## République Algérienne démocratique et Populaire Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Université Abderrahmane Mira - Bejaia



Faculté de la Technologie



Département de Génie des Procèdes

# Mémoire de Magister

Présenté par :

### **Mohammed KECHADI**

Soutenance Prévue : le 10 juin 2009

En Vue de l'Obtention du diplôme de Magister en Génie des Procédés

Option: Génie Chimique



## SUIVI DE LA FORMATION D'UN BIOFILM A PARTIR D'UNE EAU POTABLE SUR DES SUBSTRATS MODELES

#### Devant le jury composé de :

Mr B. TRIBOLLET	Directeur de Recherche au CNRS, Paris	Président
Mr L. MAKHLOUFI	Professeur, Université A. MIRA - Béjaïa	Examinateur
Mr B. SAIDANI	Professeur, Université A. MIRA - Béjaïa	Examinateur
Mr A. TOUATI	Maître de Conférences, Université A. MIRA - Béjaïa	Examinateur
M <sup>lle</sup> L. CHAAL	Maître de Conférences, Université A. MIRA - Béjaïa	Encadreur
Mr N. CHELALI	Professeur, Centre Universitaire de Bourdj-Bou-Arreridj	Invité

### REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le Laboratoire de Technologie des Matériaux et de Génie des Procédés, LTMPG, Equipe Electrochimie - Corrosion, de l'Université A-Mira, Béjaïa, et le Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (LISE), UPR 15 du CNRS, associé à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à M<sup>lle</sup> L. CHAAL, Maître de Conférences à l'Université de Béjaïa, pour avoir dirigée ce travail avec tant d'intérêt, de disponibilité et de dynamisme ainsi que pour ses remarques et critiques constructives.

J'adresse mes remerciements à Monsieur *B. TRIBOLLET*, Directeur de Recherche à l'UPR 15 du CNRS, Paris IV, qui m'a accueilli dans son équipe. Pour sa disponibilité, ses conseils pertinents et aussi pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury d'examen, je lui serais toujours reconnaissant.

Je remercie également mes deux anciens directeurs de mémoires en DEUA et en Ingéniorat, en l'occurrence, Messieurs *L. MAKHLOUFI* et *B. SAIDANI*, Professeurs à l'Université de Bejaia. Leurs présences encore une fois dans mon jury d'examen témoignent de tout le respect que je leur porte.

Messieurs *J. GAMBY* et *V. VIVIER*, Chargés de Recherche au CNRS, m'ont été d'une grande aide dans la réalisation d'une partie de ce travail. Je les remercie pour leur disponibilité et de m'avoir fait profiter de leurs riches expériences en électrochimie.

Toute ma gratitude va à Monsieur A. TOUATI, Maître de Conférences à l'Université de Béjaïa, qui m'a permis de réaliser la partie microbiologique en mettant à ma disposition les moyens dont dispose son laboratoire. Je le remercie aussi d'avoir accepté de juger mon travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur *N. CHELALI*, Professeur au Centre Universitaire de Bourdj-Bou-Arreridj, pour avoir accepté d'être présent dans mon jury d'examen.

Nombreuses sont les personnes que je souhaite également remercier :

- ✓ L'ensemble du personnel de l'Université qui ont répondu présent et ont contribué à la résolution des problèmes techniques que j'ai pu rencontrer. En particulier, Mesdames A. *BENAMOR* et F. *BRADAI* ainsi que Messieurs *M. MAMASSE* et M. *BABA AHMED*.
- ✓ Tous les membres du laboratoire d'Electrochimie : les Docteurs R. AITOUT, L. OUKIL, H. MAKHLOUFI, S. SOULAH, H. DIB et les thésards H. TEGHIDET, L. BENHADDAD et A. BENCHIKH.
- ✓ M<sup>lle</sup> B. YANAT du Laboratoire de Microbiologie Appliquée pour son aide précieuse.

- ✓ M<sup>lle</sup> *N.CHARCHOUR* pour ses coups de mains appréciables durant la période de mon stage en France.
- ✓ Mes collègues du laboratoire, *KAHINA*, *NAIMA et ZINEB*, avec lesquelles j'ai partagé de nombreux moments depuis déjà quelques années.
- ✓ Tous les responsables de l'Université de Béjaïa, qui m'ont permis d'effectuer dans des conditions très confortables mon stage à Paris.
- ✓ Tous les membres du laboratoire LISE, permanents et thésards. Je tiens à les remercier pour leur sympathie et leurs conseils, plus particulièrement :
  - ➤ Monsieur *C. DESLOUIS*, Directeur de Recherche à l'UPR 15 du CNRS, Paris. Je le remercie chaleureusement de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.
  - ➤ Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Monsieur M. KEDDAM pour les conseils qu'il m'a prodigué et les discussions que nous avons entretenues sur les mesures locales.
  - ➤ Madame *F. PILLIER* et Monsieur *S. BORENSZTAJN* pour les analyses MEB et Monsieur *D. ROSE* pour son coup de main en informatique.
  - Monsieur K. RAHMOUNI. Je garderai un excellent souvenir des conversations amicales entretenues autour d'une table de cantine ou d'une tasse de café.
  - Madame *GUILLO*, qui m'a hébergée chez elle tout au long de mon séjour à Paris. Je lui serrai toujours reconnaissant de son accueil chaleureux et sympathique.

Un grand merci à toute ma famille qui m'a encouragée et soutenue moralement et financièrement durant toutes mes années d'études. En particulier, mes très chers parents à qui je dois tous, mes sœurs, mes frères, ma grande mère maternelle, mes tantes ainsi que tous mes oncles.

Je remercie également tous mes amis, notamment : HANANE, LAMIS, AHCENE, AMAR, BELKACEM, FAHIM, GHANI, SMAIL, HAMZA et ABDELHAK.

Finalement, je désire remercier tous ceux et celles qui m'ont aidé et encouragé de prés ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Je dédie ce Travail à la mémoire de mon oncle maternel Madjid TIGHRINE et à celle de ma grand-mère.

## Lexique

**Acidophile**: Organismes ne pouvant survivre et se multiplier que dans des

environnements acides (pH faible) ou très acide.

**ADN**: Acide Désoxyribo Nucléique.

Aéro-anaérobie : La présence d'oxygène est préférable pour le développement

de la bactérie mais elle peut s'en passer.

**Aérobie**: Désigne la capacité d'un organisme ou micro-organisme à se

développer dans l'air ambiant et plus particulièrement dans

un milieu saturé en oxygène.

**AFM**: La microscopie à force atomique.

Alcalophile: Organisme qui ne peut vivre que dans des environnements à

pH basique.

Anaérobie: Un organisme vivant ou un mécanisme anaérobie n'a pas

besoin d'air ou d'oxygène pour fonctionner.

Anse : Une poignée pour porter des objets.

ARN 16S: ARN de la petite sous-unité est impliqué dans la lecture de

l'ARN messager.

ARN de la grande sous-unité du ribosome est impliqué dans

la formation des liaisons peptidiques.

**ATP**: Adénosine Triphosphate.

**Autotrophe**: Organismes vivants qui tirent leur énergie à partir de la

matière organique en procédant à la réduction de matière inorganique, par exemple le carbone (le dioxyde de carbone)

ou encore l'azote.

**Biofilm**: Communauté de micro-organismes.

**Biofouling**: Constitué d'êtres vivants ou dû à des êtres vivants.

Boîte de Pétri : Boîte cylindrique peu profonde, en verre ou en plastique

munie d'un couvercle.

**BSR**: Bactéries sulfato-réductrices. **BTR**: Bactéries thiosulfato-réductrices.

Canule: Petit tube constitué de matière plastique, de métal,

quelquefois de caoutchouc, doit ou recourbé, permettant le passage de l'air ou d'un liquide à travers un orifice.

Cataphorétique : Technique de peinture qui consiste à immerger la pièce dans

un bain de peinture hydrosoluble, en mettant la pièce en cathode et en faisant migrer les particules de peintures en suspension dans le bain au moyen de courant électrique, de

l'anode vers la cathode.

Chimioautotrophe: Organismes qui produisent ses composés organiques sans

l'aide de la lumière comme source d'énergie (chimiotrophie)

et avec une source de carbone minérale.

Chimiohétérotrophe: Organismes qui puisent leur énergie de l'oxydation de

composés organiques. Ils utilisent pour leur croissance des substrats carbonés organiques comme source de carbone.

Chimiotrophe: Des bactéries utilisent l'énergie de composés chimiques

comme source initiale d'énergie.

**Clusters**: Amas microbiens.

**Consortium**: Groupement, association, ensemble.

**Cytoplasme**: Désigne le contenu d'une cellule vivante.

DBO:
Demande biologique en oxygène.
DCO:
Demande chimique en oxygène.
Echo-pulsé:
Basée sur le cumul des signaux.
ECS:
Référence est au Calomel Saturé.
EDTA:
Acide éthylène diamine tetra acétique.
EDX:
Rayons X à dispersion d'énergie.
ENH:
Electrode normale à hydrogène.

Equipotentielle: Ensemble des points où un potentiel scalaire prend une

même valeur numérique.

**Flagelle**: Organite assurant la mobilité d'une cellule.

Gélose: Substance nutritive favorisant ou inhibant (selon sa

composition) la prolifération et le développement des

bactéries.

**HEPES**: Acide (4-2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic.

**Hétérotrophe**: Organismes qui procurent leur matière organique en la

prélevant sur d'autres organismes.

**Hydrogènases positives**: Des enzymes qui catalysent de façon réversible la conversion

des protons en dihydrogène.

Hyperthermophile: Organismes peuvent optimalement vivre et se multiplier à

des températures supérieures à 80 ° C.

**IFREMER**: Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la

MER.

Légionelle: Bactéries naturellement présentes dans l'eau et dans les

boues, responsables d'une maladie respiratoire.

**Légionellose** : Maladie infectieuse due à une bactérie d'origine hydrique. **Lipopolysaccharide** : Composant essentiel de la paroi bactérienne des bactéries à

Gram négatif.

Lithotrophe: Organismes qui utilisent une substance minérale comme

donneur d'électrons lors de leur métabolisme énergétique.

**Luciférase**: Enzyme.

Luciférine: Substance composée produisant une luminescence par

oxydation, sous l'influence d'une enzyme, la luciférase. L'énergie produite par la réaction chimique est libérée sous

forme de lumière et non sous forme de chaleur.

Lysé: Destruction d'éléments organiques sous l'action d'agents

physiques, chimiques ou biologiques.

**ME**: Microélectrode.

**MEB**: Le microscope électronique à balayage.

Mésophile: Organisme qui croît dans des conditions de température

modérée.

**MET**: La microscopie électronique à transmission.

Métabolique : Ensemble des transformations moléculaires et énergétiques

qui se déroulent de manière ininterrompue dans la cellule ou

l'organisme vivant.

Méthanogène: Des microorganismes produisent de méthane se trouvant

dans des milieux variés.

**MF**: La microscopie fluorescente balayage.

Microaérophilie: Organisme vivant en de faible pression partielle d'oxygène.

Microorganisme: Organisme vivant microscopique, c'est à dire qu'il est

généralement invisible à l'œil nu et ne peut être observé qu'à

l'aide d'un microscope.

MOB: Matières Organiques Biodégradables.

Neutrophile: Constituant cellulaire qui a une affinité pour les colorants

neutres.

**Organismes** qui utilisent une substance organiques comme

donneur d'électrons lors de leur métabolisme énergétique.

Pacemakers: Stimulateur cardiaque ou pile, implanté dans l'organisme

délivrant des impulsions électriques au cœur et permettant par exemple d'accélérer ce dernier lorsqu'il est trop lent.

**PBS**: Phosphate tampon saline; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

Peptidoglycane: Polymère de glycosaminopeptide où la N-acétyl-

glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muramique (Acide N-acétyl-muramique) sont liés par des liaisons osidiques (liaison chimique covalente entre le groupement hydroxyle de la fonction alcool du carbone hémiacétalique d'un ose et le

groupement acide d'une autre molécule).

**Peptone** : Produit d'une réaction d'hydrolyse de protéines.

**Phospholipidique**: Avoir des lipides possédant un groupe phosphate. **Photoautotrophe**: Organismes utilisent la lumière comme source d'énergie et le

CO<sub>2</sub> comme source de carbone.

**Photohétérotrophe**: Organismes hétérotrophes se développent par photosynthèse. **Phototrophe**: Organismes vivants qui tirent leur énergie à partir de la

lumière, par photosynthèse ou grâce à des protéines.

Piézo-électrique: Propriété que possèdent certains corps de se polariser

électriquement sous l'action d'une contrainte mécanique et réciproquement de se déformer lorsqu'on leur applique un

champ électrique.

**Planctonique**: Des espèces relativement marines.

**PM-IRAS**: Infrarouge de surface.

Polarisation: Grandeur physique macroscopique utilisée dans l'étude des

propriétés des matériaux diélectriques.

Polyoside: Polymère constitué de plusieurs oses liés entre eux par des

liaisons osidiques

Polysaccharique: Une forme de glucides appelés dans le langage courant des

sucres.

**Procaryote**: Etre vivant dont la structure cellulaire ne comporte pas de

noyau ni d'autres organites.

Pseudomonas Aeruginosa: Bactérie gram-négative du genre Pseudomonas.

Pseudomonas fluorescens: Bactérie à Gram négatif, en forme de bâtonnet appartenant

au genre des Pseudomonas.

**Psychrophile**: Organisme adapté et capable de survivre à des températures

froides.

**SAA**: Spectroscopie d'absorption atomique. **SECM**: La microscopie électrochimique à balayage.

Sonication: Une onde mécanique et élastique, diffusée par les gaz, les

liquides, les tissus mous ou les solides, dont la fréquence est

supérieure à 20 000 Hz.

**SPE**: Substances polymériques extracellulaires.

**SRET**: La technique d'électrode de référence à balayage.

**STM**: La microscopie à effet tunnel.

**SVET** Technique de balayage d'une électrode vibrante.

TAC: Le titre alcalimétrique complet.

**TH**: Dureté totale.

Thermophile: Organismes qui ont besoin d'une température élevée pour

vivre.

**UFC/cm<sup>2</sup>**: Unité formant colonie par unité de surface.

**XPS**: Spectroscopie de photon électron X.

## Liste symboles

v : Viscosité cinématique du milieu.

**v**: Vitesse du flux.

 $\delta$  ou  $\delta_f$ : Epaisseur de la couche poreuse (biofilm).

 $\Omega$ : Vitesse de rotation de l'électrode tournante (tr.mn<sup>-1</sup>).

C<sub>∞</sub>: Concentration de l'espèce électroactive dans la solution.

C<sub>0</sub>: Concentration de l'espèce électroactive à l'interface couche poreuse/électrode.

**D** : Coefficient de diffusion de l'espèce électroactive.

 $\mathbf{D_f}$ : Coefficient de diffusion à travers la couche poreuse.

**E**<sub>imp</sub>: Potentiel imposé à l'électrode.

**F**: Faraday (96484.56 Cb.mol<sup>-1</sup>).

i : Densité de courant (mA.cm<sup>-2</sup>).

**i**<sub>0</sub>: Courant non diffusionnel.

**I**<sub>L</sub>: Courant de Levich.

J : Flux de matière.

**K** : Coefficient de Levich.

n : Nombre d'électrons échangés.

**S**: Surface de l'électrode tournante (cm<sup>2</sup>).

t: Temps.

I : Intensité de courant (A).

**V** : Tension réelle de l'électrode de travail (V).

**E**<sub>i</sub>: Potentiel initial.

**V**<sub>b</sub>: Vitesse de balayage.

ω: Pulsation en rad/s.

**ΔE** : Perturbation de potentiel pour la mesure de l'impédance électrochimique.

 $\Delta I$ : Perturbation de courant pour la mesure de l'impédance électrochimique.

 $\Delta E(\omega)$  et  $\Delta I(\omega)$ : Appelées amplitudes complexes, correspondantes aux transformées de Fourrier des grandeurs temporelles  $\Delta E(t)$  et  $\Delta I(t)$  respectivement.

**Im(Z)**: Partie imaginaire de l'impédance.

**Re(Z)**: Partie réelle de l'impédance.

**Z** : Impédance électrochimique.

**Z**<sub>F</sub>: Impédance faradique.

| Z | : Représente le module de l'impédance.

Φ : L'argument de l'impédance.

**R**<sub>e</sub> : Résistance de l'électrolyte (ohms).

 $\mathbf{R}_{\mathbf{p}}$ : Résistance de polarisation.

**R**<sub>t</sub> : Résistance de transfert de charge.

 $C_d$ : Capacité de la double couche ( $\mu F/cm^2$ ).

C<sub>H</sub> Capacité aux hautes fréquences.

Δh: Hauteur séparant la microélectrode à l'électrode de travail dans la SRET.

 $\mathbf{V}_{\mathbf{x}}$ : Vitesse de déplacement de la sonde dans l'axe des x (50  $\mu$ m.s<sup>-1</sup>).

 $\Delta y$ : Le pas de la microélectrode dans l'axe des y (5 µm).

a : Rayon de la microélectrode.

 $I_{\infty}$  Courant stationnaire d'une microélectrode disque/plan en solution.

 $\Delta(\Delta E)$ : Potentiel mesure par la SRET et corrigé de dérive de potentiel.

Introduction générale		
Chapitre I : Analyse bibliographique		
I-1 Introduction		
I-2 Généralités sur les bactéries		
I-2-1 Conditions de vie		
I-2-2 Morphologie		
I-2-3 Métabolisme		
I-3 Composition et structure du biofilm		
I-3-1 Bactéries sulfato-réductrices (BSR)		
I-3-2 Bactéries thiosulfato-réductrices (BTR)		
I-3-3 Bactéries sulfato-oxydantes		
I-3-4 Bactéries du fer		
I-3-5 Méthanogènes et autres hydrogènases positives		
I-4 Formation du biofilm		
I-4-1 Influence de l'oxygène		
I-4-2 Influence de la température		
I-4-3 Influence de la nature du matériau et des ions métalliques en solution		
I-5 Conséquences des biofilms		
I-6 Techniques de caractérisation et de détection des biofilms		
I-6-1 Méthodes de caractérisations des biofilms		
I-6-1-1 Analyse chimique		
I-6-1-2 Dénombrement bactérien		
I-6-1-3 Techniques microscopiques		
I-6-2 Détection des biofilms		
I-6-2-1 Détection par des moyens optiques		
I-6-2-2 Détection par des moyens mécaniques		
I-6-2-3 Détection par des moyens thermiques		
I-6-2-4 Détection par moyens spectroscopiques		
· • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		
I-6-2-6 Détection par des moyens électrochimiques		
I-6-2-6-a Réduction de l'oxygène à l'interface biofilm/solution		
I-6-2-6-b Mesure du courant de polarisation		
1-0-2-0-c Transport de madere à travers une couche poreuse	∠0	
Chapitre II : Conditions et méthodes expérimentales		
II-1 Techniques de caractérisation microbiologiques	23	
II-1-1 Dénombrement bactérien		
II-1-1 Techniques d'ensemencement et isolement des bactéries		
II-1-1-2 Gélose de base Columbia		
II-1-1-3 Dénombrement des bactéries aérobies et anaérobies		
II-1-2 Coloration de Gram		
II-1-3 Observation au microscope optique		
II-2 Caractérisation physico-chimique de l'eau d'alimentation		
II-3 Formation des biofilms		
II-4 Méthodes expérimentales		
II-4-1 Modèle physique : Principe de la méthode d'estimation de		
l'épaisseur du biofilm	26	
II_1_2 Méthodes électrochimiques		

II-4-2-1 Voltamétrie	29
II-4-2-2 Chronoampèremètrie	
II-4-2-3 Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)	30
II-4-3 Conditions expérimentales	33
II-4-3-1 Cellule électrochimique	33
II-4-3-2 Electrodes	34
II-4-3-2-1 Electrode auxiliaire (contre électrode)	34
II-4-3-2-2 Electrode de référence	
II-4-3-2-3 Electrode à disque tournant (travail)	
II-4-3-2-4 Polissage mécanique des électrodes de travail	
II-4-3-3 Solutions électrolytiques	
II-4-4 Mesures locales de potentiel	
II-4-4-1 Les microélectrodes	
II-4-4-1-1 Les différents types de microélectrodes	
II-4-4-1-2 Propriétés des microélectrodes	
II-4-4-1-3 Fabrication des microélectrodes disque plan	
II-4-4-2 Technique d'électrode de référence à balayage (SRET)	39
II-4-4-2-1 Généralités et principe	
II-4-4-2-2 Dispositif expérimental	
II-4-4-2-3 Conditions expérimentales	42
Chapitre III : Détection et caractérisation des biofilms	
III-1 Caractérisation de l'eau d'alimentation	44
III-2 Détermination électrochimique de l'épaisseur du biofilm	
III-2-1 Détermination du potentiel imposé	
III-2-2 Détermination du coefficient de diffusion	
III-2-3 Résultats obtenus sur l'or	
III-2-3-1 Courbe courant –vitesse de rotation	51
III-2-3-2 Cinétique de formation du biofilm	53
III-2-4 Résultats obtenus sur le platine	
III-2-4-1 Influence du substrat sur la cinétique de formation du biofilm	56
III-2-4-2 Influence de l'hydrodynamique sur la cinétique	
de formation du biofilm	59
III-3 Analyse microbiologique d'un biofilm formé sur l'or	62
III-3 Caractérisation par impédancemétrie	63
Chapitre IV : Application des mesures locales à l'étude d'un biofilm (SRET)	
IV-1 Caractéristiques de l'eau d'alimentation	
IV-2 Activation et tests de la microélectrode	
IV-3 Résultats des mesures locales	
IV-3-1 Optimisation de la hauteur séparant les électrodes	
IV-3-2 Suivi de la formation du biofilm par la SRET sur la Platine	72
Conclusion générale	75
Références bibliographiques	
A	05

#### **Introduction Générale**

Tout élément en contact avec un milieu naturel aqueux se recouvre d'un biofilm. Les microorganismes présents dans le milieu se déposent sur la surface de l'élément et génèrent un biofilm qui constitue une des plus ancienne forme de vie sur terre. De manière générale, les biofilms sont des structures formées par des bactéries ou d'autres micro-organismes, excrétant des polyosides capables de former une matrice glycidique extrêmement résistante à l'abrasion. Cette matrice renforce l'adhérence des bactéries à la surface et les protège contre les agents chimiques, en particulier les désinfectants [1].

Les biofilms peuvent entraîner une détérioration des matériaux : de nombreux cas de biodétérioration des aciers, des pierres et des bétons ont été décrits. De tels films se forment en particulier sur les parois des conduits des réseaux de distribution d'eau potable, et sont souvent responsables d'une dégradation de la qualité de l'eau. Enfin, ces biofilms peuvent être responsables d'une corrosion accélérée des installations industrielles telles que les échangeurs de chaleur [2].

L'hétérogénéité biologique du biofilm induit une hétérogénéité dans son action corrosive par rapport au métal notamment lorsqu'il apparaît un gradient dans la concentration en oxygène à l'interface métal / biofilm [3]. Par ailleurs, l'optimisation des traitements (amélioration des performances, élimination des rejets, baisse des coûts) est liée à la possibilité de connaître en temps réel la vitesse de croissance des biofilms. A l'heure actuelle les procédés permettant de détecter la présence de biofilms et qui ont fait l'objet d'un développement industriel restent peu nombreux.

L'étude du biofilm est un thème de recherche interdisciplinaire nécessitant d'aborder les domaines de la biologie, de la chimie, de la physique et de l'écologie. Les spécialités indispensables à son étude sont donc nombreuses. Dans ce travail, l'électrochimie constituera la base de la méthode de caractérisation et quelques analyses microbiologiques seront réalisées en parallèle.

Notre objectif était dans un premier temps d'étudier la croissance du biofilm et l'estimation de son épaisseur par la méthode proposée dans la théorie. Celle-ci est basée sur l'analyse du transport de matière d'un traceur électrochimique approprié. L'étude est réalisée en grande partie au niveau du Laboratoire d'Electrochimie-Corrosion de l'Université de Béjaïa sur des

électrodes métalliques en or et en platine, afin d'éviter la formation d'une couche supplémentaire de produits de corrosion. L'utilisation d'autres électrodes susceptibles de se corroder telle qu'en acier inoxydable sera envisagée ultérieurement pour une étude plus poussée sur la cinétique de formation du biofilm.

La caractérisation par des analyses microbiologiques est indispensable pour confirmer la formation de ce voile biologique sur nos substrats. Cela est rendue possible grâce à la contribution du Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université de Béjaïa.

Par ailleurs, une nouvelle approche a été abordée dans l'étude des biofilms dans le cadre de ce travail. L'utilisation des mesures électrochimiques locales en l'occurrence, la technique d'électrode de référence à balayage (SRET) a été appliquée pour la première fois, à notre connaissance. Le montage expérimental du laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, UPR 15 du CNRS, Paris nous a permis d'effectuer les mesures locales de potentiel et d'apporter de nouvelles informations dans le suivi de la croissance du biofilm.

En résumé, Ce travail est composé de quatre chapitres et une conclusion générale :

- ➤ Dans le premier chapitre, la revue bibliographique est relative à la description des connaissances de base sur le biofilm afin de mieux appréhender sa complexité et les enjeux de sa détection.
- Le second chapitre regroupe les différentes méthodes d'études, d'analyses et caractérisations utilisées, ainsi que les conditions et les dispositifs expérimentaux employés dans ce travail.
- ➤ Le troisième chapitre est consacré à la présentation et la discussion des résultats des analyses microbiologique ainsi qu'à la détermination des épaisseurs des biofilms formés dans différentes conditions par voie électrochimique.
- Le dernier chapitre présente les résultats obtenus par les mesures électrochimiques locales, en l'occurrence la technique d'électrode de référence à balayage.

### Chapitre I

## Analyse bibliographique

#### I-1 Introduction:

Les biofilms sont des assemblages de microorganismes colonisant des supports solides en milieu humide ou aqueux. On les rencontre dans les endroits les plus divers tels que les cours d'eau, les réseaux de distribution d'eau potable, les stations d'épuration et les nappes d'eau souterraines mais ils interviennent aussi dans certaines applications techniques et médicales. Ils se présentent également sous les formes les plus diverses, pouvant s'organiser en minuscules colonies isolées ou au contraire en pellicules de plusieurs millimètres d'épaisseur. Les biofilms sont en interaction constante avec leur environnement. Ainsi, s'ils sont directement influencés par les caractéristiques physico-chimiques du milieu, ils sont également capables de le modifier de façon sensible [4, 5].

#### I-2 Généralités sur les bactéries :

De taille variant de 1 à 10 µm, les bactéries vivent sur terre, dans les sols, aires et au fond des océans. Elles peuvent résister à des conditions environnementales extrêmes de température, de pH, d'oxygène et même en présence de radiations.

Les bactéries font parties de la famille des procaryotes, qui sont constituées d'une cellule unique contenant leur matériel génétique sous forme de molécules d'ADN (Acide Désoxyribo Nucléique) directement dans le cytoplasme [6].

#### I-2-1 Conditions de vie :

A chaque type de bactéries correspond un milieu de croissance privilégié, en fonction de gammes de températures, de pH et de teneur en oxygène optimales pour leur développement [6]. Ces classifications sont présentées dans les tableaux I.1 à I.3.

Tableau I.1 : Classification des bactéries en fonction de la température

Type physiologique	Température maximale de croissance (°C)
Psychrophile	< 20
Mésophile	20 – 55
Thermophile	55 – 75
Hyperthermophile	> 80

Tableau I.2 : Classification des bactéries en fonction du pH

Type physiologique	pH croissance	
Acidophile	0 – 6	
Neutrophile	6 – 8	
Alcalophile	8 – 11,5	

Tableau I.3 : Classification des bactéries en fonction de la teneur en oxygène du milieu

Type physiologique	Croissance	
Aérobie stricte	Seulement en présence d'oxygène	
Aéro-anaérobie	Avec ou sans oxygène	
(anaérobie facultative)		
Anaérobie stricte	Seulement en absence d'oxygène	
Microaérophilie	Seulement en faible pression partielle d'oxygène	

#### I-2-2 Morphologie:

Il existe différentes formes de bactéries [7]. Chaque forme ayant une appellation particulière (tableau I.4): courte et quasiment sphérique (coque), ou allongée, en bâtonnet (bacille) ou incurvée (vibrion). Elles peuvent parfois s'associer en chaînes ou en grappes. Leur structure unicellulaire et leur forme simple leur confèrent un faible volume intérieur pour une grande surface extérieure, reflétant l'importance des échanges avec le milieu que leur impose leur métabolisme.

Tableau I.4: Représentation schématique des bactéries

Forme de la bactérie	Représentation schématique
Coque (Sphériques) de 1 à 2 µm de diamètre	0
Bacille (Bâtonnet) de 1 à 10 µm	0
Vibrion (Incurvée)	$\sim$
Fusiforme (Fuseau)	0
Spirille	$\sim$

#### I-2-3 Métabolisme :

Le métabolisme d'une cellule est l'ensemble des réactions chimiques qui se produisent au niveau de cette cellule. Pour réaliser ce processus, les bactéries, comme toutes les autres cellules, ont besoin d'énergie. L'Adénosine Triphosphate (ATP) est commune à toutes les formes de vies, mais les réactions d'oxydo-réductions impliquées dans sa synthèse sont très

variées selon les organismes et notamment chez les bactéries, qui peuvent ainsi utiliser une très large variété de source de carbone et/ou d'énergie.

Les bactéries peuvent être classées selon leur type de métabolisme, en fonction des sources de carbone et d'énergie utilisés pour la croissance, les donneurs d'électrons et les accepteurs d'électrons.

L'énergie cellulaire des chimiotrophes est d'origine chimique alors que celle des phototrophes est d'origine lumineuse. La source de carbone des autotrophes est le CO<sub>2</sub>, tandis que des substrats organiques sont la source de carbone des hétérotrophes. Il est aussi possible de distinguer deux sources possibles de protons (H<sup>+</sup>) et d'électrons (e<sup>-</sup>) : les bactéries réduisant des composés minéraux sont des lithotrophes alors que celles réduisant des substances organiques sont des organotrophes.

Les bactéries peuvent être divisées en quatre grands types nutritionnels en fonction de leurs sources de carbone et d'énergie :

- Les photoautotrophes utilisent la lumière comme source d'énergie et le CO<sub>2</sub> comme source de carbone.
- Les photohétérotrophes se développent par photosynthèse. Ils assimilent le CO<sub>2</sub> en présence d'un donneur d'électrons.
- Les chimioautotrophes utilisent des substrats inorganiques réduits pour l'assimilation réductrice du CO<sub>2</sub> et comme source d'énergie.
- Les chimiohétérotrophes utilisent des substrats organiques comme source de carbone et d'énergie

#### I-3 Composition et structure du biofilm :

La composition complexe et variée du biofilm dépend de la diversité et de l'hétérogénéité des milieux au sein desquels la matrice s'étale [9]. Les biofilms sont composés d'un consortium très complexe de micro-organismes, de substances polymériques extracellulaires et d'eau (80 à 95 % de la masse totale) [6, 10], mais aussi d'autres molécules organiques (85 à 98 % de la masse organiques totale), telles que les substances humiques, polysacchariques, protéines, lipides et des enzymes [10, 11].

En effet, comme l'ont montré Wimpenny et coll. [12], la nature de la matrice est dépendante de facteurs intrinsèques liés entre aux profils génétiques des composants cellulaires et aux facteurs externes environnementaux (paramètres physico-chimiques par exemple). Le biofilm est une communauté bactérienne au sein de laquelle on peut trouver de nombreuses

espèces différentes [9]. Les principaux types de bactéries s'écrêtant sur le métal pour former un biofilm sont [6, 13, 14] :

#### I-3-1 Bactéries sulfato-réductrices (BSR):

Ce sont des bactéries sulfurogènes, ce qui signifie qu'elles produisent du sulfure. Elles utilisent le sulfate comme accepteur d'électron, le réduisant en sulfure. Ce processus est associé parallèlement à l'oxydation d'un donneur d'électron (substance organique).

$$S^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2S$$
 (Eq.I.1)

#### I-3-2 Bactéries thiosulfato-réductrices (BTR):

Elles ont le même rôle que les BSR. La réaction mise en jeu est:

$$S_2 O_3^{2-} + H_2 O \rightarrow SO_4^{2-} + HS^{-} + H^{+}$$
 (Eq.I.2)

La thiosulfato-réduction a été démontrée en culture pure en laboratoire, en croissance sous conditions anaérobies strictes et facultatives [6]. La production de thiosulfate résulte de l'oxydation chimique du sulfite sous conditions aérobies ou anaérobies [13].

#### I-3-3 Bactéries sulfato-oxydantes:

Les bactéries sulfo-oxydantes impliquées dans ce cas de corrosion sont généralement des thio-bacilles. Elles utilisent une source de soufre ou de sulfure (FeS<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S,...) comme donneur d'électrons et elles produisent l'acide sulfurique. L'accepteur d'électrons est l'oxygène (aérobie).

#### I-3-4 Bactéries du fer:

Leur intervention dans le processus de corrosion est liée à un métabolisme du fer. On distingue parmi elles les bactéries ferro-oxydantes qui oxydent les ions Fe <sup>2+</sup> en Fe <sup>3+</sup>.

#### I-3-5 Méthanogènes et autres hydrogénases positives:

Le métabolisme des méthanogènes consiste à produire du méthane à partir du CO<sub>2</sub> et d'hydrogène. Elles peuvent utiliser l'hydrogène produit par la réaction cathodique comme l'unique donneur d'électrons.

En résumé, le biofilm a une structure hétérogène très complexe contenant des cavités, communiquant par des canaux [15]. Cette structure était considérée comme homogène et plane, dont le transfert de masse s'effectue par diffusion perpendiculaire au substrat [16, 17] jusqu'au années 80, où la structure hétérogène est mise en évidence par l'application du

microscope laser à balayage confocal [15]. Des clusters, amas microbiens, où les métabolites cellulaires et leurs produits sont plus concentrés, ont pu être mis en évidence. Ils sont séparés par des interstices à travers desquels les nutriments circulent par un transport de masse convectif. Cette structure est présente dans différents biofilms comme ceux des réacteurs, des usines de traitements, des eaux et ceux des cultures Pseudomonas Aeruginosa (Présentes dans les eaux potables) [18-23].

#### I-4 Formation du biofilm :

La formation d'un biofilm sur les surfaces exposées en eau de mer et en eau douce a fait l'objet de nombreuses études tant en milieu naturel qu'en laboratoire [9, 15]. Selon les résultats de la littérature [6, 24-31], le développement du biofilm se fait en plusieurs étapes : adsorption, croissance et stabilisation (voir la Figure I.1).

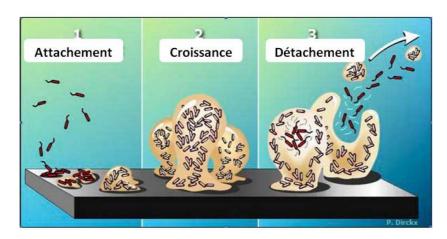


Figure I.1: Formation du biofilm [27].

La première étape est l'adsorption, à la surface des matériaux, de macromolécules organiques et/ou inorganique présentes dans le milieu ou sécrétées par les micro-organismes vivant dans ce milieu [6]. En présence de cristaux minéraux (calcite) à la surface du matériau, les micro-organismes s'adsorbent plus rapidement [32-33]. Ce film de conditionnement, composé entre autres d'exopolymères et de glycoprotéines modifie certaines propriétés physico-chimiques du matériau (tension de surface, énergie libre de surface, polarité, mouillabilité) et prépare l'attachement ultérieur des bactéries [34]. Il est à noter que l'état du matériau (sa rugosité) est un facteur déterminant dans l'étape de conditionnement du biofilm. Son augmentation permet d'avoir plus de molécules adsorbées à la surface du matériau [3]. L'épaisseur de ce film de conditionnement atteint environ 0,1 µm [6]. Cette étape permet aux micro-organismes de se fixer, d'abord de manière réversible en mettent en jeu des interactions faibles, qui sont de type

Van Der Waals: un simple rinçage peut les détacher de la surface. Ensuite, des ponts de polymères se créent entre les bactéries et la surface, résultant de l'activité métabolique bactérienne: les substances polymères extracellulaires (SPE) sécrétées par les bactéries provoquent une adhésion irréversible [6, 35].

Dans la seconde étape s'effectue la croissance en multicouche discontinue et/ou continue du biofilm [36], conséquence d'un effet combiné entre la multiplication très rapide de certaines espèces et la production d'une quantité importante d'exopolymères [9, 15]. La croissance du biofilm est contrôlée par les processus cinétiques de transfert de masse [37]. La concentration en nutriments peut influer sur la durée de croissance du biofilm. On avance des durées allant de quelques jours à quelques mois selon la composition du milieu aqueux où se développe le biofilm [18, 38-41].

Une étape de ralentissement apparait alors : l'accumulation des bactéries sous forme de multiples couches, crée à la base du biofilm, à l'interface avec le matériau, une zone anaérobie. Ce ralentissement est accompagné de l'apparition d'une étape de stabilisation, appelée aussi plateau. Cette phase est caractérisée par une forte population bactérienne avec prédominance de certaines espèces. Le biofilm atteint alors son épaisseur et sa masse maximales et un équilibre s'établit entre les différents micro-organismes [15].

Lors de cette même phase de stabilisation apparaît une étape d'érosion : les couches profondes seront privées d'oxygène et de nutriments provoquant la lyse (mort) de certaines cellules. Ainsi à des modifications des conditions hydrodynamiques et de contraintes de cisaillement, une partie du biofilm risque de se décrocher [15]. Cependant, il existe certaines bactéries aérobies capables de développer une capacité anaérobies lorsqu'elles se trouvent privées d'oxygène [9]. D'après certains auteurs, ce détachement de la biomasse permet une extension du biofilm lorsque celui-ci atteint une masse critique : un équilibre dynamique est alors atteint, pour lequel les couches externes du biofilm génèrent des organismes planctoniques destinés à la colonisation de nouvelles surfaces [42].

#### I-4-1 Influence de l'oxygène :

L'oxygène dissous est un paramètre intervenant dans les cinétiques de réactions de corrosion et dans le métabolisme des micro-organismes. Sa présence favorise à la fois la réaction cathodique et la formation du biofilm.

Des travaux de la littérature ont montré, qu'il existe des zones désaérées dans la structure du biofilm formé dans un environnement aérée. Ainsi des bactéries anaérobies telles que les BSR

ont pu être isolées à partir de ce biofilm. Il a été montré que ces bactéries ont la capacité de développer une protéine de résistance à l'oxygène, ce que laisse penser que les BSR peuvent utiliser l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons. Cette hypothèse est néanmoins controversée par d'autres équipes de recherche [43].

En milieu aéré, le biofilm se forme rapidement et devient épais grâce à l'activité des bactéries aérobies, qui aménagent également des zones anaérobies permettant un peuplement par les BSR ou autres espèces anaérobies. En revanche, un ralentissement de la croissance du biofilm est enregistré lorsque la teneur en oxygène dissous s'affaiblit. L'activité des bactéries aérobies devient moins importante ce qui rend difficile la colonisation des surfaces par les BSR : la résistance à la corrosion du métal s'améliore [6].

#### I-4-2 Influence de la température :

La croissance de biofilm est liée aux conditions environnementales telles que la température. Ce facteur intervient dans la dégradation des matières organiques biodégradables (MOB) par les bactéries, qui les utilisent comme des nutriments. Des travaux ont montré que dans un milieu synthétique et en absence des ces matières (MOB), la température n'a pas d'effet signifiant, alors qu'il présente une influence notable en présence des MOB [44].

Féron [45], en étudiant les biofilms formés sur l'acier inoxydable à deux températures différentes (20 °C et 40 °C) en eau de mer, constate que le potentiel libre de corrosion augmente uniquement dans le cas des biofilms formés à 20 °C. La variation du potentiel de corrosion mesurée sur les échantillons ayant été maintenus à 40 °C reste pratiquement stable. Cela est expliqué par l'activité métabolique des bactéries. Le mécanisme enzymatique relaté suppose que contrairement aux biofilms formés à 40 °C, les enzymes présents dans le biofilm à 20 °C sont capables d'oxyder les sucres et/ou autres produits organiques pour produire des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène qui seraient à l'origine de la catalyse de la réaction cathodique.

#### I-4-3 Influence de la nature du matériau et des ions métalliques en solution :

Le biofilm se forme sur tous les matériaux, que ce soit ceux qui présentent une interface métallique ou oxydée. La nature du matériau influe sur le temps de croissance du biofilm, qui se traduit par une augmentation du potentiel libre. D'après les travaux de la bibliographie, il a été montré que dans le cas de l'acier et le platine un potentiel de 300 mV/ECS est atteint après

un mois d'immersion alors qu'il faut attendre un mois supplémentaire pour atteindre la même valeur dans le cas du titane [45].

Le développement du biofilm est facilité par la production des substances polymériques extracellulaires (SPE). Ces dernières ont la capacité d'inclure certains ions métalliques dans leurs structures, qui peuvent réagir avec les groupements fonctionnels constituants ces SPE (protéines et carbohydrates). La présence des ions (Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>) aux différents états d'oxydations dans le biofilm conduit à de nouvelles réactions redox à l'interface biofilm/métal, où des électrons sont transférés directement du métal, en présence d'un accepteur d'électrons comme l'oxygène par exemple, la corrosion est alors accélérée [43].

Le chrome est un élément qui influe sur la répartition des bactéries dans la matrice du biofilm. A une concentration de 10 mg/l, les bactéries sont dispersées dans tout le biofilm, alors qu'à une concentration de 50 mg/l ou plus, les bactéries se regroupent en cluster (grappe). La formation de cluster est une réponse des bactéries à la toxicité de l'environnement où le biofilm se développe [46].

#### I-5 Conséquences des biofilms :

Chapitre I

Les effets négatifs des biofilms sur les matériaux et les équipements dans les installations sont nombreux : écran hydrodynamique, diminution des échanges thermiques, perte de propriétés optiques, blocage de fonctions mécaniques, accélération de la corrosion ou biodégradation [47].

Les biofilms peuvent aussi avoir des effets très désagréables. Ainsi, ils se développent dans les réseaux d'alimentation en eau potable et dans les systèmes de climatisation pouvant abriter des légionelles, agents de la très redoutée légionellose. Dans le domaine médical, les biofilms peuvent se former dans les appareils, les canules ou les implants comme les pacemakers et provoquer des infections ou réactions de rejet chez les patients. Les équipements techniques et les bâtiments ne sont pas épargnés non plus. Les attaques d'algues et de champignons imposent des mesures fortes coûteuses de rénovation et de restauration des façades et monuments. Les biofilms qui se fixent sur la coque des bateaux augmentent la résistance à l'avancement et induisent une consommation supplémentaire de carburant. Les bactéries sulfato-réductrices sont à l'origine de la corrosion perforante des matériaux métalliques qui occasionne des dommages considérables. On estime que tous ces phénomènes regroupés sous les termes de biofouling et de biocorrosion engendrent des dégâts annuels d'un coût considérablement élevé. Les biofilms qui se développent sur les échangeurs de chaleur en

limitent fortement l'efficacité. Les appareils installés dans les égouts afin de récupérer la chaleur des eaux usées sont particulièrement exposés à ce risque, la grande richesse de ces eaux en nutriments étant particulièrement favorable à la croissance microbienne [4].

La formation d'un biofilm sur les parois de conduites réduit considérablement les transferts thermiques, ceci est particulièrement important dans le cas de tubes échangeurs de chaleur. La conductivité thermique d'un biofilm (0,6 - 0,7 W/m.K) est proche de celle de l'eau mais nettement plus faible que celle des alliages métalliques (acier inoxydable 16,3 W/m.K). Ainsi, un film d'une épaisseur de 55 μm diminue de 20 % le rendement d'une centrale. Une méthode permettant d'estimer le coefficient d'échange thermique d'un tube échangeur a été développée à IFREMER. La Figure I.2 présente l'évolution du coefficient de transfert de chaleur et de perte de charge dans un tube de titane (φ 25 mm) en fonction du temps. La vitesse d'écoulement de l'eau de mer était de 1,5 m/s. Après 30 jours, une diminution de 50 % est atteinte correspondant à un biofilm de 100 μm d'épaisseur [47].

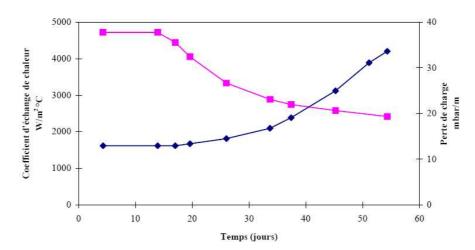


Figure I.2: Evolution du coefficient d'échange de chaleur et de perte de charge dans un tube de titane en fonction du temps. Vitesse de circulation de l'eau de mer : 1,5 m/s [47].

#### I-6 Techniques de caractérisation et de détection des biofilms :

De nombreuses techniques de caractérisation et de détection des biofilms sont actuellement disponibles, malheureusement dans la plupart des cas, les mesures ne peuvent être réalisées *in-situ*, en continu sur une même série d'échantillons et nécessitent un prélèvement de matière. Hors, il est important de pouvoir détecter et quantifier *in-situ* le développement d'un voile biologique afin de contrôler au mieux et réduire l'utilisation de biocides.

#### I-6-1 Méthodes de caractérisation des biofilms :

L'évolution des techniques d'observations et d'analyses biologiques et chimiques a permis de rendre plus facile la caractérisation et l'étude structurale des biofilms. Nous allons résumer dans ce paragraphe ces différentes techniques utilisées dans divers travaux de recherches.

#### I-6-1-1 Analyses chimiques:

L'analyse chimique d'un constituant organique passe souvent par une étape d'extraction. Dans le cas du biofilm, la procédure est généralement réalisée par un grattage mécanique ou bien par sonication [9, 13, 46-49]. Une fois le biofilm est détaché, nombreuses sont les méthodes utilisées pour caractériser les éléments qui le constituent.

L'analyse du carbone organique total est l'une des techniques utilisées dans de nombreux travaux. Ce paramètre est proportionnel aux différentes molécules organiques constituant la matrice organique (SPE). D'autres travaux sont basés sur l'exploitation des données autre que le carbone organique total, telles que le suivi de la teneur en sucres totaux et acides aminés totaux [9].

Les méthodes spectroscopiques utilisées dans ce contexte sont nombreuses et ont fait l'objet d'analyse dans la plupart des travaux de la littérature. On cite à titre d'exemple : PM-IRAS (Infrarouge de surface), XPS (spectroscopie de photon électron X), EDX (rayons X à dispersion d'énergie) et microspectrométrie Raman confocale [32, 48-54].

Par ailleurs, la caractérisation d'un biofilm ne se limite pas uniquement dans la matrice organique puisque l'activité métabolique des bactéries dans le biofilm peut également être exploitée comme une donnée permettant d'identifier la nature de la biomasse. D'après les travaux déjà réalisés, une analyse de la teneur des sulfates par chromatographie dans un milieu synthétique à permis de justifier la présence des bactéries sulfato-réductrices, au sein du biofilm [46]. Aussi d'autres analyses chimiques du milieu dans lequel se développe le biofilm peuvent être effectuées, telles que la demande biologique en oxygène DBO, la demande chimique en oxygène DCO, par titrage ou oxymétrie, la teneur en chlore par la méthode de Mohr's ainsi que la teneur en magnésium et en calcium par la spectroscopie d'absorption atomique SAA [51].

#### I-6-1-2 Dénombrement bactérien :

Les méthodes de dénombrement ne sont pas toujours fiables. Elles donnent une valeur approximative du nombre de bactéries existant en unité formant colonie par unité de surface (UFC/cm²) ou par log (UFC/cm²) [44, 51]. Ceci est encore plus vrai dans le cas du dénombrement d'une communauté bactérienne vivante au sein d'un biofilm. Le dénombrement dans ce cas pratique nécessite un décrochage du biofilm et cela conduit à des erreurs dans le comptage des bactéries, due à l'efficacité du décrochage (un biofilm âgé ne se décroche pas totalement) ou même il se peut que le décrochage tue les bactéries, alors que dans le cas du dénombrement on tien compte uniquement des bactéries vivantes [9].

L'ensemencement des bactéries dans des milieux nutritifs ne tient pas en compte des bactéries stressées qui sont dans un état de dormance due à la modification de certains paramètres physico-chimiques tels le pH ou la température [55].

Afin de dénombrer les bactéries totales et cultivables, diverses techniques (biologiques, moléculaires, enzymatiques,...) sont utilisées *in situ* pour compléter les techniques traditionnelles de culture. On cite la microscopie épifluorescence [12, 54] qui permet soit de dénombrer les bactéries totales par l'utilisation de marqueurs de structure d'acide nucléique, soit de dénombrer l'intégralité membranaire des bactéries en utilisant des indicateurs d'acides nucléiques bactériens [12]. Toujours en marquant l'acide nucléique, les techniques d'hybridation *in situ* de l'ARN 16S et de l'ARN 23S sont utilisées et cela en ciblant l'acide nucléique au sein d'un biofilm par des sondes fluorescentes [56].

#### I-6-1-3 Techniques microscopiques:

La structure d'un biofilm est très adsorptive et poreuse (> 95 % d'eau). Il est donc difficile de caractériser sa structure par microscopie en deux dimensions [57]. L'évolution des techniques microscopiques a permis de passer d'une structure du biofilm homogène et plane à une structure hétérogène et très complexe. Ces techniques peuvent être classées en quatre principales catégories :

- ✓ La microscopie électronique à balayage environnementale qui permet depuis des années de donner des informations sur la structure de surface ainsi que sur la densité et la nature des populations bactériennes. Cette technique reste limitée à l'observation [51,58-62].
- ✓ La microscopie électronique à transmission (MET), qui donne la possibilité d'explorer en détail la texture, la composition et la morphologie du biofilm [9]. Son couplage

avec des marqueurs spécifiques (fluorochromes, anticorps, ...) mais aussi avec la microdiffraction à rayon X conduit à l'obtention d'un spectre de rayons X qui permet d'évaluer rapidement la composition minérale du biofilm [32].

- ✓ la microscopie confocale à balayage laser, permet d'obtenir des images nettes des surfaces mais également d'explorer la structure interne et les éléments intracellulaires dans les trois dimensions de l'espace [9].
- ✓ Enfin, La microscopie à force atomique (AFM), récemment utilisée dans l'étude des biofilms [40,50,63].

La caractérisation des différentes étapes de formation du biofilm sur différents substrats par l'utilisation des techniques microscopiques a fait l'objet de plusieurs investigations. On citera à titre d'exemple, les travaux de Yuan et *coll*. [54]. En étudiant la corrosion des alliages de Cu-Ni induite par les biofilms, ces auteurs ont pu mettre en évidence, la présence d'un biofilm discontinu lors de la première étape de formation (Initiation) en utilisant la microscopie fluorescente (MF) et la présence d'une corrosion par piqûres au dessous des couches du biofilm discontinu grâce au microscope électronique à balayage (MEB)

Sheng et *coll* [48] ont illustré les différentes étapes de formation du biofilm sur l'acier AISI 316 à savoir : l'initiation, la croissance, la stabilisation suivie d'un détachement du biofilm en utilisant la microscopie à force atomique.

Gamby et *coll*. [50] ont distingué par le MEB la présence d'un dépôt mixte minéral/biologique après 15 et 90 jours d'immersion, sur des coupons d'acier immergés dans l'eau du robinet à 20 et 37° C en alimentation continue. L'exploitation des données de l'AFM a permis de montrer la présence d'une dizaine de bactéries immobilisées sur une zone de 400 µm², après 15 jours d'immersion. Il semblerait que certaines de ces bactéries présentent des flagelles indiquant qu'elles sont de différents types.

#### I-6-2 Détection des biofilms :

L'optimisation des traitements (amélioration des performances, élimination des rejets, baisse des coûts) est liée à la possibilité de connaître en temps réel la vitesse de croissance des biofilms. Dans cette partie, nous allons présenter les différents moyens développés dans les laboratoires pour la détection des biofilms.

#### I-6-2-1 Détection par des moyens optiques :

La détection d'un biofilm par des moyens optiques repose sur un seul principe, qui est la mesure du signal lumineux transmis et/ou réfracté qu'il émit. L'exploitation des données optiques enregistrées par des photodétecteurs, a permis à certains auteurs d'estimer l'épaisseur du biofilm [15, 64].

Le développement des instruments optiques, tels que les fibres optiques, a son rôle dans l'évolution des moyens de détection optique des biofilms par des microélectrodes. Le principe est le même (mesure de la lumière transmise et absorbée par le biofilm) [15], le câble optique mesure les variations d'un paramètre dépendant de la structure du biofilm, qui peut être le pH, la concentration d'ion ou en molécule organique.

Balaji et coll. [49] ont utilisé la fibre optique pour estimer les variations de pH au sein d'un biofilm formé sur l'acier inoxydable 316L. Cela renseigne aussi sur l'état du matériau (étude de la corrosion). Ce capteur optique a les avantages d'avoir : un temps de réponse court, une réponse linéaire, reproductible et très stable.

On utilise également la technique des fibres optiques pour suivre la croissance du biofilm. La lumière étant dans ce cas transmise sur un photo-détecteur, l'intensité lumineuse mesurée est alors fonction de la quantité de particules qui permettent la réflexion de la lumière [15].

#### I-6-2-2 Détection par des moyens mécaniques :

Divers moyens mécaniques peuvent êtres utilisés pour la détection des biofilms, on cite à titre d'exemple, le suivi de la résistance de friction par des mesures de pression, ou de la vitesse du son par des ultrasons, ou en utilisant l'écho-pulsé des ondes acoustiques de surface et enfin la microbalance à cristal de quartz.

Cette dernière technique est souvent appliquée dans les travaux de la littérature [65-68]. C'est une méthode non destructive, basée sur le suivi de la variation de la fréquence de résonnance d'un cristal piézo-électrique qui traduit l'augmentation de la masse correspondante à la présence d'un biofilm sur la surface analysée. Néanmoins, ce capteur présente quelques inconvénients comme une utilisation complexe et des difficultés d'interprétation des résultats ; de plus, il s'agit surtout d'une méthode de laboratoire [9].

Par ailleurs, Eguia et *coll*. [69] ont exploité les données du comportement mécanique d'un fluide circulant à l'intérieur des conduites contenant un biofilm. La croissance du biofilm sur les surfaces humides conduit à l'augmentation de la résistance de friction du fluide.

Cependant, cette technique ne permet pas de définir exactement le type de dépôt formé sur les parois des canalisations.

#### I-6-2-3 Détection par des moyens thermiques :

En se basant sur le principe général du transfert de chaleur, des détecteurs par moyens thermiques ont été conçus, afin d'estimer l'épaisseur du biofilm en exploitant les données des variations de la valeur du coefficient de transfert de chaleur [69]. L'inconvénient de ce capteur est la sensibilité aux faibles dépôts correspondent à l'étape initiale de formation du biofilm. C'est pour cela que d'autres auteurs proposent une méthode du suivi de la formation du biofilm par un couplage de flux thermique/capteur à fibre optique. Ce dernier (fibre optique) détecte les premières étapes de la formation, tandis que le capteur à flux thermique détecte le biofilm âgé [9].

D'autres travaux se sont orientés vers le couplage de la méthode thermique avec les mesures électrochimiques en vue d'étudier le comportement des aciers inoxydables en présence des biofilms [70, 71].

#### I-6-2-4 Détection par moyens spectroscopiques :

Le domaine du moyen infrarouge contient l'essentiel des signatures spectrales des molécules biologiques. Le développement d'une nouvelle génération de fibres optiques travaillant dans ce domaine spectral, a permis de concevoir une instrumentation dédiée à la détection *in situ* ainsi qu'à la caractérisation des biofilms bactériens [72].

L'analyse des modes de vibration par spectroscopie infrarouge fournit des informations sur la structure moléculaire des matériaux et permet de caractériser certaines de leurs propriétés de surface [50]. M. A. Siebel et *coll*. ont développé un capteur basé sur ce principe, permettant de déterminer de manière non destructive et en ligne des changements dans la nature chimique du biofilm. Néanmoins, l'analyse des spectres nécessite des compétences particulières et la technicité est complexe sur site industriel [73].

A. Delille et *coll*. ont également utilisé la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier avec réflexion totale atténuée, qui permet de suivre *in situ* l'état d'attachement des bactéries sur les matériaux ainsi que l'accumulation des exopolymères [74]. Cette technique permet de suivre les étapes initiales de formation de biofilm, leurs réponses aux changements dans les conditions environnementales et enfin elle renseigne sur la composition chimique et l'état physiologique du biofilm. Toutefois, l'interprétation quantitative reste délicate [75].

Par ailleurs, l'association de la microscopie électronique à transmission avec les techniques d'analyses spectrométriques à dispersion d'énergie (EDX) a permis de mettre en évidence différents composés constituant un biofilm formé sur acier au carbone [76].

#### I-6-2-5 Détection par des moyens biologiques :

Nombreux sont les travaux consacrés au développement des détecteurs par des moyens biologiques. Ces détecteurs exploitent les différents outils de la biochimie et de la biologie moléculaire et dépendent étroitement des espèces que l'on cherche à identifier.

On cite, à titre d'exemple, la détection *in situ* des biofilms en caractérisant spécifiquement les polymères extracellulaires par un système de marquage basé sur l'utilisation d'anticorps. Cependant, la visualisation et l'interprétation des résultats s'effectuent par microscopie électronique, ce qui fait de cette technique un moyen de laboratoire difficilement applicable sur site industriel [9].

Par ailleurs, l'analyse de l'ATP (Adénosine Triphosphate), molécule hautement énergétique, peut renseigner sur la biomasse vivante au sein du biofilm. L'outil Bioscan<sup>TM</sup> dont le principe est basé sur cette analyse permet de détecter et de corréler l'intensité de la lumière émise au taux de biomasse active de l'échantillon suite à une réaction biochimique entre l'ATP et un réactif spécifique (Luciférine – Luciférase) [77].

Les analyses microbiologiques, qui sont nombreuses, permettent de collecter des informations microbiologiques, chimiques, biochimiques et physiques sur la biomasse fixée, cela à travers les techniques de la détermination de la morphologie, nombre de bactéries [78,44] composition de l'eau, carbone total, quantité de l'azote, phosphore[9,60], les protéines, carbohydrates [79-81], l'acide urique, les lipides, l'ATP [77], l'ARN et l'ADN [78,82,83], l'activité respiratoire, la masse de la biomasse, son épaisseur et les propriétés spectroscopiques [15].

Comme le décrit la littérature [15], le premier système de suivi avec des échantillons en dérivation ou en série est le Robbins Device où les coupons ont la forme de clous. Ses principaux inconvénients sont les temps de détection assez longs et une réalisation complexe. De plus, les petits échantillons entraînent une perte d'informations sur toute la surface. Cependant l'utilisation des systèmes en dérivation est plus flexible et interfère moins sur les installations. D'autre part, ce type de capteur peut aussi être utilisé dans le cadre du contrôle sous l'action de biocide.

Chang et *coll*. [84] ont appliqué une technique pour quantifier directement le biofilm développé sur différents matériaux de canalisation, grâce à un couplage avec une sonde spécifique à l'ADN. Cette sonde BO-PRO <sup>TM-3</sup> présente l'avantage de réduire les liaisons non spécifiques, c'est-à-dire avec des composants autre que l'ADN, ce qui arrive très fréquemment lors des réactions de marquage du biofilm [4].

#### I-6-2-6 Détection par des moyens électrochimiques :

La diversité des techniques de mesures électrochimiques a fait de ce domaine un vaste espace de développement des capteurs de biofilms. Ces détecteurs électrochimiques ont, pour la plupart, un point commun qui est l'étude de la corrosion bactérienne et comme avantage l'accès à l'épaisseur du biofilm. Certains auteurs estiment que ce type de capteurs est le plus adapté et le plus sensible notamment pour l'étude des premières étapes de formation du biofilm par rapport à d'autres capteurs classiquement utilisés [9].

En se basant sur le principe de fonctionnement de ces capteurs, on peut distinguer trois catégories de capteurs qui sont basés sur :

- la réduction cathodique de l'oxygène à l'interface biofilm/solution.
- la mesure du courant de polarisation.
- la réduction d'un traceur électrochimique et l'analyse du transport de matière à travers une couche poreuse pour y'accéder directement à l'épaisseur du biofilm.

D'autres techniques basées également sur des mesures électrochimiques sont largement utilisées pour suivre la formation de biofilm. Il s'agit, à titre d'exemple, de mesurer la variation du potentiel libre de corrosion d'une électrode métallique qui permet de suivre les étapes de colonisation de la surface par les bactéries. L'inconvénient de cette technique est la difficulté à interpréter les données dans le cas de la présence de la corrosion microbienne [11, 45, 85].

#### I-6-2-1-a Réduction de l'oxygène à l'interface biofilm/solution :

Le processus de la réduction de l'oxygène au sein de l'interface biofilm/solution a fait l'objet de nombreux travaux de recherches, surtout dans les milieux marins [6, 45, 8 1, 85-86], car il constitue le moteur de la corrosion microbienne. Tout matériau immergé dans un milieu contenant des bactéries voit sa surface recouverte d'un biofilm, qui engendre l'augmentation de la vitesse de réduction de l'oxygène dissous selon la réaction suivante :

$$O_2 + 2H_2O + 4\acute{e} \rightarrow 4OH^-$$
 (Eq.I.3)

La présence d'un biofilm à la surface d'un métal conduit naturellement à l'augmentation de son potentiel libre de corrosion [86]. Le biofilm peut alors influencer la valeur du courant obtenue par son épaisseur et sa capacité à permettre la diffusion de l'oxygène [9]. La mesure du courant galvanique entre l'acier et un alliage de cuivre durant les premières semaines d'exposition, augmente rapidement traduisant la croissance d'un biofilm à la surface de l'acier inoxydable, ensuite à des temps plus longs, le courant diminue, conséquence de l'épaississement du biofilm. Tous ces travaux ont donné lieu à la conception d'un capteur : *BIOX* montré sur la figure I.3, qui enregistre la valeur du courant de couplage galvanique entre un acier inoxydable et un alliage de cuivre qui est associé à la phase de croissance du biofilm [87].



Figure I.3: Photo de la sonde BIOX [87]

Bressel et coll. [9] ont utilisé des microélectrodes en platine pour suivre l'évolution du potentiel électrique à la surface de ces électrodes en fonction du temps d'immersion et donc de l'âge du biofilm. Ainsi le potentiel enregistré augmente en fonction du temps jusqu'à une valeur correspondante à un biofilm mature, cela a été confirmée par les observations au microscope confocale à balayage.

#### I-6-2-1-b Mesure du courant de polarisation :

Un capteur de suivi du biofilm dénommé *BIoGEORGE* <sup>TM</sup> élaboré par G. Licina et *coll*. a été utilisé pour le suivi en ligne dans le but d'optimiser les traitements biocides. Ce capteur est constitué de deux électrodes identiques montées sur un corps en acier inoxydable et d'un système de contrôle et d'acquisition de données (Figure I.4). Les électrodes sont polarisées quotidiennement et la réponse en courant et en potentiel sont suivis. Ainsi, la croissance des biofilms peut être détectée par le suivi du courant qui évolue pendant le cycle de polarisation [9, 88].

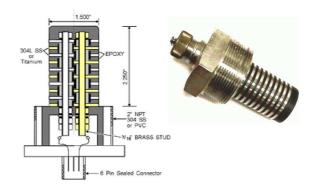


Figure I.4: Photo et schéma de la sonde BIoGEORGE TM [9]

Très récemment, Vieira et *coll*. [89] ont utilisé la technique électrochimique de voltamétrie cyclique sur des électrodes de platine. Les auteurs ont pu détecter très tôt la formation de biofilm de *Pseudomonas fluorescens* à la surface des électrodes de platine par interprétation de l'évolution des voltamogrammes en fonction du temps d'immersion des électrodes. Il s'agit donc, d'après les auteurs, d'un procédé de caractérisation *in situ* sensible, simple et rapide d'interprétation mais encore en cours de validation.

En conclusion, même si les capteurs basés sur une mesure du couplage galvanique répondent à certains critères comme la simplicité d'utilisation, d'interprétation et la solidité, ils semblent relativement discutables d'un point de vue sensibilité, précision et fiabilité dans l'interprétation des résultats [15].

#### I-6-2-1-c Transport de matière à travers une couche poreuse :

L'analyse du transport de matière à travers une couche poreuse dans le but de déterminer l'épaisseur d'un biofilm implique un contrôle et une maitrise des conditions hydrodynamiques. C'est la raison pour laquelle un système fixe avec une surface uniformément accessible a été proposé, à savoir, un dispositif à jet immergé. Ce dispositif est utilisé depuis une vingtaine d'années, pour diverses applications industrielles en électrochimie comme le polissage électrochimique, la corrosion/érosion ou l'électrodéposition de microdépôts localisés [9].

C'est sur ce principe que la détection du biofilm par la « cellule à jet noyé » fut développée par Herbert-Guillou et *coll*. brevetée conjointement par le laboratoire LISE (CNRS/UPR 15), l'IFREMER et la CIRSEE-Lyonnaise des Eaux [15].

Ce capteur, composé de trois électrodes (électrode de travail fixe, électrode de référence et une contre électrode), permet la mesure ampérométrique du flux de matière d'une espèce électroactive, l'oxygène dissous ou d'un indicateur électrochimique spécifique, au niveau de la surface de l'électrode, donc à l'interface métal/biofilm. Le courant mesuré est alors directement lié au biofilm formé au cours du temps, car en se développant sur la surface de l'électrode, la biomasse et l'augmentation de son épaisseur va provoquer la diminution du flux de matière [90].

Cette méthode fut validée par la suite par visualisation directe de la surface de l'électrode grâce à un montage expérimental qui a permis, après traitement des images, d'acquérir des informations comme le taux de recouvrement, le nombre d'objets et l'épaisseur ; donc de corréler ces données avec les mesures du capteur [91].

Ce capteur répond à d'importants critères à savoir simplicité d'utilisation, facilité d'interprétation et solidité car pouvant supporter de hautes pressions d'après les auteurs. De plus, il est sensible et précis car des biofilms de quelques micromètres seulement ont pu être détectés.

Actuellement, la «cellule à jet noyé» n'a été appliquée industriellement que très ponctuellement au sein de l'IFREMER (ou du CIRSEE-Lyonnaise des Eaux) avec, pour seul milieu d'étude, l'eau de mer.

En électrochimie, d'autres dispositifs de mesures électrochimiques basés sur le transport de matière sont connus et utilisés, comme le système d'électrodes à disque tournant. Ce système est bien connu depuis les travaux de Levich (1962) qui a mis en évidence des relations entre le courant de diffusion et la vitesse de rotation appliquée et qui a trouvé de nombreuses applications dans le domaine de l'analyse électrochimique (études des mécanismes réactionnels, détection et identification des espèces en solution,...).

Ce moyen n'a été développé que très récemment à travers les travaux de Forêt et *coll* [9, 10]. Un prototype de capteur industriel basé sur cette méthode a été testé sur site et validé. Nous tenterons dans le cadre de cette étude,

Par ailleurs, les impédances électrochimiques sont utilisées pour suivre l'évolution des biofilms et voir même, étudier leurs conséquences. Plusieurs travaux de recherches sont menés dans ce contexte. Castaneda et *al* [58] ont étudié l'influence des milieux biologiques sur la corrosion de l'acier en utilisant les impédances électrochimiques. Les diagrammes enregistrés à différents temps montrent que le matériau présente un comportement différent

entre un milieu stérile et un milieu riche en bactéries. En milieu stérile une série de capacités en hautes fréquences sont observées, caractéristique d'une couche poreuse du produit de corrosion. Tandis qu'en milieu biologique et en hautes fréquences, ce comportement n'est pas observé. L'adsorption des produits de corrosion dans la matrice du biofilm, non pas sur la surface du matériau est à l'origine de ce phénomène.

La corrosion engendrée par les SBR constituant le biofilm formé sur un alliage en cuivre-zinc est étudiée par Jing et *al* [52]. Pour cela, la microscopie d'impédances électrochimiques est utilisée pour caractériser la surface des échantillons d'alliages dans un milieu biologique artificiel. Sur les diagrammes Nyquist, en comparant les boucles enregistrées après 1h en milieu stérile et 3 jours en milieu synthétique riche en SBR, on constate une augmentation de la boucle en hautes fréquences, signifiant la formation d'une couche protective, probablement un biofilm. Alors qu'à 14 jours d'immersion et toujours en milieu riche en SBR la boucle en hautes fréquences diminue. Cette diminution est relative à la dégradation de la surface de l'échantillon étudié par la présence des bactéries à l'interface métal/biofilm. A noter que d'autres travaux de recherches on exploités les impédances électrochimiques en vue de caractériser l'interface métal/biofilm sur l'acier dans un milieu marin [54].

## Chapitre II

## Conditions et méthodes expérimentales

Ce chapitre est un exposé succinct des conditions expérimentales et de l'ensemble des techniques d'investigation employées dans le cadre de cette étude. Il apporte l'essentiel des renseignements indispensables à la compréhension de la démarche suivie. Des ouvrages spécialisés, relatifs aux techniques utilisées sont données dans les références bibliographiques pour des détails éventuels.

#### II-1 Techniques de caractérisation microbiologiques :

Les techniques de caractérisation microbiologiques sont nombreuses et nécessitent une grande précision mais également une stérilité totale du matériel utilisé.

Les tests microbiologiques réalisés dans ce travail concernent essentiellement le dénombrement bactérien et l'observation au microscope optique. Il est important de signaler que lors du dénombrement seules les bactéries vivantes sont considérées, on ne tient pas compte des bactéries mortes ou stressées.

#### II-1-1 Dénombrement bactérien :

#### II-1-1 Techniques d'ensemencement et isolement des bactéries [92]:

L'obtention des cultures pures s'effectue en isolant les bactéries les unes des autres, soit par l'ensemencement avec des anses (en surface) ou en masse, dans un milieu nutritif approprié.

Ces techniques permettent d'obtenir des bactéries séparées, ou plus souvent de petits agrégats de bactéries (Unité Formant Colonie ou UFC) qui vont se développer sur un milieu gélosé, en donnant une seule colonie qui correspond souvent à un clone car elle est issue d'une même cellule mère. Les différents types de bactéries sont à l'origine de colonies que l'on peut différencier par leur aspect : forme, taille, bord et surface. En pratique, le protocole expérimental recommandé est décrit selon les étapes suivantes :

- ✓ Dans le cas de l'ensemencement avec une anse (en surface) :
  - Déboucher le flacon de l'échantillon (eau du robinet ou biofilm décroché) à analyser dans la zone stérile du bec Bunsen.

- Prélever l'échantillon du flacon, à l'aide de l'anse stérile.
- Ouvrir la boite de Pétri du côté de la flamme et étaler la prise d'échantillon sur la boite de pétri contenant de la gélose.
- Fermer la boite pour pouvoir la tourner pour l'ensemencement et après inscription des références, incuber la boite de Pétri couvercle en bas (pour éviter que l'eau de condensation ne tombe pas sur la gélose).
- ✓ L'ensemencement en masse obéit presque aux mêmes étapes énumérées ci-dessus, sauf que la gélose et l'échantillon à analyser (1 ml) sont mélangés au préalable dans un tube avant d'être versé dans la boite de Pétri.

#### II-1-1-2 Gélose de base Columbia [92]:

Milieu hautement nutritif pour la culture des germes. Sa composition est la suivante : Peptone (hydrolysat pepsique de viande) : 23 g/l ; Amidon : 1 g/l ; Chlorure de sodium : 5 g/l ; Agar : 10 g/l ; pH :  $7.3 \pm 0.2$ .

#### II-1-1-3 Dénombrement des bactéries aérobies et anaérobies [6] :

En milieu solide et liquide, le dénombrement s'effectue sur des bactéries adaptées au milieu proposé en unité formant des colonies par unité de surface. La majeure partie de ces bactéries étant viables mais non cultivables au laboratoire et ne représentent qu'un faible pourcentage (1 %) de la population totale. Le dénombrement ce fait par comptage des colonies après 48 heurs d'ensemencement dans un milieu nutritif (gélose) à 37 °C.

#### II-1-2 Coloration de Gram [92,93]:

Certaines colorations permettent d'observer plus facilement les détails morphologiques des bactéries qui ont un caractère incontournable pour l'identification : tel est le cas du Gram qui reste la base différentielle de la bactériologie, en distinguant les deux grands groupes de germes Gram + et Gram -.

La coloration de Gram est basée sur la différence de perméabilité des bactéries à l'alcool, donc sur leur capacité à retenir dans leur cytoplasme et leur paroi un colorant primaire. Cette différence de perméabilité est liée à une différence de structure pariétale des deux grands groupes Gram + et Gram -, et se trouve corrélée avec de nombreux autres caractères.

Dans le cas des bactéries Gram +, la membrane cytoplasmique est recouverte d'une zone épaisse de peptidoglycanes. Ces dernières enveloppent la cellule dans une coque relativement rigide et épaisse (20 à 80 nm). En revanche, dans l'autre type de bactéries, Gram -, la couche

de peptidoglycanes est de faible épaisseur (1 à 3 nm). Elle est recouverte d'une deuxième membrane phospholipidique avec laquelle elle est liée par des ponts covalents. Ces bactéries ont donc deux membranes : membrane interne nommée membrane cytoplasmiques et une membrane externe d'une composition spéciale renfermant des constituants caractéristiques [94]. Le protocole expérimental de la coloration de Gram est décrit en **annexe 1**.

#### II-1-3 Observation au microscope optique :

Les observations au microscope optique se font directement sur des lames de verre contenant les bactéries fixées par la coloration de Gram. Cette technique donne, en première approximation, le type de bactéries formant l'échantillon analysé (eau d'alimentation ou un biofilm décroché).

#### II-2 Caractérisation physico-chimique de l'eau d'alimentation [95,96] :

Les paramètres physico-chimiques, tels que le pH, la conductivité, la dureté, l'alcalinité, la teneur en chlore et en oxygène dissous, sont déterminés afin de caractériser l'eau, dont laquelle nos échantillons ont été immergés.

Le pH, la conductivité ainsi que la teneur en oxygène dissous sont mesurés par un appareil à multifonctions de marque *inoLab Multi Level 1*. Quant à la détermination des autres paramètres, les modes opératoires suivis sont décrits dans l'annexe 2.

#### II-3 Formation des biofilms :

La formation des biofilms sur les échantillons métalliques sur lesquelles notre étude est axée a nécessité la mise en place au niveau du laboratoire LTMGP d'un montage expérimental simulant les conditions d'une canalisation de distribution d'eau potable. En effet, en raison des coupures fréquentes en eau courante à l'Université de Béjaia, nous avons été amené à alimenter des fûts par de l'eau potable (Figure II.1).

Le montage comporte essentiellement un bécher en verre de 6.5 cm de diamètre et de 12 cm de longueur assurant une circulation continue d'eau potable à débit de 42 ml/mn. Des échantillons constitués d'électrodes à disque tournant en or et en platine de diamètre 4,5 mm et 2 mm respectivement montés sur des embouts isolants en téflon (modèle Radiometer-Tacussel) ont été immergés dans ce bécher pour que leurs surfaces soient colonisées par le biofilm après un temps d'immersion suffisant. Il est à noter que le bécher a été maintenu à température ambiante ou placé dans une enceinte thermostatée à 37 °C afin d'accélérer le processus de colonisation.

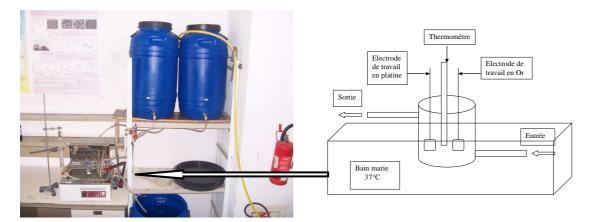


Figure II.1 : Schéma du montage expérimental utilisé pour l'étape de colonisation du biofilm sur les électrodes métalliques

# II-4 Méthodes expérimentales

Pour mener à bien notre travail, plusieurs techniques électrochimiques ont été utilisées. Des techniques dites globales : la voltamétrie pour la détermination du potentiel à imposer ainsi que pour l'activation des microélectrodes, la chronoamperometrie pour l'estimation des courants limites et l'impédance électrochimique pour la détermination de la capacité haute fréquence. La méthode électrochimique basée sur le transport de matière et préconisée pour la caractérisation des biofilms est développée, dans cette partie. Une technique plus récente basée sur des mesures locales a été également exploitée. Il s'agit de la technique d'électrode de référence à balayage (SRET). Le principe de chacune de ces méthodes est développé cidessous.

## II-4-1 Modèle physique : Principe de la méthode d'estimation de l'épaisseur du biofilm

L'épaisseur du biofilm est mesurée à l'aide de la technique de l'électrode à disque tournant. Une couche poreuse d'épaisseur  $\delta_f$  recouvrant la surface d'une électrode métallique agit comme une barrière de diffusion [10]. L'interface métal/couche est supposée uniformément réactive. Le gradient de concentration de l'espèce électroactive est distribué entre :

- la solution, où le transport de matière est contrôlé par un processus de diffusion convective. Le flux suit alors l'équation de Nernst-Plank :

$$J = -D\nabla c + c\upsilon \tag{Eq.II.1}$$

- la couche poreuse, où le transport de matière est contrôlé par un processus de diffusion moléculaire. L'expression du flux revient à :

$$J = -D\nabla c (Eq.II.2)$$

Dans cette étude, l'électrolyte support est supposé en excès et ainsi le flux de migration pourra être systématiquement négligé (Figure II.2).

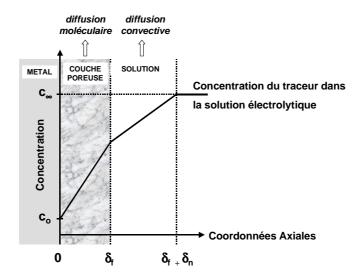


Figure II.2 : Profil de concentration des espèces électroactives consommées à la surface d'une électrode recouverte d'une couche poreuse

Pour une électrode à disque tournant, la surface est uniformément accessible et en absence de couche poreuse, V. G. Levich a calculé le courant limite de diffusion sur cette électrode tournante. Pour  $C_0=0$ , Ce courant s'écrit [97] :

$$I_L = 0.62 nFSC_{\infty} D^{2/3} v^{-1/6} (2\pi/60)^{1/2} \Omega^{1/2} = K\Omega^{1/2}$$
 (Eq.II.3)

avec n le nombre d'électrons échangés ; F la constante de Faraday,  $C_{\infty}$  la concentration du traceur électrochimique au sein de la solution; S la surface de l'électrode ; D le coefficient de diffusion des espèces électroactives dans la solution, v la viscosité cinématique de la solution et  $\Omega$  la vitesse de rotation de l'électrode.

En présence d'une couche poreuse, le système, décrit par les équations (Eq.II.1) et (Eq.II.2), s'intègre analytiquement et l'expression du courant s'écrit :

$$i = \frac{1}{i_f^{-1} + i_L^{-1}}$$
 (Eq.II.4)

$$i_f^{-1} = \frac{\delta_f}{nFD_f SC_{\infty}}$$
 (Eq.II.5)

où  $D_f$  est le coefficient de diffusion des espèces électroactives dans la couche poreuse. et  $\delta_f$  l'épaisseur de la couche poreuse.

Généralement, et ainsi que cela a été démontré par E. L'Hostis [98], si la couche poreuse est considérée comme une couche solide d'épaisseur indépendante de la vitesse de rotation de l'électrode, alors l'analyse de l'équation (Eq.II.4) s'effectue d'après la représentation de Koutecky-Levich (Figure II.3)

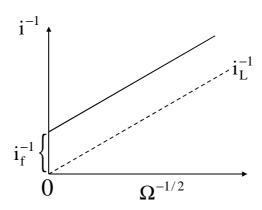


Figure II.3: Représentation de Koutecky-Levich

 $i_f^{-1}$ est déduit à partir de l'ordonnée à l'origine de la droite représentant la variation de  $i^{-1}$  en fonction de  $\Omega^{-1/2}$ . Cette droite est parallèle à celle qui représente la variation de  $i_L^{-1}$ . La mesure de  $i_f$  permet alors de remonter à  $\delta_f$ , l'épaisseur du biofilm.

Dans le cas particulier d'un biofilm, il a été montré que ce dernier se comporte comme une couche inerte d'eau stagnante sur la surface du matériau. En effet, l'eau constitue une grande part de la matrice du biofilm (98 à 99 %), le reste est constitué de macromolécules (protéines) très dense représentant presque 95 % du poids sec du biofilm. De ce fait, il a été supposé que le coefficient de diffusion dans le biofilm  $D_f$  est identique au coefficient de diffusion dans l'eau D [15, 29].

Dans ces conditions, pour des temps t plus longs,  $i_f^{-1} \neq 0$ , on considère que  $\delta_f$  est dépendante de la vitesse  $\Omega$  de rotation de l'électrode. A chaque vitesse de rotation,  $i_f$  est facilement déduit à partir de la mesure du courant global :

$$i_f^{-1} = i^{-1}_{(\Omega,t)} - i_{L(\Omega,t=0)}^{-1}$$
 (Eq.II.6)

Par conséquent, on peut extraire l'expression permettant de calculer directement l'épaisseur de biofilm présent sur la surface de l'électrode, soit:

$$\delta_f = nFD_f SC_{\infty} (i_{(\Omega,t)}^{-1} - i_{L(\Omega,t=0)}^{-1})$$
 (Eq.II.7)

# II-4-2 Méthodes électrochimiques

## II-4-2-1 Voltamétrie:

La voltampérométrie consiste à imposer à l'électrode de travail, un potentiel variant linéairement avec le temps à partir d'une valeur initiale et à enregistrer la réponse en courant. Les courbes de polarisation ainsi obtenues renseignent sur les processus électrochimiques mis en jeu entre l'électrolyte et le matériau. Cela permet de connaître l'influence du biofilm sur les processus cinétique et diffusionnel à l'interface de l'électrode et la gamme de potentiel correspondant au courant limite de diffusion peut alors être déterminée [15].

La tension E mesurée et enregistrée n'est pas la tension réelle de l'électrode de travail. En effet, elle contient, outre la tension V qui existe entre l'électrode de travail et l'électrolyte, un terme (*Re.I*) dû la chute ohmique provoquée par la résistance de l'électrolyte compris entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. La tension E s'écrit comme suit :

$$E = V + R_{e} I$$
 (Eq.II.8)

 $R_e$ : résistance de l'électrolyte (ohms) ; I : intensité de courant (A) ; V : tension réelle de l'électrode de travail (V).

La mesure de I est effectuée puis donnée en fonction de E par un balayage du potentiel en fonction du temps, suivant la relation linéaire suivante :

$$E = E_i + V_h.t (Eq.II.9)$$

 $E_i$ : potentiel initial;  $V_b$ : vitesse de balayage; t: temps.

Dans cette étude, la vitesse de balayage appliquée est de 10 mV.s<sup>-1</sup>.

Il est à noter que dans certains travaux de recherche, la voltamètrie a été utilisée pour évaluer directement les valeurs de courant limite sans passer par l'estimation du potentiel à imposer. En effet, en appliquant cette technique sur les échantillons colonisés à différent temps, l'extrapolation des courbes cathodiques permet d'atteindre les valeurs des courants limites et ainsi la détermination de l'épaisseur des biofilms en se référant à la méthode électrochimique décrite dans le paragraphe II.4.1 [15, 99].

# II-4-2-2 Chronoampèremètrie [10]:

Le courant qui traverse l'interface métal/électrolyte est enregistré en fonction du temps en imposant à l'électrode de travail un potentiel choisi à partir de la courbe de polarisation I=f(E): c'est le principe de la chronoampérométrie.

Cette méthode a été récemment recommandée dans certains travaux visant à caractériser les biofilms [10, 15, 50, 98]. Le signal étudié est le courant correspondant à une réaction électrochimique entièrement limitée par le transport de matière et produite à l'interface métal/biofilm. Plus précisément, il s'agit en fait d'analyser l'écart entre le courant mesuré (en présence de biofilm), et le courant de Levich (en absence de biofilm). Ainsi la technique expérimentale correspondante consiste à analyser la variation du courant avec la vitesse de rotation de l'électrode.

Pour suivre la formation du biofilm au cours du temps, cette procédure est appliquée aux différents temps d'immersions des électrodes correspondant à des âges différents de biofilms.

# II-4-2-3 Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE):

L'emploi des techniques non stationnaires permet de séparer les différentes réactions élémentaires dans la mesure où elles ont des constantes de temps suffisamment distinctes [100]. La SIE permet de suivre en continu, la cinétique de formation des dépôts, de caractériser leur compacité et d'évaluer leurs caractère adhèrent. L'impédance électrochimique est une technique qui repose sur la mesure d'une fonction de transfert entre la réponse en courant (potentiel) à une perturbation de faible amplitude du potentiel (ou courant) du système électrode/solution [100-102].

Le principe de l'impédance électrochimique est d'imposer à un potentiel constant de polarisation  $E_0$ , un potentiel sinusoïdal  $\Delta E$  (t) de faible amplitude et ensuite enregistrer la réponse en courant du système. Inversement,  $\Delta I$  (t) peut être superposé au courant  $I_0$  et le potentiel enregistré (Figure II.4).

Si la perturbation en potentiel est de la forme: 
$$E(t) = E_0 + \Delta E(t)$$
 (Eq.II.10)

Avec: 
$$\Delta E(t) = |\Delta E| \sin \omega$$
 (Eq.II.11)

et  $\omega$ : pulsation en rad/s.

Alors l'impédance électrochimique, grandeur complexe, est définie à chaque pulsation ω par :

$$Z(\omega) = \frac{\Delta E(\omega)}{\Delta I(\omega)} = \frac{|\Delta E| e^{j\omega t}}{|\Delta I| e^{j(\omega t - \phi)}} = |Z| e^{j\phi}$$
 (Eq.II.12)

où  $j^2 = -1$  et  $\Delta E(\omega)$  et  $\Delta I(\omega)$ , appelées amplitudes complexes, correspondantes aux transformées de Fourrier des grandeurs temporelles  $\Delta E(t)$  et  $\Delta I(t)$  respectivement; |Z| représente le module et  $\phi$  l'argument de l'impédance.

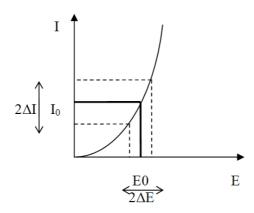


Figure II.4: Perturbation d'un système électrochimique non linéaire en un point de fonctionnement stationnaire  $P(E_0, I_0)$ 

Comme  $|\Delta I|$  dépend de  $\omega$ , |Z| est fonction de la fréquence appliquée.

 $Z(\omega)$  peut aussi être exprimée en terme de partie réelle et partie imaginaire, selon la relation suivante :

$$Z(\omega) = R_e Z(\omega) + j.lm.Z(\omega)$$
 (Eq.II.13)

 $R_{e}Z$  et lmZ ont pour unité Ohm  $(\Omega)$ .

L'impédance peut être représentée dans le plan complexe par un vecteur dont les coordonnées cartésiennes x et y sont respectivement  $R_eZ$  et lmZ. Cette représentation est appelée diagramme de Nyquist (Figure II.5).

Chaque point du diagramme correspond à une fréquence donnée du signal d'entrée.

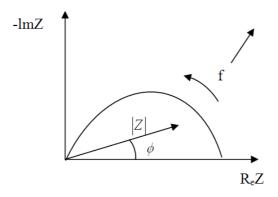


Figure II.5 : Diagramme de Nyquist.

L'impédance d'électrode est une fonction à la fois de la fréquence et du point de polarisation  $P(I_0,E_0)$  (Figure II.4). La limite haute fréquence du diagramme fournit la valeur de la

résistance d'électrolyte  $R_e$ . Quant à la limite basse fréquence, elle équivaut à  $(R_e + R_p)$ ,  $R_p$  porte le nom de résistance de polarisation, définit comme l'inverse de la pente en P de la courbe courant potentiel stationnaire corrigée de la chute ohmique ainsi :

$$R_p = \frac{dE}{dI}\Big|_{(E_0, I_0)}$$
 (Eq.II.14)

Entre ces deux limites, la dépendance en fréquence de Z, c'est-à-dire son comportement non résistif, provient de :

- La contribution capacitive de la double couche électrochimique, illustrant une modification de la répartition des charges électrique à l'interface (déficit ou excès d'électrons du côté de l'électrode et excès ou défaut de charges ioniques du côté de l'électrolyte).
- La contribution faradique liée au courant électrique et la réaction électrochimique (transfert d'électrons à travers l'interface).

En termes d'impédance, la charge de la double couche est représentée par une capacité  $C_d$  (quelques dizaines de  $\mu F/cm^2$ ). Quant au processus faradique, il est décrit par une impédance  $Z_F$ , dite impédance faradique.

Si les effets capacitifs et faradiques sont supposés additionnés, alors l'interface métal/électrolyte est représentée par le circuit électronique général de la Figure II.6 appelé circuit de Randles.

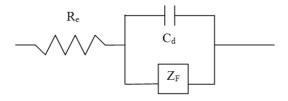


Figure II.6 : Circuit de Randles

Dans ce cas, l'impédance d'électrode se calcule à l'aide de la relation suivante :

$$Z(\omega) = R_e + \frac{Z_f(\omega)}{1 + j\omega C_d Z_F(\omega)}$$
 (Eq.II.15)

L'impédance faradique  $Z_F$  est une combinaison de plusieurs impédances. Elle comprend toujours un terme résistif appelé le transfert de charge  $R_t$  et, selon les mécanismes, des

impédances de concentrations d'espèces éléctroactives en solution (impédance de diffusion convection) et/ou en phase adsorbée.

La figure II.7 montre un diagramme de Nyquist correspond à une cinétique mixte d'activation-diffusion. Il se compose d'un demi-cercle qui correspond au transfert de charge, suivi d'une droite Warburg, dont la pente est de 45°, associé à l'impédance de diffusion.

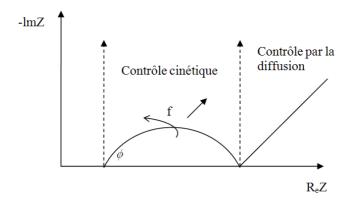


Figure II.7 : Représentation de l'impédance électrochimique correspondant a une cinétique mixte d'activation-diffusion.

# II-4-3 Conditions expérimentales

# II-4-3-1 Cellule électrochimique :

Après colonisation, les échantillons sont rincés à l'eau distillée et transférés sur un autre montage comportant une cellule électrochimique classique à trois électrodes et un potentiostat/galvanostat de marque Autolab PGSTAT30 (Eco Chemie) (voir Figure II.8). L'ordinateur contrôle les mesures par deux logiciels GPES et FRA. Les mesures sont maintenues en température ambiante et en milieu aéré.

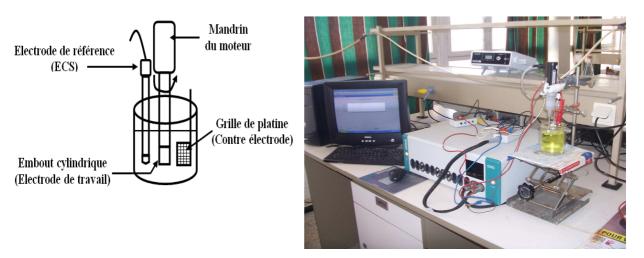


Figure II.8 : Schéma du montage expérimental utilisé pour les mesures électrochimique

#### II-4-3-2 Electrodes:

## II-4-3-2-1 Electrode auxiliaire (contre électrode) :

L'électrode auxiliaire utilisée est une grille en platine. Son rôle est d'assurer le passage du courant électrique dans le montage à trois électrodes, de minimiser l'effet de polarisation et localiser la chute ohmique au voisinage de l'électrode de travail.

#### II-4-3-2-2 Electrode de référence :

C'est une électrode impolarisable dont le potentiel est rigoureusement constant et reproductible, le potentiel de référence est au Calomel Saturé (ECS). La correspondance du potentiel de cette électrode à celui de l'électrode normale à hydrogène (ENH) est donnée par la relation suivante :

$$E/ECS = E/ENH - 0.244 \text{ Volt}$$
 (Eq. II.16)

L'électrode de référence est placée le plus près possible de l'électrode de travail afin de limiter les erreurs de mesures dues à la chute ohmique induite par l'électrolyte.

# II-4-3-2-3 Electrode à disque tournant (électrode de travail) :

Pour chaque mesure, l'échantillon prélevé du montage de colonisation est adapté sur le support à disque tournant, constituant ainsi l'électrode de travail. La surface mise en contact avec la solution de travail est un disque en patine ou en or de surface 0.03 et 0.16 cm² respectivement. Les électrodes elles-mêmes sont sous forme cylindrique enrobées par une résine, dont les embouts sont reliés à des tiges en fer pour permettre la conduction d'électricité. Ces électrodes sont reliées à un système qui assure une agitation constante et homogène au voisinage de l'électrode. Le dispositif tournant est de marque TACUSSEL, type

CV101 (CTV101) dont la vitesse de rotation est comprise entre 0 et 5000 tr/min. L'utilisation d'un tel système offre en outre la possibilité d'étudier le comportement des électrodes dans les conditions d'agitation variables mais bien définies.

## II-4-3-2-4 Polissage mécanique des électrodes de travail :

Le polissage du métal est une étape très importante qui peut être responsable de l'irreproductibilité entre plusieurs mesures. Le choix de la méthode de polissage est déterminé par la dureté du métal à polir.

Avant immersion, les électrodes de platine et d'or sont polies au papier abrasif de carbure de silicium de grains 1200 et 2400, rincées avec l'éthanol puis l'eau distillée. Le traitement de surface est effectué à l'aide d'une polisseuse de type METASERV 2000.

# II-4-3-3 Solutions électrolytiques :

La réaction mise en jeu par le couple rédox  $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$  est généralement employée pour l'étude du transport de matière car elle est extrêmement rapide. Ainsi, une concentration de 10 mM en présence de l'électrolyte support, chlorure de potassium (KCl), à 0.5 M a été utilisée. Il est important de remarquer qu'une étude précédente [98] a permis de vérifier le caractère non bactéricide de ce traceur électrochimique. Par ailleurs, les mesures d'impédance électrochimique ont été réalisées en milieu KCl, 0,1 M.

## II-4-4 Technique de mesures locales:

Jusqu'aux années 1980, une expérience électrochimique classique impliquait l'application d'une perturbation en terme de courant ou de potentiel à une électrode métallique de taille millimétrique. L'apparition des microélectrodes (ME) à la fin des années 1970, alliée à la résolution spatiale de la microscopie à effet tunnel (STM) «Scanning Tunneling Microscopy», ont conduit au développement de nouvelles techniques de microscopie à sondes locales basées sur le déplacement de microélectrodes au voisinage d'une interface, telles que la technique d'électrode de référence à balayage (SRET) «Scanning Reference Electrode Technique», la technique de l'électrode vibrante à balayage (SVET) «Scanning Vibrating Electrode Technique» et la microscopie électrochimique à balayage (SECM) «Scanning ElectroChemical Microscopy» [103, 104].

Ces techniques de mesures locales ont rapidement connues un essor considérable et constituent désormais de nouveaux concepts de l'analyse électrochimique. En effet, la plupart des techniques de mesures électrochimiques telles par la voltamétrie cyclique, la

chronoampérométrie et la chronopotentiométrie, peuvent être réalisées à l'aide d'un dispositif SECM/SRET. A noter que sur le plan expérimental les deux techniques peuvent être réalisées sur le même dispositif (cela à été le cas dans cette présente étude). De plus, la résolution spatiale permet d'augmenter fortement les capacités des techniques électrochimiques pour la caractérisation d'interfaces ou la mesure de cinétiques par exemple [103].

Nous rappelons que dans le cadre de cette étude, les mesures locales effectuées et présentées dans ce mémoire concernent uniquement la technique d'électrode de référence à balayage (SRET), grâce à l'utilisation du montage expérimental dont dispose l'UPR 15 du CNRS.

Pour bien comprendre le mode de fonctionnement de cette technique de pointe, il est nécessaire de connaître les propriétés des microélectrodes. La présentation générale des différents types et des principales caractéristiques de ces dernières est donnée ci-dessous. L'accent est par la suite mis plus spécialement sur les microélectrodes disque plan, qui sont les plus largement utilisées dans les mesures locales.

#### II-4-4-1 Les microélectrodes :

Les microélectrodes encore appelées ultra-microélectrodes ont été largement étudiées et décrites dans la littérature [102, 103]. Elles représentent l'élément central de la transduction d'un mécanisme interfacial ou de la modification localisée d'une interface et a donc un rôle essentiel dans les mesures locales.

# II-4-4-1-1 Les différents types de microélectrodes :

On appelle microélectrode (ME) une électrode dont une des dimensions au moins est micrométrique [104]. Les microélectrodes peuvent être différenciées par leur géométrie et, selon Forster [105], on peut en définir cinq principaux types qui sont illustrés sur la figure II.9. La plus utilisée est le micro disque, viennent ensuite les cylindres et les réseaux, puis en forme de bande et anneau, et enfin, les formes en sphères ou hémisphères [103, 106].

Dans le premier cas, la très grande majorité des études ont impliqué des microélectrodes disque plan. Il existe cependant quelques exemples de géométries originales, comme les électrodes utilisées pour le couplage SECM-AFM [107]. Dans le cas de sondes potentiométriques, en plus des électrodes disque plan classiques qui peuvent être modifiées par la suite pour former une microélectrode sélective [108], certaines études ont été réalisées avec des micropipettes [109].

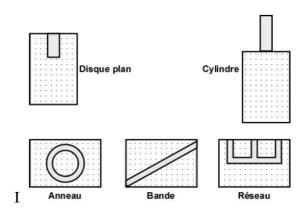


Figure II.9: Schémas des géométries de microélectrodes les plus utilisées [104].

# II-4-4-1-2 Propriétés des microélectrodes :

Les dimensions des microélectrodes, qui sont de l'ordre de quelques micromètres, permettent l'établissement d'un régime stationnaire de diffusion hémisphérique (Figure II.10). L'épaisseur de cette couche de diffusion dépend uniquement de la géométrie de l'électrode [104, 106].

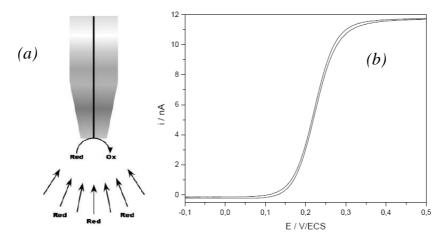


Figure II.10: Représentation de la diffusion hémisphérique de l'espèce électroactive sur une microélectrode ( $a=5~\mu m$ ) en solution (a) et son voltamogramme à  $v=10~mV~s^{-1}$  dans une solution de  $K_4Fe(CN)_6~10~mM+KCl~0,5~M~(b)~[106]$ .

En présence d'un couple redox, la réponse d'une ME à un échelon de potentiel est caractérisée par l'établissement d'un courant stationnaire,  $I_{\infty}$ , limité par la diffusion.  $I_{\infty}$  est proportionnel au rayon a de l'électrode, selon la relation obtenue par intégration de la loi de

Fick [110]: 
$$I_{\infty} = 4nFDC_{\infty} a \qquad (Eq.I.17)$$

où n est le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday, D le coefficient de diffusion,  $C_{\infty}$  la concentration dans la solution de l'espèce électroactive consommée et a le rayon de la microélectrode.

Les microélectrodes ont permis la progression dans plusieurs domaines de recherches. Ainsi, la dépendance directe du courant stationnaire au rayon de la microélectrode, à la constante de diffusion et à la concentration de l'espèce active, est exploitée dans l'électrochimie analytique [103, 104]. Du fait de la faible chute ohmique des microélectrodes, il est possible de faire des études dans des milieux très résistifs, qui sont des milieux faiblement concentrés [104]. Les dimensions des microélectrodes permettent, par ailleurs, d'exploiter les systèmes biologiques et faire des analyses *in vivo* [111, 112]. On notera aussi que la faible constante de temps des microélectrodes permet d'accéder à des cinétiques rapides en utilisant la voltampérométrie cyclique avec des vitesses de balayage élevées [104].

# II-4-4-1-3 Fabrication des microélectrodes disque plan:

La fabrication des microélectrodes et leur optimisation ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche [103, 104, 113-115]. Le schéma d'une microélectrode est représenté sur la figure II.11. Nous décrivons, dans ce qui suit, les étapes de confection des microélectrodes réalisées au laboratoire : le matériau d'électrode, un fil (en argent dans notre cas) de quelques micromètres de diamètre (80 µm), est soudé avec un fil de cuivre étamé, puis recouvert par une couche cataphorétique. Le fil d'argent est ensuite inséré dans un capillaire, le tout est rigidifié par l'ajout d'une résine à l'intérieur de ce capillaire. La microélectrode est ensuite polie avec du papier abrasif jusqu'au grade 2400. On réalise ensuite une électrodéposition d'AgCl par voltamérie cyclique pour rendre la pointe plus conductrice [104]. Il est important de signaler que quelle que soit la technique utilisée pour fabriquer ces ME, celles-ci sont systématiquement testées en électrochimie avec un couple redox connu (par exemple : solution de ferri / ferrocyannure de potassium).

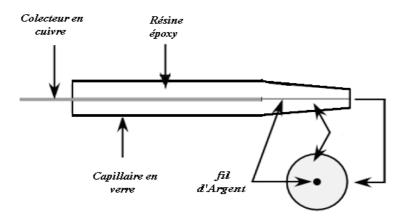


Figure II.11: Schéma d'une microélectrode disque plan

En résumé, la fabrication des ME est une étape délicate et nécessite une certaine précision de l'opérateur pour les réussir. Par conséquent, les deux points clés suivant doivent être respectés [104]:

- Le scellement du micro fil dans le capillaire. Suivant la température de fusion on peut faire fondre le verre sur le matériau (sans déformer le micro fil métallique) ou le sceller à l'aide d'une résine (après une isolation latérale du fil).
- La jonction entre le fil de la microélectrode et le collecteur (fil de cuivre étamé) par une soudure à l'étain, contact par mercure, laque d'argent ou vernis conducteur.

# II-4-4-2 Technique d'électrode de référence à balayage (SRET) :

## II-4-4-2-1 Généralités et principe :

Depuis le développement des microélectrodes, on enregistre de plus en plus de références bibliographiques qui font appel aux techniques de mesures locales. Le positionnement précis des microélectrodes à proximité d'une interface permet l'étude d'interfaces que seul ce type de mesure autorise. Des avancées considérables dans de nombreux domaines de recherche sont par conséquent constatées grâce aux nouvelles informations apportées par les résultats de ces mesures. C'est le cas, de la SRET notamment pour étudier *in situ* divers cas de corrosion (corrosion localisée, la corrosion par piqure : de l'initiation à son développement, l'inhibition de la corrosion et l'érosion des couches de produits de corrosion) [116, 120-124].

Köster et *coll* [125] l'ont également utilisée pour vérifier la conductivité de microélectrodes.

Un exemple d'utilisation de cette technique pour l'étude de la corrosion localisée a été décrit par Cui et *coll*. [116]. Ils ont visualisé les sites anodiques et cathodiques sur un acier au carbone subissant une corrosion par piqûre en présence d'ions halogénures. Cette étude a permis de montrer que la SRET est très sensible aux faibles changements des valeurs de potentiels. Les images récoltées traduisent de manière précise l'apparition des piqûres.

Zin et *coll*. [113] ont également utilisé cette technique pour étudier la corrosion de l'acier galvanisé par une couche d'époxy en milieu légèrement acide et son inhibition par l'ajout d'un pigment d'époxy chromé. Les résultats obtenus ont montré que les sites locaux anodiques et cathodiques sont bien distincts et non fixes sur l'acier contenant des défauts de surface.

La technique d'électrode de référence à balayage est une méthode qui permet d'avoir les variations de potentiel à l'échelle microscopique sur une surface d'un matériau, sans recours à la modification des processus chimiques qui se déroulent à sa surface. Cette technique de

mesure de faibles valeurs de potentiels relie la surface active du matériau à l'électrolyte existant à son voisinage [116, 117]

Il est important de préciser que la SRET mesure la distribution du potentiel, au voisinage d'une surface électrochimiquement active, engendrée par un flux de courant local (le courant global est nul), qui peut traduire une corrosion localisée ou corrosion galvanique [118].

La distribution des lignes de potentiels et de courant locaux à la surface d'un matériau électrochimiquement actif est schématisée sur la figure II.12 ; les lignes équipotentielles étant perpendiculaires aux lignes de courant [119].

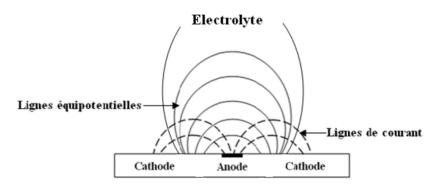


Figure II.12: Principe de mesure des gradients de potentiels locaux avec une ME [119].

La technique sert à quantifier les distributions de potentiel au voisinage de la surface d'un échantillon. Il existe plusieurs modes pour effectuer ces mesures. La différence de potentiel peut être mesurée en déplaçant la sonde à proximité du substrat entre une microélectrode simple et une électrode de référence en solution, une microélectrode simple et le substrat ou bien entre les deux fils composant une bi-microélectrode [104].

## II-4-4-2-2 Dispositif expérimental :

Le dispositif expérimental utilisé est présenté schématiquement dans la figure II.13. Il est constitué de deux parties principales, une première pour le positionnement de la sonde et une seconde pour la régulation et la mesure des potentiels. Elles sont toutes les deux contrôlées par un ordinateur à l'aide d'un programme unique. Le système de positionnement permet de déplacer la sonde dans les trois directions de l'espace avec une résolution dépendante du matériel (c'est-à-dire système de motorisation, platine et contrôleur). Les valeurs de la différence de potentiel entre la microélectrode mobile et l'électrode de travail fixe sont collectées par un multimètre relié à l'ordinateur. L'appareillage présenté ici, bien que suffisant pour réaliser des mesures, est souvent complété par d'autres éléments (caméra, table

anti-vibration, cage de Faraday,...) afin d'optimiser la précision et la résolution des mesures [104].

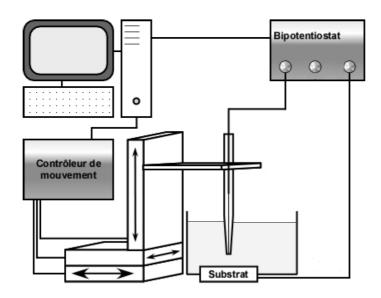


Figure II.13: Schéma de principe de la SRET [118]

Expérimentalement, une fois la ME positionner à une distance  $\Delta h$  fixe par rapport au substrat, comme le montre la Figure II.13, la sonde est déplacée selon l'axe x à une vitesse Vx = 50  $\mu \text{m.s}^{-1}$  pour différentes valeurs de y espacées régulièrement d'un pas  $\Delta y = 5$   $\mu \text{m}$ . Le balayage de l'axe x s'effectue dans les deux sens (Figure II.14)

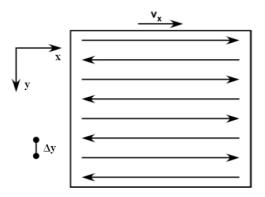


Figure II.14: Direction du balayage de la microélectrode dans le dispositif de la SRET [104]

Après enregistrement, les données sont exploitées par un logiciel de calcul, *Origin 7*, qui permet de tracer les cartographies en trois dimensions (3D), dont les cordonnées sont l'axe x et y représentent la surface balayée, et l'axe z la différence de potentiel enregistrée.

A noter que les valeurs du potentiel ont été corrigées, dans la dimension  $y\hat{O}z$ , pour cause de l'influence du bruit sur la mesure, qui se traduit par une dérive de potentiel dans les cartographies [125].

# II-4-4-2-3 Conditions expérimentales

Les mesures par la SRET nécessitent l'utilisation de microélectrodes actives et fiables. Un traitement préalable de ces microélectrodes confectionnées au laboratoire est donc indispensable afin de nettoyer les pointes et de permettre l'obtention de réponses électrochimiques reproductibles [104]. Ainsi, ces ME une fois préparées, (voir paragraphe II-4-4-1-3) sont polies au papier abrasif de carbure de silicium de grains 1200 et 2400, rincées à l'éthanol puis à l'eau bidistillée. Avant chaque mesure, l'activation de cette dernière s'effectue en milieu KCl à 2 M par voltamètrie cyclique (15 cycles) à une vitesse de balayage égale à 10 mV.s<sup>-1</sup>, en utilisant une électrode de référence au calomel saturée (ECS) et une contre électrode en platine.

L'électrode de travail qui représente le substrat à coloniser, est en platine de diamètre 5 mm (soit une surface de 0.785 cm²), sous forme cylindrique enrobée par une résine, dont l'embout est relié à une tige en fer. Cette électrode est immergée dans un circuit d'eau de robinet de Paris, à raison d'un débit de 80 ml.mn<sup>-1</sup>.

Afin de préserver la structure du biofilm formé sur les électrodes, il est important de rincer avant chaque mesure de SRET les échantillons en utilisant une solution appropriée. En effet, en se basant sur des travaux de la littérature [126], il s'avère que l'emploi de l'acide (4-2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic, noté HEPES à 0.1 et pH=7.4 permet de mieux préserver l'encapsulation des bactéries dans les polymères extracellulaires comparativement à d'autres milieux de rinçage tels que l'eau désionisée ou PBS (phosphate tampon saline ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Ainsi, le rinçage du biofilm par cette solution conserve l'état des bactéries au sein de la matrice polymérique sans les décrocher. Cet avantage est dû à l'attraction électrostatique entre l'acide exopolysaccharide et la partie pipérazine de l'HEPES [126].

A chaque mesure locale, correspondante à des âges de biofilms différents, l'électrode est adaptée sur le montage montré sur la figure II.13, en la fixant dans une cellule confectionnée spécialement pour ce genre de mesure (figure II.15). La surface à analyser est orientée vers le haut, permettant ainsi le positionnement et le déplacement de la microélectrode à sa proximité. Ces mesures sont effectuées en milieu KCl 0,1 M [125].

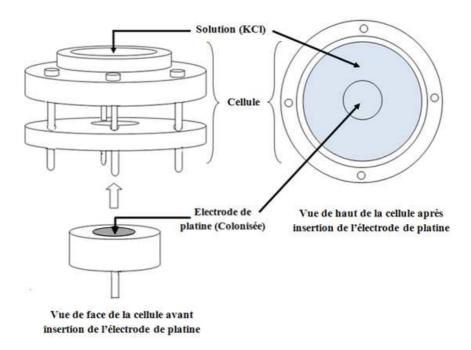


Figure II.15: Schéma de la cellule employée dans le montage de la SRET

# Chapitre III

# Détection et caractérisation des biofilms

Ce chapitre est consacré à une première partie du travail réalisée aux laboratoires d'Electrochimie-Corrosion et de Microbiologie Appliquée de l'Université de Béjaïa. On y présentera les résultats obtenus sur la formation des biofilms et leurs caractérisations par différentes techniques électrochimiques, dites globales associées à des mesures microbiologiques indispensable à une telle étude.

#### III-1 Caractérisation de l'eau d'alimentation :

L'eau utilisée dans cette partie est l'eau potable alimentant l'Université de Béjaïa. Les caractéristiques physico-chimiques moyennes de cette eau pendant la période d'étude sont présentées sur le tableau III.1 :

Paramètres	Valeurs
рН	7,5-7,8
Conductivité (µS cm <sup>-1</sup> )	812
Dureté totale (TH en °F)	36,4
Alcalinité (TAC en °F)	4,1
Teneur Cl <sup>-</sup> (mg/l)	78
Teneur en O <sub>2</sub> dissous (mg/l)	5,12

Tableau III.1 : Caractéristiques physico-chimiques de l'eau potable de Béjaïa

Les analyses ont été effectuées selon les modes opératoires cités dans la littérature [95,96] et rappelés dans ce mémoire (voir chapitre II et annexe 2).

Les caractéristiques microbiologiques de cette eau ont été déterminées grâce à l'aide précieuse du laboratoire de Microbiologie Appliquée où les dénombrements bactériens ont pu être effectués. Des échantillons d'eau ont été prélevés à différents endroits de l'installation à savoir : à l'entrée, dans le bécher et à la sortie (voir Figure II.1).

Les flores totales aérobies et anaérobies ont été dénombrées après ensemencement en masse sur boites de pétri contenant un milieu de culture riche gélosé (Columbia). La température d'incubation est de 37 °C. Après une durée de 48 heures, on remarque la présence de

colonies sur les boites. Ces colonies, de tailles et couleurs différentes (crème, orange, blanche avec une dominance des crèmes), correspondent aux bactéries anaérobies strictes ou aéro-anaérobies. Le nombre de colonies calculé est autour de 67 UFC.ml<sup>-1</sup> à l'entrée, 77 UFC.ml<sup>-1</sup> dans le bécher et 110 UFC.ml<sup>-1</sup> à la sortie de celui-ci.

La présence de bactéries aérobies n'a pu être détectée dans ces conditions, où le dénombrement a été réalisé en masse. Pour rendre compte de l'absence ou de la présence de ce type de bactéries, un dénombrement en surface est nécessaire. En effet, à défaut de déposer des gouttes d'eau dans les boites de pétri pour l'analyse, un étalement de l'échantillon sur la gélose à l'aide des oses en plastique est effectué.

A 48 heures d'incubation (voir la figure III.1), on remarque un développement important des colonies oranges dans la première boite (échantillon prélevé à l'entrée de l'installation) et des crèmes dans les deux autres boites (échantillon pris dans le bêcher et à la sortie de l'installation). Par ailleurs, on constate l'absence des colonies de petite taille et de couleur blanche qui correspondent aux bactéries anaérobies strictes.

Il ressort de ces résultats l'absence de bactéries aérobies strictes dans l'eau analysée.

Par ailleurs, la méthode de coloration de Gram dont le principe est cité auparavant (annexe 1) est utilisée afin de caractériser le type de bactéries présentes dans l'eau. Il s'avère que l'eau prélevée garde sa couleur violette après décoloration par l'alcool éthylique, ce qui reflète la présence exclusive de bactéries Gram positifs. L'observation au microscope a permis de distinguer deux formes. Les bactéries de couleur crème et blanche sont sous forme de coccies en chainettes alors que les oranges apparaissent soit isolées soit en diplocoques, sous forme de streptococcies en chainettes.





Figure III.1: Images des boites de pétri après 48 h d'incubation par ensemencement en surface d'un échantillon d'eau potable de la ville de Béjaia prélevé à différents endroits de l'installation : (1) à l'entrée, (2) dans le bécher, (3) à la sortie

# III-2 Détermination électrochimique de l'épaisseur du biofilm :

# III-2-1 Détermination du potentiel imposé :

Pour caractériser le biofilm et suivre son évolution au cours du temps par la technique électrochimique, le signal étudié est le courant correspondant à la réaction de réduction du ferricyanure (Fe<sup>3+</sup>) en ferrocyanure (Fe<sup>2+</sup>) suivant la réaction suivante :

$$Fe(CN)_6^{-3} + e^- \rightarrow Fe(CN)_6^{-4}$$
 (Eq.III.1)

Il s'agit en réalité de déterminer l'écart entre le courant mesuré en présence de biofilm et celui obtenu en son absence. Pour ce type de mesure, un potentiel est imposé à l'électrode de travail correspondant au potentiel de réduction du traceur électrochimique à la surface de l'électrode. Au préalable, il a été nécessaire de réaliser des suivis voltampérométriques pour déterminer la plage de potentiel pour laquelle on obtient, dans nos conditions expérimentales, le courant limite de diffusion.

Les courbes de polarisation cathodiques de la réduction du traceur électrochimique à différentes vitesse de rotation de l'électrode et à une vitesse de balayage de 10 mV/s, obtenus sur le platine et l'or dés immersion, sont illustrées sur les figures III.2 et III.3 respectivement.

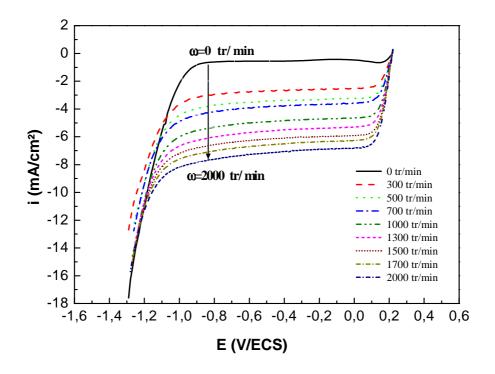


Figure III.2 : Courbe courant-potentiel à différentes vitesses de rotation d'une électrode en platine nu avec le traceur Ferricyanure

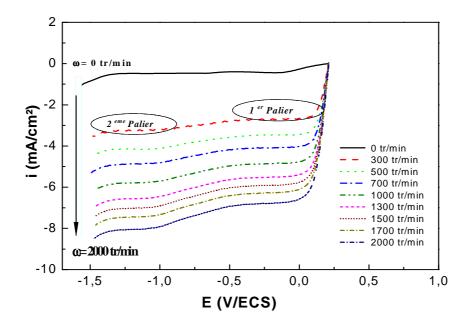


Figure III.3 : Courbe courant-potentiel à différentes vitesses de rotation d'une électrode en or nu avec le traceur Ferricyanure

Dans le cas du platine, figure III.2, on remarque que le palier de diffusion est bien défini pour toutes les valeurs étudiées de vitesse de rotation puisque les valeurs de la densité de courant

restent sensiblement constantes dans un large domaine de potentiels, de 0 V/ECS à - 1 V/ECS. La hauteur du palier de diffusion augmente avec l'intensification du transport de matière due à l'augmentation de la vitesse de rotation de l'électrode. La sensibilité de ce palier aux conditions hydrodynamiques est en accord avec un contrôle diffusionnel de la réduction du ferricyanure de potassium en ferrocyanure ; la hauteur du palier correspondrait au courant limite de diffusion.

Concernant les résultats obtenus sur l'électrode en or, figure III.3, on constate l'apparition de deux paliers bien distincts quelque soit la vitesse de rotation. Le premier, situé entre - 50 mV/ESC et - 300 mV/ECS, est attribué à la réduction du traceur électrochimique utilisé. Le second, qui se trouve entre - 950 mV/ECS et - 1400 mV/ECS, est due à la réduction de l'oxygène résiduel dissous. Ce dernier a pu être éliminé comme en témoigne les résultats de la figure III.4 obtenus en milieu désaéré par simple barbotage d'argon dans la solution.

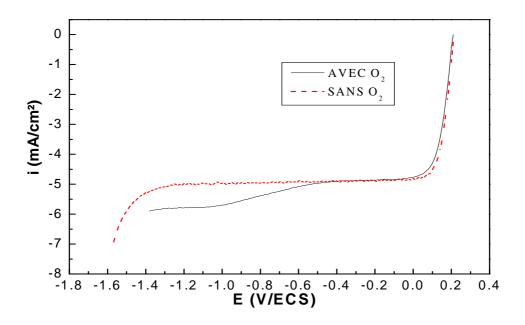


Figure III.4: Courbe courant-potentiel à 1000 tr/min d'une électrode en or avant immersion avec le traceur Ferricyanure en présence

Dans les deux cas étudiés et à fortes polarisation cathodiques, nous enregistrons une évolution rapide du courant due à la décomposition du solvant avec dégagement de l'hydrogène. En conclusion, le potentiel -250 mV/ECS a été choisi comme potentiel de polarisation de

l'électrode d'or ou de platine pour les mesures du courant limite de diffusion.

## III-2-2 Détermination du coefficient de diffusion :

La figure III.5 représente un exemple du tracé chronoampérométrique à différentes vitesses de rotation de l'électrode de travail. Cette mesure permet de déterminer les courants limites correspondants à chaque valeur de vitesse appliquée à l'électrode.

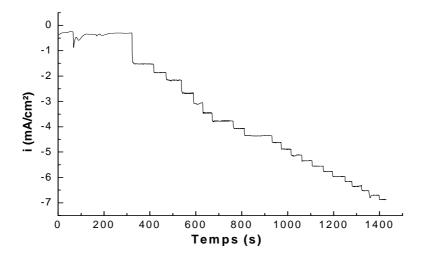


Figure III.5 : Courbe i=f(t) à différentes vitesses de rotation (0 à 2000 tr/min) d'une électrode en or dans une solution de ferricyanure à 0.1mM dans KCL à 0.5 M,  $E_{imp}$ =-0,25 V/ECS

Les valeurs tracée en fonction de  $\Omega^{1/2}$ , c.à.d en représentation de Levich, sont assez proches dans les deux cas étudiés et se placent sur des droites linéaires dans tout le domaine de vitesse exploré (Figure III.6). Ces données suivent bien la relation de Levich. Notons cependant, qu'il existe de faibles valeurs positives des ordonnées à l'origine qui correspondent à un courant non diffusionnel, attribué au dégagement de l'oxygène ou de l'hydrogène (on ne peut l'attribuer au dégagement de l'hydrogène car on est loin du potentiel correspondant).

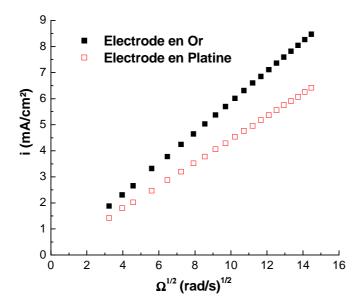


Figure III.6: Tracé de Levich des électrodes or et platine avant immersion avec le traceur Ferricyanure

L'application de la loi de Levich (Eq.II.8) a permis de déterminer les valeurs du coefficient de diffusion, en utilisant les valeurs numériques suivantes :

$$D_{f} = \begin{bmatrix} I_{L} \\ 0.62 \, nFS \, \frac{2}{3} v^{-1/6} \sqrt{2\pi/60} \, \Omega^{1/2} C_{\infty} \end{bmatrix}^{\frac{3}{2}}$$
 (Eq.III.2)

C∞: Concentration de l'espèce électroactive dans la solution (10<sup>-2</sup> M dans ce cas),

V: viscosité cinématique du milieu ( $10^{-2} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ ),

F: Faraday (96484.56 C.mol<sup>-1</sup>),

n : nombre d'électrons échangés (n=1 pour le ferricyanure),

I : Intensité de courant limite (en mA),

 $\Omega$ : vitesse de rotation de l'électrode tournante (tr.mn<sup>-1</sup>),

S : surface de l'électrode tournante (cm²),

Les valeurs du coefficient de diffusion déduites sont de l'ordre de 9,6.  $10^{-6}$  cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> et 6,4.  $10^{-6}$  cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> pour l'or et le platine respectivement. Il est à noter la divergence des valeurs calculées par expérience alors que l'on s'attendrait à des valeurs beaucoup plus proches puisqu'il s'agit d'un même milieu. Néanmoins, ces valeurs restent d'un même ordre de grandeur que celle de la valeur théorique extraite de l'analyse bibliographique [15], qui est de

5,6.10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. C'est cette dernière valeur que l'on va par la suite considérer dans l'ensemble de nos calculs pour la détermination de l'épaisseur des biofilms.

## III-2-3 Résultats obtenus sur l'or :

## III-2-3-1 Courbe courant -vitesse de rotation :

Les courbes courant-vitesses de rotation de l'électrode d'or au cours d'une phase de colonisation de 8 semaines à une température de 37°C sont représentées sur la Figure III.7, selon la représentation de Levich, à savoir  $i = f(\Omega^{1/2})$ . On remarque qu'au delà de deux jours d'immersion les tracés ne sont plus des droites et elles ne passent pas par l'origine, la loi de Levich n'est plus vérifiée et la représentation de Koutecky-Levich doit alors être utilisée pour la détermination de l'épaisseur du biofilm.

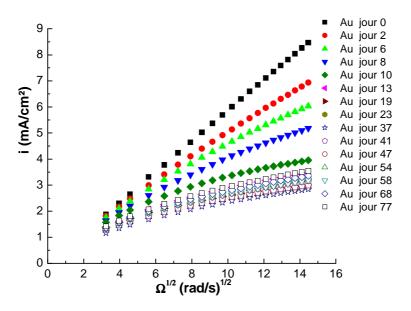


Figure III.7 : Tracé de Levich d'une électrode en or avec le traceur Ferricyanure à différents temps d'immersion

Les variations de la densité de courant données par la représentation de Koutecky-Levich  $(i^{-1} = f(\Omega^{-1/2}))$  sont présentées sur la figure III.8.

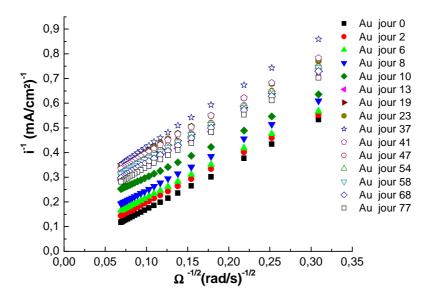


Figure III.8 : Tracé de Koutecky-Levich d'une électrode en or avec le traceur Ferricyanure à différents temps d'immersion

L'analyse de ces courbes a permis de noter les points suivants :

- Au temps initial, c.à.d en absence du biofilm, la droite passe par l'origine confirmant de nouveau que la loi de Levich est vérifiée. Ce qui permet en réalité de négliger la contribution du faible courant d'activation enregistré sur le processus de réduction étudié (voir Figure III.7).
- ➤ Quand le temps d'immersion augmente, donc avec la croissance de l'âge du biofilm, le courant mesuré diminue et ce, pour chacune des vitesses de rotations appliquées. Cette réduction de courant mesurée à la surface de l'électrode caractérise la formation du biofilm dans le temps. En présence de ce dernier, deux conclusions peuvent être tirées en fonction de l'âge du biofilm :
  - ✓ Jusqu'à 8 jours d'immersion les courbes sont sensiblement des droites dont l'extrapolation de l'ordonnée à l'origine permet de déterminer l'épaisseur du biofilm. Ce qui confirme l'application de la relation (Eq.II.9) pour un âge bien déterminé du biofilm (≤ 8 jours):

$$\delta_f = n F D C_{\infty} S i_{(\Omega=0)}^{-1}$$
 (Eq.III.3)

✓ Pour des temps d'immersion plus important (au-delà de 8 jours), on constate que la méthode Koutecky-Levich n'est plus valable du fait que des courbures apparaissent, ce ne sont donc plus des droites. En conséquence, l'application

de la relation (Eq.II.9) ne peut être appliquée. En se basant sur les travaux de la littérature [15, 98], ce résultat est attribué à la présence d'un film poreux à la surface de l'électrode. Ce qui laisse penser à une passivation progressive de la surface de l'électrode. L'exploitation des données obtenues jusqu'à présent prenait comme hypothèse que l'épaisseur du biofilm  $\delta_f$  est indépendante de la vitesse  $\Omega$  de rotation de l'électrode. Dans le cas contraire, où la dépendance de l'épaisseur d'une couche poreuse en fonction de la vitesse de rotation est mise évidence selon une variation  $i^{-1}=f(\Omega^{-0,5})$ , la relation (Eq.II.14) est appliquée pour accéder aux valeurs de l'épaisseur du biofilm [15,50] et que nous rappelons ci-dessous :

$$\delta_f = nFD_f SC_{\infty} (i_{(\Omega,t)}^{-1} - i_{L(\Omega,t=0)}^{-1})$$

# III-2-3-2 Cinétique de formation du biofilm :

La figure III.9 représente l'évolution de l'épaisseur d'un biofilm formé sur l'électrode d'or à la surface de laquelle circule une eau potable pendant 10 semaines à 37 °C.

A chaque temps d'immersion, l'épaisseur est déterminée à partir de l'équation (Eq.II.14) pour différentes vitesses.

On remarque que lorsque l'hydrodynamique augmente, ce qui se traduit par une augmentation de la vitesse de rotation de l'électrode, l'épaisseur du biofilm reste sensiblement constante, mettant ainsi en évidence un caractère non élastique du biofilm.

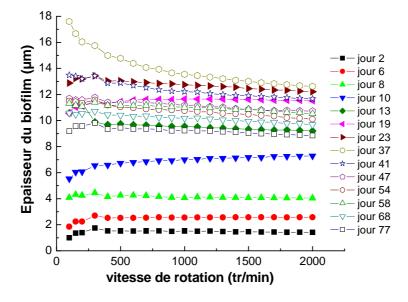


Figure III.9: Variation de l'épaisseur d'un biofilm obtenu sur électrode en or après 77 jours d'immersion

Une autre présentation de ces résultats est donnée sur la figure III.10, où l'épaisseur est donnée en fonction du temps d'immersion pour différentes vitesses de rotation.

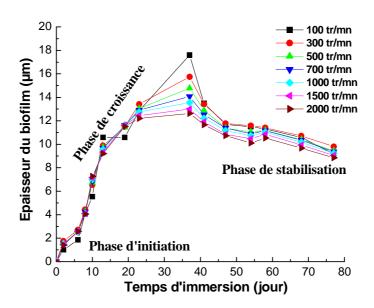


Figure III.10 : Variation de l'épaisseur d'un biofilm à différentes vitesses de rotation de l'électrode en or après 77 jours d'immersion

Pour des temps d'immersion inférieurs à 24 jours, l'épaisseur est indépendante de la vitesse de rotation et varie de 1 µm à 13 µm.

A des temps plus longs, cette épaisseur continue de croître et devient plus sensible à la vitesse de rotation pour une période allant de 24 à 40 jours d'immersion. Ce comportement indique un caractère élastique du biofilm.

Au delà de 40 jours, on enregistre une diminution de cette épaisseur, traduisant un caractère plus rigide du biofilm élastique.

Cette notion d'élasticité varie avec l'âge du biofilm et s'explique par les propriétés structurales du biofilm évoquées dans la littérature [9, 18, 127], où le caractère poreux du biofilm résulte de l'organisation morphologique autour d'amas cellulaires, qui, sous la contrainte, se tassent sur le support entrainant alors une diminution globale de l'épaisseur du biofilm. Ce phénomène peut également être attribué à la forte minéralisation de certains biofilms, telle celle décrite par Hiernaux [32].

Par ailleurs, la comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature montre une divergence du comportement observé en fonction de l'âge du biofilm.

En effet, certains auteurs ont démontré le contraire de ce que nous avons obtenu, c.à.d, pour des biofilms « jeunes », l'épaisseur est variable et sensiblement dépendante de la vitesse de rotation de l'électrode, mettant en évidence le caractère élastique du biofilm.

Pour des biofilms plus âgés, cette épaisseur tend à se stabiliser pour devenir indépendante de la vitesse de rotation, indiquant ainsi que l'épaisseur mesurée semble atteindre une valeur qui suggère la présence d'une couche plus mature donc plus structurée.

Néanmoins, d'autres travaux [15] ont aboutit aux mêmes conclusions que celles présentées dans ce travail.

La figure III.11 présente un exemple d'évolution de l'épaisseur formée, obtenue à une seule vitesse de rotation, à savoir 500 tr/mn.

La cinétique de croissance du biofilm montre de manière générale que l'évolution de son épaisseur passe par plusieurs phases :

- ❖ une phase initiale de croissance de l'ordre de 6 jours dans nos conditions opératoires, confirmant ainsi les résultats de la littérature [36, 50]. On prétend en effet que cette durée peut varier d'un biofilm à un autre et peut s'étendre sur une période allant jusqu'à 8 voire, 10 jours.
- une phase de croissance, où l'on enregistre une augmentation rapide de l'épaisseur du biofilm, passant de 3 μm à 13 μm en 14 jours. Le maximum de croissance est atteint au bout de 37 jours d'immersion.
- ❖ une phase de stabilisation au cours de laquelle la matrice du biofilm acquiert une plus grande maturité et tend à se stabiliser alors que des phases concomitantes d'adhésion/décrochage plus ou moins accentuées prennent place à l'interface métal/électrolyte, ce qui explique la diminution de l'épaisseur enregistrée pour des temps d'immersion dépassant les 5 semaines.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature et sont couramment admis par l'ensemble de la communauté scientifique [36, 50].

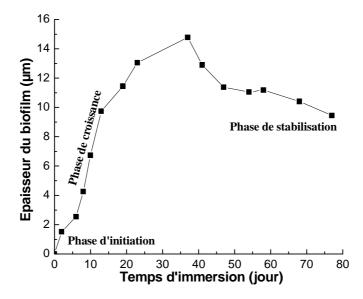


Figure III.11: Evolution de biofilm au cours du temps sur une électrode en or à 500 tr/mn

# III-2-4 Résultats obtenus sur le platine :

# III-2-4-1 Influence du substrat sur la cinétique de formation du biofilm :

La disponibilité des électrodes de platine au laboratoire nous a permis d'effectuer en parallèle les mêmes séries de tests que celles décrites ci-dessus (37°C et un débit de 42 ml/mn). Les résultats obtenus ne traduisent pas de différences significatives avec ceux obtenus sur l'or, comme on peut le constater sur les figure III.12 et III.13 relatives à la représentation de Levich et Koutecky-Levich respectivement.

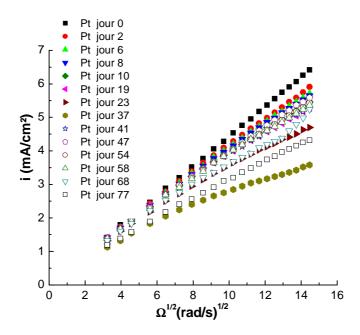


Figure III.12 : Tracé de Levich d'une électrode en platine avec le traceur Ferricyanure à différents temps d'immersion

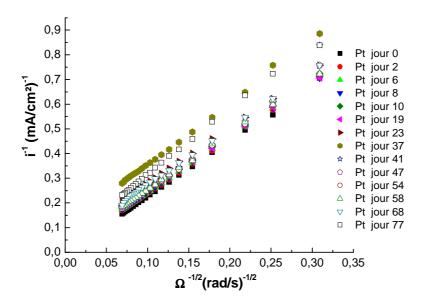


Figure III.13 : Tracé de Koutecky-Levich d'une électrode en platine avec le traceur Ferricyanure à différents temps d'immersion

Cependant, il y'a lieu de noter que l'étude quantitative réalisée sur la détermination des épaisseurs du biofilm a conduit dans le cas du platine (figure III.14 et III.15) à des valeurs moins importantes en comparaison avec celles obtenues sur l'or (voir figure III.9 et III.10).

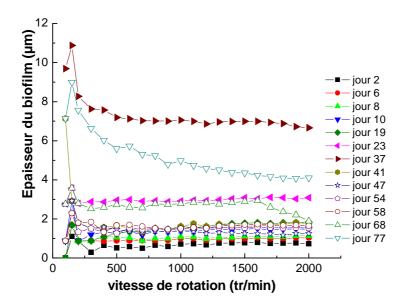


Figure III.14: Variation de l'épaisseur d'un biofilm obtenu sur électrode en platine dans un système ouvert après 77 jours d'immersion

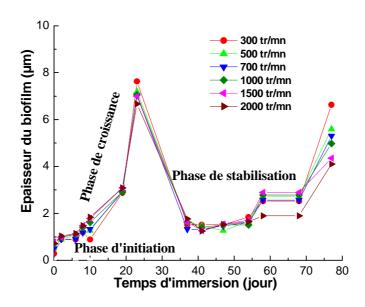


Figure III.15: Variation de l'épaisseur d'un biofilm à différentes vitesses de rotation de l'électrode en platine après 77 jours d'immersion

A titre comparatif, nous avons représenté sur la figure III.16 la cinétique de croissance du biofilm obtenue sur les deux électrodes étudiées à une seule vitesse de rotation de 500 tr/mn.

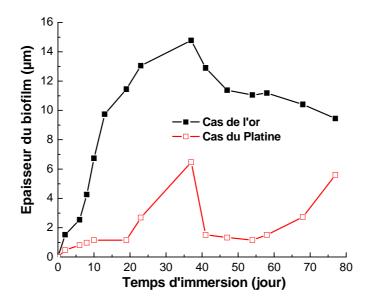


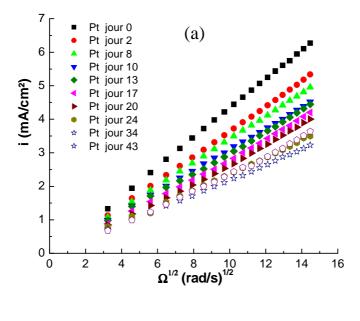
Figure III.16: Evolution de l'épaisseur de biofilms formés sur l'or et le platine à une vitesse de rotation des électrodes de 500 tr/mn après 77 jours d'immersion.

Une tendance de comportement similaire est observée entre les résultats obtenus avec les deux matériaux. Cependant, l'écart enregistré est significatif concernant les valeurs des épaisseurs déterminées. Rappelons que la surface de l'électrode en or est supérieure d'un facteur 5 par rapport à celle du platine. Ceci dit, la nature du matériau est un facteur important dont dépend la fixation des bactéries dans la matrice organique et le développement par conséquent du biofilm. L'étude doit être poursuivie de manière plus approfondie afin de pouvoir élucider les mécanismes mis en jeu à l'interface métal/biofilm/solution.

## III-2-4-2 Influence de l'hydrodynamique sur la cinétique de formation du biofilm :

Dans le but d'élargir l'étude précédente et de mieux comprendre le rôle des paramètres contrôlant la cinétique de formation des biofilms sur les matériaux, l'influence de l'hydrodynamique a été abordée en comparant les résultats obtenus sur le platine et décrits cidessus avec ceux obtenus sur le même substrat lors d'une phase de colonisation de 20 jours à 37 °C dans un système fermé (milieu stagnant). Le contenu du bécher est ajusté chaque jour, du fait que l'eau s'évapore à la température d'étude (37°C).

Au temps initial, le tracé de Levich (figure III.17-a) de l'électrode en platine dans le système fermé est une droite qui passe par l'origine, d'où la confirmation de la loi correspondante. Au delà de deux jours d'immersion le tracé présente une légère courbure. La représentation de Koutecky-Levich (figure III.17-b) ne donne pas des droites, par conséquent les valeurs de l'épaisseur du biofilm seront déterminées par l'hypothèse de la couche poreuse.



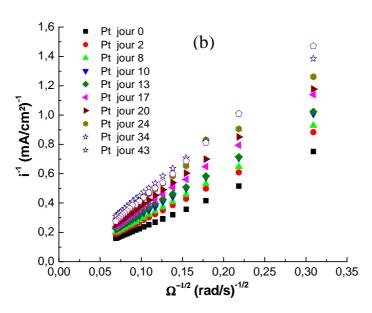


Figure III.17: Tracé de Levich (a) et de Koutecky-Levich (b) d'une électrode en platine avec le traceur Ferricyanure à différents temps d'immersion dans un circuit fermé à 37°C

L'évolution de l'épaisseur en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode est présentée sur la figure III.18. Contrairement aux résultats obtenus sur le même matériau dans le cas du système ouvert, l'épaisseur du biofilm mesurée dans ce cas dépend de la vitesse de rotation de l'électrode reflétant ainsi un comportement élastique assez net notamment à des temps d'immersion longs (au-delà de 10 jours).

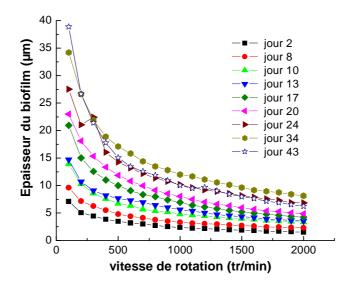


Figure III.18 : Variation de l'épaisseur d'un biofilm obtenu sur électrode en platine dans un système fermé après 43 jours d'immersion

Sur la figure III.19, on peut constater l'écart enregistré dans les deux cas étudiés (système ouvert et fermé) pour une vitesse de rotation de 500 tr/mn. On remarque dans le cas du système ouvert les valeurs des épaisseurs déterminées sont beaucoup plus faibles. Elles atteignent 6µm au bout de 37 jours d'immersion. Par contre, dans le cas du système fermé, une valeur d'épaisseur 3 fois plus importante est atteinte à cette même période.

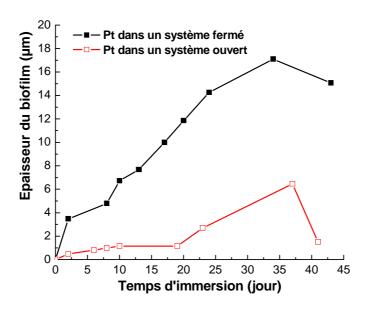


Figure III.19: Evolution de l'épaisseur de biofilms formés sur le platine dans un système ouvert et fermé à une vitesse de rotation des électrodes de 500 tr/mn après 43 jours d'immersion

Ces résultats corroborent ceux de la littérature puisque que dans des conditions d'écoulement laminaire, le biofilm formé est plus souple par rapport à celui obtenu dans des conditions d'écoulement turbulent [15].

#### III-3 Analyse microbiologique d'un biofilm formé sur l'or :

Le couplage entre différentes méthodes de caractérisation est le moyen le plus approprié afin de valoriser un travail donné en apportant des informations nouvelles et souvent complémentaires. Sachant qu'il n'existe pas de relation directe entre le nombre de bactéries adsorbées sur une surface considérée et son épaisseur [9], il est malgré cela intéressant de vérifier la présence de ces bactéries sur la surface du matériau, et ainsi justifier le mot biofilm évoqué tout au long de ce travail.

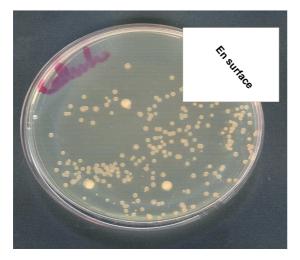
Les analyses microbiologiques de la biomasse fixée sur un support sont rendues possibles grâce à l'utilisation des ultrasons, qui permet le décrochage des bactéries sans les endommager.

Ne sera présenté dans ce travail que le résultat d'une analyse obtenue sur un échantillon en or ayant subit une phase de colonisation de 22 jours dans un système ouvert à 37°C avec une circulation d'eau de 42 ml mn<sup>-1</sup>.

Le biofilm a été détaché dans un bécher contenant de l'eau distillée (milieu stérile) à pH = 6,7 en utilisant les ultrasons à une puissance de 160 W pendant 5min.

A noter que la surface de l'électrode immergée dans l'eau stérile ne correspond pas uniquement à la surface de l'or, mais aussi à celle de l'embout colonisé par des bactéries, ce qui implique une influence certaine sur la précision des résultats de dénombrement bactérien. Par conséquent, cette analyse est à caractère qualitatif et permettra de vérifier le type de bactéries qui s'adsorbent sur l'électrode.

La figure III.20 suivante montre l'image des boites de pétri obtenues par ensemencement en masse et en surface du biofilm décroché. La prise d'échantillon est de 1 ml pour chaque analyse, dans un milieu nutritif non spécifique (gélose columbia).



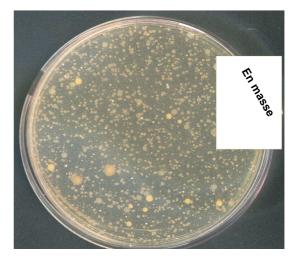


Figure III.20: Images des boites de pétri après ensemencement d'un échantillon de biofilm formé sur l'Or à 22 jours d'immersion

Ces images révèlent une présence plus importante de bactéries, par rapport à ce qui a été quantifié initialement. Le nombre de colonies calculé dans le cas de l'ensemencement en surface est égal à 310 UFC.ml<sup>-1</sup>, alors que dans le cas de l'ensemencement en masse, il est indénombrable.

Seuls les bactéries anaérobies strictes et quelques bactéries aéro-anaérobies sont présentes dans l'échantillon analysé. Une éventuelle contamination du biofilm par des bactéries aérobies n'a pas été détectée.

#### III-4 Caractérisation par impédancemétrie :

Afin de caractériser le biofilm formé sur les électrodes modèles, il est important d'utiliser d'autres techniques expérimentales qui permettent d'extraire des informations supplémentaires sur l'interface métal/biofilm. Ainsi, nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce travail à l'utilisation de la technique des impédances électrochimiques. Pour ce faire, deux électrodes en platine ont été immergées dans l'eau à circulation continue (42 ml/min) et à 37°C afin de pouvoir vérifier la reproductibilité des résultats. Des mesures d'impédance électrochimique à différents âges de biofilm ont été réalisées dans un milieu KCl 0.1M, au potentiel libre et à une vitesse de rotation de l'électrode de 500 tr/mn. Ces mesures effectuées en mode potentiostatique avec une amplitude du signal de la perturbation de 10 mV et des valeurs de fréquences comprises entre 100 KHZ et 10 mHZ ont été obtenues à raison de 10 points/décade.

La figure III.21 illustre les résultats obtenus dans la représentation de Bode (phase et module en fonction de la fréquence) sur une électrode de platine en absence et en présence du biofilm à différents âges.

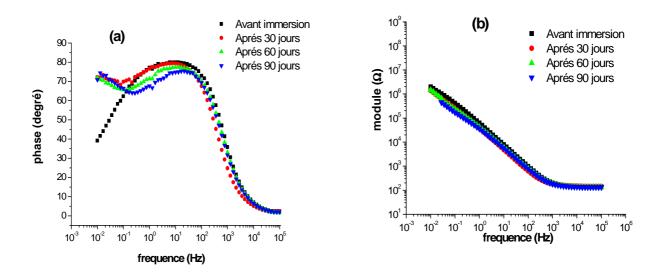


Figure III.21 : Diagrammes de Bode obtenu sur une électrode en Platine dans KCl à 0.1M, à différents temps d'immersions dans l'eau du robinet, ω= 500tr/min, E <sub>libre</sub>

On signalera qu'en absence du biofilm, une seule boucle capacitive est enregistrée dans la représentation de Nyquist (non présenté ici à cause de la dispersion des points enregistrés en basses fréquences en présence des biofilms), dans tout le domaine de fréquence étudié, reflété par la présence d'une constante de temps comme le prouve la figure III.21(a). Par contre, en présence du biofilm, une autre constate de temps apparait aux basses fréquences pour les biofilms formés au-delà de 30 jours. Cela est plus notable avec la variation de la phase en fonction de la fréquence. Par ailleurs sur la figure III.21(b), on distingue aussi un changement de pente en basse fréquence. La détermination de la pente dans une telle représentation donne une indication sur les phénomènes mis en jeu; une pente d'environ 0.5 correspond à un mécanisme diffusionnel, alors qu'une pente d'environ égale à 1 correspond à un phénomène purement capacitif [6]. Les valeurs obtenues dans notre cas sur le platine recouvert de biofilm à différent âge avoisinent  $\approx 0.5$  dans le domaine des basses fréquences. Ce résultat indique que les phénomènes liés au domaine de basses fréquences sont limités par la diffusion.

L'exploitation de ces résultats de mesures d'impédance électrochimique, dites globales, permettent en outre de déterminer certains paramètres cinétiques, telle que la capacité aux hautes fréquences. La détermination de cette capacité peut être envisagée à partir du calcul de la limite haute fréquence (entre 100 KHz et 100 Hz) de l'impédance d'un circuit RC en parallèle (voir annexe 3). Cette capacité est égale à la capacité de double couche habituelle dans le cas d'une électrode entièrement active. Lorsqu'un film organique est adsorbé, la constante diélectrique du milieu au proche voisinage de l'interface décroît, on s'attendrait alors à une décroissance de la capacité haute fréquence. Les valeurs de ces capacités peuvent être déduites à partir des courbes  $C_{HF} = f (1/\omega)$  montrées sur la figure III.22. L'extrapolation de ces courbes à la fréquence infinie ( $\omega \rightarrow \infty$ ), nous permet d'estimer la valeur de la capacité en présence d'un processus d'adsorption à la surface de l'électrode.

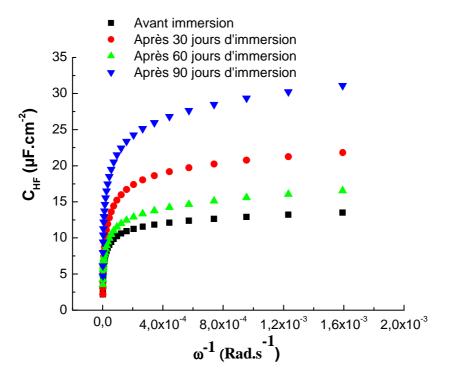


Figure III.22 : Détermination de la capacité aux hautes fréquences par la méthode de mesure d'impédance électrochimique en très hautes fréquence pour électrode en Platine à différents âge du biofilm, dans une solution KCl à 0.1M,  $\omega = 500 tr/min$ .

La figure III.23 représente la variation des valeurs de la capacité haute fréquence estimées en fonction de l'âge du biofilm.

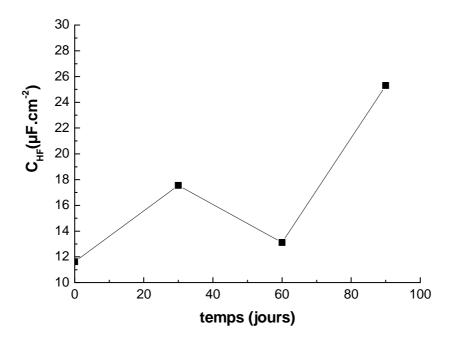


Figure III.23 : Variation des valeurs de la capacité haute fréquence en fonction de l'âge du biofilm

Ces valeurs sont de l'ordre de quelques dizaines de micromètre. L'augmentation constatée avec le temps d'immersion est surprenant et opposé à ce que l'on s'attendait. Ce type de mesure, dite globale, ne mettent pas en évidence les hétérogénéités de surface et considère que la formation du biofilms est uniforme sur toute la surface, ce qui n'est pas le cas en réalité. D'où l'intérêt de poursuivre cette étude pour donner une meilleure interprétation aux phénomènes observés.

# Chapitre IV

# Application des mesures locales à l'étude d'un biofilm

Ce chapitre fait l'objet des résultats obtenus au laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (LISE), UPR 15 du CNRS - Paris, grâce à l'octroi d'un stage de deux mois dans le cadre d'un programme de coopération Algéro-Français, Tassili n°08 MDU 750.

L'utilisation de techniques "classiques" pour l'étude des biofilms se heurte à un problème majeur, la réponse recueillie est moyennée sur l'ensemble de la surface. Compte tenu du caractère complexe des biofilms que l'on a pu dévoiler tout au long de cette étude, il nous a semblé intéressant d'orienter l'étude vers une échelle microscopique en réalisant des mesures locales notamment par l'utilisation de la technique d'électrode de référence à balayage (SRET) dont dispose le LISE. Le but est de pouvoir atteindre de nouvelles informations dans ce domaine d'investigation.

## IV-1 Caractéristiques de l'eau d'alimentation:

Les électrodes de platine sont immergées dans un circuit d'eau de robinet de Paris, dont les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ont été également vérifiées et données dans le tableau IV.1 :

Paramètre	Valeur
рН	7,6-8,1
Conductivité (µS cm <sup>-1</sup> )	549
Dureté totale (TH en °F)	30
Alcalinité (TAC en °F)	3,6
Teneur Cl - (mg/l)	56
Teneur en O <sub>2</sub> dissous (mg/l)	5,83
Bactéries anaérobies (UFC.ml <sup>-1</sup> )	66
Bactéries aérobies (UFC.ml <sup>-1</sup> )	24

Tableau IV.1 : Caractéristiques de l'eau potable de Paris

Ces résultats d'analyses sont relativement proches de celles obtenus dans la première partie de ce travail.

Par la suite, des électrodes de platine ont été immergées dans un circuit d'eau en circulation continue à raison d'un débit de 80 ml/mn. Pour rappel, la technique de la SRET (voir chapitre II) consiste à mesurer la différence du potentiel entre une microélectrode d'argent d'un diamètre 80 µm confectionnée au laboratoire et l'électrode de platine, colonisée par des biofilms formés.

#### IV-2 Activation et tests de la microélectrode :

Comme cela a déjà été développé précédemment dans le chapitre II, l'activation de ces microélectrodes est indispensable avant de procéder aux mesures locales. Ce test de fonctionnement permet de nettoyer la surface par le biais d'étapes de dissolution / déposition, réalisées par voltamétrie les pointes des microélectrodes (ME). Pour le d'une ME en argent, la voltamétrie est réalisée en milieu KCl 2 M, à 10 mV/s et une quinzaine de cycles [104] (Figure IV.1). Le nettoyage s'effectue par dépôt d'AgCl puis redissolution de celui-ci. Ainsi, les gammes de potentiel correspondantes à la dissolution et au dépôt sont vérifiées.

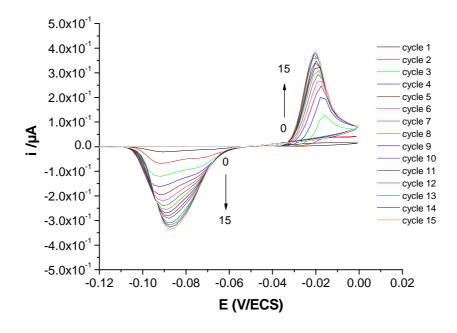


Figure IV.1: Activation de la ME d'argent ( $a = 80 \mu m$ ), solution KCl 2 M,  $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$ 

Sur cette figure, on remarque que l'activité de la microélectrode (les courants des pics anodiques et cathodiques) augmente en fonction du nombre de cycle. Ce traitement permet l'obtention de réponses électrochimiques reproductibles [104].

La figure IV.2 représente l'image MEB prise sur la pointe de la microélectrode d'argent après polissage mécanique, avant qu'elle ne soit légèrement coupée par un polissage mécanique.

L'inconvénient de faire une pointe fine par le polissage est la difficulté à centrer le fil sur la pointe sans avoir des défauts sur celle-ci.

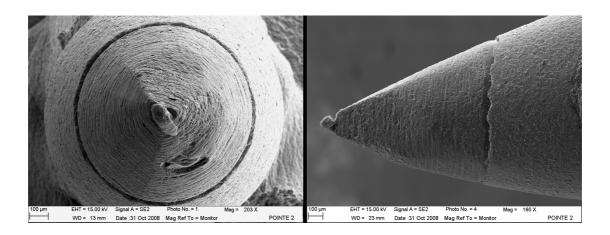


Figure IV.2 : Image MEB d'une pointe de la Microélectrode de 80µm de diamètre.

Les images de la figure IV.3 montrent la surface de la microélectrode après la coupe réalisée sur sa pointe et déposition d'AgCl par voltamétrie. L'analyse EDX réalisé confirme la présence d'AgCl sur cet échantillon.

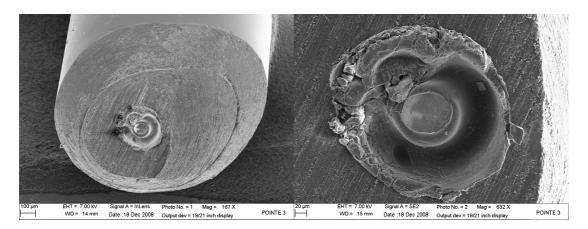


Figure IV.3 : Image MEB de la surface de la Microélectrode de 80µm après la coupe réalisée sur la pointe

#### IV-3 Résultats des mesures locales :

#### IV-3-1 Optimisation de la hauteur séparant les électrodes :

Les mesures de la SRET ont été réalisées en milieu KCl 0.1 M afin d'éviter l'influence des grandes concentrations de sels sur les bactéries. Avant et après chaque mesure, la surface de l'électrode colonisée est rincée par une solution HEPES à 0,1M (chapitre II).

Le positionnement de la ME à proximité de l'échantillon à analyser est un facteur important dans les techniques de mesures locales notamment celles basées sur la microscopie à effet proche. Ainsi, des enregistrements de potentiel en variant la différence d'hauteur  $\Delta h$  entre les deux électrodes, allant de 0,1 à 0,04  $\mu m$  ont été effectués. Des cartographies peuvent alors être tracées. Elles représentent les différences de potentiel entre le platine et l'argent, corrigées de la dérive de potentiel. L'axe de z représente alors les valeurs de  $\Delta(\Delta E)$  et non pas  $\Delta E$ , en fonction des axes x et y.

Les cartographies montrées sur la figure IV.4 représentent les enregistrements obtenus avec un biofilm âgé de 26 jours pour différents valeurs de  $\Delta h$ .

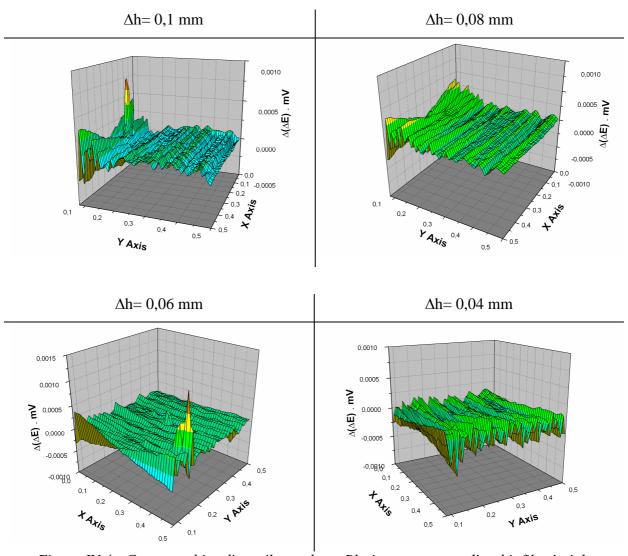


Figure IV.4: Cartographies d'une électrode en Platine recouverte d'un biofilm âgé de 26 jours (zone 1). Mesures réalisées à différente hauteurs séparant les deux électrodes,  $v_x = 50 \ \mu m \ s^{-1}, \ \Delta y = 5 \mu m$ .

Afin de s'assurer de la fiabilité des résultats et de leurs reproductibilités, d'autres endroits sur la surface colonisée ont été exploités (Figure IV.5).

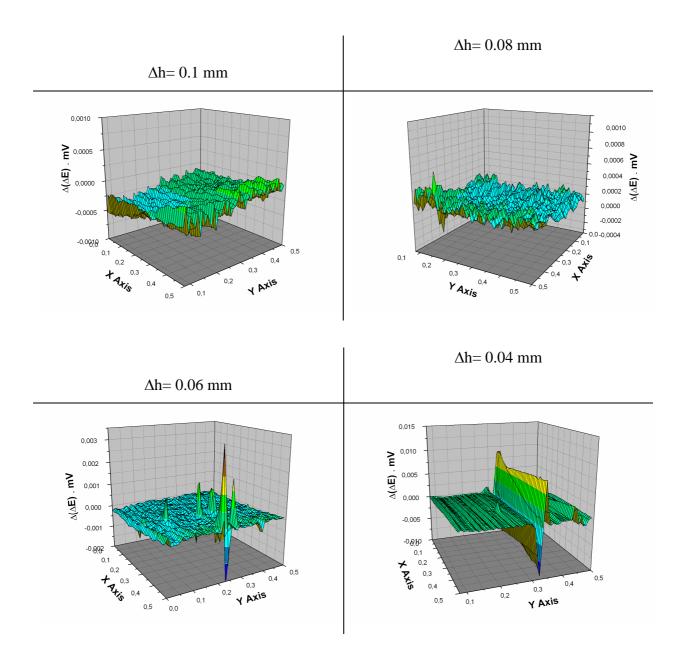


Figure IV.5 : Cartographies d'une électrode en Platine recouverte d'un biofilm âgé de 26 jours (zone 2). Mesures réalisées à différente hauteurs séparant les deux électrodes,  $v_x = 50 \ \mu m \ s^{-1}, \ \Delta y = 5 \mu m.$ 

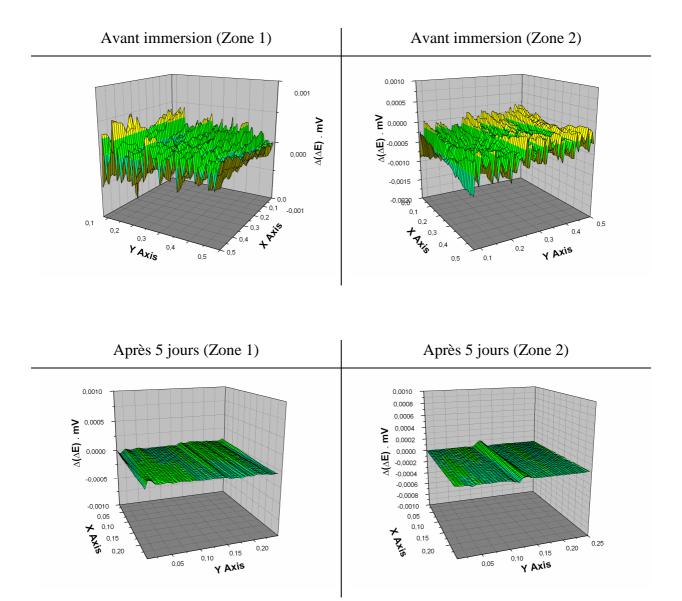
L'analyse de ces cartographies nous a permis d'opter, pour la suite de nos mesures, sur une valeur optimale de la distance séparant la ME de l'électrode de travail égale à 0,06 mm.

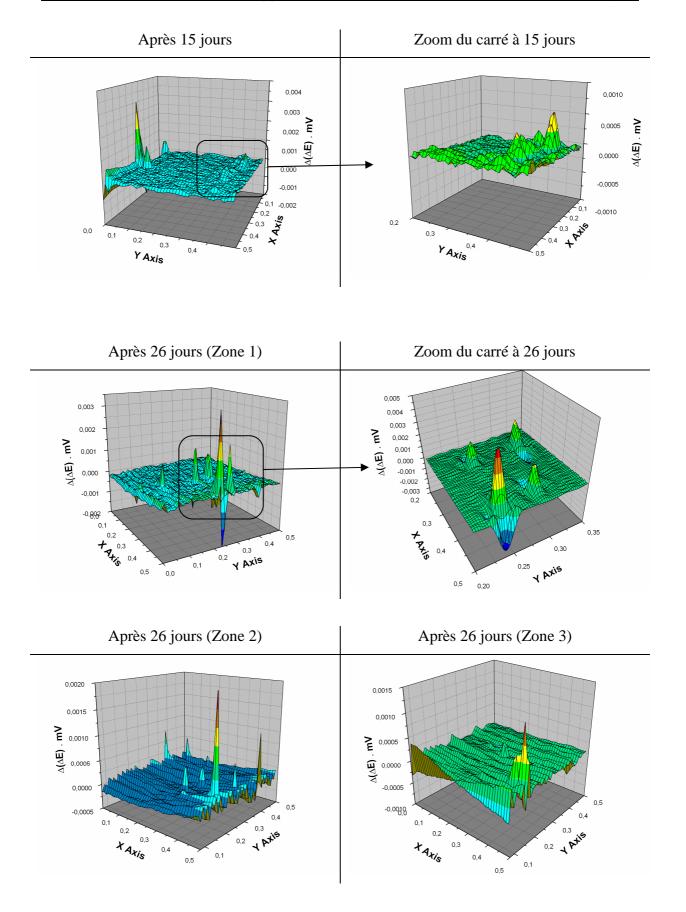
C'est en effet à cette hauteur que les pics sont plus nombreux et plus intenses.

### IV-3-2 Suivi de la formation du biofilm par la SRET sur le platine:

Dans le but d'étudier la sensibilité de la technique d'électrode de référence à balayage (SRET) aux différentes étapes de formation du biofilm, des mesures ont été enregistrées pour différents âges de biofilms.

Les cartographies représentées sur la figure IV.6 correspondent aux différences de potentiels enregistrées à la surface du platine obtenues sur différentes zones en fonction du temps d'immersion des électrodes dans l'eau de robinet (avant immersion, 5, 15, 26 et 34 jours). Le positionnement de la ME est fixée à une distance  $\Delta h$ = 0,06 mm.





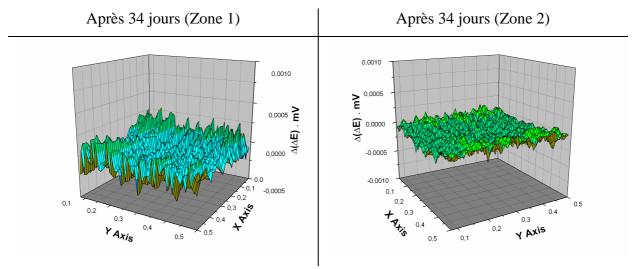


Figure IV.6 : Cartographies d'une électrode en Platine recouverte d'un biofilm de différents âges. Mesures réalisées à  $\Delta h=0.06$  mm,  $v_x=50$   $\mu$ m s<sup>-1</sup> et  $\Delta y=5\mu$ m.

L'analyse de ces résultats permet de soulever les remarques suivantes :

En absence du biofilm, c.à.d avant immersion dans le circuit d'eau, les cartographies montrent que les valeurs des potentiels sont fluctuantes. Ces fluctuations peuvent être dues à la sensibilité de la mesure qui peut augmenter avec de nombreux paramètres, tels que le polissage ou la pointe de la microélectrode. En comparant ces cartographies à celles obtenues après 5 jours, on constate un comportement différent traduit par une quasi-stabilité des valeurs de potentiels sur toute la surface de l'électrode analysée.

Ces dernières cartographies devraient être considérées comme l'état de surface initial de l'électrode, puisque à des temps courts le biofilm n'est qu'à sa phase d'initiation [6, 24-31].

À 15 jours d'immersion, les différences de potentiel demeurent relativement stables avec apparition de pics d'intensités différentes, qui varient entre 0,001 mV à 0,0035 mV. Ce changement d'état de surface peut être expliqué par un début de formation du biofilm, qui consiste à former des matrices exopolymériques, permettant aux bactéries de s'accrocher à la surface du matériau. Une modification plus importante de l'état de surface du platine est également enregistrée à 26 jours d'immersion. Le nombre de pics augmente ainsi que leurs intensités.

Cependant, les pics observés sur les biofilms plus âgés (formés au bout de 34 jours) sont d'une intensité moins élevée alors que l'on s'attendrait à un comportement contraire.

En conclusion, ces mesures locales ont permis de mettre en évidence le caractère hétérogène du biofilm sur une électrode de platine en eau potable. Elles ne représentent qu'une approche préliminaire nécessitant une étude plus poussée dans l'interprétation et la compréhension de ce phénomène.

#### Conclusion Générale

Le travail présenté dans ce mémoire sur la cinétique de formation des biofilms constitue une première approche, entreprise par notre laboratoire, sur cette thématique.

Les biofilms sont souvent considérés comme indésirables, voire nuisibles dans de nombreux secteurs d'activités comme la distribution d'eau potable, les industries agroalimentaires, pharmaceutiques, électroniques...

Les effets négatifs sur les matériaux et équipements sont nombreux : écran hydrodynamique, diminution des échanges thermiques, perte de propriétés optiques, blocage de fonctions mécaniques, accélération de la corrosion ou biodégradation. Les dépenses annuelles attribuées à l'existence des biofilms sont par conséquent considérables.

Pour palier à ces nombreux inconvénients dont ils sont la cause et lutter contre la formation de biofilms, une meilleure compréhension des mécanismes de fixation et de développement des biomasses est indispensable.

L'objectif de ce travail est double, d'une part valider la méthode électrochimique recommandée dans la littérature pour la caractérisation des biofilms, basée sur l'analyse du courant limite de diffusion d'un traceur électrochimique sur une surface immergée dans un milieu aqueux et d'autre part, apporter de nouvelles informations dans l'étude de biofilms grâce à l'utilisation des mesures locales, en l'occurrence, la technique d'électrode de référence à balayage (SRET). L'application de cette technique de pointe permettra à priori de mieux suivre les étapes de formation de biofilm.

Dans un premier temps, nous avons à travers cette étude, effectué une synthèse bibliographique sur le sujet. Cela nous a permis de nous rendre compte de la complexité structurale et physiologique de telles matrices mais également de collecter des données fortes intéressantes.

Une installation simulant un réseau de distribution d'eau potable a été réalisée au laboratoire comportant des échantillons métalliques en or et en platine.

Nous avons mis en évidence que l'adhésion des micro-organismes s'adsorbent sur les surfaces étudiées. Des mesures d'épaisseur de la couche diffuse constituant le biofilm ont été estimées grâce à l'utilisation du dispositif de l'électrode à disque tournant. Les résultats obtenus confirment le fait que la croissance du biofilm est rapide durant les premiers jours puis tend à se stabiliser.

La mesure de l'épaisseur en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode a mis en évidence un caractère élastique du biofilm, c'est à dire, que celui-ci peut se déformer sous l'action de la vitesse de rotation et reprendre ensuite son épaisseur initiale quand la contrainte cesse.

Cette méthode électrochimique, qui permet de suivre l'évolution de l'épaisseur du biofilm, s'avère être un outil simple et fiable. Elle peut être utilisée en toute rigueur comme capteur de détection de biofilm pour contrôler son développement ainsi que pour évaluer l'efficacité des traitements physico-chimiques au sein d'un circuit donné.

L'hétérogénéité du biofilm rend plus difficile la compréhension de sa cinétique de formation et de son mode d'action envers les matériaux. Cette structure complexe est mise en évidence dans notre travail par des mesures locales en utilisant la Technique d'Électrode de Référence à Balayage (SRET). Cette analyse à l'échelle micrométrique a permis d'enregistrer des cartographies sur le substrat platine à différents âges du biofilms. Il s'avère qu'après deux semaines d'immersion la surface du platine présente un changement de sa réactivité exprimé par la variation des valeurs du potentiel libre. Des pics à différentes zones et à différentes intensités sur la surface du platine sont enregistrés.

Ce travail a permis la détection et le suivi de la formation de biofilms sur des substrats modèles à partir d'une eau potable. De nombreuses perspectives pour une recherche plus approfondie sur cet axe sont à envisager, compte tenu de l'importance pratique du sujet en question. On imagine facilement tout l'intérêt que prendrait ce type de mesures en biocorrosion sur une électrode d'acier. Différentes qualités d'eau (eau potable, eau de mer, eau industrielle, eau de rivière, ...) peuvent être envisagées pour la réalisation de l'étude.

Des applications pour le traitement de ces biofilms sont également prévues. Elles peuvent être associées aux techniques de prévention et/ou de contrôle du développement des biofilms de façon à optimiser leurs performances.

- **J. D. Bryers**; *Biofilms and the technological implications of microbial cell adhesion*; Colloids Surf. B: Biointerfaces, 2 (1994) 9-23.
- **F. G. Ferris, T. R. Jack, B. J. Bramhill**; Corrosion products associated with attached bacteria at an oil field water injection plant; Can. J. Microbiol. 38 (1992) 1320-1324.
- **F. Feugeas, J. P. Magnin, A. Cornet, J. J. Rameau**; Corrosion influencée par les microorganismes, influence du biofilm sur la corrosion des aciers, techniques et résultats récents; Journal de Physique III, 7 (1997) 631-663.
- 4 **O. Wanner, M. Bauchrowitz**; *Les biofilms sont omniprésents*; Article Thèmatique, Eawag News 60f (2006) 4-7.
- 5 **T. Egli**; *Biofilms: Both a Curse and a Blessing*; Editorial Eawag News 60e (2006).
- 6 **E. Dajoux Malard**; Corrosion des aciers faiblement allies en eau de mer naturelle : Influence des éléments d'alliage et des bactéries; Thèse de Doctorat, Université CAEN / Basse-Normandie (2006).
- 7 **M. T. Madigan, J. M Martinko**, *Brock Biology of Microorganisms*, 11<sup>th</sup> Ed. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ (2005).
- 8 **J. Perry, J. Staley, S. Lory**; *Microbiologie*. Éditions Dunod (2004).
- 9 **C. Forêt** ; Maintien de la qualité des eaux dans les réseaux par des procédés innovants de traitement et de détection des biofilms ; Thèse de Doctorat ; université de Poitiers (2006).
- 10 **C. Forêt, N. Merlet, B. Tribollet, G. Chaussec, B. Legube**; *Détermination électrochimique de l'épaisseur des biofilms dans les circuits d'eau*; Matériaux et Techniques 94 (2006) 467-476.
- A. M. Shams El Din, T. M. H. Saber, A. A. Hammoud; Biofilm formation on stainless steels in Arabian Gulf water; Journal of Desalination 107 (1996) 251-264.
- J. Wimpenny, W. Manz, U. Szewzyk; Heterogeneity in biofilm; FEMS Micro biology Reviews, 24 (2000) 661-671.
- 13 **I. Dupont-Morral** ; *De la microbiologie dans la compréhension des phénomènes de corrosion microbienne un exemple : étude de l'inter- influence de la flore sulfurogène et la protection cathodique* ; Mémoire de H.D.R., Université Sciences et Technologies de Lille 1 (2005).
- **I. B. Beech**; *Sulfate-reducing bacteria in biofilms on metallic materials and corrosion*; Microbiology today, Vol.30 (2003)115-117.
- **D. H. Guillou**; Détection d'un biofilm et mesure de son épaisseur par des techniques électrochimiques. Développement d'un capteur; Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI (2000).
- **J. V. Matson, W. G. Characklis**; *Diffusion into microbial aggregates*; Water Research Vol. 10 (1976) 877-885.
- 17 **H. A. Videla, W. G. Characklis**; *Biofouling and microbially influenced corrosion*; International Biodeterioration and Biodegradation, 29(1992)195.

- J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. Caldwell, D. Korber, H. M. Lappin-Scott; *Microbial biofilms*; Annual Review of Microbiology, **49**(1995)711.
- 19 **J. Wimpenny**; *Biofilms*: *Structure and organization*; Microbial Ecology in Health and Disease, 8(1995)305.
- J. W. T. Wimpenny, S. L. Kinniment, M. A. Scourfield; *In Microbial Biofilms : Formation and Control*; The Society for Applied Bacteriology, Editor(1993).
- 21 **M. C. M. Van Loosdrecht, C. Picionearu, J. J. Heijnen**; *A more unifying hypothesis for biofilm structures*; FEMS Microbiology Ecology, 24 (1997)181.
- J. Lefebvre, J.-C. Vincent; Control of the biomass heterogeneity in immobilized cell systems. Influence of initial cell and substrate concentrations, structure thickness, and type of bioreactors; Enzyme and Microbial Technology, 20, (1997)536-543.
- **Z. Lewandowski, H. Beyenal**; Limiting-Current-Type Microelectrodes for Quantifying Mass Transport Dynamics in Biofilms; Methods in enzymology, Academic Press, Vol.23(2001) 339-359.
- **I. D. Bryers, W. G. Characklis**; *Processes governing primary biofilm formation*; Biotechnology and Bioengineering; 24(1982)2451.
- C. Compère, L. Lemoine, C. Lemaitre, N. Pébère, D. Festy; *Protection cathodique et biofilm*; Biodétérioration des Matériaux, Editors, EDP Sciences, (1998)196.
- S. Hao, B. Moran, D. Chopp; Biofilm growth: perspectives on two-phase mixture flow and fingerings formation; Solid Mechanics and Its Applications; Ed. Springer Netherlands (2006)273–290.
- Q. Wang, T. Zhang, N. Cogan; *Modeling Biofilms Using Complex Fluid Models*; Department of Mathematics Florida State University Tallahassee, FL 32306, FSU.
- H. C. Flemming, C. Lemaitre, N. Pébère, D. Festy; *Biofilms*, in Biodétérioration des Matériaux, Editors, EDP Sciences (1998).
- 29 **L. F. Melo, T. R. Bott**; *Biofouling in water systems*; Experimental Thermal and Fluid Science, 14, (1997) 375.
- 30 H. A. Videla, F. Bianchi, M. M. S. Freitas, C. G. Canales, J. F. Wilkes, J. R. Keans, B. Little; *Monitoring biocorrosion and biofilms in industrial waters : a pratical approach*; Microbiologically influenced corrosion testing, Editors, Philadelphia, (1994)128.
- 31 **T. S. Whitham**; Challenges to the Prediction and Monitoring of Microbially Influenced Corrosion in the Oil Industry; Microbial Corrosion, Portugal, The Institute of Materials, European Federation of Corrosion, 15(1994)314.
- **P. Hierniaux**; Contribution de la fraction minérale des eaux au développement et à la structure des biofilms : apport des méthodes microscopiques et spectroscopiques; Thèse, université de Poitiers (2005).
- **S. Sibler, M. Dittrich**; *Précipitation de calcite à la surface des cyanobactéries*; Eawag News 60f (2006) 14-15.
- 34 **F. L. Roe, Z. Lewandowski, T. Funk**; Simulating microbiologically influenced corrosion by depositing extracellular biopolymer on mild steel surface; Corrosion, Vol. 52 (1996) 744-752.

- **Y. Gauthier, P. Isoard**; *L'adhésion des bactéries sur les surfaces*; Industries alimentaire et agricole, 106, 1-2, 31-33.
- **E. S. Beardwood**; *Modelling and performance monitoring of biofilms*; in Corrosion, The NACE International, Houston (1995)201.
- 37 **S. Okabe, H. Kuroda, Y. Watanabe**; *Significance of biofilm structure on transport of inert particulates into biofilms*; Water Science and Technology, 38 (8-9), (1998)163.
- 38 Y. Tsai, T. Y. Pai, J. M. Qiu; The impact of the AOC concentration on biofilm formation under higher shear force condition; Journal of Biotechnology, 111 (2004) 155-167.
- J. C. Block, K. Haudidier, J. L. Paquin, J. Miazga, Y. Levi; Biofilm accumulation in drinking water distribution système; Biofouling,6 (1993) 33-343.
- N. B. Hallam, J. R. West, C. F. Forster, J. Simms; The potential for biofilm growth in water distribution systems; Water Research, 35, 17(2001) 4063-4071.
- 41 **R. Boe-Hansen, H. –J. Albrechtsen, E. Arvin, C. Jorgensen**; *Dynamics of biofilm formation in model drinking water distribution system*; Journal of Water Supply, Research and Technology, AQUA, 51, 7 (2002) 399-406.
- 42 **W. J. Dunne**; *Bacterial adhesion: Seen any Good biofilms Lately*; Clinical Microbiology Review, 15, 2(2002) 155-166.
- 43 **I. B. Beech, J. Sunner**; *Biocorrosion : towards understanding interactions between biofilm and metals*; Current Opinion in Biotechnology, 15, (2004)181-186.
- **S. Ndiongue, P. M. Huck, R. M. Slawson**; Effects of temperature and biodegradable organic matter on control of biofilm by free chlorine in a model drinking water distribution system; Journal of Water Research 39 (2005) 953-964.
- **D. Féron**; Comportement des aciers en environnement naturel: cas des aciers inoxydables en eau de mer; Matériaux et Techniques 93(2005) 43-58.
- 46 **H. H. P. Fang, L.-C. Xu, K.-Y. Chan**; *Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion*; Journal of Water Research 36 (2002) 4709-4716.
- 47 **C. Compère**; *Biofilms en milieu marin*; Techniques Sciences Méthodes, N°11 (1999) 48-54.
- 48 **X. Sheng, Y.-P. Ting, S. O. Pehkonen**; *The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316*; Journal of Corrosion Science 49 (2007) 2159-2176.
- 49 **A. Balaji, T. K. Radhakrishnan**; *Fiber-optic sensors for the estimation of pH within natural biofilms on metals*; Science and Actuators B 123 (2007) 1107-1112.
- J. Gamby, A. Pailleret, C. Boucher, C.-M. Pradier, B. Tribollet; Caractérisation par microscopie, spectroscopie et électrochimie d'un biofilm à partir d'une eau potable sur acier inoxydable; Matériaux et Techniques, 94(2006)441-454.
- 51 **B. R. Baba, S. Maruthamuthu, A. Rajasekar, N. Muthukumar, N. Palaniswamy**; *Microbiologically influenced corrosion in dairy effluent*; Journal, Environ. Sci. Tech. Vol. 3, (2006)159-166.

- 52 **L. Jing, Z. Jiashen, X. Liming**; *The corrosion behavior of 70/30 copper-zinc alloy under the biofilm of sulfate-reducing bacteria*; J. Materials and Corrosion, 52 (2001)833-837.
- 53 C. Rubio, C. Ott, C. Amiel, I. Dupont-Moral, J. Travert, L. Mariey; Sulfato/thiosulfato reducing bacteria characterization by FT-IR spectroscopy: A new approach to biocorrosion control; Journal of Microbiological Methods 64 (2006)287-296.
- **S. J. Yuan, A. M. F. Choong, S. O. Pehkonen**; *The influence of the marine aerobic Pseudomonas strain on the corrosion of 70/30 Cu-Ni alloy*; J. Corrosion Science 49 (2007) 4352-4385.
- J. D. Oliver; Formation of viable but nonculturable cells; Starvation in Bacteria, Ed. Kjelleberg S. Plenum Press, New York (2000) 239-272.
- 56 **R. I. Amman, W. Ludwig, K. H. Schleifer**; *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*; Microbiological Reviews, 59 (1995) 143-169.
- 57 **M. Chevrou, A. Roudiere** ; *Les biofilms* ; Rapport de stage, Option Méthodologies d'analyses, Ecole Nationale de Chimie de Rennes, (2004).
- 58 **H. Castaneda, X. D. Benetton**; SBR-biofilm influence in active corrosion sites formed at the steel-electrolyte interface when exposed to artificial seawater conditions; Corrosion Science; Vol. 50 (2008)1169-1183.
- E. Miranda, M. Bethencourt, F. J. Botana, M. J. Cano, J. M. Sanchez-Amaya, A. Corza, J. Garcai de Lomas, M. L. Fardeau, B. Ollivier; Biocorrosion of carbon steel alloys by an hydrogenotrophic sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio Capillatus isolated a Mexican oil field separator; Journal Corrosion Science 48 (2006) 2417-2431.
- 60 **P. S. Stewart, R. Murga, R. Srinivasani, D. Beer**; *Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods*; Wat. Res. Vol. 29, No.8(1995)2006-2009.
- **S. Chongdar, G. Gunasekaran, P. Kumar**; *Corrosion inhibition of mild steel by aerobic biofilm*; Electrochimica Acta, 50 (2005) 4655–4665.
- J. Van Heerden; M. Turner, D. Hoffmann; J. Moolman; Antimicrobial coating agents: can biofilm formation on a breast implant be prevented?; Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery (2008)1-8.
- 63 **S. J. Yuan; S. O. Pehkonen**; *Microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by aerobic Pseudomonas NCIMB 2021 bacteria: AFM and XPS study*; Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 59 (2007) 87–99.
- **R. Bekke, R. Kommedal, S. Kalvenes**; *Quantification of biofilm accumulation by on optical approach*; Journal of Microbiological Methods, 44(2001) 13-26.
- 65 **H. C. Flemming**; *Old and news methods for biofilm monitoring*", in Interaction of Microbial Systems with Industrial Materials, Hungary (1996)511.
- 66 **D. E. Nivens, J. Q. Chambers, T. R. Anderson, D. C. White**; Long-Term, On-Line Monitoring of Microbial Biofilms Using a Quartz Crystal Microbalance; Anal. Chem. 65(1993) 05-09.

- J. Rickert, T. Weiss, Q. Krass, G. Jung, W. Göpel; A new affinity biosensor: Self-assembled thiols as selective monolayer coatings of quartz crystal microbalances; Biosensors & Bioelectronics; 11 (1996) 591-598.
- 68 Y. Zhang, V. Telyatnikov, M. Sathe, X. Zeng, P. G. Wang; Studying the Interaction of r-Gal Carbohydrate Antigen and Proteins by Quartz-Crystal Microbalance; Journal of American Chemical Society, 125 (2003) 9292-9293.
- 69 **E. Eguia, A. Trueba, B. Rio-Calonge, A. Giron, C. Bielva**; Biofilm control in tubular heat exchangers refrigerated by seawater using flow inversion physical treatment; International Biodeterioration & Biodegradation (2007).
- G. Salvago, G. Fumagalli, P. Critiani, G. Rocchini; *Biofilm monitoring and on-line control : 20-month experience in seawater*; Microbial Corrosion, European Federation of Corrosion, Editors, Institute of Materials (1994)301.
- 71 **P. S. N. Stokes, M. A. Winters, P. O. Zuniga, D. J. Scholottenmeir**; *Developments in on-line fouling and corrosion surveillance*; Microbiologically influenced corrosion testing, Philadelphia (1994)99.
- J. Keirsse, C. Boussard-Pledel, B. Bureau, O. Sire, O. Loreal, J. Lucas; Capteurs à fibres optiques infrarouge dédiés à la détection in situ d'anomalies métaboliques; J. Phys. IV France 12 (2002) 217.
- 73 **M. A. Siebel, W. A. Characklis, R. Bakke**; *Non-destructive methods for detecting organic deposits and removing them*; Research and Development Institute, Montana State University, US4912332, USA (1990).
- A. Delille, F. Quilès, F. Humbert; In Situ Monitoring of the Nascent Pseudomonas fluorescens Biofilm Response to Variations in the Dissolved Organic Carbon Level in Low-Nutrient Water by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy; Applied and Environmental Microbiology, Vol. 73, No. 18 (2007) 5782-5788.
- 75 **F. Humbert, F. Quilès**; Caractérisation in situ par spectroscopie ATR/FTIR de biofilm monocouches de Pseudomonas Fluorescens; 3<sup>eme</sup> journées thématiques du RNB, Université de Nancy, juin (2008).
- **F. Feugeas, G. Ehret, A. Cornet**; *Microsonde électronique et caractérisation de biofilms sur aciers*; J. Phys. IV France 06 (1996) 931- 937.
- 77 **D. Van der Kooija; H. R. Veenendaala, W. J. H. Schefferb**; Biofilm formation and multiplication of Legionella in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene; Journal of Water Research 39 (2005) 2789–2798.
- 78 **D. G. Bourne, L. Hoj, N. S. Webster, J. Swan, M. R. Hall**; *Biofilm development within a larval rearing tank of the tropical rock lobster, Panulirus ornatus*; Journal of Aquaculture 260 (2006) 27–38.
- 79 **S. Chongdar, G. Gunasekaran, P. Kumar**; Corrosion inhibition of mild steel by aerobic biofilm; J. Electrochimica Acta 50 (2005) 4655–4665.
- 80 M. Tian, N. Kanavillil, L. Davey, K. T. Leung, H. Schraft, A. Chen; Direct growth of biofilms on an electrode surface and its application in electrochemical biosensoring; J. Electroanalytical Chemistry 611 (2007) 133–139.

- **E. J. Pérez, R. Cabrera-Sierra, I. Gonzalez, F. Ramirez-Vives**; Influence of Desulfovibrio sp. biofilm on SAE 1018 carbon steel corrosion in synthetic marine medium; Corrosion Science 49 (2007) 3580–3597.
- M. Morikawa; Beneficial Biofilm Formation by Industrial Bacteria Bacillus subtilis and Related Species; Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 101, N°.1(2006)1–8.
- I. Neria-Gonzaleza, E. T. Wanga, F. Ramirezb, J. M. Romeroc, C. Hernandez-Rodrigueza; Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico Anaerobe; Ecology/Environmental Microbiology; 12 (2006) 122–133.
- Y. C. Chang, M. Le Puila, J. Biggerstaffb, A. A. Randall, A. Schultec, J. S. Taylora; Direct estimation of biofilm density on different pipe material coupons using a specific DNA-probe; Molecular and Cellular Probes, 17 (2003) 237-243.
- **C. Marconnet, C. Dagbert, M. Roy, D. Féron**; *Comportement d'aciers inoxydables en eaux naturelles*; Matériaux et Techniques; 93 (2005)83-90.
- A. Bergel, D. Féron, A. Mollica; Analysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm; Electrochemistry Communications 7(2005) 900-904.
- **F. Agostini**; On-line monitoring of chlorination treatments at Vado Ligure power plant by BIOX system: tow year of experience. Mitigation of heat exchanger fouling and its economic and environmental impact; Banff, Alberta, Canada (1999).
- H. C. Flemming, A. Tamachkiarowa, J. Klahre, J. Schmitt; *Monitoring of fouling and biofouling in technical systems*; Wat. Sci. Technol., 38 (1998) 291-298.
- **M. J. Vieira, I. A. Pinho, S. Giao, M. I. Montenegro**; The use of Cyclic Voltammetry to detect biofilm formed by Pseudomonas fluorescens on Platinum electrodes; Biofouling, 19, 4 (2003) 215-222.
- **D. Herbert-Guillou, B. Tribollet, D. Festy**; *Influence of the hydrodynamics on the biofilm formation by mass transport analysis*; Bioelectrochemistry, 53 (2000) 119-125.
- **H. Cachet, T. El-Moustafid, D. Herbert-Guillou, D. Festy, S. Touzian, B. Tribollet**; *Characterization of deposits by direct observation and electrochemical methods on a conductive transparent electrode*; Electrochemica Acta, 46 (2001) 3851-3857.
- **J. Béraud** ; *Le technicien d'analyse biologique, guide théorique et pratique* ; Edition Médicales Internationales ; (2001)847-848.
- **R. Roy, L. Robert**; *Travaux pratique de microbiologie*, Ed. Maloine, Paris, pp39-50(1979).
- **J. Pelmont**; Bactéries et environnement, Adaptations physiologiques; Ed. EPD Sciences, Grenoble sciences (1993)13.
- **J. Rodier**; *L'analyse de l'eau*; 7<sup>eme</sup> Ed. Dunod, Paris (2005).
- **M. T. Hynry, J. P. Beaudry**; *Chimie des eaux*; Ed. Les griffons d'argiles, Monterial; P340.
- **V.G Levich**; *Physicochemical Hydrodynamics*, Ed. P. Hall, New Jersey, Englewood Cliffs (1962).

- **E. L'Hostis** ; *Détection et caractérisation de biofilms par méthodes électrochimiques* ; Thèse de l'Université Paris VI, spécialité Electrochimie (1996).
- **F. F. Feugeas, A. Cornet, B. Tribollet**; *Biodétérioration des matériaux, Action des micro-organismes, de l'échelle nanométrique à l'échelle macroscopique*; Ellipses Edition Marketing S. A. (2008)209.
- **I. Frateur;** *Incidence de la corrosion des matériaux ferreux sur la demande en chlore libre en reseaux de distribution d'eau potable*; Thèse de doctorat de l'université Paris 6 (1997).
- **C. Deslouis, D. Festy, O. Gil, V. Maillot, S. Touzain, B. Tribollet**; Kinetic and characterization of calcareous deposit in artificial sea water by impedance technique.2-Desposit of  $Mg(OH)_2$  without  $CaCO_3$ ; J. Electrochemica Acta, Vol. 45, p.1837-1845 (2000).
- **C. Barchiche**; Caractérisation et cinétique de formation des dépôts calcomagnésiens sur acier en eau de mer artificielle; Thèse doctorat, université de la Rochelle (2004).
- **E. Fortin**; Microscopie électrochimique pour l'élaboration et la caractérisation de bio-assemblages sur électrode : application aux biopuces ; Thèse de Doctorat à l'université Joseph Fourier Grenoble I (2005).
- **N. Portail** ; Mesures électrochimiques locales pour l'étude de la corrosion du fer par piqûre ; Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie paris VI (2007).
- **R. J. Forster**; *Microelectrodes: New dimensions in* electrochemistry; Chemical Society Reviews, 23 (1994) 289-297.
- **L. Rajendran, S. P. Ananthi**; Transient chronoamperometric current response at hemispheroidal ultramicroelectrodes; Journal of Electroanalytical Chemistry 501(2001)210-214.
- **C. Amatore**, *Physical Electrochemistry*. *Principles*, *methods*, *and applications*; Rubinstein, I., Ed.; Marcel Dekker: NY ed., (1995).
- N. Zine, J. Bausells, F. Vocanson, R. Lamartine, Z. Asfari, F. Teixidor, E. Crespo, I. A. M. Oliveira, J. Samitier, A. Errachid; Potassium-ion selective solid contact microelectrode based on a novel 1,3-(di-4-oxabutanol)- calix[4]arene-crown-5 neutral carrier; Electrochimica Acta, Vol.51, Issue 24, 15(2006) 5075-5079.
- 109 C. Wei, A. J. Bard, G. Nagy, K. Toth; Scanning Electrochemical Microscopy. 28. Ion-Selective Neutral Carrier-Based Microelectrode Potentiometry; Analytical Chemistry, 67 (1995) 1346-1356.
- **A. J. Bard, F. R. Fan, M. V. Mirkin**; *Scanning Electrochemical Microscopy*; Physical Electrochemistry, Rubinstein, I.,Ed.; Marcel Dekker: NY ed. (1995) 209-242.
- M. Zhang, B. Su, F. C. Salazar, M. Hojeij, H. H. Girault; *SECM photography*; Electrochemistry Communications 10 (2008)714–718.
- **D. R. Rolison**; Fabrication of Ultramicroelectrodes; Datatec Systems, INC.Morganton, NC ed., (1987).
- **I. M. Zin**; Corrosion of galvanized steel with damaged epoxy coatings; Materials Science, Vol. 3, 6(2001)990-992.

- 114 C. Gabrielli, S. Joiret, M. Keddam, N. Portail, P. Rousseau, V. Vivier; Single pit on iron generated by SECM An electrochemical impedance spectroscopy Oinvestigation; Electrochimica Acta 53 (2008) 7539–7548.
- W. S. Roberts, D. J. Lonsdale, J. Griffiths, S. P. J. Higson; Advances in the application of scanning electrochemical microscopy to bioanalytical systems; Biosensors and Bioelectronics, 23 (2007) 301–318.
- N. Cui, H. Y. Ma, J. L. Luo, S. Chiovelli; Use of scanning electrode technique for characterizing pitting and general corrosion of carbon steel in neutral media; Electrochemistry Communication, 3(2001)716-721.
- 117 **E. Ghali, W. Dietzel, K.-U. Kainer**; *Testing of General and Localized Corrosion of Magnesium Alloys*; JMEPEG, 13 (2004)517-529.
- 118 **P. Marcus, F. Mansfeld;** *Analytical Methods in Corrosion Science*; CRC press, Taylor and Francis Group, (2006) Chap15.
- 119 **E. Bayet;** Contribution à la mesure de l'impédance électrochimique locale. Conception et mise au point d'une nouvelle technique basée sur l'électrode vibrante (SVET). Application à des systèmes modèles et à des cas de corrosion; Thèse à l'université P. et M. Curie, Paris (VI), (1997).
- 120 V. S. Voruganti, H. B. Luft, D. DeGeer, S. A. Bradford; Scanning reference electrode technique for the investigation of preferential corrosion of weldments in offshore applications; Corrosion, 47(1991) 343.
- W. Zhang, S. Jin, E. Ghali, R. Tremblay, M. Shehata, E. Es-Sadiqi; Corrosion Behavior of AZ91D and AJ62x Magnesium Alloys in Chloride Media; Advanced Engineering Materials, Vol. 8, 10(2006)973 980
- 122 C. L. Lin, J. L. Luo, X. D. Zhou, Z. W. Tian; Scanning Microelectrode Studies of early Pitting Corrosion of 18/8-Stainless-Steel; Corrosion, 54 (1998) 265.
- H. S. Isaacs, G. Kissel; Surface Preparation and Pit Propagation in Stainless Steel. Electrochem. Soc., 119 (1972) 1628.
- 124 **P. J. Kinlen, V. Menon, Y. Ding**; Corrosion and protection of mild steel using sulfonic and phosphonic acid-doped polyanilines; J. electrochem. Sco. 146 (1999) 3690.
- E O. Koster, W. Schuhmann, H. Vogt, W. Mokwa; Quality control of ultramicroelectrode arrays using cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy and scanning electrochemical microscopoy; Sensors and Actuators B 76 (2001) 573-581.
- **Z. Suo, X. Yang, R. Avci, L. Kellerman, D. W. Pascual, M. Fries, A. Steele;** *HEPES-Stabilized encapsulation of Salmonella typhimurium*; Langmuri, 23 (2007)1365-1374.
- **J. W. Costerton;** *Introduction to biofilms*; International Journal of Antimicrobial Agents, 11(1999) 217.

# **ANNEXE 1**

#### Coloration de Gram:

Diverses techniques sont utilisées, mais toutes respectent la chronologie suivante :

- 1) Coloration par le violet de gentiane : Laisser agir 1 minute ; Rincer à l'eau déminéralisée.
- 2) Mordançage au Lugol (solution d'iode iodo-iodurée): étaler le lugol et laisser agir 1 minute ; rincer à l'eau déminéralisée. L'échantillon doit toujours apparaître bleuviolet.
- 3) Décoloration à l'alcool : verser goutte à goutte d'alcool à 95% sur la lame inclinée obliquement. Le liquide doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer aussitôt sous un filet d'eau déminéralisé. NB : un mélange alcool-acétone est parfois utilisé à la place de l'alcool.
- 4) Recoloration à la safranine ou à la fuschine : Laisser agir 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Laisser sécher la lame 10 à 15 minutes.
- 5) Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer à l'objectif x100.

Le violet de gentiane colore le contenu des bactéries et est décoloré par l'alcool, qui ne franchit que les parois des bactéries à Grams négatifs. Elles apparaîtront donc en rouge au microscope (la couleur de la coloration finale qui permet de contraster), alors que les bactéries à Gram positif, ne pouvant être décolorées à l'alcool, garderont la teinte bleu-violet du violet de gentiane.

# **ANNEXE 2**

## Caractérisations physico-chimiques de l'eau :

### Dosage des chlorures par la méthode de « MOHR » :

Cette méthode de dosage est celle homologuée en France « NF-T90-014 février 1952» pour analyser la teneur en Cl dans l'eau. Les chlorures sont dosés en milieu neutre, par une solution titrée de nitrate d'argent en présence de chromate de potassium. La réaction s'achève par l'apparition d'une teinte rouge, caractéristique du chromate d'argent, formé par la présence d'un excès d'une solution de nitrate d'argent.

$$2Ag^{+} + CrO_{4}^{2-} \rightarrow Ag_{2}CrO_{4}$$
 (Précipitation rouge brique)

Le mode opératoire est le suivant : à 25 ml d'échantillon, on ajoute à l'aide d'une pipette 1 ml d'indicateur  $K_2Cr_2O_7$  à 10 %, ensuite on effectue un titrage par addition progressive de nitrate d'argent,  $AgNO_3$ , (0,01N) jusqu'à obtention d'une coloration à peine brunâtre ou mieux, jusqu'à ce que la solution cesse d'être jaune citron.

Les résultats sont exprimés par la relation suivante :

$$Cl^{-}(mg/l) = \frac{N.V.35,5}{V(Echantillon)}$$

où N: Normalité d'AgNO<sub>3</sub>; V: volume d'AgNO<sub>3</sub> titrant.

#### > Dureté totale (TH) :

La méthode de détermination de la dureté totale permet de doser la somme des ions calcium et magnésium. Une liaison de coordinance s'établie entre le métal et chaque atome d'azote de l'acide éthylène diamine tetra acétique (EDTA), ce qui conduit à la formation d'un complexe cyclique (chélate).

Le mode opératoire est le suivant : on prélève 50 ml de l'eau à analyser à laquelle on ajoute 4 ml de solution tampon ammoniacal (pH=10) et une pincée de l'indicateur coloré noir Erichrome T. Ensuite, on titre le mélange avec la solution d'EDTA (0.02N) jusqu'au virage de rouge au : 1<sup>er</sup> cas : bleue, implique TH=0.

 $2^{\text{\'eme}}$  cas : rouge brique, implique un titrage avec l'EDTA jusqu'à l'apparition d'une coloration bleue.

La dureté est donnée par les équations suivantes :

$$TH(^{\circ}F) = \frac{(N.V_{EDTA}.5000)}{V(Echantillo\ n)}$$

### ➤ Le titre alcalimétrique complet (TAC) :

Le titre alcalimétrique complet ou (TAC) mesure la somme des alcalins libres, des carbonates et des bicarbonates.

L'alcalinité d'une eau d'alimentation est essentiellement due aux ions carbonate  $CO_3^2$  et hydrogénocarbonate  $HCO_3^-$ . Ces deux ions peuvent donc réagir avec les ions oxonium  $H_3O^+$ : ainsi, l'alcalinité d'une eau peut se mesurer à partir d'un titrage réalisé avec de l'acide chlorhydrique et s'exprime par les titres alcalimétriques.

Le mode opératoire est le suivant : Prélever 50 ml d'eau à analyser dans un Erlenmeyer de 250 ml et ajouter 1 à 2 gouttes de phénophtaléine à 0,5%. Une coloration rose doit alors apparaître ; dans le cas contraire le TAC est nul, ce qui se produit en général pour les eaux naturelles dont le pH < 8,3. Verser ensuite doucement l'acide (0,02 N) dans la capsule à l'aide d'une burette, en agitant constamment et ceci jusqu'à décoloration complète de la solution (pH=8,3). Soit V le nombre de millilitres d'acide versés (V= 0ml dans notre cas). Utiliser l'échantillon traité précédemment ou le prélèvement primitif s'il n'y a pas de coloration. Ajouter 2 gouttes de méthylorange à 0,5 % et titrer de nouveau avec le même acide jusqu'au virage du jaune au jaune orangé (pH = 4,3). Soit V' le nombre de millilitres d'acide versés depuis le début du dosage. Retrancher 0,5 ml, quantité d'acide nécessaire pour le virage de l'indicateur, qui est un peu plus faible que le pH de neutralisation exacte de l'hydrogénocarbonate.

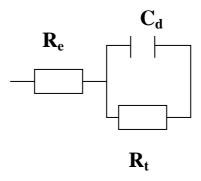
Les résultats sont exprimés par la relation suivante :

$$TAC\ (m\acute{e}q/l) = (V'_{H_2SO_4} - 0.5)N_{H_2SO_4} \times 0.1$$

# **ANNEXE 3**

Détermination de la capacité aux hautes fréquences par la méthode de la mesure de l'impédance électrochimique :

Dans le domaine de hautes fréquences, la contribution du processus de diffusion est négligeable devant le transfert de charge. L'interface métal/solution peut alors être schématisée par le circuit équivalent suivant :



L'impédance d'un tel circuit est donnée par la formule :

$$Z = R_e + \frac{1}{j\omega C_d + 1/R_t} \tag{1}$$

Cette expression peut aussi s'écrire

$$Z = R_e + \frac{R_t}{1 + \omega^2 R_t^2 C_d^2} - j \frac{\omega R_t^2 C_d}{1 + \omega^2 R_t^2 C_d^2} = Z' + j Z''$$
 (2)

En opérant à des fréquences appropriées, le terme  $\omega^2 R_t^2 C_d^2$  peut être considéré plus élevé que l'unité (c'est-à-dire  $\omega$ ) $\lambda 1/R_t C_d$ ) et par conséquent la partie imaginaire de Z est :

$$Z'' = -1/\omega C_d \tag{3}$$

A partir du tracé de la courbe  $-1/(Z''\omega) = f(1/\omega)$ , nous pouvons déduire la valeur de la capacité en tendant  $\omega \to \infty$ .

Résumé: Les surfaces immergées dans un environnement aqueux se recouvrent progressivement d'un film lié à la présence de matière minérale et organique. Celui-ci constitue un milieu favorable pour l'adhésion et le développement des microorganismes, formant ainsi un biofilm. Ces derniers sont parfois à l'origine de la dégradation de la qualité des eaux et de problèmes de contamination bactériologique des eaux transportées. La méthode électrochimique d'estimation de l'épaisseur du biofilm a pour objectif d'apporter une contribution à la compréhension des étapes de mécanismes de formation de cette couche en l'associant à des analyses microbiologiques. Des mesures d'épaisseur de la couche poreuse constituant le biofilm formé sur des substrats modèles, de l'ordre de quelques micromètres, ont été estimées. Les résultats obtenus confirment la croissance rapide du biofilm durant les premiers jours d'immersion des électrodes puis tend à se stabiliser. Il a été montré que ces biofilms présentaient un caractère élastique et que leur épaisseur est fonction de la vitesse de l'écoulement. Le caractère élastique est plus ou moins prononcé à faible vitesse d'agitation. L'application la technique d'électrode de référence à balayage (SRET) permettra a priori de mieux suivre les étapes de formation du biofilm. L'étude est réalisée sur des échantillons métalliques en platine, immergés dans une eau potable renouvelée en permanence. Le suivi de la formation des biofilms à différents âges est ainsi possible. Des microélectrodes en argent ont été confectionnées et les variations du potentiel ont été mesurées en milieu KCl 0.1 M. Des cartographies représentant ces variations en fonction de différentes distances entre l'aire de la surface balayée et la pointe de la microélectrode ont été tracées. Elles révèlent une apparition de pics d'intensités variables, synonyme d'hétérogénéité dans la composition du biofilm. Il ressort de cette étude que si le biofilm, à l'échelle macroscopique, peut être vu comme un dépôt uniforme et qu'une épaisseur moyenne peut être déterminée, sa structure est en réalité beaucoup plus complexe puisqu'il est doté d'un caractère hétérogène.

Mots clés: Biofilm, Epaisseur, Microélectrode, SRET.

**Abstract**: The surfaces immersed in an aqueous environment overlap gradually with a film related to presence of the mineral and organic matter. This one constitutes a medium favorable for the adhesion and the development of the micro-organisms, thus forming a biofilm. The latter are sometimes at the origin of the deterioration the quality of water and problems of bacteriological contamination in transported water. The electrochemical method to estimate thickness of the biofilm aims to contribute a share to comprehension of the stages mechanisms of formation this layer by associating it microbiological analyses. Measurements thickness of the porous layer constituting the biofilm formed on model substrates, about some micrometers, were estimated. The results obtained confirm the fast growth of the biofilm during the first days of immersion of the electrodes then tends to be stabilized. It was shown that these biofilms presented an elastic character and that their thickness is a function rate of the flow. The elastic character is more or less pronounced at low stirring velocity. The application the Scanning Electrode Reference Technique (SRET) will make it possible a priori to better follow the stages of formation of the biofilm. The study is carried out on metal platinum samples, immersed in a drinking water renewed permanently. The follow-up of the formation of the biofilms at various ages is thus possible. Silver microélectrodes were made and the variations of the potential were measured in KCl medium at 0.1 M. Cartographies representing these variations according to various distances between the area of swept surface and peak of the microelectrode were traced. They reveal an appearance of peaks of variable intensities, synonymous with heterogeneity in the composition of the biofilm. It comes out from this study which if the biofilm, on a macroscopic scale, can be seen like a uniform deposit and that an average thickness can be estimated, its structure is actually much more complex since it is equipped with a heterogeneous nature.

Keywords: Biofilm, Thickness, Microélectrode, SRET.