e siècle) Caractérisation des produits de corrosion et étude des mécanismes (*Thèse de doctorat de l'Université de Technologie de Belfort-Montbéliard*).
- Videla, H. A., & Herrera, L. K. (2005). Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology*, 8(3), 169.
- Vigneron, A., Head, I. M., & Tsesmetzis, N. (2018). Damage to offshore production facilities by corrosive microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2525-2533.
- Volkland, H. P., Harms, H., Knopf, K., Wanner, O., & Zehnder, A. J. (2000). Corrosion inhibition of mild steel by bacteria. *Biofouling*, 15(4), 287-297.
- Vos, M., Wolf, A. B., Jennings, S. J., & Kowalchuk, G. A. (2013). Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(6), 936-954.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R., & Ivanova, E. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
- Wade, S. A., Javed, M. A., Palombo, E. A., McArthur, S. L., & Stoddart, P. R. (2017). On the need for more realistic experimental conditions in laboratory-based microbiologically influenced corrosion testing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 121, 97-106.
- Wan, H., Song, D., Zhang, D., Du, C., Xu, D., Liu, Z., ... & Li, X. (2018). Corrosion effect of *Bacillus cereus* on X80 pipeline steel in a Beijing soil environment. *Bioelectrochemistry*, 121, 18-26.
- Wang, H., Hu, C., Hu, X., Yang, M., & Qu, J. (2012). Effects of disinfectant and biofilm on the corrosion of cast iron pipes in a reclaimed water distribution system. *Water Research*, 46(4), 1070-1078.
- Wang, H., Hu, C., Zhang, L., Li, X., Zhang, Y., & Yang, M. (2014). Effects of microbial redox cycling of iron on cast iron pipe corrosion in drinking water distribution systems. *Water Research*, 65, 362-370.

- Wasim, M., Robert, D., Li, C. Q., & Mahmoodian, M. (2017). Corrosion behaviour of pipes in soil and in simulated soil solution. *Corrosion and Prevention*, 1-12.
- Wasim, M., Shoaib, S., Mubarak, N. M., & Asiri, A. M. (2018). Factors influencing corrosion of metal pipes in soils. *Environmental Chemistry Letters*, 16(3), 861-879.
- Wasim, M., & Djukic, M. B. (2020). Long-term external microbiologically influenced corrosion of buried cast iron pipes in the presence of sulfate-reducing bacteria (SRB). *Engineering Failure Analysis*, 115, 104657.
- Weber, K. A., Achenbach, L. A., & Coates, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 752-764.
- Weimer, P. J., Van Kavelaar, M. J., Michel, C. B., & Ng, T. K. (1988). Effect of phosphate on the corrosion of carbon steel and on the composition of corrosion products in two-stage continuous cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(2), 386-396.
- Wen, X., Bai, P., Luo, B., Zheng, S., & Chen, C. (2018). Review of recent progress in the study of corrosion products of steels in a hydrogen sulphide environment. *Corrosion Science*, 139, 124-140.
- Widdel, F., & Bak, F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The prokaryotes*, Springer, New York, NY, 3352-3378.
- Williams, A. G., & Scherer, M. M. (2004). Spectroscopic evidence for Fe (II)– Fe (III) electron transfer at the iron oxide– water interface. *Environmental Science & Technology*, 38(18), 4782-4790.
- Williams, K. H., Kemna, A., Wilkins, M. J., Druhan, J., Arntzen, E., N'Guessan, A. L., ... & Banfield, J. F. (2009). Geophysical monitoring of coupled microbial and geochemical processes during stimulated subsurface bioremediation. *Environmental Science & Technology*, 43(17), 6717-6723.
- Xing, X., Wang, H., Hu, C., & Liu, L. (2018). Characterization of bacterial community and iron corrosion in drinking water distribution systems with O3-biological activated carbon treatment. *Journal of Environmental Sciences*, 69, 192-204.
- Xu, C., Zhang, Y., Cheng, G., & Zhu, W. (2008). Pitting corrosion behavior of 316L stainless steel in the media of sulphate-reducing and iron-oxidizing bacteria. *Materials Characterization*, 59(3), 245-255.
- Xu, D., Li, Y., Song, F., Gu, T., (2013). Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing bacterium *Bacillus licheniformis*. *Corrosion Science*, 77, 385-390.
- Xu, D., & Gu, T. (2014). Carbon source starvation triggered more aggressive corrosion against carbon steel by the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 91, 74-81.
- Yang, Y., Xu, M., Guo, J., & Sun, G. (2012). Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Process Biochemistry*, 47(12), 1707-1714.
- Yang, F., Shi, B., Gu, J., Wang, D., & Yang, M. (2012). Morphological and physicochemical characteristics of iron corrosion scales formed under different water source histories in a drinking water distribution system. *Water Research*, 46(16), 5423-5433.
- Yang, F., Shi, B., Bai, Y., Sun, H., Lytle, D. A., & Wang, D. (2014). Effect of sulfate on the transformation of corrosion scale composition and bacterial community in cast iron water distribution pipes. *Water Research*, 59, 46-57.
- Zegeye, A., Huguet, L., Abdelmoula, M., Carteret, C., Mullet, M., & Jorand, F. (2007). Biogenic hydroxysulfate green rust, a potential electron acceptor for SRB activity. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(22), 5450-5462.
- Zegeye, A., Mustin, C., & Jorand, F. (2010). Bacterial and iron oxide aggregates mediate secondary iron mineral formation: green rust versus magnetite. *Geobiology*, 8(3), 209-222.
- Zhang, P., Xu, D., Li, Y., Yang, K., & Gu, T. (2015). Electron mediators accelerate the microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm. *Bioelectrochemistry*, 101, 14-21.

Zheng, Y., Brown, B., & Nešić, S. (2014). Electrochemical study and modeling of H₂S corrosion of mild steel. *Corrosion*, 70(4), 351-365.

Zhou, C., Vannela, R., Hayes, K. F., & Rittmann, B. E. (2014). Effect of growth conditions on microbial activity and iron-sulfide production by *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of Hazardous Materials*, 272, 28-35.

Zhu, X. Y., Lubeck, J., & Kilbane, J. J. (2003). Characterization of microbial communities in gas industry pipelines. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5354-5363.

Annexes

Annexe 1 : Fonctionnement des revêtements barrières

La Figure A1-1 montre le avant-après du revêtement barrière physique du Zn Al Cu de Saint-Gobain PAM contre la corrosion en présence de microorganismes. La micrographie d'un tuyau enfoui pendant 20 ans montre clairement que la couche native d'oxydes est morcelée et plus irrégulière que celle du tuyau neuf (Figure A1-1a et b). En lumière polarisée (Figure A1-1c), différentes textures sont identifiables, et notamment le produit de conversion du zinc qui provient du revêtement sacrificiel actif.

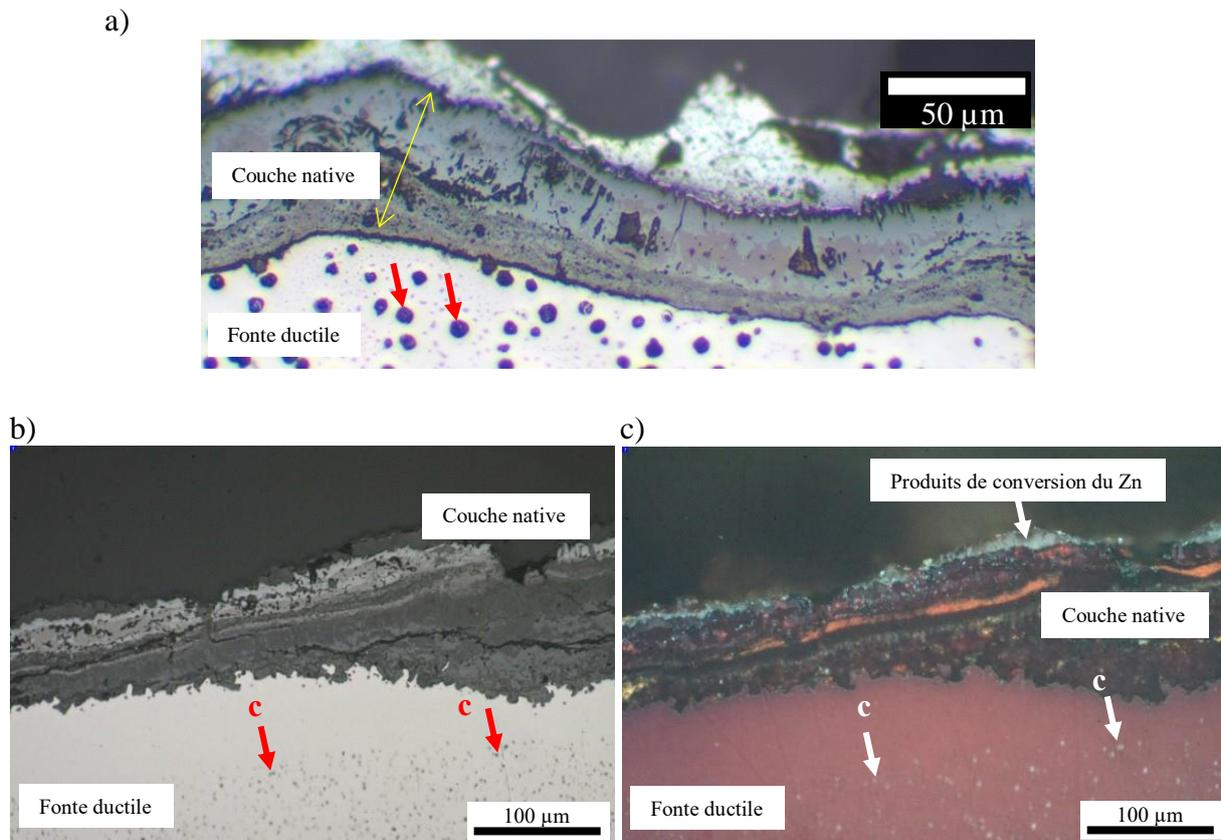


Figure A1-1 : Section transversale d'un échantillon de tuyau en fonte (a) sain en micrographie et (b) et (c) enfoui pendant 20 ans en micrographie (b) et en lumière polarisée (c), c = carbone sphéroïdal (Saint-Gobain PAM, 2017).

Annexe 2 : Spectres Raman de référence

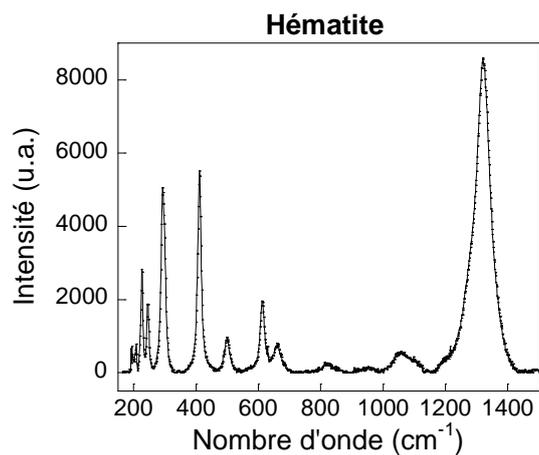


Figure A2-1 : Spectre Raman de l'hématite $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (RRUFF™).

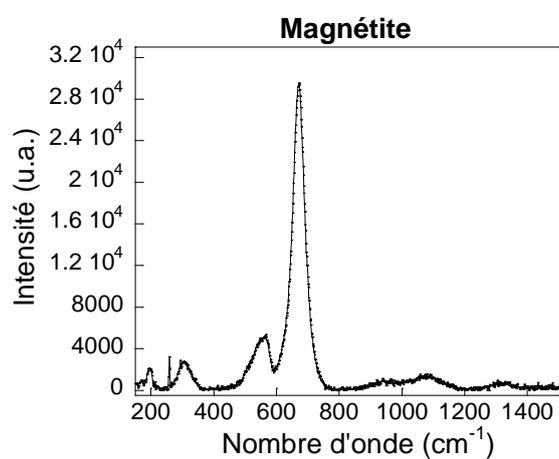


Figure A2-2 : Spectre Raman de la magnétite Fe_3O_4 (RRUFF™).

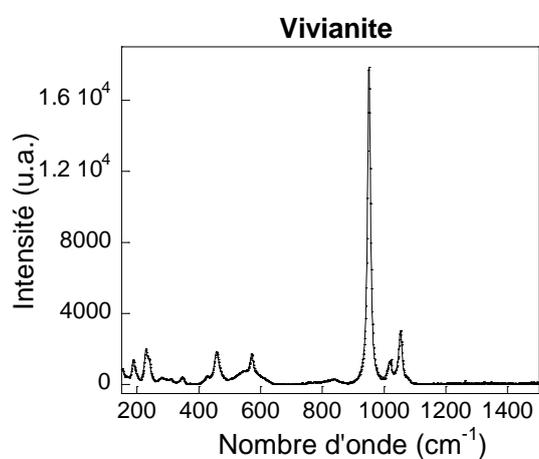


Figure A2-3 : Spectre Raman de la vivianite $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (RRUFF™).

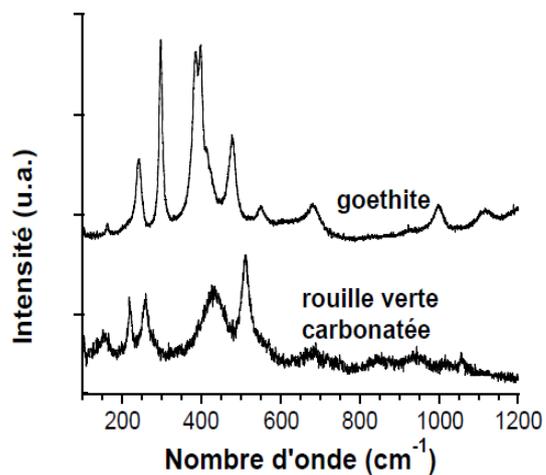


Figure A2-4 : Spectre Raman de la goethite $\text{FeO}(\text{OH})$ et de la rouille verte carbonatée $\text{Fe}_4\text{Fe}_2(\text{OH})_{12}\text{CO}_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (adapté de Etique, 2014).

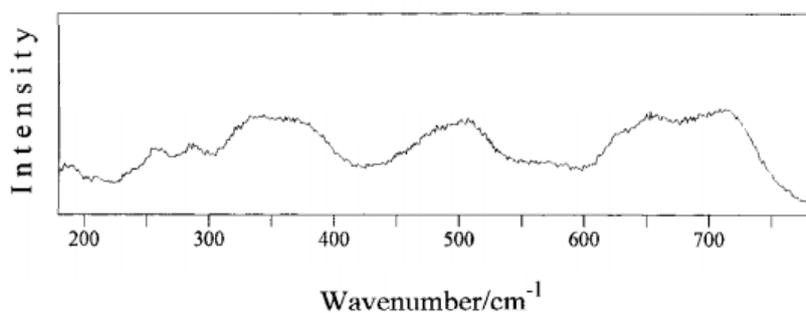


Figure A2-5 : Spectre Raman de la maghémite $\gamma \text{Fe}_2\text{O}_3$ (adapté de De Faria *et al.*, 1997).

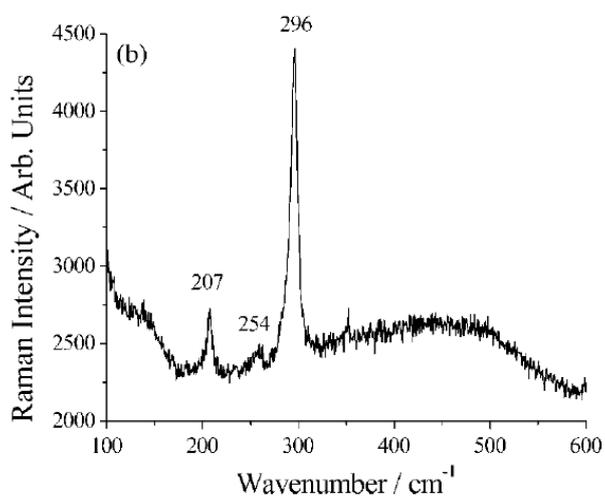


Figure A2-6 : Spectre Raman de la mackinawite cristalline Fe_{1+x}S (Bourdoiseau *et al.*, 2010).

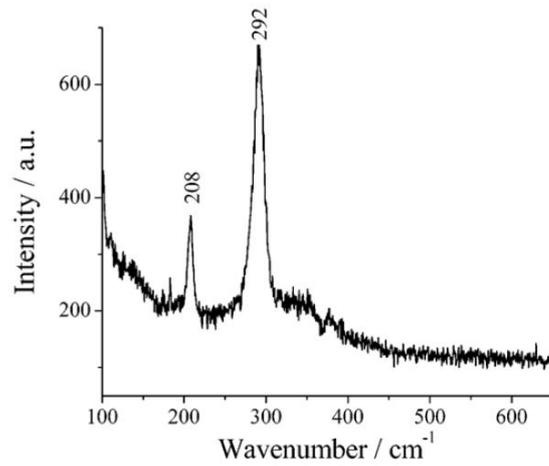


Figure A2-7 : Spectre Raman de la mackinawite nanocristalline $Fe_{1+x}S$ (Bourdoiseau *et al.*, 2008).

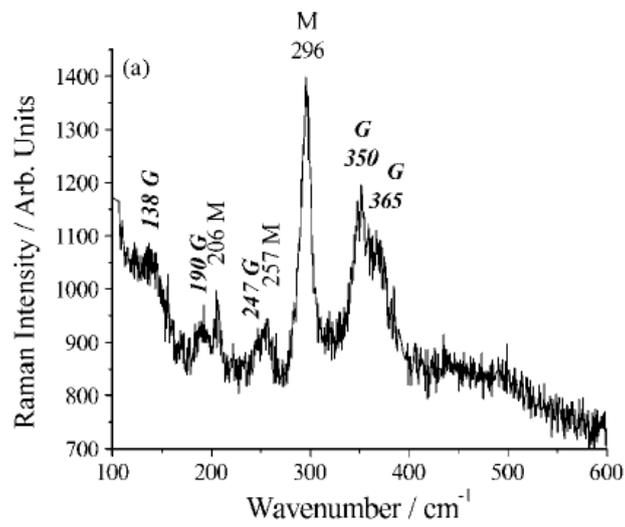


Figure A2-8 : Spectre Raman du mélange greigite (G) Fe_2S_4 – mackinawite (M) $Fe_{1+x}S$ (Bourdoiseau *et al.*, 2010).

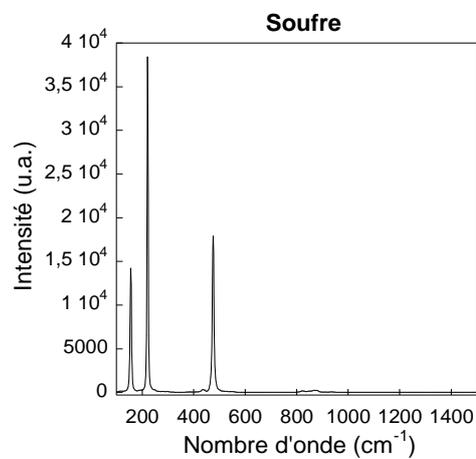


Figure A2-9 : Spectre Raman du soufre S^0 (RRUFF™).

Annexe 3 : Extrait du protocole du kit génomique Wizard® Genomic DNA purification

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

Quick
PROTOCOL

Isolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Pellet Cells

Centrifuge 1ml of overnight culture for 2 minutes at 13,000–16,000 × g^* .
Discard the supernatant.

A. For Gram Positive Bacteria

1. Suspend cells in 480µl 50mM EDTA.
2. Add lytic enzyme(s) (120µl) [lysozyme and/or lysostaphin].
3. Incubate at 37°C for 30–60 minutes.
4. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × g^* and remove supernatant.
5. Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

B. For Gram Negative Bacteria

Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

Lyse Cells

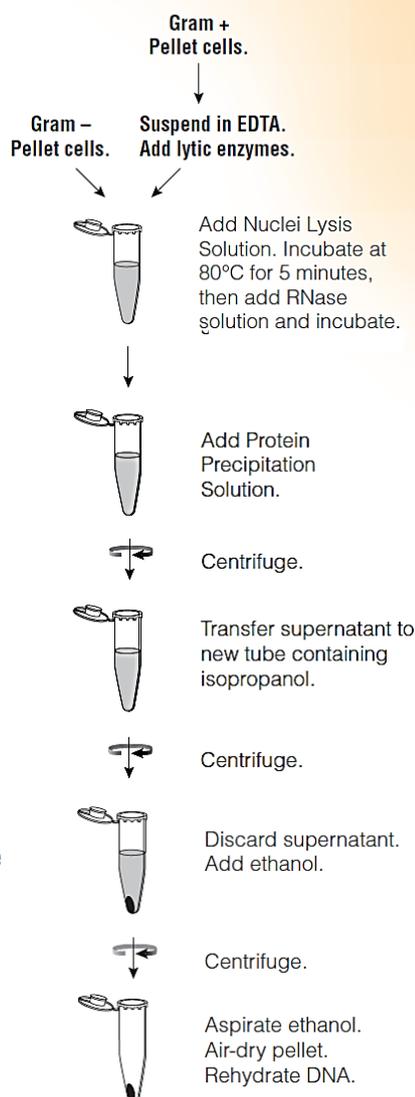
1. Add 600µl Nuclei Lysis Solution. Pipet gently to mix.
2. Incubate for 5 minutes at 80°C, then cool to room temperature.
3. Add 3µl of RNase Solution. Mix, incubate at 37°C for 15–60 minutes, then cool to room temperature.

Protein Precipitation

4. Add 200µl of Protein Precipitation Solution. Vortex.
5. Incubate on ice for 5 minutes.
6. Centrifuge at 13,000–16,000 × g^* for 3 minutes.

DNA Precipitation and Rehydration

7. Transfer the supernatant to a clean tube containing 600µl of room temperature isopropanol. Mix.
8. Centrifuge as in “Pellet Cells” above, and decant the supernatant.
9. Add 600µl of room temperature 70% ethanol. Mix.
10. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × g^* .
11. Aspirate the ethanol and air-dry the pellet for 10–15 minutes.
12. Rehydrate the DNA pellet in 100µl of Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.



*Maximum speed on a microcentrifuge.

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM050, available online at: www.promega.com

ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601



Promega

Printed in USA. Revised 4/20
Part #9FB022

© 1999–2020 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Annexe 4 : Extrait du protocole du kit DNaesy® Power Water® (Qiagen, Cat No 14900-50-NF)

Protocol: Experienced User

Important points before starting

- Solution PW1 must be warmed at 55°C for 5–10 minutes to dissolve precipitates prior to use. Solution PW1 should be used while still warm.
- If Solution PW3 has precipitated, heat at 55°C for 5–10 minutes to dissolve precipitate.
- Shake to mix Solution PW4 before use.
- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).

Procedure

1. Filter water samples using a filter funnel attached to a vacuum source. The volume of water filtered will depend on the microbial load and turbidity of the water sample.
Note: Please see Appendix A: Types of water samples.
2. If using a reusable filter funnel, remove the upper portion of the apparatus.
3. Using two sets of sterile forceps, pick up the white filter membrane at opposite edges and roll the filter into a cylinder with the top side facing inward.
Note: Do not tightly roll or fold the filter membrane.
4. Insert the filter into a 5 ml PowerWater DNA Bead Tube.
5. Add 1 ml of Solution PW1 to the PowerWater DNA Bead Tube.
Note: For samples containing organisms that are difficult to lyse (e.g. fungi, algae) an additional heating step can be included. See Alternative Lysis Methods in the Troubleshooting Guide.
6. Secure the tube horizontally to a Vortex Adapter (cat. no. 13000-V1-5/13000-V1-15).
7. Vortex at maximum speed for 5 min. Centrifuge the tubes $\leq 4000 \times g$ for 1 min. (This centrifugation step is optional if a centrifuge with a 15 ml tube rotor is not available, but will result in minor loss of supernatant).

8. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided). Draw up the supernatant using a 1 ml pipette tip by placing it down into the beads.
Note: Placing the pipette tip down into the beads is required. Pipette until you have removed all the supernatant. Expect to recover 600–650 μ l of supernatant.
9. Centrifuge at 13,000 x *g* for 1 min.
10. Avoiding the pellet, transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
11. Add 200 μ l of Solution IRS and vortex briefly to mix. Incubate at 2–8°C for 5 min.
12. Centrifuge the tubes at 13,000 x *g* for 1 min.
13. Avoiding the pellet, transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
14. Add 650 μ l of Solution PW3 and vortex briefly to mix.
15. Load 650 μ l of supernatant onto an MB Spin Column. Centrifuge at 13,000 x *g* for 1 min. Discard the flow-through. Repeat until all the supernatant has been processed.
16. Place the MB Spin Column Filter into a clean 2 ml Collection Tube (provided).
17. Add 650 μ l of Solution PW4 (shake before use). Centrifuge at 13,000 x *g* for 1 min.
18. Discard the flow-through and add 650 μ l of ethanol (provided) and centrifuge at 13,000 x *g* for 1 min.
19. Discard the flow-through and centrifuge again at 13,000 x *g* for 2 min.
20. Place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube (provided).
21. Add 100 μ l of Solution EB to the center of the white filter membrane.
22. Centrifuge at 13,000 x *g* for 1 min.
23. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.
Note: We recommend storing DNA frozen (–90°C to –15°C) as Solution EB does not contain EDTA. To concentrate DNA, see the Troubleshooting Guide.

Annexe 5 : Mise au point du dénombrement spécifique de *Shewanella putrefaciens* et *Desulfovibrio desulfuricans* par approche moléculaire (qPCR)

Pour mesurer l'abondance relative de *S. putrefaciens* et *D. desulfovibrio*, nous avons mesuré par qPCR le nombre de séquences spécifiques à chaque espèce, à savoir une séquence sur le gène de l'ARN ribosomique 16S pour *S. putrefaciens* et une séquence de gènes codant pour les sous unités α (dsrA) et β (dsrB) de la sulfite réductase dissimilatoire (DSR) pour *D. desulfuricans*.

Des cultures de *S. putrefaciens* seule, de *D. desulfuricans* seule et de la coculture ont été effectuées à une densité initiale de DO_{600nm} 1 ou de DO_{600nm} 0,1 et en présence d'un coupon en fonte. Des prélèvements des suspensions ont été effectués au jour de l'incubation puis après 1 et 4 jours d'incubation. Pour chaque condition, 1 mL d'une culture *overnight* de la souche *E. coli* EDCM a été ajouté. Cette souche est en fait un contrôle car elle est connue et très utilisée au laboratoire.

A5-1. Vérification de la pureté des ADN extraits

Avant de réaliser les qPCR, l'ADN présent dans les prélèvements a été extrait via un kit d'extraction puis dosé par spectrophotométrie aux longueurs d'onde de 230, 260 et 280 nm (Tableau A5-1). Toutes les concentrations en acide nucléiques sont supérieures au seuil de détection (i.e. 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) excepté pour les contrôles abiotiques. Les concentrations diminuent pour *S. putrefaciens* en fonction du jour de prélèvement. Pour *D. desulfuricans* et la coculture, les concentrations augmentent après le 1^{er} jour puis diminuent au 4^e jour. Globalement, les concentrations en acides nucléiques au jour 0 pour la DO 1 sont supérieures à celle de la DO 0,1. Les ratios des mesures d'absorbance permettent de définir la pureté des extractions. Il y a présence de contaminants pour la plupart des conditions car les ratios $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ ne sont pas compris entre 1,8 et 2,0 et les ratios $\frac{A_{260}}{A_{230}}$ ne sont pas compris entre 2,0 et 2,2. Comme il y a un coupon en fonte dans les suspensions, il était attendu d'avoir un polluant, par exemple le fer.

Tableau A5-1 : Dosage par spectrophotométrie de la quantité relative d'ADN extrait dans les échantillons (SP = *Shewanella putrefaciens*, DD = *Desulfovibrio desulfuricans*, SP DD = *Shewanella putrefaciens* + *Desulfovibrio desulfuricans* et T- = contrôle abiotique).

Temps de culture (j)	Souche – DO initiale	[Acides nucléiques] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A ²⁶⁰	A ²⁸⁰	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	$\frac{A_{260}}{A_{230}}$
0	SP 0,1	10,0	0,200	0,110	1,8	2,0
		19,5	0,390	0,207	1,9	1,1
	SP 1	17,2	0,344	0,187	1,8	2,0
		10,6	0,213	0,107	2,0	2,2
	DD 0,1	1,6	0,032	0,029	1,1	1,2
		2,6	0,053	0,033	1,6	1,1
	DD 1	7,3	0,147	0,095	1,5	1,2
		4,5	0,091	0,051	1,8	1,1
	SP DD 0,1	2,0	0,040	0,026	1,5	1,2
		2,8	0,055	0,034	1,6	2,5
		1,4	0,028	0,014	2,0	2,1
	SP DD 1	30,2	0,605	0,362	1,7	2,0
		26,5	0,530	0,307	1,7	2,0
	T-	0,1	0,002	-0,004	-0,3	0,1
		-0,2	-0,004	-0,004	1,1	-0,1
	1	SP 0,1	1,8	0,037	0,027	1,4
2,1			0,043	0,022	2,0	1,2
SP 1		4,0	0,080	0,050	1,6	1,4
		5,1	0,102	0,060	1,7	1,1
DD 0,1		24,2	0,484	0,291	1,7	1,0
		26,4	0,529	0,319	1,7	0,9
DD 1		9,8	0,197	0,108	1,8	1,2
		51,5	1,029	0,652	1,6	1,3
SP DD 0,1		11,2	0,225	0,136	1,7	1,5
		35,1	0,702	0,432	1,6	2,1
		26,3	0,526	0,303	1,7	0,6
SP DD 1		84,4	1,688	0,993	1,7	1,4
		82,4	1,647	0,987	1,7	1,3
T-		-0,1	-0,003	0,008	-0,3	0,3
		0,3	0,006	0,005	1,1	0,2
4		SP 0,1	5,2	0,105	0,071	1,5
	11,7		0,233	0,139	1,7	1,6
	SP 1	3,6	0,072	0,058	1,2	1,6
		9,9	0,198	0,128	1,6	1,4
	DD 0,1	22,6	0,451	0,278	1,6	1,3
		26,8	0,536	0,335	1,6	1,7
	DD 1	11,7	0,234	0,104	2,2	3,1
		36,7	0,734	0,428	1,7	1,4
	SP DD 0,1	10,1	0,201	0,120	1,7	0,9
		18,4	0,369	0,231	1,6	1,2
		10,5	0,209	0,133	1,6	1,0
	SP DD 1	53,7	1,075	0,618	1,7	1,7
		32,5	0,650	0,254	2,6	2,0
	T-	1,6	0,031	0,023	1,4	0,3
		0,7	0,014	0,009	1,5	0,2

A5-2. Optimisation des conditions de mise en œuvre des qPCR

Avant de quantifier l'ADN présent dans nos échantillons, les programmes d'amplification de qPCR doivent être mis en place, testés et validés. Cela permet d'optimiser l'efficacité de la manipulation et de garantir les meilleures conditions d'amplifications d'ADN. Pour valider les programmes, les gammes étalons sont utilisées. Elles doivent avoir une efficacité comprise entre 90 % et 105 % et un coefficient de corrélation R^2 proche de 1.

Le programme de qPCR de la souche contrôle indicatrice *Escherichia coli* EDCM est très utilisé au laboratoire. Vérifier ici la gamme étalon, permet surtout de s'assurer qu'il n'y a pas d'erreurs de la part du manipulateur. Le cycle de seuil (C_t) a été tracé en fonction du log du nombre de copies de gène de pBELX2 d'*E. coli*, le test a été réalisé en triplicata (Figure A5-1). L'efficacité est de 99 %, et le R^2 de 0,99, la gamme est donc correcte et validée.

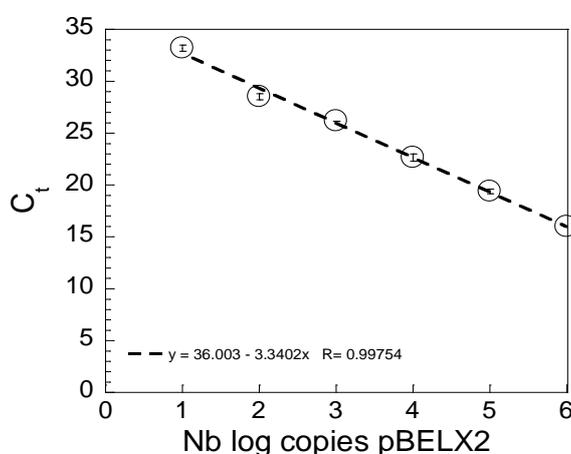


Figure A5-1 : Cycle de seuil (C_t) en fonction du nombre de copie du plasmide pBELX2 d'*Escherichia coli* EDCM. Les écarts types sont cachés par les symboles, ($n = 3$).

Les qPCR avec nos souches d'intérêts *S. putrefaciens* et *D. desulfuricans* n'ont jamais été réalisées au laboratoire. La première étape a donc été de sélectionner des amorces spécifiques dans la littérature. Les amorces tirées des travaux de Li *et al.*, 2018 et de Kondo *et al.*, 2008 ont été retenues respectivement pour *S. putrefaciens* et pour *D. desulfuricans*. Elles ont montré une forte spécificité et une reproductibilité significative.

Pour ces deux souches, quatre programmes de qPCR ont été testés dans le but d'obtenir des gammes étalons acceptables (Tableau A5-2). Seule l'étape d'hybridation/élongation varie et notamment la température d'hybridation T_m . Les autres étapes sont décrites dans la session expérimentale (cf. Chapitre II).

Tableau A5-2 : Programmes de qPCR testés pour l'étape hybridation/élongation.

<i>S. putrefaciens</i>		<i>D. desulfuricans</i>	
T _m	Durée	T _m	Durée
55 °C	1 min	55 °C	1 min
53 °C	1 min	55 °C	1 min
57 °C	1 min	60 °C	1 min
55 °C - 72 °C	3 min - 30 s ¹		
60 °C	1 min		

Les gammes étalons ont été réalisées avec les souches *S. putrefaciens* seule et *D. desulfuricans* seule incubées à J0 à une densité optique de 1. Les calculs décrits ci-après permettent d'avoir la relation entre la quantité d'ADN dosé par spectrophotomètre et le nombre de copies de génome :

S. putrefaciens a une taille de génome en moyenne de 4,66 Mb, soit $4,66 \times 10^6$ pb. Sachant que 1 da équivaut à $1,66 \times 10^{-27}$ kg et qu'une paire de base vaut 650×1 da, soit $1,08 \times 10^{-15}$ µg. Une copie de gène de *S. putrefaciens* vaut donc : $1,08 \times 10^{-15}$ µg \times $4,66 \times 10^6$ pb = $5,03 \times 10^{-9}$ µg. L'ADN dosé pour *S. putrefaciens* au jour 0 et à une densité optique de 1 a été de 17,2 µg/mL. Ainsi, il est retrouvé $17,2 / 5,03 \times 10^{-9}$, soit $3,42 \times 10^9$ copies mL⁻¹. De ce fait, pour préparer une gamme étalon allant jusqu'à 10^8 copies mL⁻¹ (c'est en réalité équivaut à 10^6 copies/10 µL/puits), il faut prélever : $10^8 \times 1000 \mu\text{L} / 3,42 \times 10^9 = 29,24 \mu\text{L}$ de *S. putrefaciens* à DO 1 au jour 0 et le diluer dans 970,76 µL H₂O ($\frac{V_{\text{prélevé}}}{V_{\text{H}_2\text{O}}} = 0,030$). Pour économiser l'ADN, nous avons fait le choix de prélever 7,31 µL qui ont été dilués dans 242,69 µL H₂O (ratio $\frac{V_{\text{prélevé}}}{V_{\text{H}_2\text{O}}}$ conservé).

Avec *D. desulfuricans*, la procédure est la même. La taille de son génome est en moyenne de 3,36 Mb, soit 36×10^6 pb. Une copie d'ADN de *D. desulfuricans* équivaut donc à : $1,08 \times 10^{-15}$ µg \times $3,36 \times 10^6$ pb = $3,63 \times 10^{-9}$. Sachant que l'ADN dosé pour *D. desulfuricans* au jour 0 et à une densité optique de 1 a été de 7,3 µg mL⁻¹, il y a donc $7,3 / 3,63 \times 10^{-9} = 2,01 \times 10^9$ copies mL⁻¹. Pour avoir une gamme étalon allant jusque 10^8 copies mL⁻¹, il faut : $10^8 \times 1000 \mu\text{L} / 2,01 \times 10^9 = 49,75 \mu\text{L}$ de l'ADN de *D. desulfuricans* au jour 0 dans 950,25 µL H₂O. Pour économiser l'ADN, nous avons fait le choix de prélever 7,46 µL qui ont été dilués dans 142,54 µL H₂O.

Les gammes les plus correctes correspondent à une température T_m de 60 °C (Figure A5-2). Pour *S. putrefaciens*, l'efficacité est de 87 % et le R² de 0,99 (Figure A5-2a). Après 3 essais

indépendants, il n'a pas été possible d'obtenir une meilleure efficacité pour les tests avec *S. putrefaciens*, nous avons donc considéré que ce programme restait le plus approprié. Pour *D. desulfuricans*, l'efficacité est de 90 % et le R² de 0,99, le programme est donc validé (Figure A5-2b).

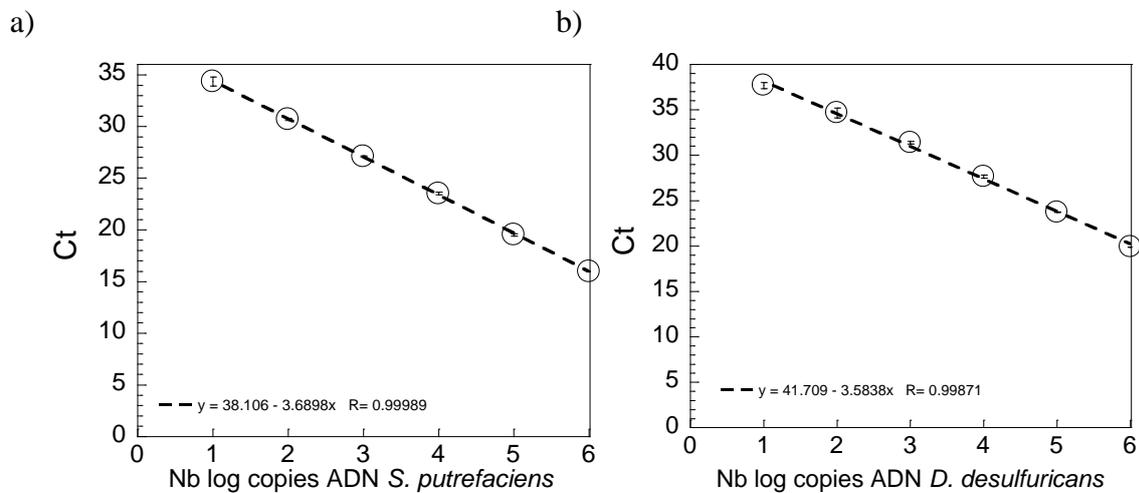


Figure A5-2 : Cycle de seuil (C_t) en fonction du nombre de copie d'ADN de (a) *Shewanella putrefaciens* et (b) *Desulfovibrio desulfuricans*, (n = 3).

A5-3. Tests de la spécificité des amorces

En coculture, l'ADN des deux bactéries est présent et pour quantifier l'ADN de chacune d'entre elles, nous devons utiliser les deux amorces. Or, il faut être certain que les amorces de la première souche n'amplifieront pas l'ADN de la seconde souche. Pour cela, des qPCR ont été effectuées avec les amorces de la première souche sur les échantillons de la seconde, de la coculture et d'elle-même afin d'avoir un contrôle positif (Tableaux A5-3 et 4).

Aux erreurs près, la quantité d'ADN de *S. putrefaciens* mesurée dans la coculture correspond bien à celle qui a été ajoutée (Tableau A5-3). Dans les échantillons contenant uniquement l'ADN de *D. desulfuricans*, il n'y a pas eu d'amplification. Le contrôle positif qui correspond à l'ajout d'ADN de *S. putrefaciens* montre des résultats cohérents avec ce qui était attendu. Les amorces de *S. putrefaciens* sont donc bien spécifiques.

Tableau A5-3 : Tests avec les amorces de *Shewanella putrefaciens*, (n = 3).

	Quantité d'ADN ajoutée	Quantité d'ADN attendue	Quantité mesurée
Coculture	5×10^3	5×10^3	$(4,8 \pm 0,4) \times 10^3$
	5×10^4	5×10^4	$(6,6 \pm 0,8) \times 10^4$
	5×10^5	5×10^5	$(7,2 \pm 0,3) \times 10^5$
Echantillons de <i>D. desulfuricans</i>	10^4	0	< LD
	10^5	0	< LD
	10^6	0	< LD
Echantillons de <i>S. putrefaciens</i>	10^4	10^4	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^4$
	10^5	10^5	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^5$
	10^6	10^6	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^6$

LD : limite de détection

Avec les amorces de *D. desulfuricans*, aux erreurs près, la quantité d'ADN de *D. desulfuricans* mesurée dans la coculture correspond bien à celle qui a été ajoutée (Tableau A5-4). Dans les échantillons contenant uniquement l'ADN de *S. putrefaciens*, une quantité d'ADN de $(2,7 \pm 0,4) \times 10^3$ est retrouvée dans les échantillons où 10^6 d'ADN de *D. desulfuricans* a été ajouté. Pour les deux autres quantités d'ADN ajoutée (i.e. 10^4 et 10^5), aucun ADN de *D. desulfuricans* n'est retrouvé. A noter donc qu'il faut diluer les échantillons de sorte à avoir une quantité inférieure à 10^6 afin d'obtenir des résultats robustes. Le contrôle positif qui correspond à l'ajout d'ADN de *D. desulfuricans* montre des résultats cohérents avec ce qui était attendu.

Tableau A5-4 : Tests avec les amorces de *Desulfovibrio desulfuricans*, (n = 3).

	Quantité d'ADN ajoutée	Quantité d'ADN attendue	Quantité mesurée
Coculture	5×10^3	5×10^3	$(5,2 \pm 0,2) \times 10^3$
	5×10^4	5×10^4	$(7,9 \pm 0,8) \times 10^4$
	5×10^5	5×10^5	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^6$
Echantillons de <i>S. putrefaciens</i>	10^4	0	< LD
	10^5	0	< LD
	10^6	0	$(2,7 \pm 0,4) \times 10^3$
Echantillons de <i>D. desulfuricans</i>	10^4	10^4	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^4$
	10^5	10^5	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^5$

LD : limite de détection

Annexe 6 : Résultat des essais de décontamination des échantillons de sols

Afin d'avoir des contrôles abiotiques contenant la matrice du sol, il faut être capable de décontaminer ces échantillons de sols. Pour cela, trois protocoles ont été testés, le nombre de cycle de traitement à la chaleur (i.e. autoclave), la durée et la position du tube dans l'autoclave varient. Pour vérifier que la décontamination a été efficace, 100 µL des suspensions stérilisées ont été étalées sur gélose TSA et incubées 7 jours à 30 °C (Tableau A6-1). Des microorganismes sont encore capables de se développer et cela même après 2 autoclaves de 20 min (essai #1). Seul le flacon de 10 mL placé horizontalement est négatif. Après 2 autoclaves de 30 min (essai #2), aucun test n'est négatif. C'est au troisième autoclave que la totalité des microorganismes est tuée quel que soit le volume de suspension ou la position du flacon. On observe aussi que la position horizontale semble la plus adaptée, elle donne accès à une superficie plus importante que la position verticale. Pour l'essai #3, tous les flacons ont été placés à l'horizontal. Afin de s'assurer que le protocole est efficace quel que soit le sol considéré, trois suspensions de sols différents ont été testées (suspension du sol de Lesménils, Saint Firmin et Pau). Après 2 autoclaves de 1 h, seuls les sols de Lesménils (10 mL) et de Pau (80 mL) ont été décontaminés. Après les 3 autoclaves de 1 h, plus aucun microorganisme n'est capable de survivre quel que soit le volume de milieu de culture et quel que soit le sol.

Le protocole retenu correspond à 3 traitements à la chaleur de 1 h à 121 °C en tube horizontal avec 15 h de pause entre chaque traitement afin de laisser germer les éventuels microorganismes qui avaient sporulé.

Tableau A6-1 : Nombre de colonies dénombrées sur gélose TSA après 7 jours d'incubation à 30 °C en fonction du traitement de décontamination réalisé pour les essais (a) #1 et #2 et (b) #3, (n = 2).

a)		Horizontal		Vertical	
Position du flacon		10 mL	85 mL	10 mL	85 mL
Volume de la suspension		10 mL	85 mL	10 mL	85 mL
#1	Après 1 autoclave	3 ± 0	3 ± 3	1 ± 0	10 ± 14
	Après 2 autoclaves	0 ± 0	1 ± 1	2 ± 0	3 ± 2
#2	Après 1 autoclave	> 200	4 ± 1	1 ± 0	6 ± 5
	Après 2 autoclaves	1 ± 1	9 ± 8	2 ± 1	2 ± 2
	Après 3 autoclaves	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

b)		Horizontal					
Suspension de sol		Lesménils		Saint Firmin		Pau	
Volume de la suspension		10 mL	85 mL	10 mL	85 mL	10 mL	85 mL
#3	Après 2 autoclaves	0 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	0 ± 0
	Après 3 autoclaves	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Annexe 7 : Séquençage d'échantillons de sols issus d'enrichissements en IRB et SRB après 13 mois d'incubation

Les deux culots bactériens issus d'enrichissements en IRB et SRB ont été séquençés afin d'avoir une idée de leur population microbienne. Pour rappel, le « culot 1 » est issu de l'enrichissement en IRB et le « culot 2 » en SRB. D'abord, la concentration en acides nucléiques et les mesures d'absorbance à 260 nm et 280 nm ont été mesurées car elles permettent de connaître la qualité des ADN extraits (Tableau A7-1). Les ratios $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ sont pour la plupart inférieurs à 1,8 et $\frac{A_{260}}{A_{230}}$ très inférieurs à 2. Cela signifie que l'extraction n'est pas pure et cette pollution provient probablement des coupons en fonte.

Tableau A7-1 : Dosage par spectrophotométrie de la quantité d'ADN extrait dans les enrichissements IRB et SRB, (n = 3).

	[Acides nucléiques] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A^{260}	A^{280}	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	$\frac{A_{260}}{A_{230}}$
IRB – 1	3,4	0,067	0,042	1,6	0,2
IRB – 2	4,1	0,081	0,047	1,7	0,5
IRB – 3	3,5	0,070	0,048	1,5	0,3
SRB – 1	11,5	0,229	0,129	1,8	1,1
SRB – 2	13,0	0,260	0,135	1,9	0,8
SRB – 3	4,0	0,081	0,047	1,7	0,3

Au total, 805 879 séquences d'ADN ont été trouvées dans les échantillons. Après un nettoyage des séquences (i.e. enlever les séquences chimères, trop courtes, les ADN parasites, etc.), 602 335 séquences sont retrouvées et des blasts ont été effectués afin d'affilier les séquences d'ADN à des organismes.

La diversité alpha a été analysée afin de comparer les séquences d'ADN. Il s'agit de la richesse spécifique d'un habitat donné, i.e. la mesure du nombre d'espèces. Elle a été analysée en fonction des triplicatas des échantillons (Figure A7-1). Les résultats montrent que la diversité est globalement plus importante dans le culot 1 par rapport au culot 2. Le culot 1 est issu du milieu d'enrichissements des IRB et celui-ci contient une quantité en sulfate non négligeable, les SRB présentes dans ce milieu d'enrichissement ont donc pu s'y développer aussi. Cela peut expliquer pourquoi la diversité est plus importante dans ce culot.

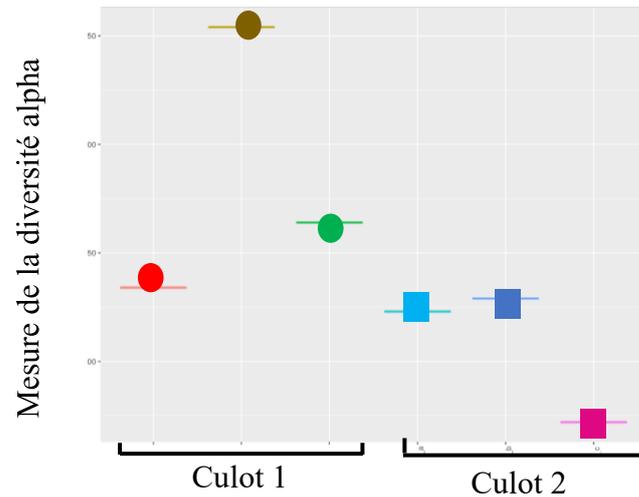


Figure A7-1 : Distribution de la diversité alpha en fonction des échantillons, les ronds brun, rouge et vert représente les triplicatas des IRB, les carré bleu, violet et rose les triplicatas des SRB.

En termes de distribution des phyla (Figure A7-2), les triplicatas suivent la même proportion quel que soit le culot. Pour les deux culots, le phylum majoritaire est celui des firmicutes. Le phylum des desulfobacterota reste majoritaire pour le culot 2 (issu de l'enrichissement en SRB). Seul le culot 1 montre la présence de protéobactéries. Quant à la proportion d'halobactéries, elle semble identique quel que soit le culot. Des chloroflexi et des actinobactéries sont également retrouvés en quantité très minime et ne sont donc pas visibles sur l'histogramme.

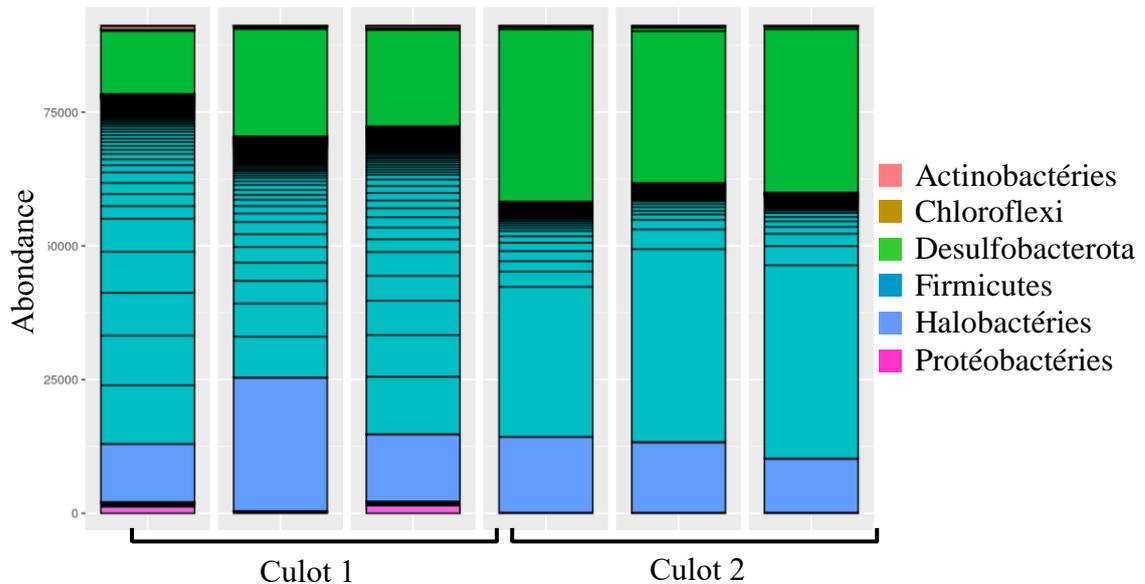


Figure A7-2 : Histogramme de l'abondance relative des phyla dans chaque triplicata d'échantillons.

Pour compléter ces informations, une *heatmap* a été réalisée (Figure A7-3). C'est en fait un autre moyen, plus détaillé et plus visuel, de représenter l'abondance relative et le partage des

OTUs (Unité taxonomique opérationnelle) entre les deux conditions. Chaque nœud correspond à un rang taxonomique (i.e. domaine, phylum, classe, ordre et cela s'arrête au rang famille pour simplifier la lecture). La grosseur des nœuds correspond au nombre d'OTU, plus le nœud est gros, plus il y a d'OTUs. Pour pouvoir comparer les deux conditions, trois couleurs ont été choisies : le rose renvoie à la classification du culot 1, le bleu celui du culot 2 et le gris signifie que l'abondance est identique entre les deux conditions.

La *heatmap* permet d'abord de confirmer que la diversité dans le culot 1 est plus importante que dans le 2. Pour les deux conditions, le phylum firmicutes est le plus abondant. La présence d'actinobactéries, de clostridium, d'alphaprotéobactéries et de gammaprotéobactéries est très marquée pour le culot 1. Pour le culot 2, ce sont les desulfobactéries qui sont en abondance.

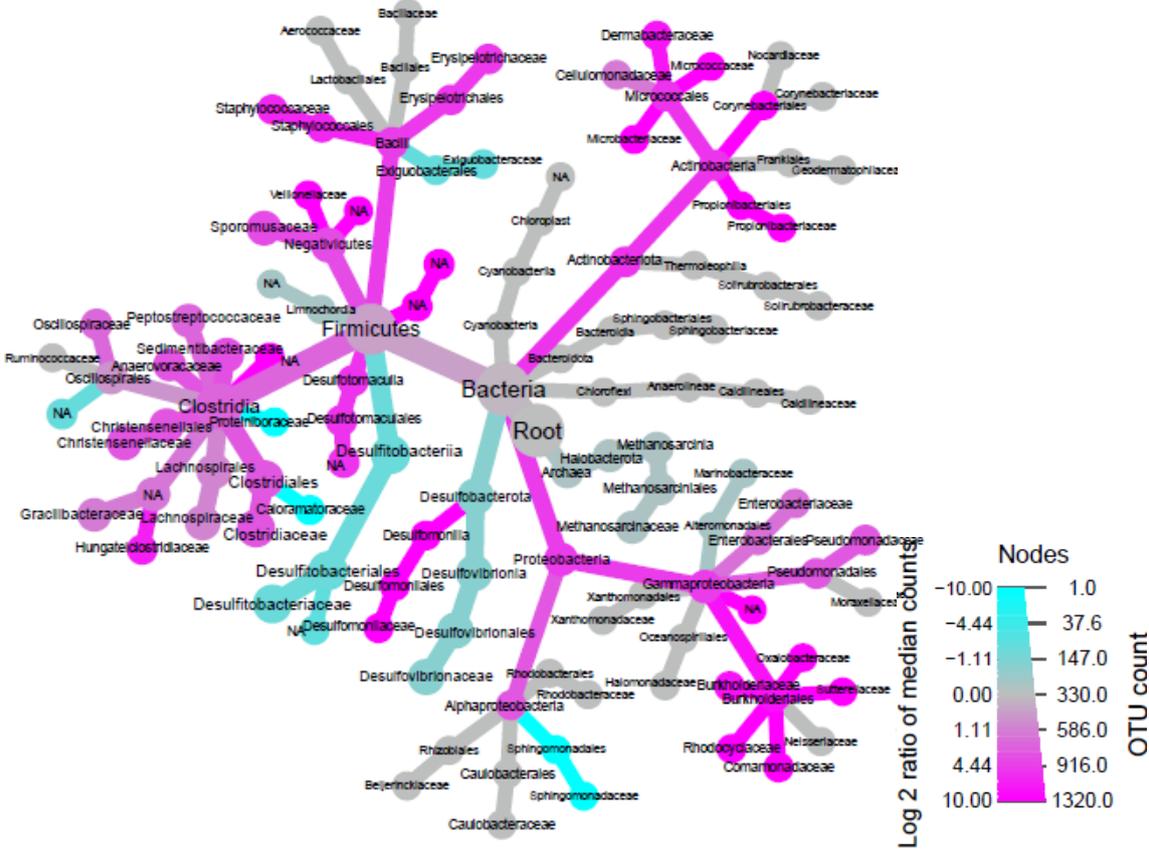


Figure A7-3 : Heatmap des échantillons du culot 1 versus culot 2.

Annexe 8 : Aspects visuel des coupons revêtus après 7 mois d'incubation

La suspension du sol de Pau, *Shewanella putrefaciens* et le contrôle abiotique ont été mis en présence de coupons revêtus ou en fonte brute pendant 7 mois. Au terme de l'incubation, les flacons et les coupons ont été analysés visuellement afin de se rendre compte des différences entre les conditions (Figure A8-1).

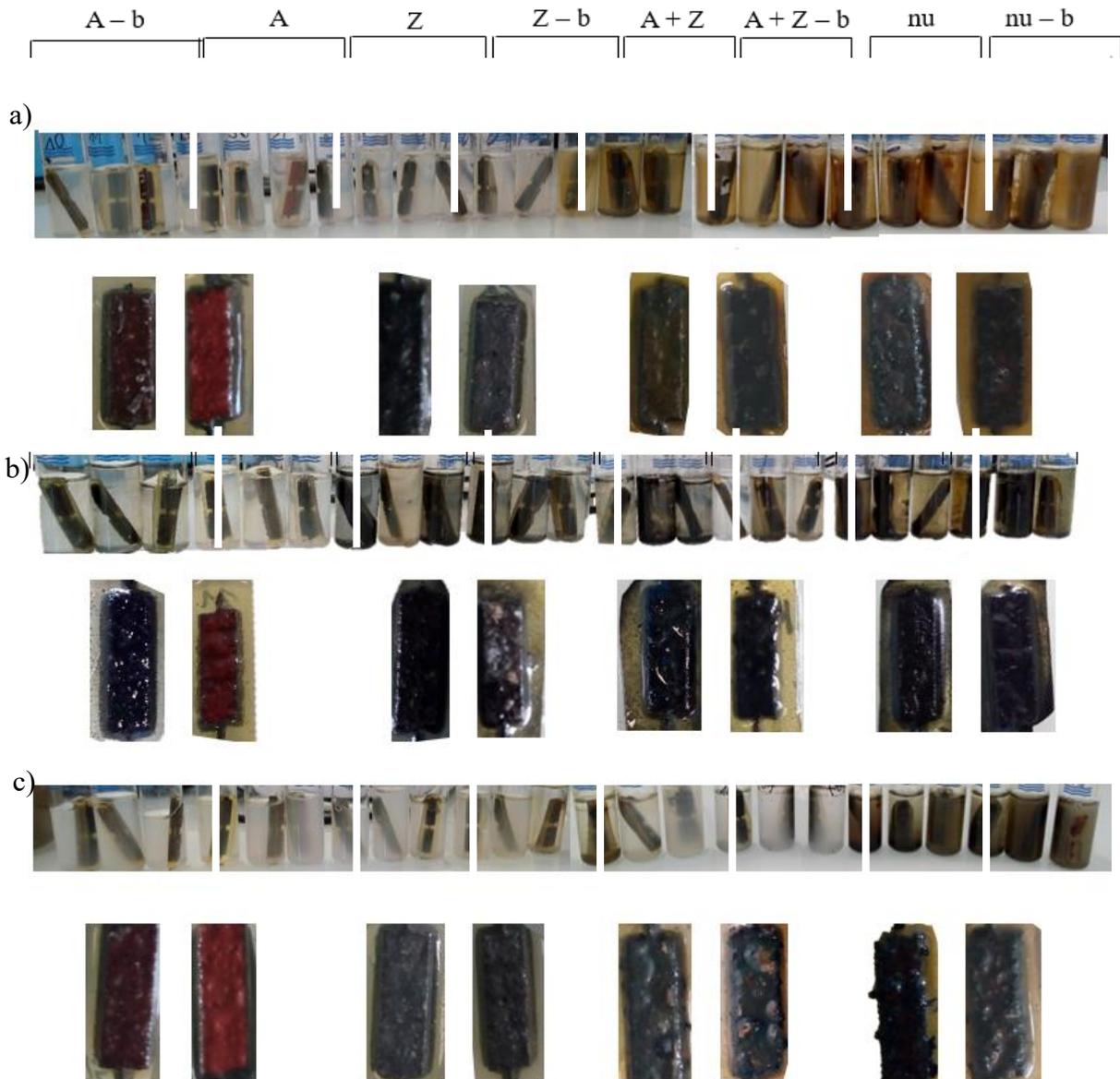


Figure A8-1 : Aspects des flacons et coupons après les 7 mois d'incubation avec (a) *Shewanella putrefaciens*, (b) la suspension du sol de Pau et (c) le contrôle abiotique. A = Aquacoat®, Z = ZnAlCu, A+ Z = Aquacoat® + ZnAlCu, et b = blessé.

Annexe 9 : Séquençage des échantillons du sol de Pau après 7 mois d'incubation

Après les 7 mois d'incubation en présence d'un coupon en fonte brute et de la suspension du sol de Pau, un séquençage a été effectué pour connaître la composition microbiologique du sol.

La concentration en acides nucléiques et les mesures d'absorbance à 260 nm et 280 nm ont été mesurées car elles permettent de connaître la qualité des ADN extraits (Tableau A9-1). Les ratios $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ sont pour la plupart inférieurs à 1,8 et $\frac{A_{260}}{A_{230}}$ sont nettement inférieurs à 2. Cela signifie que l'extraction n'est pas pure, elle est probablement polluée par les coupons en fonte.

Tableau A9-1 : Dosage par spectrophotométrie de la quantité d'ADN extrait de la suspension du sol de Pau.

	[Acides nucléiques] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	A_{260}	A_{280}	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	$\frac{A_{260}}{A_{230}}$
Pau – 1	5,9	0,119	0,063	1,9	0,2
Pau – 2	3,5	0,069	0,040	1,7	0,2
Pau – 3	6,4	0,127	0,069	1,8	0,2

La diversité alpha a tout d'abord été analysée en fonction des triplicatas des échantillons (Figure A9-1). Les résultats montrent une diversité moyenne.

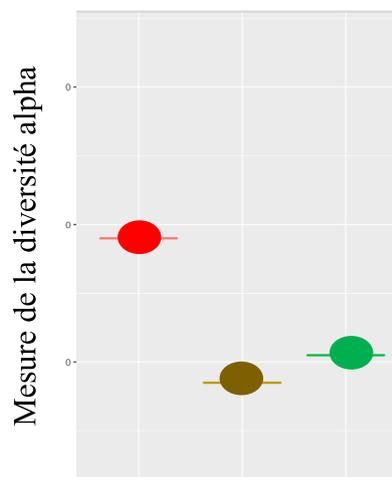


Figure A9-1 : Distribution de la diversité alpha en fonction des échantillons, les ronds brun, rouge et vert représente les triplicatas de la suspension du sol de Pau.

Le phylum des actinobactéries est majoritaire (Figure A9-2). Deux réplicas présentent la même abondance, avec une majorité de protéobactéries et une minorité de firmicutes. Le troisième réplica présente une abondance en firmicutes bien plus élevée. D'autres phyla sont également retrouvés (i.e. bactéroïdes, Desulfobacterota, halobactéries) mais sont en quantité minime et ne sont pas visibles sur l'histogramme.

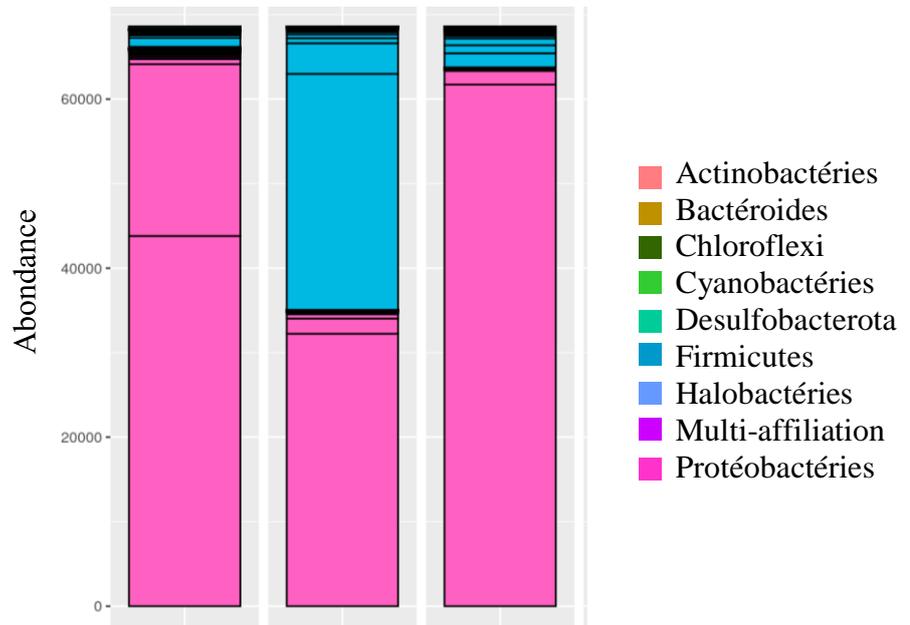


Figure A9-2 : Histogramme de l'abondance relative des phyla dans chaque triplicata d'échantillons.

RÉSUMÉ

Notre étude s'est intéressée à la biocorrosion de la fonte des tuyaux de Saint-Gobain PAM, destinés à l'adduction d'eau potable et d'assainissement. Ces tuyaux sont enfouis dans des milieux divers (tels que des sols de compositions et textures variables, des galeries, etc.) et leur protection contre la corrosion est assurée par des revêtements barrières et galvaniques. Dans certains cas, ces revêtements sont altérés laissant la fonte face aux agressions de l'environnement et notamment en contact avec les microorganismes naturellement présents dans les sols. L'activité des populations bactériennes est susceptible d'avoir un impact sur la corrosion de matériaux métalliques, c'est appelé la « MIC » (*microbial influenced corrosion*). Afin de connaître la contribution relative de microorganismes sur la fonte nue, des groupes métaboliques bactériens suspectés d'être impliqués dans ces réactions ont été incubés en présence de coupons de fonte (i.e. activités ferriréductrices (IRB), sulfatoréductrices (SRB) et nitrate-réductrices (NRB)) en souche pure mais également en coculture. Les résultats ont été comparés à des tests purement abiotiques. Nous avons montré que ces trois groupes métaboliques ont un impact sur la corrosion puisqu'ils modifient la composition de la couche native d'oxydes présente à la surface de la fonte. Par exemple, l'IRB, *Shewanella putrefaciens* a présenté un taux de corrosion de $CR = 0,35 \text{ mm an}^{-1}$ contre seulement $CR = 0,05 \text{ mm an}^{-1}$ en absence de bactéries. Par ailleurs, pour se rapprocher des conditions réelles, nous avons étudié l'impact des bactéries issues de divers sols sur la corrosion (via des suspensions de sols et des enrichissements en IRB, SRB et NRB). Sur la base de ces résultats, l'hypothèse de l'altération de la fonte ductile de Saint-Gobain PAM par des activités microbiennes est donc tout à fait réaliste. Les connaissances qui résultent de cette étude sont essentielles pour, à terme, mettre en place des modèles prédictifs fiables qui permettront d'ajuster les moyens de lutte contre la corrosion.

Mots-clés : corrosion influencée par les microorganismes, fonte, bactéries sulfatoréductrices, bactéries ferriréductrices, bactéries nitrate-réductrices, sol

SUMMARY

Our study focused on the biocorrosion of the cast iron pipes of Saint-Gobain PAM, used for drinking water supply and sanitation. These pipes are buried in various environments (such as soils of variable composition and texture, galleries, etc.) and their protection against corrosion is provided by barrier and galvanic coatings. In some cases, these coatings are altered, leaving the cast iron exposed to environmental aggressions and in contact with microorganisms naturally present in the soil. The activity of the bacterial populations has an impact on the corrosion of metal, it's called the "MIC" (*microbial influenced corrosion*). In order to know the relative contribution of microorganisms on the cast iron corrosion, bacterial metabolic groups, suspected to be involved in these reactions, have been incubated with cast iron (i.e. iron reducing (IRB), sulfate reducing (SRB) and nitrate-reducing (NRB) activities) in pure strain but also in coculture. The results were compared to purely abiotic tests. We have shown that these three metabolic groups have an impact on corrosion since they modify the composition of the native oxides layer present on the cast iron surface. For example, the IRB, *Shewanella putrefaciens* presented a corrosion rate of $CR = 0.35 \text{ mm yr}^{-1}$ against only $CR = 0.05 \text{ mm yr}^{-1}$ in the absence of bacteria. In addition, to get closer to real conditions, we studied the impact of bacteria from various soils on corrosion (via soil suspensions and enrichments in IRB, SRB and NRB). Based on these results, the hypothesis of the alteration of Saint-Gobain PAM ductile cast iron by microbial activities is therefore quite realistic. The knowledge that result from this study is essential for the development of reliable predictive models that would allow the adjustment of corrosion control measures.

Keywords: microbially induced corrosion, cast iron, sulfate reducing bacteria, iron reducing bacteria, nitrate reducing bacteria, soil