



HAL
open science

Etude électrochimique des mécanismes de la biocorrosion à l'interface de l'acier au carbone en présence de bactéries ferri-réductrices et hydrogénotrophes dans le contexte de stockage des déchets nucléaires.

Rebeca Leite de Souza Moreira

► **To cite this version:**

Rebeca Leite de Souza Moreira. Etude électrochimique des mécanismes de la biocorrosion à l'interface de l'acier au carbone en présence de bactéries ferri-réductrices et hydrogénotrophes dans le contexte de stockage des déchets nucléaires.. Matériaux. Université Paris 6 - Pierre et Marie Curie, 2013. Français. NNT: . tel-01379448

HAL Id: tel-01379448

<https://theses.hal.science/tel-01379448>

Submitted on 11 Oct 2016

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

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



**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**
Spécialité

Génie des Procédés et Technologies Avancées

Présentée par :

Rebeca LEITE DE SOUZA MOREIRA

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Étude électrochimique des mécanismes de la biocorrosion à l'interface de l'acier au carbone en présence de bactéries ferri-réductrices et hydrogénotrophes dans le contexte de stockage des déchets nucléaires

Thèse soutenue le 22 juillet 2013 devant le jury composé de :

Directeur de thèse :	B. TRIBOLLET	Directeur de Recherche (LISE – CNRS)
Rapporteurs :	R. SABOT	Maître de Conférence (LaSIE - FRE 3474 CNRS)
	D. FERON	Directeur de Recherche (CEA/SACLAY/DEN/DANS/DPC/SC CME)
Examineurs :	M. LIBERT	Ingénieur de Recherche / Docteur d'état (CEA/DEN/DTN/SMTM/LMTE)
	V. VIVIER	Directeur de Recherche (LISE – CNRS)
	F. AREFI-KHONSARI	Professeur, UPMC



Remerciements

Il m'est impossible d'exprimer verbalement ma gratitude, pour tout ce que j'ai reçu au cours de ce travail, qui fut pour moi un extraordinaire épanouissement personnel et professionnel. Chaque situation, chaque moment partagé, chaque apprentissage, tout fut vraiment très marquant.

A la communauté européenne et le « BIOCOR ITN PROJECT qui ont financé ce magnifique projet.

A mon directeur Bernard Tribollet, à qui je rends hommage pour sa compétence, son bon sens et pour sa bonne humeur.

A Vincent Vivier, mon conseiller officiel, qui m'a introduite dans le monde de l'électrochimie et a affermi mes premiers pas sur cette voie et m'a supportée au cours de cette aventure.

Aux membres du jury, Madame Farzi Arefi - Khonsari, Monsieur Danien Féron et Monsieur Sabot, pour leur compétence et leur grande disponibilité, ainsi qu'à Marie Libert, en particulier pour sa générosité.

Aux membres du projet BIOCOR, notamment à la coordinatrice Regine Basseguy, à Jenny et à Vincent.

A Celia, la coordonnatrice du Département de physique-chimie, de l'UFRJ qui m'a reçue dans son laboratoire, et qui a rendu possible ma ré-intégration dans le monde scientifique.

A Priscilla, amie si chère et si motivante.

A Antonio, pour son soutien pendant le stage à l'UFRJ.

Aux professionnels du laboratoire LISE, particulièrement à Françoise Pillier.

A Axell, pour son soutien technique.

A Martine, Isabelle et Véronique, mes précieux guides, toujours disponibles, dans les méandres administratifs.

A mes amis, mes frères et sœurs que j'ai rencontrés au cours de cette aventure, qui m'ont si bien accueillie, qui m'ont apportée un soutien affectif et intellectuel, m'ont sensibilisée à de nouvelles cultures, de nouvelles coutumes et surtout qui ont rempli ma vie de multiples couleurs, même lors des jours les plus gris. Nombreux sont les souvenirs de ces moments si particuliers que nous avons partagés. Impossible de ne pas mentionner ici les « Lisiens », Huong, Nizar, Dào, Bea, Alban, Flavie, Mariele, Mathilde, Florence, Myriam, Abdes, Peng, Yanjia, Nabila, Mercedes, Edgard, Silvia, Syrine, Marina...

Aux amis de longue date, tant de personnes inoubliables, pour leur soutien émotionnel si indispensable dans ce voyage.

A Annabelle, pour son amitié si accueillante.

A toute ma famille bien-aimée, pour son affection chaleureuse et constante, en particulier mon frère Sávio.

A mes parents qui, en plus de me donner la vie, m'ont également donnée l'occasion de frayer mon chemin.

A Ronny, avec qui je partage tous les moments de ma vie et à notre cher Arthur Theodor qui m'a accompagnée à la fin de cette aventure.

Résumé

La sûreté du stockage de déchets nucléaires est un sujet de préoccupation majeure, principalement pour les industries de production d'énergie nucléaire. Il est prévu de stocker les déchets de haute activité pendant des millions d'années dans des conteneurs en acier inox, avec un surconteneur en acier au carbone enfouis dans des formations argileuses à une profondeur de 500 m. La resaturation du milieu va entraîner l'arrivée d'eau au contact du colis provoquant la corrosion des matériaux métalliques en milieu anoxique, avec production d'hydrogène et de produits de corrosion comme des oxydes de fer III.

Cette production d'hydrogène représentera une nouvelle source énergétique pour le développement bactérien, en particulier dans un tel environnement présentant une faible teneur en matière organique biodégradable. La croissance des biofilms bactériennes dans l'environnement des conteneurs en acier carbone pourrait contribuer à la biocorrosion.

L'objectif de cette étude était de caractériser les interfaces électrochimiques afin de comprendre les mécanismes de la biocorrosion de l'acier au carbone mis en jeu en présence de *Shewanella oneideinsis*, une bactérie ferri-réductrice et hydrogénotrophe. Pendant cette étude les oxydes de fer III et l'hydrogène formés à partir de la corrosion anaérobie ont été utilisés comme donneur et accepteur d'électrons respectivement pour le métabolisme bactérien. Le taux de consommation d'hydrogène par *Shewanella oneidensis* a été estimé à l'aide de la technique de microscopie électrochimique à balayage (SECM) à 10^{-4} mol s⁻¹. Enfin, l'influence de la génération locale d'hydrogène a été évaluée par chronoampérométrie. Une accélération de la vitesse de corrosion a été observée quand l'hydrogène est généré localement sur le substrat d'acier au carbone. Finalement, le mécanisme de la corrosion généralisée a été mis en évidence à partir des techniques d'impédance globale et locale.

Mots clés : biocorrosion, bactéries ferri-réductrices, bactéries hydrogénotrophes, impédance électrochimique, impédance électrochimique locale, chronoampérométrie.

Abstract

The safety of deep geological repository for nuclear waste is a very important and topical matter especially for the nuclear industry. Such as nuclear fuel the high-level waste have to be stored for time frames of millions of years in metallic containers. Typically these containers should be placed in deep geological clay formations 500 metres underground. Corrosion processes, will take place after the resaturation of the geological medium and under the prevalent anoxic conditions may lead to the generation of hydrogen. This gas accumulates in clay environment through the years and eventually becomes hazardous for steel containers. In the particular environment of geological repositories does not provide much biodegradable substances. This is the reason that hydrogen represents a new suitable energy source for hydrogenotrophic bacteria. Thereby formed bacterial biofilms on the containers may contribute to a process of fast decay of the steel, the so called biocorrosion.

The aim of this study is to characterize the electrochemical interfaces in order to obtain the mechanisms of biocorrosion of carbon steels in presence of iron-reducing and hydrogenotrophic bacterium *Shewanella oneideinsis*.

The products of corrosion processes, namely hydrogen and iron (III) oxides are used as electron donor and acceptor, respectively. The amount of hydrogen consumed by *Shewanella* could be estimated with 10^{-4} mol s⁻¹ using Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) techniques.

The influence of the local hydrogen generation was evaluated via chronoamperometry. When hydrogen was locally generated above a carbon steel substrate an accelerated corrosion process can be observed.

Eventually, using Local Electrochemical Impedance Spectroscopy (LEIS) techniques, the mechanism of the generalised corrosion process was demonstrated.

Key words: Biocorrosion, bacteria, iron-reducing, hydrogenotrophic bacteria, EIS, LEIS, chronoamperometry.

Sommaire

Introduction.....	133
1 État de l'art.....	135
1.1 Stockage des déchets nucléaires.....	135
1.1.1 Contexte.....	135
1.1.2 Les déchets de Haute Activité (HA).....	138
1.1.3 Le stockage des déchets nucléaires HA – système multi-barrières.....	139
1.1.4 Les colis de stockage des déchets C.....	139
1.1.4.1 Les enveloppes primaires.....	139
1.1.4.1.1 Les enveloppes secondaires.....	140
1.1.4.2 Les ouvrages de stockage.....	141
1.1.4.3 La formation géologique.....	144
1.1.5 Phénoménologie dans l'environnement de stockage.....	145
1.1.6 Corrosion des matériaux métalliques dans les conditions de stockage.....	147
1.1.6.1 Généralités.....	147
1.1.6.2 Conditions dans le centre du stockage :.....	148
1.1.7 La présence d'hydrogène dans les conditions de stockage des déchets de HA.....	149
1.1.8 Conditions microbiologiques dans l'environnement de stockage.....	150
1.1.8.1 Facteurs influençant le développement microbologique.....	150
Nutriments.....	150
Nutriments énergétiques.....	151
Activité de l'eau (a_w).....	152
Température.....	153
pH.....	153
Tolérance a l'oxygène.....	153
Potentiel d'oxydo-réduction.....	154
1.1.8.2 Considérations sur les conditions microbiologiques dans l'environnement de stockage.....	154
1.2 Biocorrosion.....	155
1.2.1 Les biofilms.....	156
1.2.1.1 La formation des biofilms.....	156
1.2.1.2 Influence du biofilm dans le processus de biocorrosion.....	158
1.2.2 Les microorganismes sulfato réducteurs – BSR.....	158
1.2.3 Bactéries ferri-réductrices.....	161
1.2.3.1 Shewanella.....	163
2 Techniques électrochimiques.....	165

2.1 Chronopotentiométrie à courant nul	165
2.2 Chronoampérométrie	166
2.3 Courbes de polarisation ou voltammétrie	166
2.4 Microscopie électrochimique à balayage	168
2.4.1 Ultra-microélectrode (UME).....	168
2.4.2 Mode de fonctionnement	169
2.4.3 Courbe d'approche.....	171
2.4.4 Mode générateur / collecteur	173
2.4.5 Autres modes d'applications	173
2.5 Spectroscopie d'Impédance Electrochimique	174
2.6 Spectroscopie d'impédance électrochimique locale (SIEL)	179
2.6.1 Impédance locale (z)	181
2.6.2 Impédance interfaciale locale (z_0).....	181
2.6.3 Impédance ohmique locale (z_e).....	181
2.6.4 Influence de la géométrie du substrat.....	182
3 Etude de la biocorrosion de l'acier au carbone	184
3.1 Objectif	184
3.2 Matériaux et méthodes	184
3.2.1 Bactéries.....	185
3.2.2 Milieu de culture	186
3.2.3 Cellule électrochimique pour des mesures électrochimiques locales en conditions anaérobiques.....	189
Validation de la cellule électrochimique.....	191
3.2.4 La sonde pour le SECM et la polarisation linéaire.....	192
3.2.5 Sonde utilisée pour les mesures d'impédance locale.....	193
3.2.6 Instrumentation pour les mesures de SECM.	194
3.2.7 Instrumentation pour les mesures de dissolution du fer.	194
3.2.8 Instrumentation pour mesures de LEIS.....	194
3.3 Résultats et discussion	195
3.3.1 Détection du dihydrogène dans la solution M1.....	196
3.3.2 Détermination de la consommation d'hydrogène par <i>Shewanella</i>	197
3.3.2.1 Conclusions partielles.....	202
3.3.3 Influence de la génération locale de l'hydrogène en condition de confinement dans la dissolution de l'acier au carbone	203
3.3.3.1 Résultats et discussion.....	205
3.3.3.2 Conclusions partielles.....	215

3.3.4 Etude de la corrosion localisée.....	216
3.3.4.1 Mise en place de l'expérience	217
3.3.4.2 Mesures d'impédance globales et locales.....	223
3.3.5 Conclusion partielles :	241
3.3.6 Etude géochimique de l'influence de IRB dans le processus de la biocorrosion de l'acier au carbone	242
4 Conclusion et perspectives.....	244
5 Références.....	247
Annexe I.....	252
Annexe II	261

Introduction

Le stockage des déchets nucléaires est une préoccupation mondiale. Les décisions qui sont prises aujourd'hui auront un impact sur les prochaines générations. Les déchets nucléaires seront stockés pendant des millions d'années, ainsi tous les travaux pour une compréhension maximale des phénomènes pouvant interférer avec les composants ou avec la structure du stockage doivent être entrepris pour garantir une sûreté maximale.

Cette étude correspond au stockage des déchets radioactifs de haute activité. Ces déchets ayant une durée de vie longue et un niveau radioactif élevé par rapport aux déchets d'une activité moyenne et faible. Aujourd'hui le principe du stockage de ces déchets repose sur un concept de différentes barrières métalliques. Après la phase de resaturation hydraulique, l'eau arrivant au contact des matériaux métalliques pourrait initier des processus de corrosion. Les oxydes de fer(III) et l'hydrogène sont attendus comme produits de corrosion. La disponibilité de ces deux éléments pourrait favoriser le développement des bactéries ferri-réductrices et hydrogénotrophes. La question qui se pose par conséquent est de savoir si l'activité des microorganismes peut avoir un impact sur le processus de corrosion en favorisant la corrosion localisée.

Pour essayer de répondre à cette question, une étude électrochimique a été conduite en utilisant des mesures locales et globales pour une meilleure compréhension des mécanismes de la biocorrosion de l'acier au carbone en présence des bactéries ferri-réductrices et hydrogénotrophes. (Pour cette étude, *Shewanella oneidensis* a été choisi comme un microorganisme modèle).

Ce mémoire se divise en quatre chapitres.

Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique où le contexte du stockage des déchets nucléaires, les principes de base des activités microbiologiques et ceux de la biocorrosion sont introduits.

Dans le deuxième chapitre, nous exposons les différentes techniques électrochimiques, appliquées dans cette étude.

Le troisième chapitre est dédié à l'étude de la biocorrosion de l'acier au carbone, où sont présentés les matériaux et méthodes utilisées dans cette étude, y compris la description de la cellule développée exclusivement pour les mesures électrochimiques locales en conditions anaérobies. Les résultats et discussions sont aussi présentés. Tout d'abord la détection et la consommation d'hydrogène par *Shewanella* ont été mises en évidence à l'aide de la technique de SECM. Dans une deuxième partie, l'influence de la génération localisée d'hydrogène a été étudiée pour trois différentes conditions par la technique d'ampérométrie. Les résultats ont mis en évidence une augmentation de la charge libérée en présence de bactéries et une génération locale d'hydrogène. Ensuite, une étude de la corrosion localisée a été effectuée à l'aide des techniques d'impédance globales et locales. Grâce à ces méthodes l'influence des bactéries ferri-réductrices et hydrogénotrophes sur la corrosion généralisée a pu être analysée.

Enfin, la conclusion générale et futures perspectives sont présentées dans le quatrième chapitre.

1 État de l'art

Ce chapitre présente le contexte de l'étude, et une analyse révisons bibliographique comprenant une introduction des éléments nécessaires à la compréhension de l'étude électrochimique de la biocorrosion de l'acier au carbone en présence de la bactérie *Shewanella oneidensis*.

1.1 Stockage des déchets nucléaires

1.1.1 Contexte

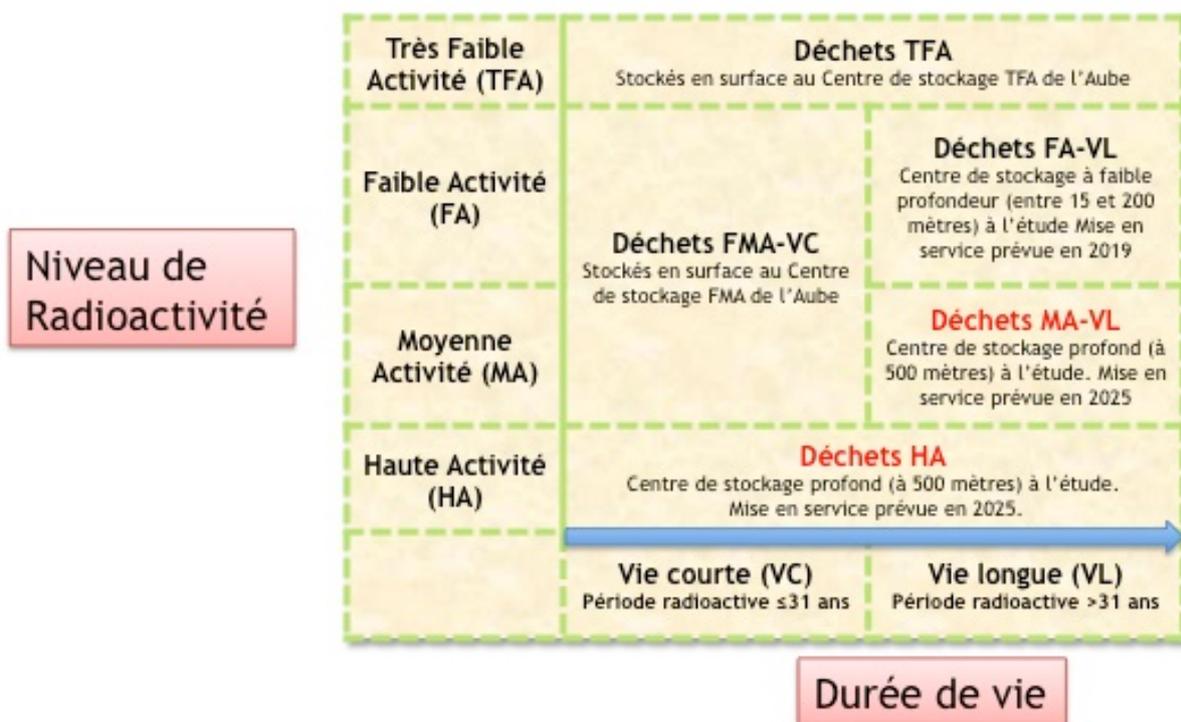
L'utilisation d'éléments radioactifs dans notre société est aujourd'hui devenue un acte courant. L'utilisation du *radium* en France dès les années 1930 dans les hôpitaux pour combattre le cancer a permis de mettre en évidence la problématique de la gestion des déchets radioactifs. Mais ce n'est qu'après la deuxième guerre mondiale que la quantité de déchets générés est devenue de plus en plus importante. Les premières normes pour garantir la sûreté du stockage des déchets, ainsi que leur entreposage ont été érigées par le commissariat à l'énergie atomique (CEA).

La situation a rapidement évolué dans les années 1950 et 1960, avec le développement des centrales nucléaires ainsi qu'avec la recherche sur les armements atomiques.

Après la crise pétrolière de 1974, la France a pris la décision de devenir énergétiquement indépendante. Un nouveau programme de développement de l'industrie électronucléaire a alors été conçu. L'implantation de plusieurs centrales nucléaires a augmenté largement le volume des déchets de tous niveaux de radiation comme représenté au Tableau 1. Pour cette raison, en 1979, le CEA a été chargé par le gouvernement d'ouvrir un organisme pour la gestion de tous les déchets nucléaires : l'Andra – Agence nationale pour la gestion des déchets

radioactifs. Ainsi, l'Andra a établi des réglementations sévères pour la sûreté du stockage des déchets en surface – tels que le stockage en colis normalisés – et rationalisés – mais aussi le contrôle de l'impact environnemental de l'eau au contact des déchets nucléaires. Le centre de la Manche a été le premier centre de stockage géré par l'Andra pour le stockage de déchets de faibles et de moyennes activités.

Tableau 1 : Classification des déchets nucléaires par rapport au niveau de radioactivité et de durée de vie.



Le système de stockage a été affiné au fil des années, et le système de multibarrières a été défini comme le modèle de base. Ce système consiste en l'utilisation de différents matériaux pour garantir la sûreté du stockage des déchets radioactifs tels que les colis, les ouvrages de stockage et le milieu géologique d'accueil des colis.

Plusieurs études géologiques ont été réalisées à partir de 1984 afin de déterminer un lieu propice à l'installation d'un nouveau centre pour compléter celui de la Manche. La région de l'Aube a été largement étudiée et les informations sur ces recherches ont été rendues publiques. Le 22 juillet 1987, le Premier Ministre a signé la déclaration d'utilité publique autorisant la construction, dans l'Aube, du Centre de Stockage pour les Déchets de Faible et Moyenne Activité (CSFMA).

Par contre, la situation du stockage des déchets de Haute Activité (HA) et Moyenne Activité de Vie Longue (MA-VL) n'est toujours pas résolue : les déchets provenant du traitement des combustibles nucléaires français usés attendent encore une solution de stockage définitive et sont, jusqu'à présent, entreposés sur les sites de La Hague et de Marcoule.

D'autres pays travaillent également à la recherche de possibilités de stockage dans différents types de formations géologiques profondes, comme par exemple :

- à Mol, en Belgique, dans l'argile.
- à Asse, en Allemagne, dans une ancienne mine de sel.
- à Grimsel, en Suisse, dans du granite.
- à Östhammar, en Suède, également dans du granite.

En 1982, la France entame une collaboration avec ces pays, pour avancer dans les recherches en vue d'un stockage souterrain dans diverses formations rocheuses. A partir de la première loi relative à la gestion des déchets nucléaires en 1991, l'Andra est devenue indépendante du CEA, et a été désignée pour piloter sur une période de 15 ans, une étude très spécifique sur la faisabilité du stockage souterrain.

Les études des différentes strates ont été réalisées d'abord dans une région argileuse du Jura où des expériences ont été menées grâce à un tunnel préexistant dans une couche d'argile. Des recherches réalisées dans plusieurs laboratoires universitaires sont également encore en cours.

En 1998, le gouvernement a autorisé l'installation par l'Andra d'un laboratoire souterrain sur le site de la Meuse/Haute-Marne. Le concept de réversibilité du stockage des déchets radioactifs a été défini comme le plus favorable.

La construction des installations du laboratoire souterrain a débuté en 2000 ; et en 2004, des galeries à des profondeurs de 445 et 490 mètres ont été installées. Les expériences développées sur ce site ont montré un très bon accord avec les études préliminaires.

En 2005, l'Andra a publié un important dossier (Dossier 2005 Argile [1-3]) sur l'architecture, la phénoménologie et la sûreté du stockage géologique des déchets radioactifs montrant la faisabilité d'un centre de stockage de déchets radioactifs de haute et moyenne activités à vie longue sur le site de la Meuse/Haute-Marne. Cette conclusion a été l'aboutissement de 15 années de recherche sur la thématique du

stockage des déchets radioactifs.

Après la loi du 28 de juin 2006, l'Andra a été chargée de concevoir et d'implanter dans la couche d'argile du Callovo-Oxfordien en Meuse et Haute-Marne, à 500 mètres de profondeur, un centre de stockage réversible pour les déchets de haute et de moyenne activités à longue durée de vie. Ce centre, le Cigéo (Centre industriel de stockage géologique) est maintenant en phase de conception, et la date prévisionnelle pour sa mise en service est 2025.

1.1.2 Les déchets de Haute Activité (HA)

Les déchets de haute activité viennent principalement du processus de traitement des combustibles usés. Différents processus chimiques et mécaniques sont appliqués pour le recyclage des combustibles originaires de l'industrie nucléaire permettant la séparation des éléments valorisables comme l'Uranium, le Plutonium, mais aussi d'autres produits non réutilisables qui constituent les déchets de HA (Figure 1). Le pourcentage de ces déchets représente environ 4% de la totalité des combustibles traités et il est constitué :

- de produits de fission obtenus directement de la fission des noyaux lourds comme l'uranium 235, ou par la désintégration des fragments de fission, comme par exemple l'iode 129. Ce groupe, qui peut être constitué de différents éléments chimiques, représente la majorité des éléments à traiter.
- d'actinides mineurs, comme par exemple le neptunium 237, l'américium 241 ou 243 et le curium 244 ou 245.
- de produits d'activation formés à partir du bombardement de neutrons ou d'autres particules dans les alliages et les matériaux de structure [1].



Figure 1 : Représentation de la composition d'un combustible usé de type oxyde d'uranium [4]

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés au stockage de déchets de type HA qui représentent moins de 0,2% du volume des déchets radioactifs français, mais qui sont responsables de plus de 96,8% de la radioactivité totale [5]. Ils sont aussi classés C dans la catégorie des déchets, et subissent un processus de vitrification avant leur conditionnement dans les colis de stockage. Ce groupe est aussi subdivisé par rapport aux caractéristiques radioactives spécifiques de ces déchets, en particulier en relation avec la libération de chaleur au cours des années.

1.1.3 Le stockage des déchets nucléaires HA – système multi-barrières

Le système multi-barrière a été conçu pour éviter la contamination de l'environnement et de l'homme par des éléments radioactifs stockés pendant des milliers d'années. La sûreté du stockage doit être assurée par l'utilisation des différents composants tels que les colis de stockage (les récipients collecteurs des déchets radioactifs), les ouvrages de stockage et le site géologique proprement dit. Le principal objectif est de réduire au maximum la circulation de l'eau autour des déchets, car l'eau est un facteur déterminant d'altération des conteneurs par la corrosion et aussi de diffusion des radionucléides [2].

1.1.4 Les colis de stockage des déchets C

Les colis des déchets C sont constitués d'enveloppes primaires et secondaires.

1.1.4.1 Les enveloppes primaires

Les déchets de HA sont incorporés dans une matrice de verre borosilicaté. Ce mélange (verre/déchet) est coulé directement dans l'enveloppe primaire (structure en acier inoxydable) représenté sur la Figure 2. Cette procédure permet une meilleure stabilisation des déchets, une distribution des déchets radioactifs dans le colis et, donc, une répartition plus uniforme de la chaleur qui sera libérée au cours des années de stockage. Ces déchets sont encore divisés en 5 classes par rapport à la nature du contenu radioactif.

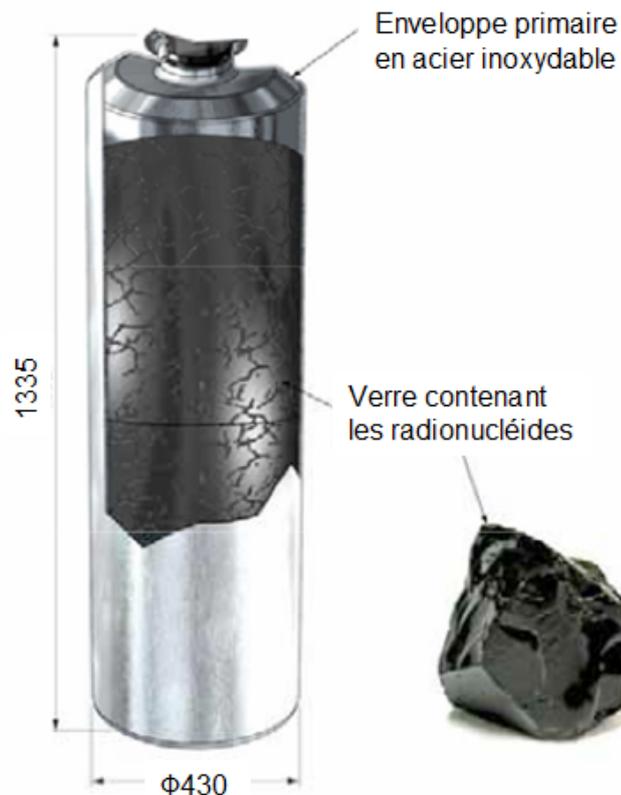


Figure 2 : Schéma d'un colis de déchets de HA vitrifiés

1.1.4.1.1 Les enveloppes secondaires

Chaque colis est disposé dans une enveloppe d'acier au carbone de 55 mm d'épaisseur. Un couvercle fait dans le même matériau est alors soudé à l'enveloppe cylindrique après le conditionnement du colis primaire (Figure 3).

L'utilisation de cette enveloppe épaisse est nécessaire pour garantir l'étanchéité du colis de stockage. Leur résistance mécanique, leur faible vitesse de corrosion dans l'environnement anoxique, la corrosion généralisée comme mécanisme de corrosion ainsi que le coût du matériel sont des critères importants pour l'éligibilité de l'acier au carbone comme matériau de composition des enveloppes de stockage. Par ailleurs, l'étude d'objets archéologiques constitués de métaux a permis, par analogie, de décrire le comportement de certains matériaux sur de longues périodes dans différents environnements [6].

Sur la paroi externe de ces conteneurs, des patins en céramique sont fixés servant à l'appui du colis sur le chemisage métallique des alvéoles.

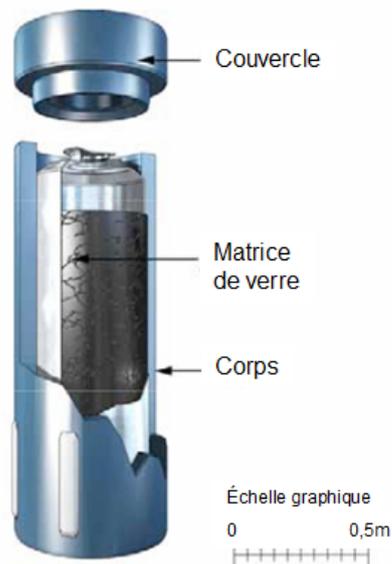


Figure 3 : Schéma du sur-container en acier au carbone avec un colis primaire C.

1.1.4.2 Les ouvrages de stockage

Les ouvrages de stockage des déchets de HA sont constitués d'alvéoles en acier non allié ou faiblement allié, qui sont insérés directement en position horizontale dans la couche d'argile du Callovo-Oxfordien. Ces alvéoles ont une longueur d'environ 40 m et une épaisseur qui peut varier de 25 à 40 mm. Leur implantation sera finalisée à partir des galeries d'accès (Figure 4).

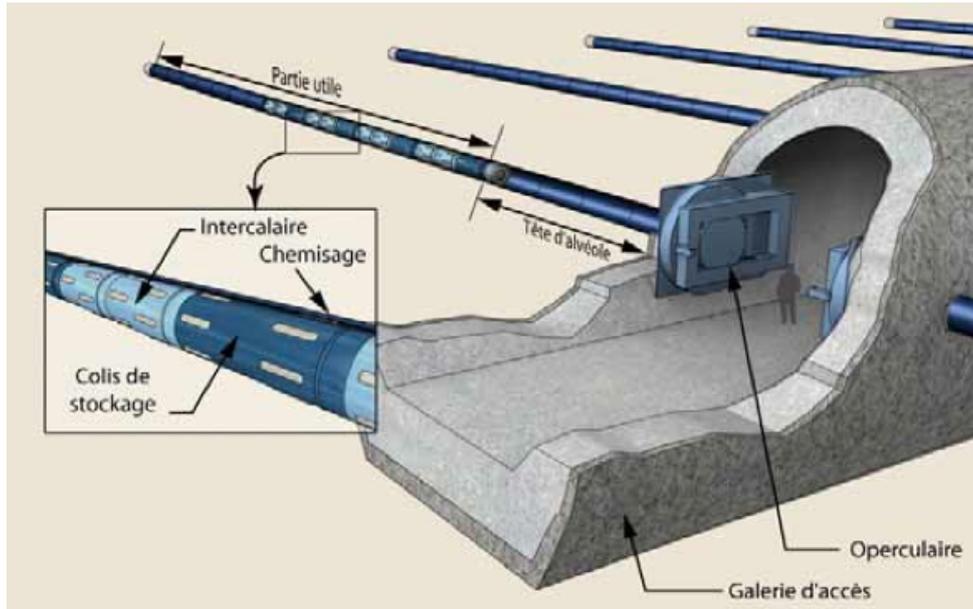


Figure 4 : Schéma représentatif des alvéoles de stockage avec les colis de stockage dans la partie utile.

La quantité et la distribution de ces colis dans les alvéoles dépendront de la nature et des niveaux de radioactivité des colis. Le calcul de la distribution des colis est réalisé par rapport à la prévision de dégagement de chaleur que ces déchets vont libérer pendant les années de stockage. Les colis seront intercalés avec des séparateurs pour équilibrer le remplissage des alvéoles et la quantité de colis varie de 5 à 18 par tunnel. L'objectif est de garantir que la température maximale au voisinage des alvéoles ne dépasse pas 90°C, comme illustré sur la Figure 5.

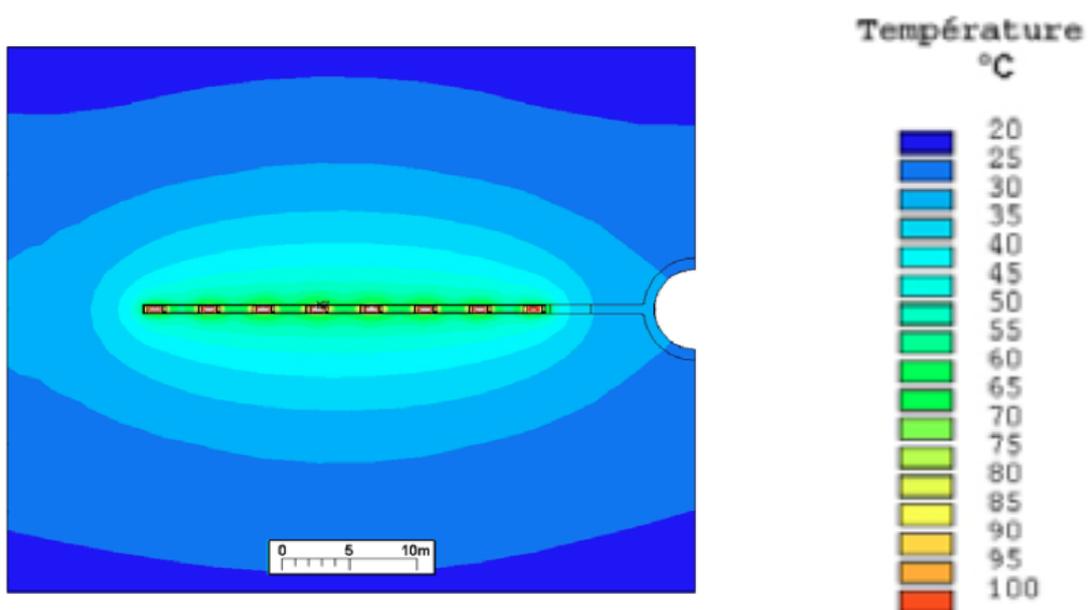


Figure 5 : Simulation des isothermes de température pour une période correspondant à un pic thermique, d'après la référence [3].

Après l'installation des colis, 3 barrières mécaniques seront utilisées pour la fermeture de l'alvéole (voir Figure 6):

- un chemisage métallique qui joue un rôle structural, et assure la réversibilité du stockage.
- une barrière d'argile gonflante. Ces matériaux composés essentiellement de minéraux argileux (smectite), mais aussi d'éléments secondaires, comme les carbonates, les feldspaths, le quartz, la pyrite, les oxyhydroxide, etc. En quantité encore plus faible, les minéraux à l'état de traces, comme le titane et le zirconium sont aussi présents. En raison de sa structure cristalline en feuillets, la smectite a la capacité de rétention de molécules polaires comme l'eau dans la couche interfeuille de sa structure cristalline ce qui lui laisse une possibilité de gonflement et lui garantit également une très faible perméabilité. Après le gonflement, le bouchon d'argile isole les galeries de stockage des galeries d'accès ;
- un bouchon de béton est utilisé pour confiner l'argile et sans empêcher le gonflement.

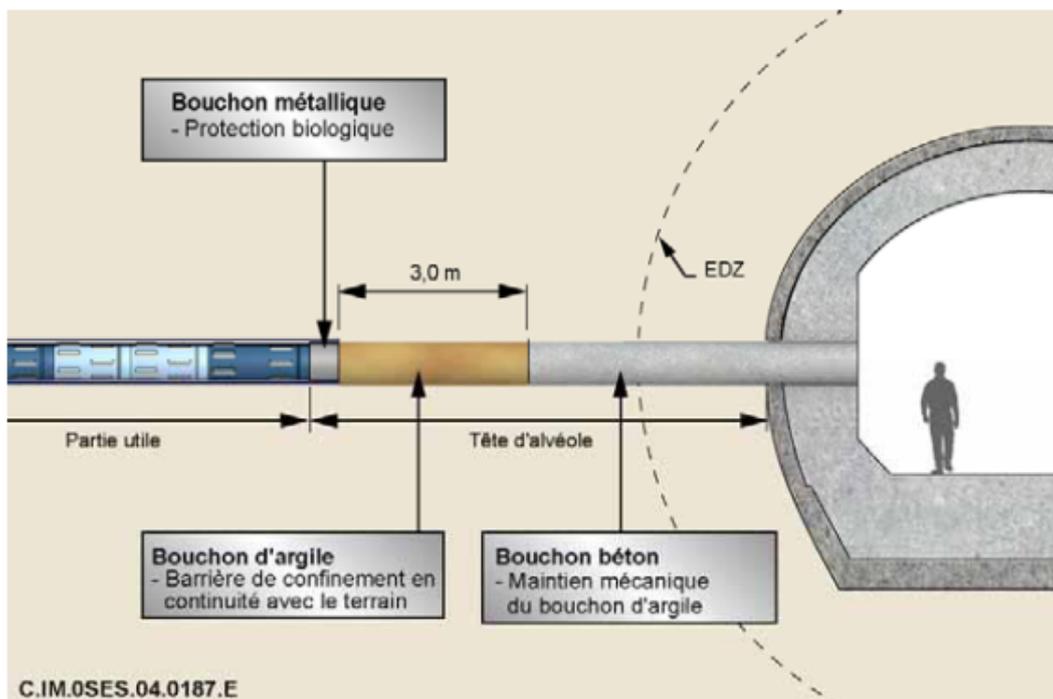


Figure 6 : Schéma représentatif des alvéoles de stockage avec la représentation des trois barrières mécaniques (métallique, argile gonflante et béton) [3]

1.1.4.3 La formation géologique

La couche du Callovo-oxifordien, située de 420 à 600 m de profondeur dans la région de Meuse-Haute Marne est constituée d'argilite, matériel sédimentaire compacté depuis environ 150 millions d'années (période du Jurassique) (Figure 7). Sa perméabilité est considérée comme faible grâce à une très fine porosité (environ 50 à 200 nm) et à la présence d'eau l'intercalée d'eau dans les feuillets des argiles, ce qui lui confère un coefficient de diffusion compris entre 5.10^{-12} et de $2,5.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ pour une porosité accessible de 5% pour les anions et de 8% pour les cations. Le pH du milieu reste autour de 7 et cette formation argileuse est naturellement un milieu réducteur [1].

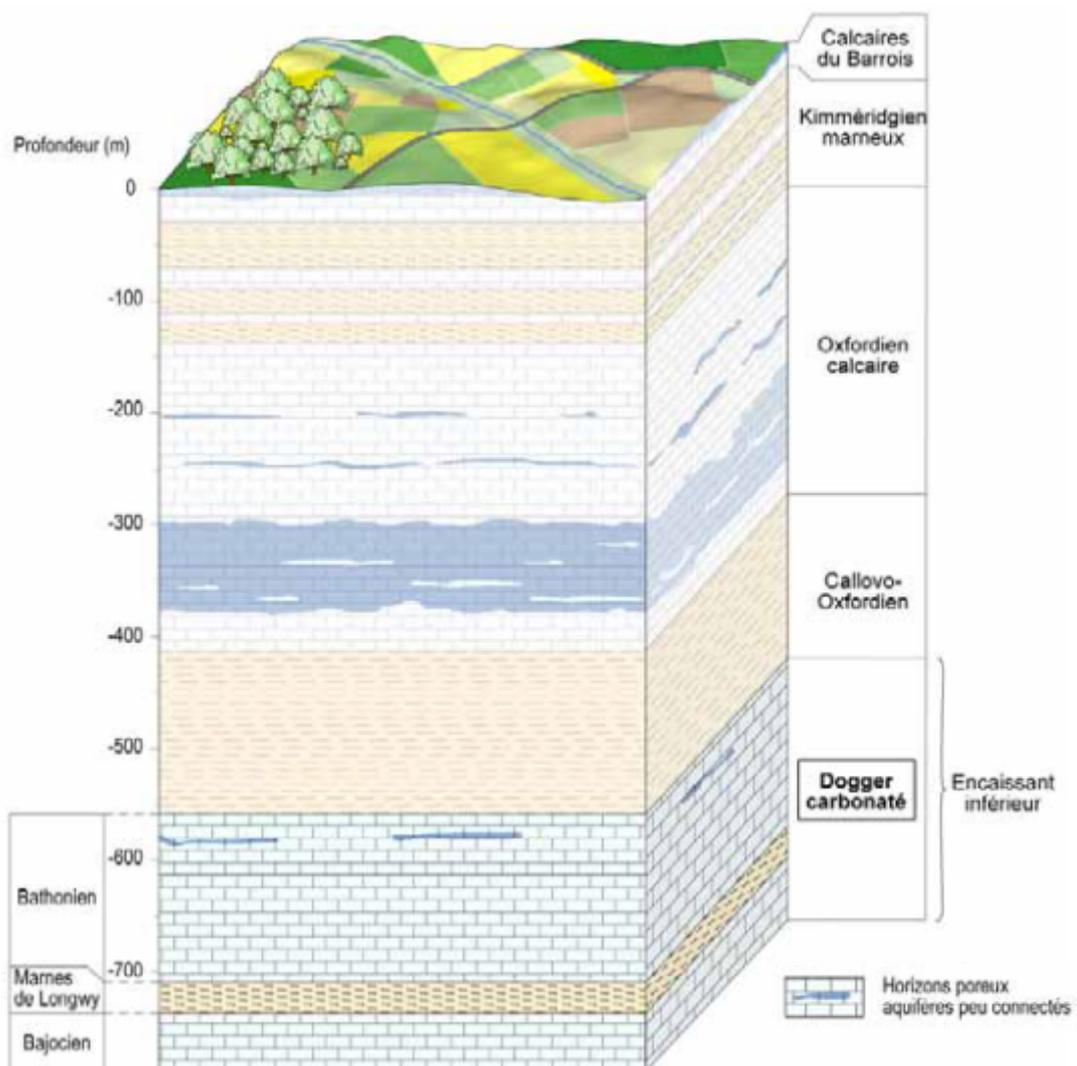


Figure 7 : Coupe transversale de la couche géologique de la région du Meuse/Haute Marne [2].

Cette formation a été choisie comme futur site de stockage en raison de sa stabilité et de la très faible activité sismique observée ces derniers siècles. La très faible perméabilité est également un bon indicateur pour la rétention de la radioactivité.

1.1.5 Phénoménologie dans l'environnement de stockage.

Parmi les différents facteurs qui influencent l'environnement du stockage, on doit prendre en compte le vieillissement de la structure mais aussi l'évolution géodynamique de la couche d'argile, comme par exemple, les variations climatiques en surface ou les mouvements tectoniques.

Dû à une grande stabilité du site géologique de Meuse / Haute Marne, le facteur naturel est considéré comme étant le plus important pour les altérations géodynamiques et les changements climatiques à la surface. Ces altérations au cours des années peuvent modifier l'écoulement de l'eau et le transport des solutions.

La Figure 8 représente la prévision chronologique des principaux phénomènes qui auront lieu dans l'environnement de stockage des déchets C [1].

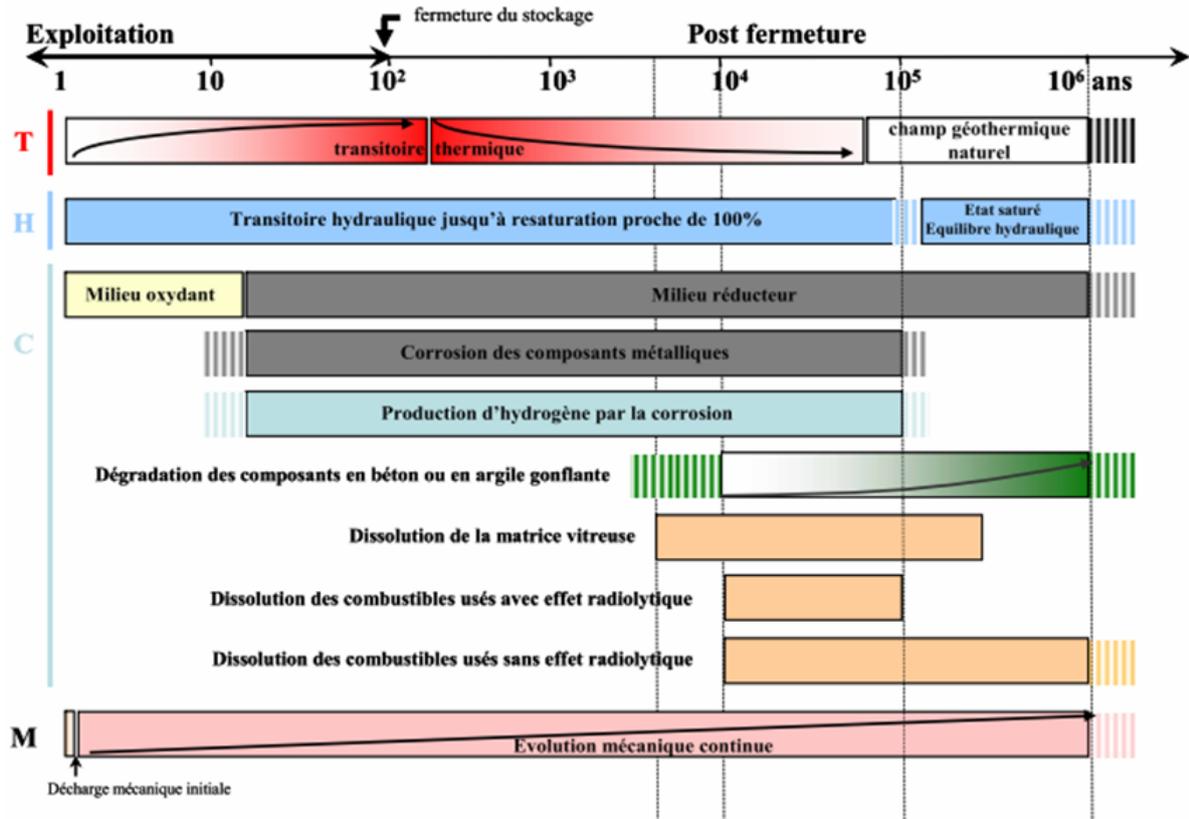


Figure 8 : Chronogramme des principaux phénomènes qui interfèrent dans le stockage des zones des déchets C [3].

Pendant le processus d'excavation des galeries souterraines, l'équilibre hydrodynamique sera affecté autour de l'ouvrage dû à la modification de la pression en eau. La circulation de l'air non saturé en eau dans les galeries ouvertes déshydrate également l'atmosphère dans les galeries et aux environs de celles-ci. Après la fermeture des galeries, un nouvel équilibre hydraulique est mis en place. Cet équilibre sera encore affecté par les variations de la température des déchets pendant leur stockage et par l'hydrogène libéré par le processus de corrosion des matériaux métalliques, plus particulièrement pour les galeries des déchets C.

La dégradation d'autres matériaux comme le verre, le béton ou l'acier sont aussi prévisibles au cours des années, mettant ainsi en évidence l'importance d'une estimation valide de la stabilité de tous ces matériaux cruciale pour assurer la sûreté du stockage des déchets nucléaires.

1.1.6 Corrosion des matériaux métalliques dans les conditions de stockage

1.1.6.1 Généralités

Tous les matériaux ont tendance à évoluer au cours du temps, en évoluant vers un état thermodynamiquement le plus stable. La corrosion est un processus électrochimique où, en présence d'éléments oxydants, par exemple l'oxygène, un métal revient à l'état oxydé (plus stable) dans lequel on le trouve le plus souvent à l'état naturel. Cette oxydation aboutit dans certains cas à la formation de couches protectrices (couches d'oxydes), qui peuvent également réduire la vitesse de corrosion du matériau en jouant le rôle de couche barrière plus ou moins efficace.

La corrosion peut survenir soit de façon généralisée soit de façon localisée. La corrosion généralisée, ou uniforme, est considérée comme étant un phénomène homogène sur toute la surface métallique. Au contraire, quand le phénomène de corrosion n'est pas uniforme il est considéré comme localisé. Différents types de corrosions localisées (Figure 9) existent, comme par exemple:

- la corrosion par piqûre qui correspond à une attaque initiale très localisée sur la surface d'un matériau (par exemple la rupture de la couche passive sur un acier en présence d'ions halogénure ou de microorganismes). C'est un type de corrosion très courant dans le cas des aciers inoxydables et ce type de corrosion peut se propager en profondeur dans le matériau, compromettant ainsi gravement l'intégrité des structures.
- la corrosion galvanique se produit lorsque deux matériaux de différentes natures sont mis en contact dans un milieu conducteur. Un transfert des électrons entre les deux matériaux est observé (l'un étant l'anode, l'autre la cathode), ce qui se traduit par la dissolution de l'anode proche de la région de couplage.
- La corrosion par crevasse est le résultat de l'aération différentielle rencontrée à la jonction entre les matériaux. La partie exposée n'est pas affectée, par contre, la partie confinée est corrodée.
- La corrosion intergranulaire est due à la différence de potentiel des grains adjacents dans un alliage. La dissolution du métal se produit autour de ces grains.

- La corrosion sélective est la dissolution préférentielle d'un des éléments constitutifs d'un alliage.
- La corrosion par érosion correspond à l'action de forces externes comme par exemple l'air, un écoulement de solution ou un frottement entre deux matériaux qui accélère le processus de corrosion.
- La corrosion par le stress résulte d'une modification de la corrosion lorsque le matériau est soumis à des contraintes mécaniques [7-9].

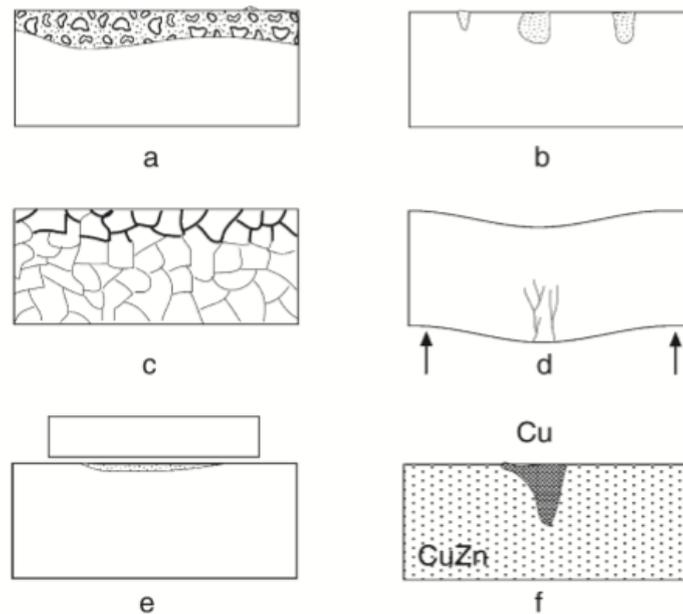


Figure 9 : Exemples de différents types de corrosion : (a) corrosion uniforme, (b) corrosion par piquûre, (c) corrosion intragranulaire, (d) « stress corrosion » (e) corrosion par crevasse, et (f) corrosion sélective [10].

1.1.6.2 Conditions dans le centre du stockage :

Comme cela a été mentionné précédemment, une grande quantité de matériaux métalliques comme l'acier au carbone sera utilisée dans l'environnement souterrain. Trois étapes de temps pourront être observées sur le site de stockage. Au premier stade (processus d'excavation et construction), la présence d'oxygène est observée autour des ouvrages. Après le remplissage et la fermeture des galeries, une étape de transition aérobie / anaérobie est attendue, se terminant par mis en place d'un environnement anoxique. Le fer en milieu aqueux est sujet à la corrosion, et les réactions qui peuvent avoir lieu dans un tel environnement sont décrites par les mécanismes présentés dans le Tableau 2 [11] :

Tableau 2 : Réactions de corrosion du fer dans les environnements de stockage géologique.

Corrosion Aérobie	$4 \text{ Fe}^0 + 3 \text{ O}_2 \rightarrow 2 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ $4 \text{ Fe}^0 + 6 \text{ H}_2\text{O} + 3 \text{ O}_2 \rightarrow 4 \text{ Fe(OH)}_3$ $2 \text{ Fe}^0 + \text{ H}_2\text{O} + 3/2 \text{ O}_2 \rightarrow 2 \text{ FeO(OH)}$
Transformation minéral – Phase de transition	$4 \text{ Fe}_2\text{O}_3 + \text{ Fe} \rightarrow 3 \text{ Fe}_3\text{O}_4$ $2 \text{ Fe(OH)}_3 + 4 \text{ Fe} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{ Fe}_3\text{O}_4 + 5 \text{ H}_2$
Corrosion Anaérobie	$3 \text{ Fe}^0 + 4 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{ Fe}_3\text{O}_4 + 4 \text{ H}_2$ $\text{ Fe}^0 + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{ Fe(OH)}_2 + \text{ H}_2$ $3 \text{ Fe(OH)}_2 \rightarrow \text{ Fe}_3\text{O}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{ H}_2$

Une libération importante de H₂ est prévisible [12] au cours des années dans l'environnement du stockage des déchets radioactifs et la présence d'oxydes de fer III, comme la magnétite, est attendue comme produit de la corrosion du fer dans des conditions anoxique [13, 14]. Il faut aussi noter que certains oxydes de fer sont aussi présents dans le milieu argileux.

1.1.7 La présence d'hydrogène dans les conditions de stockage des déchets de HA.

Lorsque le matériau métallique est en contact avec l'argile saturée, une formation d'hydrogène par corrosion est attendue. L'hydrogène est aussi généré par le processus de radiolyse de l'eau et de matières organiques. Par contre, ces voies représentent moins de 10% de la quantité en hydrogène totale qui sera générée dans les galeries.

L'hydrogène libéré par le processus de corrosion est initialement observé sous forme dissoute. Comme le coefficient de diffusion dans l'argilite est faible, la quantité d'hydrogène généré sera importante, ce qui conduit à la saturation en hydrogène dans l'eau interstitielle, induisant ainsi la formation de l'hydrogène à l'état gazeux dès les premières années de l'installation du centre de stockage.

Les perturbations générées par la présence de ce gaz à pression élevée peuvent modifier considérablement les régimes hydrogéologiques à cause de l'expansion du gaz. A haute pression, l'hydrogène peut aussi favoriser la formation de fissures dans la couche d'argile modifiant la migration des radionucléides [1].

Un autre facteur à considérer est l'interaction de l'hydrogène avec les matériaux métalliques. La haute concentration en hydrogène peut induire la corrosion de l'acier au carbone en favorisant la formation de fissures et par

conséquence la rupture du matériel, mettant ainsi en danger la sûreté de la structure du stockage [15].

L'hydrogène est aussi considéré comme étant un substrat énergétique important pour les microorganismes, surtout dans un environnement souterrain avec une teneur en matière organique réduite [16].

1.1.8 Conditions microbiologiques dans l'environnement de stockage

L'influence des microorganismes dans les conditions du stockage géologique fait encore aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches scientifiques. Plusieurs études de corrosion dans ce contexte ont été réalisées sans prendre en compte le facteur microbiologique, bien que la présence de microorganismes, dans l'environnement souterrain soit bien établie et qu'elle ait déjà été l'objet de nombreuses recherches [17-20].

Différents aspects de l'impact des activités microbiennes ont été étudiés, comme, par exemple, l'influence de l'activité biologique dans le processus de diffusion des radionucléides dans l'environnement de stockage ou encore l'impact sur la corrosion métallique [21, 22].

Les microorganismes peuvent se développer dans une gamme très large de conditions environnementales. Leur développement est lié à la disponibilité de certains facteurs, comme la disponibilité en eau libre (nécessaire pour réaliser des fonctions biologiques), la présence de nutriments, d'oxygène ou d'autres gaz, la température, le potentiel redox et le pH [23].

1.1.8.1 Facteurs influençant le développement microbiologique

Nutriments

Pour réaliser les processus métaboliques, les microorganismes ont besoin de nutriments. Certains nutriments sont assimilés par les microorganismes et font partie de leur composition structurale (les éléments essentiels et les éléments secondaires) ou métabolique (éléments essentiels et micronutriments), ce qu'on appelle le métabolisme assimilatif. Ils utilisent les substrats en différentes proportions, comme présenté dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Composition des éléments bio-essentiels dans les cellules bactériennes en pourcentage de poids [24, 25].

		Fonction métabolique
Eléments essentiels (1 - 65 wt%)	H C N O	Principaux constituants des matériaux cellulaires
Eléments secondaires (0,05 - 1 wt%)	Na Mg P S Cl K Ca	<ul style="list-style-type: none"> • Impliqués dans les différents processus de transport • Cofacteur de enzymes ; présent dans les parois cellulaires ; membranes, ribosomes et phosphate • Constituant des acides nucléiques, des phospholipides, nucléotides et vecteurs énergétiques (ATP/ADP) • Constituant des aminoacides, pyrophosphate, coenzyme A, biotine et acide lipoïque • Important anion inorganique cellulaire • Principal ion inorganique dans la cellule ; cofacteur de quelques enzymes. • Présent dans les exoenzymes et dans les parois cellulaires
Micronutriments (<0,05 wt%)	B, Fe, Si, V, Cr, Mn, Cu, I, Co, Mo, Zn, Se, Ni, W	Font partie, en général, des atomes centraux des groupements prosthétiques (liaisons très fortes entre les coenzymes et les enzymes), et participent aux fonctions cellulaires comme l'activité enzymatique spécifique et le transfert d'électrons [16].

Le carbone est l'élément principal de la structure bactérienne. Les microorganismes peuvent obtenir ce substrat de deux façons :

- à partir de molécules organiques (microorganismes hétérotrophes).
- à partir du dioxyde de carbone (microorganismes autotrophes).

Nutriments énergétiques

Pour obtenir les substrats pour leur reproduction, la synthèse de matériel cellulaire ou extracellulaire, la locomotion..., les bactéries ont besoin d'énergie. Cette énergie peut être obtenue par deux voies :

- les microorganismes utilisent l'énergie lumineuse en captant des photons : ce sont les microorganismes photosynthétiques
- par réaction chimique, en réalisant des réactions d'oxydoréduction qui surviennent entre un donneur et un accepteur d'électrons. Cette réaction est un processus électrochimique où l'énergie est stockée sur la forme d'ATP : métabolisme dissimilatif [26].

Dans l'environnement souterrain où il n'y a pas la présence de lumière, seuls les microorganismes chimiotrophes peuvent se développer. Les bactéries peuvent utiliser des éléments organiques et inorganiques, comme donneurs et accepteurs d'électrons : on parle alors de microorganismes lithotrophes (qui utilisent les substrats inorganiques) et organotrophes (qui utilisent des substrats organiques).

Activité de l'eau (a_w)

Pour leur développement, les microorganismes ont besoin d'eau. Cependant, l'eau dans la nature est observée dans 3 conditions : hygroscopique, pelliculaire ou gravitationnelle. L'eau hygroscopique n'est pas disponible pour l'activité biologique. Due à la nature de leur forte liaison, cette l'eau forme un film de $3 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}$ d'épaisseur autour des particules solides [19]. Cette eau est immobilisée. Au contraire de eau hygroscopique, des eaux pelliculaires et gravitationnelles (qui ont des liaisons plus faibles avec les particules) peuvent être utilisées pour les activités biologiques. Cette eau disponible est mesurée sous la forme d'activité de l'eau (a_w), et est obtenue par le quotient de la pression de vapeur de la solution (P) par la pression de vapeur de l'eau (P_0) (à la même température) [7].

$$a_w = \frac{P}{P_0}$$

Équation 1

L'activité de l'eau est un facteur limitant pour le développement microbiologique. Les bactéries peuvent en général résister à une variation d'activité de l'eau de 0,9 à 0,8, valeur qui peut atteindre 0,75 dans conditions salines pour les microorganismes halophiles. Les champignons sont encore plus résistants : ils peuvent survivre avec des valeurs d'activité de l'eau de l'ordre de 0,6.

Température

Tous les organismes vivants ont une température optimale pour leur développement. La température optimale est liée à la spécificité du système enzymatique de chaque organisme. Ce sont les enzymes qui catalysent les réactions métaboliques. Même si le développement de microorganismes est possible dans une large gamme de température, chaque microorganisme possède une température optimale de développement. Le Tableau 4 présente ces températures pour différentes familles de microorganismes. On constate que la plage couverte pour tous les microorganismes considérés s'étend sur plus de 100° C.

Tableau 4 : Classification des microorganismes en fonction de leur température optimale de développement. [23]

Classification	Variation de la température optimale de développement
Psychro- ou kryophiliques	< 0°C à 20°C
Psychrotrophiques	0°C à 30°C
Mesophiliques	10°C à 40°C
Thermophiliques	35°C à 55°C
Thermophiliques modérés	50°C à 85°C
Thermophiliques extrêmes	75°C à 95°C
hyperthermophiliques	> 90°C

pH

Comme pour la température, les microorganismes ont aussi un pH optimal pour réaliser leurs fonctions métaboliques. Ils peuvent être divisés en 3 groupes, les alkalophiles (pH >9), les neutrophiles (pH de 7 à 9) et les acidophiles, qui peuvent encore être divisés en deux groupes : forts (pH 0 à 3) et modérés (pH 2 à 5) [23].

Tolérance à l'oxygène

Les microorganismes peuvent être aussi classifiés en fonction de leur tolérance à l'oxygène. Les microorganismes aérobies sont complètement

dépendants de la présence d'O₂ pour leur respiration, et sont classifiés comme "aérobies stricts". Certains d'entre eux peuvent réaliser à la fois la respiration aérobie et la respiration anaérobie : ils sont alors classifiés par rapport au mécanisme préférentiel, ou aérobies facultatifs quand l'oxygène est le principal accepteur d'électrons, mais ils sont aussi capables, en absence d'oxygène, d'utiliser d'autres accepteurs. Les anaérobies stricts ne sont pas capables de survivre en présence d'oxygène, même à faibles concentrations, ils utilisent exclusivement un autre accepteur d'électrons que l'oxygène.

Potentiel d'oxydo-réduction

Le potentiel redox indique le potentiel d'oxydation et de réduction des espèces électroactives présentes dans le milieu. Tous les processus métaboliques ont lieu entre les potentiels d'oxydation et de réduction de l'oxygène et de l'hydrogène, et les potentiels peuvent indiquer le type de mécanisme qui aura lieu. Plus grande est la différence de potentiel entre le donneur et l'accepteur d'électrons, plus grand sera le gain énergétique [23].

1.1.8.2 Considérations sur les conditions microbiologiques dans l'environnement de stockage

La porosité de la roche du Callovo Oxfordien est de 50 à 200 nm environ. Les bactéries ont une taille moyenne de 0,5 à 1 µm, ce qui permet de supposer une activité microbiologique faible dans cet environnement due à la compression des microorganismes. Par contre, due à l'insertion des différents matériaux (containers métalliques, béton, etc.) lors de la construction du centre de stockage, l'environnement souterrain va être profondément modifié. Autour de la zone d'excavation (CFZ, *Connected Fractured Zone*) d'importantes altérations sont attendues, comme le changement de la porosité, la formation de fissures, la présence d'un vide technologique et l'insertion des différents matériaux qui peuvent favoriser des changements de pH ou de potentiel redox.

Dans la couche d'argile du Callovo-Oxfordien des éléments nutritifs sont disponibles [27]. En outre, le processus de corrosion du matériel métallique fournira une quantité importante d'hydrogène ainsi que des oxydes de fer. L'hydrogène est

un des principaux substrats énergétiques dans l'environnement souterrain, qui est généralement un milieu pauvre en matière organique [16] .

Au-delà des microorganismes typiques [19, 28, 29], d'autres espèces pourront être introduites dans cet environnement pendant la période de construction du stockage [21]. La présence de l'hydrogène et des oxydes de fer III pourra favoriser le développement de bactéries hydrogénophiles (HOB) et ferriréductrices (IRB).

1.2 Biocorrosion

Quand le processus de corrosion est associé à l'action de microorganismes, le phénomène est appelé biocorrosion, ou MIC pour *Microbiologically Influenced Corrosion*.

L'influence de l'action des microorganismes comme agent responsable de la corrosion est un phénomène étudié récemment. Les microorganismes s'organisent à l'interface du matériau en formant des structures complexes : les biofilms. Les recherches pour élucider les mécanismes de la biocorrosion ont considérablement été développées ces dernières années grâce en particulier à l'amélioration des techniques d'analyses de surface, des techniques de microscopie confocale à balayage laser, de microscopie de force atomique (AFM), microscopie de force biologique (BFM), spectroscopie de masse (MS), diffraction de rayon-X (XPS), techniques qui ont beaucoup aidé à la connaissance du monde complexe des biofilms [30]. Cependant, beaucoup de questions restent encore sans réponse. Il est maintenant admis que le développement du biofilm crée des sites sur la surface métallique favorisant ainsi les mécanismes traditionnels de corrosion électrochimique. Ce concept a quelque peu évolué après la mise en évidence de la participation active des microorganismes dans le mécanisme proprement dit, avec le transfert direct d'électrons entre les microorganismes et le substrat [31].

La biocorrosion est donc un phénomène complexe où les connaissances interdisciplinaires sont nécessaires : sciences des matériaux, électrochimie, chimie, microbiologie,

Selon le centre de recherche de corrosion marine et biologique (Corrodys) [32], le coût annuel de la biocorrosion, en France est estimé à 5 milliards d'euros, ce

qui correspond à environ 10% du coût global de la corrosion. La non prise en compte de ce phénomène sous-estime considérablement les risques, ce qui peut entraîner de grandes pertes financières et écologiques, comme par exemple dans le cas de l'industrie pétrochimique (installations *offshore*) et dans l'industrie du *stockage* nucléaire.

Il faut aussi garder à l'esprit que l'action des microorganismes peut concerner pratiquement tous les types de matériaux [26].

1.2.1 *Les biofilms*

Dans la nature, les microorganismes ont tendance à s'attacher à la surface des substrats : seuls 10% se trouvent à l'état planctonique (i.e. libre). Ils s'organisent en communautés pour former des structures très complexes qu'on appelle biofilm. Les biofilms sont un type de consortium où de multiples espèces cohabitent dans une structure capable de résister aux dangers externes (comme par exemple la résistance à l'action des biocides), ou encore capable de fournir des conditions spécifiques favorables (comme des gradients anaérobies). Les biofilms peuvent être comparables à une forteresse et leur structure est formée par une matrice exopolymérique ou EPS (Extracellular Polymeric Substance). L'EPS est composée d'un mélange de macromolécules, telles que des protéines, des polysaccharides, des lipides, des acides nucléiques, avec une composition qui varie en fonction de la flore microbienne présente [30]. Ces matrices peuvent prendre différentes formes et résultent de facteurs divers, la réaction au stress, les conditions nutritives, la température, le milieu de culture.... Leur conformation spatiale est responsable des différents gradients de concentration de nutriments qui peuvent être observés [33].

1.2.1.1 *La formation des biofilms*

Le schéma du cycle de formation des biofilms est présenté sur la Figure 10.

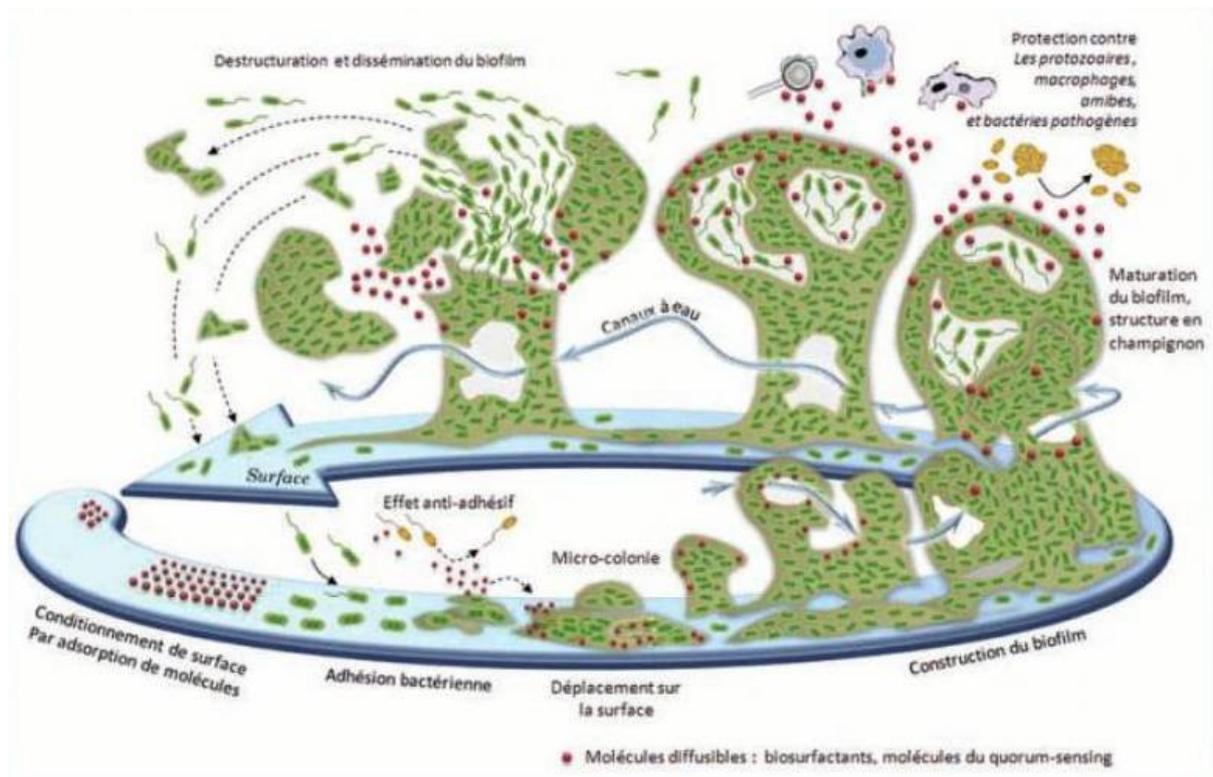


Figure 10 : cycle des phases de développement d'un biofilm [33].

Un processus d'adhésion se met en place au début du développement du biofilm. En général, les microorganismes les plus petits, ou les fragments d'EPSs, provenant de l'étape de dispersion d'un biofilm antérieur, sont les premiers à se fixer sur le substrat. Les interactions principales entre microorganismes / substrat se produisent par des interactions de type Van der Waals. Ces réactions peuvent aussi être modifiées dans le cas d'une répulsion électrostatique. Si les microorganismes arrivent à vaincre cette barrière et à renforcer leur interaction avec le substrat en utilisant des liaisons d'hydrogène, le processus d'adhésion est effectif. Dans ce processus, les caractéristiques intrinsèques de chaque substrat jouent un rôle important, ainsi la topographie a montré la préférence des bactéries à adhérer dans les creux ou dans les rugosités [31].

Les microorganismes modifient leur métabolisme pour passer de l'état planctonique à l'état de biofilm. Ainsi, des analyses topographiques ont montré que l'utilisation des flagelles (des organelles avec une fonction locomotrice) n'est plus nécessaire. Leur énergie est dirigée vers la production d'EPS, polymère agissant comme une colle, qui facilitera l'adhésion d'autres microorganismes.

Après une croissance de la population bactérienne, le biofilm commence à former une configuration 3D. Des particules de surfactants aident à la formation des

« canaux » où la circulation de l'eau permettra la diffusion des substrats. Après avoir atteint un état de maturité, le biofilm peut se rompre et des microorganismes ou des amas de microorganismes / EPS, se divisent et sont aptes à coloniser d'autres surfaces. De cette façon, le cycle de formation se répète.

1.2.1.2 Influence du biofilm dans le processus de biocorrosion

La présence des biofilms en contact avec des surfaces métalliques peut provoquer des altérations interfaciales physiques ou chimiques, et favoriser les échanges d'électrons par différentes voies. Les mécanismes de la biocorrosion peuvent être d'origine directe et indirecte. Quand le processus de corrosion est déclenché à partir de la formation de substances résultantes du métabolisme des microorganismes, par exemple dans le cas de la production de sulfites par des BSR (Bactéries Sulfato-Réductrices), on considère que c'est un mécanisme indirect.

Le mécanisme est considéré comme direct quand le microorganisme participe de façon active au processus de biocorrosion. Ce processus peut être réalisé de différentes manières, telles que la production de leur propre médiateur d'électrons ou le transfert direct d'électrons [34].

Dans la nature, un biofilm est composé de différentes espèces, ce qui est aussi un facteur de difficulté pour la compréhension des mécanismes de la biocorrosion. Le rôle de chaque microorganisme a été progressivement étudié à l'échelle du laboratoire, souvent en monoculture, et des espèces qui n'étaient pas considérées comme des microorganismes actifs dans le processus de biocorrosion sont maintenant reconnues comme tels.

1.2.2 Les microorganismes sulfato réducteurs – BSR

Les microorganismes le plus associés au processus de biocorrosion dans les environnements anoxiques sont sans aucun doute les bactéries sulfato réductrices (BRS), notamment dans les domaines du pétrole et du gaz, dans l'environnement marin ou des structures de béton dans les égouts [35, 36] . Les BRS ont une grande diversité et avec diverses souches des archaées, elles constituent ainsi le groupe de MSR (Microorganismes Sulfato-Réducteurs). Le plus grand nombre de ces MSR entre dans la catégorie des microorganismes anaérobies strictes, bien que certaines

espèces peuvent être tolérantes à l'oxygène et sont capables d'utiliser les différents composés du soufre par dissimilation (Figure 11). Avec d'autres donneurs d'électrons, comme le nitrate et le fumarate, ils ont aussi un métabolisme fermentatif, ce qui donne une grande versatilité à ce groupe [37].

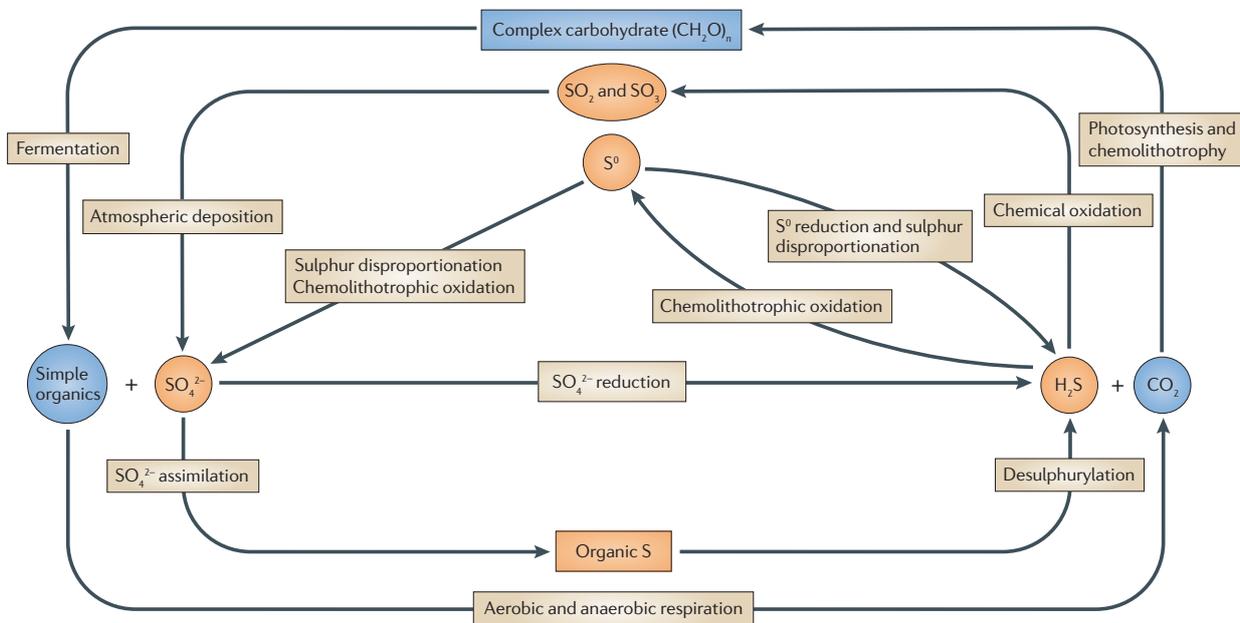


Figure 11 : Les microorganismes sulfato-réducteurs (MSRs) et les cycles du carbone et du soufre : Les MSRs utilisent le sulfate (SO_4^{2-}) comme terminal accepteur d'électrons pendant la dégradation de la matière organique simple. La réduction de SO_4^{2-} produit le sulfure d'hydrogène (H_2S) et le dioxyde de carbone (CO_2). Ainsi, les MSRs jouent un rôle important dans le cycle naturel du soufre et du carbone (voies orange et bleu, respectivement). En tant que produit de la réduction de SO_4^{2-} , le H_2S peut être subséquemment oxydé par des microorganismes chimiotrophes en sulfure élémentaire (S^0) et à la suite en SO_4^{2-} . Le sulfate peut également provenir de la déposition atmosphérique d'oxydes de soufre qui sont formés à partir de l'oxydation chimique de l' H_2S . De cette façon, SO_4^{2-} peut être soit réduit par des MSRs à H_2S , ou pris comme un nutriment essentiel par de nombreux organismes pour former du soufre organique. La désulfuration du soufre organique au cours de la décomposition des organismes morts libère le soufre sous la forme H_2S . D'autres biotransformations dans le cycle du soufre comprennent la réduction de S^0 à H_2S et, la dismutation du soufre, où S^0 est converti sous les deux formes, H_2S et SO_4^{2-} . Le rôle des MSRs dans le cycle du carbone est lié à l'utilisation des composés organiques simples, tels que des acides organiques, comme les donneurs d'électrons dans la réduction de SO_4^{2-} . Le CO_2 , l'un des produits finaux de la réduction du SO_4^{2-} , entre dans le cycle global du carbone et peut être fixé en glucides complexes pour la photosynthèse ou la chemolithotrophie. Ces complexes carbohydrates peuvent encore être fermentés en composés organiques simples, qui sont ensuite utilisés pour la réduction de SO_4^{2-} ou d'autres modes du métabolisme [38].

La diversité des BSR dans la nature est importante : différentes techniques sont utilisées pour leur détection et leur étude. La technique d'enrichissement en milieu de culture, bien qu'elle soit la plus ancienne est toujours utilisée, mais ne permet pas d'étudier toutes les espèces, car on estime que 1% seulement des BSR

dans la nature peuvent être cultivées. Des acides gras phospholipidiques sont utilisés principalement pour la détection des groupes de BSR. Ainsi, une grande partie des informations de la diversité de BRS est obtenue à partir de l'utilisation de gènes marqueurs. Le gène marqueur le plus couramment utilisé est le gène qui code l'ARN ribosomique 16S (rRNA). Différentes techniques comme le clonage ou l'électrophorèse sur gel de gradient dénaturant, ou l'amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 16S rRNA, *dsr* ou *aprA* fragments de gènes ou encore le « DNA microarray de SRP-PhyloChip » ont été aussi appliquées pour déterminer la diversité des BSR dans différents environnements [39].

La présence d'un biofilm de BSR sur une surface métallique conduit souvent à la formation de piqûres. Le mécanisme de biocorrosion des BSR au départ a été attribué au processus de dépolarisation cathodique, cette théorie « classique » étant basée sur l'action de l'enzyme hydrogénase. Dans cette approche, l'enzyme consomme l'hydrogène formé par réaction cathodique à la surface du métal qui agit comme un agent catalyseur. Par contre, cette théorie a été remise en cause, et des applications alternatives ont été développées [26]. Par exemple, le mécanisme indirect de la formation du sulfure d'hydrogène qui favorise une attaque chimique du fer métallique selon, [40]



Équation 2

La formation de FeS va favoriser la création de nouveaux sites cathodiques en générant ainsi une cellule galvanique, ce qui a pour résultat une augmentation de la vitesse de corrosion [13].

En outre, il est possible de citer l'effet propre du biofilm sur la surface métallique qui peut aussi favoriser la formation d'un effet galvanique au-delà des EPS. Il a été démontré que ceux-ci peuvent être des agents accélérateurs de la corrosion [13].

En 2003, Hang a proposé un nouveau mécanisme de corrosion par des souches de BSR plus agressives en termes de corrosion (comme la souche IS4). Leurs résultats indiquent un contact intime entre la surface du fer métallique et les bactéries qui peuvent accepter directement les électrons du métal pour la réduction du sulfate. La réduction du sulfate a été démontrée comme étant plus rapide en présence du fer métallique comme l'unique donneur d'électrons qu'en présence de

lactate et d'hydrogène. De cette façon l'auteur a proposé l'action conjointe de deux mécanismes :

- un transfert d'électrons direct par les cellules microbiennes
- un effet chimique du sulfite produit par l'action des BSR

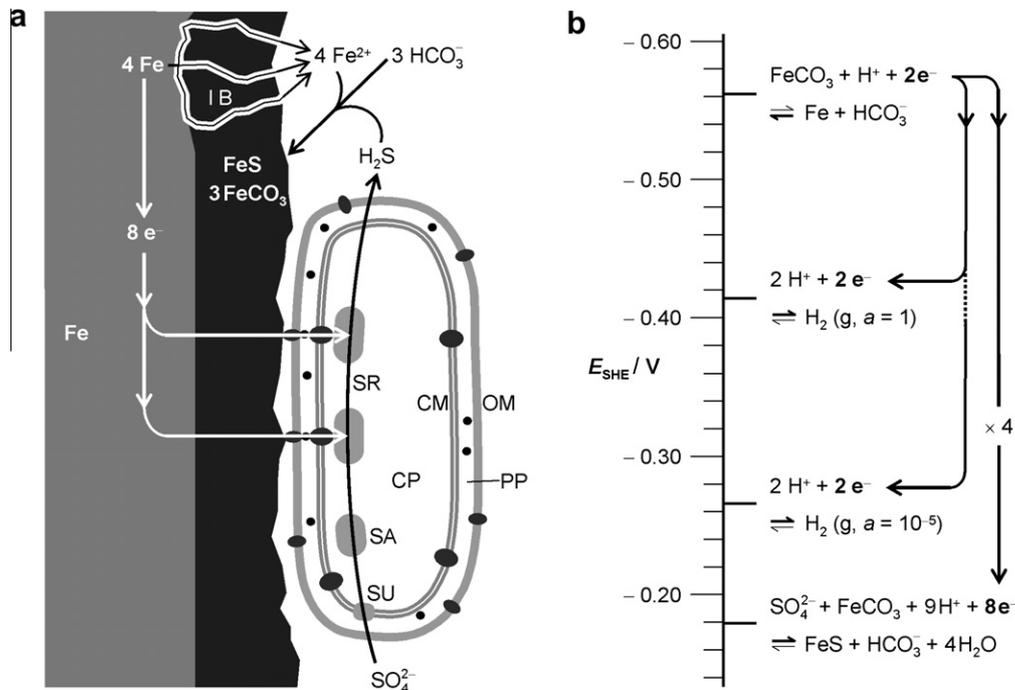


Figure 12 : base topologique et électrochimique, aspects de l'étude des bactéries sulfato réductrices corrosifs. (a) Schéma simplifié des flux d'électrons à partir de la dissolution du fer via des précipités conducteurs (FeS contenu dans FeCO₃) dans la cellule bactérienne. Protéines spécifiques dans la membrane extérieure (OM), périplasma (PP) et la membrane cytoplasmique (CM) permettent le transport des électrons aux enzymes pour la réduction du sulfate (SR). Le schéma indique également les ponts d'ion (IB), le cytoplasme (CP), enzyme pour l'activation du sulfate (SA), et de protéines pour l'absorption de sulfate (SU). Le schéma ne comprend pas la conservation d'énergie biochimique (couplage énergétique) et la biosynthèse de la masse des cellules, telles que l'assimilation de CO₂. (b) L'équilibre des potentiels redox des demi-réactions dans un système de l'eau de mer. L'équilibre des potentiels redox est déterminé par le sulfate et bicarbonate dissouts, et par les cristaux de fer carbonatés et le sulfure ferreux (supposé ici au lieu du sulfure ferreux amorphe). Pour plus de commodité, tous les potentiels redox sont indiqués pour un pH 7.[30]

1.2.3 Bactéries ferri-réductrices

Les bactéries ferri-réductrices sont les bactéries capables de réduire le fer (III) par un processus de dissimilation. Elles sont considérées comme des organismes de grande importance dans les cycles de dégradation anaérobie des matières organiques dans les environnements souterrains et les sédiments : elles sont

considérées comme la principale forme de respiration dans ce contexte [31]. La réduction d'autres éléments, comme le Mn(IV), U(VI), oxygène, nitrate, est aussi observée en présence des IRB. Elles sont capables d'utiliser l'hydrogène comme source de donneurs d'électrons ainsi que de la matière organique, comme des sucres et des acides aminés.

Moins d'attention a été portée sur l'effet des IRB sur le processus de la biocorrosion. Contrairement aux BSR qui sont toujours impliquées dans la plus grande partie des cas de biocorrosion, leur rôle dans le processus de biocorrosion est jusqu'à maintenant un sujet controversé, car certaines études suggèrent que les IRB peuvent jouer aussi un rôle protecteur à la surface des matériaux, inhibant ainsi le processus de corrosion. Cette protection provient de la formation d'une couche de produits de corrosion de Fe (II) qui doit sa formation à la présence du biofilm et qui empêche la dissolution des produits de corrosion du Fe (II). Ainsi, l'action des IRBs est influencée par les caractéristiques environnementales tels que le pH, la composition ionique de la solution, le niveau d'oxygène, ...[32].

Les mécanismes de corrosion des IRB sont associés au processus de réduction du fer (III) des produits de corrosion ; de cette façon le métal va être exposé au milieu corrosif. Dans la littérature, il est possible de trouver des exemples de mécanismes d'espèces d'IRB utilisant des transferts d'électrons à partir de substrats solides, tels que:

- l'utilisation de médiateurs qui peuvent agir comme des navettes de transfert d'électrons entre les cellules bactériennes et les composés accepteurs (Figure 13);

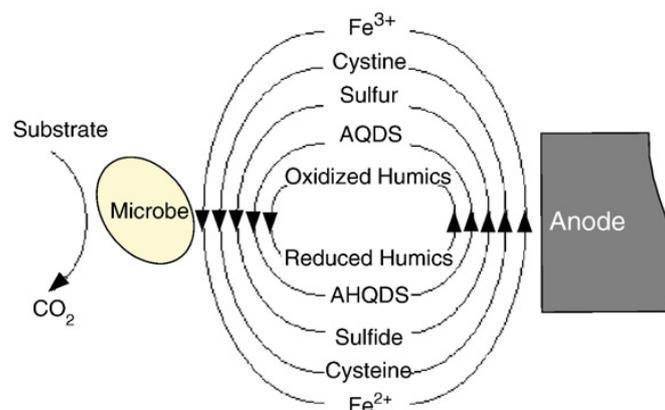


Figure 13 : Modèle de différents composés utilisés comme des navettes d'électrons entre des microorganismes actifs électrochimiquement et l'anode [33].

- Le contact direct des cellules avec un substrat solide à travers les cytochromes multihèmes situés sur la membrane externe (Figure 14); les IRBs doivent transporter les électrons de la membrane cytoplasmique interne jusqu'à l'oxyde de fer(III) à l'extérieur de la cellule.

- L'utilisation de filaments conducteurs intracellulaires (*nanowires*).

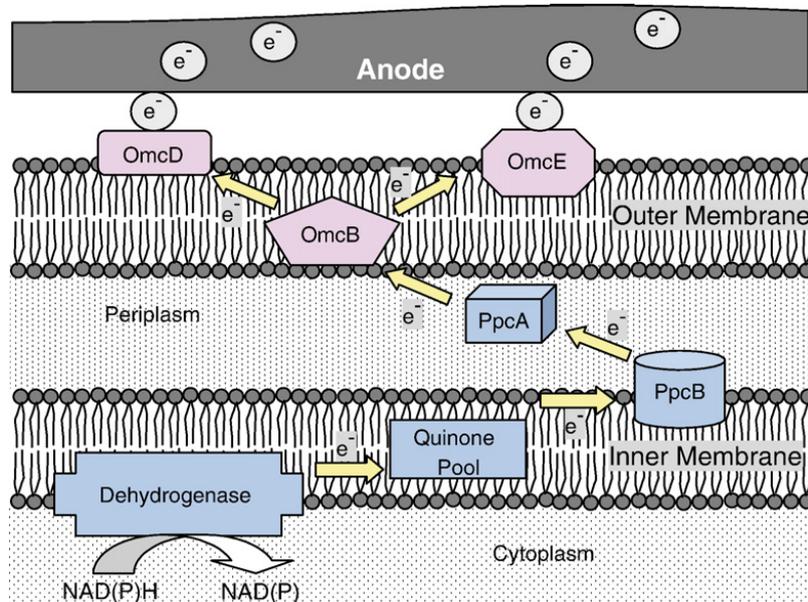


Figure 14 : Récapitulatif des éléments proposés pouvant être impliqués dans le transport des électrons à partir des cellules bactériennes vers l'anode en utilisant une « microbial fuel cell »¹ (MFC) par un IRB (*Geobacter species*) [41].

Il est bien connu que la présence de micro-organismes IRB peut influencer la vitesse de corrosion, mais on ne sait pas si les IRB sont capables d'induire ou d'influencer la corrosion localisée.

1.2.3.1 *Shewanella*

Dans ce travail, *Shewanella oneidensis* MR-1 a été choisi comme microorganisme modèle d'IRB. C'est une bactérie anaérobie facultative capable d'utiliser différents composés comme donneurs d'électrons, tels que le lactate, le formiate, du pyruvate, les acides aminés et, également, l'hydrogène. Selon El-

¹ Microbial Fuel Cells (MFC) pile à combustible microbienne (MFC) est un bioréacteur qui convertit l'énergie chimique, dans les liaisons chimiques dans les composés organiques à l'énergie électrique à travers des réactions catalytiques des microorganismes en conditions anaérobiques

Naggar et al. [42], le taux de respiration de *Shewanella oneidensis* souche MR-1 est $2,6 \times 10^6$ électrons par cellule par seconde en utilisant le lactate comme donneur d'électrons.

L'enzyme fer réductase de *Shewanella oneidensis* MR-1 est supposée contenir deux c-type cytochromes extra membranaires, MtrC (locus tag SO1778 ; aussi connu comme OmcB) et l'OmcA (locus tag SO1779) [43-47], qui permettent, à travers un système complexe de réseau des protéines, de transporter les électrons à partir de la membrane cytoplasmique vers l'espace périplasmique, puis à travers la membrane externe vers la surface extérieure de la cellule où l'enzyme fer réductase catalyse le transfert d'électrons directement à la surface d'un minéral de fer III.

Un autre mécanisme possible est l'utilisation de « nanowires ». *S. oneidensis* MR-1 est capable de produire des « nanowires » dans des conditions anaérobiques. Gorby *at al.* (2006) [48] ont observé par microscope à effet tunnel (STM) que les structures sont des conducteurs électriques efficaces de 50 à 150 nm de largeur. Un mécanisme probable est que les nanowires peuvent permettre l'accessibilité à distance des bactéries au substrat solide en facilitant le transfert d'électrons au travers du biofilm par les cellules immobilisées.

Shewanella oneidensis est aussi capable de respirer à partir de substrats inorganiques avec la sécrétion de riboflavine (B2) et de la flavine mononucléotide (FMN) qui agissent comme des navettes d'électrons. Ces substances sont détectées dans toutes les cultures de *Shewanella*. Kotloski et Gralnick (2013) [49] ont proposé que les riboflavines des *Shewanella oneidensis* ont une contribution d'environ 75% dans le transfert d'électrons.

2 Techniques électrochimiques

À partir de l'instant où un métal est mis en contact avec un environnement aqueux, des réactions de nature électrochimique peuvent se dérouler. Ces réactions, sont en général complexes. Ainsi différents facteurs peuvent affecter le transport de charge à travers l'interface métal/électrolyte, comme par exemple la présence concomitante de plusieurs réactions cinétiques différentes. En présence de réactions en série, le processus est contrôlé par la cinétique la plus lente. En conséquence, due à la complexité des réactions existantes, l'utilisation de différentes techniques complémentaires est nécessaire pour une meilleure compréhension des différentes réactions présentes. A titre d'exemple, il est possible de citer, outre le transfert de charge pouvant avoir lieu sur une surface hétérogène, le processus de transport de matière à l'interface du matériau/électrolyte, les processus d'adsorption et de désorption des espèces, la formation des films d'oxydes à la surface des matériaux métalliques, etc.

Dans ce chapitre, les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail sont présentées.

2.1 Chronopotentiométrie à courant nul.

Cette technique consiste à suivre le potentiel de circuit ouvert (ou potentiel d'abandon) de l'électrode de travail en fonction du temps. Le potentiel de l'électrode est mesuré par rapport à une électrode de référence immergée dans une cellule électrochimique. Dans cette situation, le courant global est nul, résultat de l'équilibre entre les courants cathodiques et anodiques (équation 3) et le potentiel est appelé le potentiel d'équilibre (U_{eq}).

$$i = i_a - i_c = 0 \quad i_c < 0 \quad \text{Équation 3}$$

Dans le cas d'un matériau métallique, le potentiel d'équilibre est aussi appelé potentiel de corrosion (E_{cor}).

2.2 Chronoampérométrie

Pour la réalisation de la chronoampérométrie, le potentiel de l'électrode de travail est fixé. Le système n'est donc plus à l'équilibre et on mesure un courant global cathodique ou anodique selon le potentiel choisi. Ainsi, le courant faradique sera suivi en fonction du temps. La charge échangée pendant le processus de dissolution peut dans certains cas être calculée à partir de l'intégration du courant.

2.3 Courbes de polarisation ou voltammétrie

Les courbes de polarisation et de voltammétrie sont obtenues en balayant le potentiel d'une électrode de travail à une vitesse déterminée. Le courant résultant de cette opération est tracé par rapport au potentiel. La vitesse de balayage est un facteur très important, qui sera choisie selon le phénomène que l'on souhaite observer.

Pour l'analyse des systèmes stationnaires, une vitesse très faible est nécessaire. Ainsi, pour raisons pratiques les courbes de polarisation sont obtenues avec une très faible vitesse de balayage, en général 1 mV s^{-1} ou moins, ce qui correspond dans la réalité à un régime quasi-stationnaire. Les courbes cathodiques et anodiques sont mesurées successivement. La mesure démarre quelques millivolts avant (ou après) le potentiel du circuit ouvert, et les résultats sont en général tracés avec une échelle semi-logarithmique. La Figure 15 (courbe noire) représente une courbe de polarisation. Les courants cathodique et anodique peuvent être obtenus par linéarisation des parties extrêmes (anodique et cathodique) (Figure 15 bleu). Le point d'intersection des deux droites résultantes correspond au potentiel de corrosion et au courant de corrosion. Pour un système mixte, les couples redox étant différents

en oxydation et en réduction, les courants anodique et cathodique s'expriment selon deux équations de Tafel distinctes. Ainsi, dans le domaine anodique [50]:

$$i_a = k_a \exp(b_a \eta_s) \quad \text{Équation 4}$$

et pour le courant cathodique :

$$i_c = -k_c \exp(-b_c \eta_s) \quad \text{Équation 5}$$

où

- k_a et k_b sont les constantes cinétiques de chacune des réactions anodique et cathodique.
- b_a et b_c sont les coefficients de Tafel (V^{-1}) et sont reliés à la pente de Tafel (β en V / décade) par la relation :

$$b = \frac{2,303}{\beta} \quad \text{Équation 6}$$

- η_s est la surtension qui est calculée à partir de la relation entre le potentiel imposé (U) et le potentiel d'équilibre d'un couple redox quelconque (U_{eq}) selon :

$$\eta_s = U - U_{eq} \quad \text{Équation 7}$$

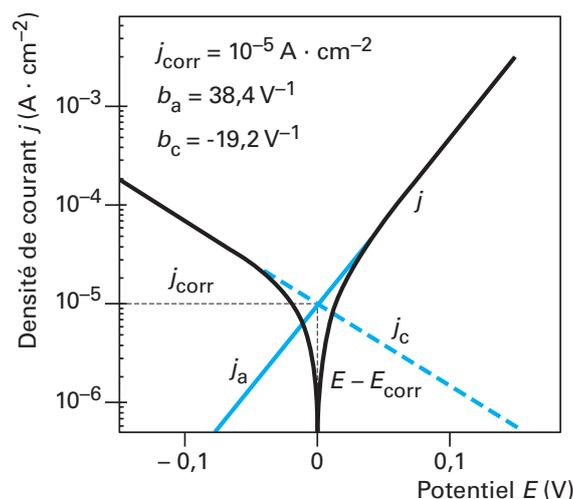


Figure 15 : Exemple d'une courbe de polarisation du fer dans un milieu acide avec leurs représentations respectives des courants anodique et cathodique en échelle semi logarithmique [8].

2.4 Microscopie électrochimique à balayage

La microscopie électrochimique à balayage, plus connue sous son acronyme SECM (*Scanning Electrochemistry Microscopy*), est une technique électrochimique mettant en œuvre une sonde qui mesure des variations de courant liées aux réactions électrochimiques qui se déroulent à une interface [9].

Cette technique a été développée dans les années 80 et perfectionnée par le groupe de Bard. C'est une technique capable de fournir des informations topographiques *in situ* et des informations sur l'évolution de la réactivité de la surface en solution aqueuse, à l'échelle micrométrique et submicrométrique. Pour cette raison, la technique de SECM est un outil très avantageux pour les études de l'évolution de la surface d'un matériau ou des processus de corrosion dès leur apparition [51].

Dans ce travail, la SECM a été utilisée pour étudier la consommation de l'hydrogène par des bactéries ferriréductrices pendant le processus de biocorrosion de l'acier au carbone.

Les principes et modes d'opération de cette technique sont décrits brièvement dans ce qui suit.

2.4.1 Ultra-microélectrode (UME)

Une ultra-microélectrode, ou simplement microélectrode, est une électrode qui, de par sa petite taille, a une diffusion hémisphérique.

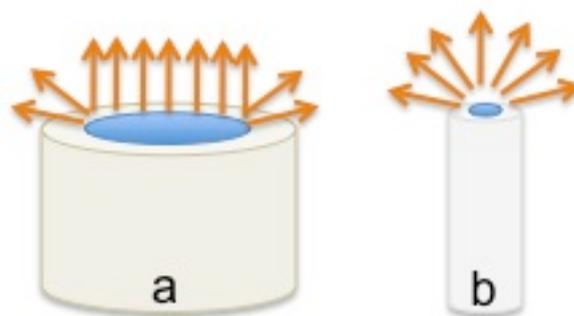


Figure 16 : Illustration du processus de diffusion à l'interface d'une : (a) macro électrode à disque-plan (b) une microélectrode à disque-plan, dans une solution.

Les UME peuvent présenter des géométries très différentes, comme par exemple la microélectrode hémisphérique (goutte de mercure) ou encore la microbande ou la microélectrode anneau, mais la microélectrode à disque plan reste néanmoins la plus souvent décrite et utilisée. Une des raisons de ce choix est liée à leur relative facilité de préparation qui consiste à insérer dans un capillaire en verre (ou pour autre matériau isolant) un fil métallique (en général de platine ou d'or). D'un rayon inférieur à 50 μm , que l'on scelle soit par fusion du verre soit à l'aide de résines. La sonde doit ensuite être polie perpendiculairement au fil et les parois latérales du capillaire seront façonnées pour obtenir les proportions désirées. Cette proportion est caractérisée par un paramètre adimensionnel RG qui impacte le comportement du transport de matière d'une sonde de SECM. Ce facteur RG est obtenu par :

$$RG = \frac{Rg}{a} \quad \text{Équation 8}$$

Où Rg c'est le rayon de la paroi du capillaire et a le rayon du fil métallique.

Dues à leurs dimensions réduites, les ultra-microélectrodes ont plusieurs avantages par rapport aux électrodes classiques, comme par exemple :

- une faible chute ohmique,
- une couche de diffusion mince et hémisphérique qui se traduit par un transport de masse rapide et contrôlé, et un courant quasi-stationnaire ou stationnaire.
- une faible constante de temps pour la cellule électrochimique,
- une détection de faibles concentrations d'espèces électroactives en solution.

Ce sont des éléments essentiels pour les applications en SECM.

2.4.2 Mode de fonctionnement

Les mesures de SECM sont faites à l'aide d'une cellule électrochimique traditionnelle, à trois électrodes (électrode de travail, normalement nommée substrat, électrode de référence et contre-électrode) et une sonde (un seconde électrode de travail) qui doit être positionnée perpendiculairement à ce substrat. Cette sonde peut

être déplacée au voisinage du substrat (première électrode de travail) avec un système de positionnement. Pour ce faire, il est indispensable d'utiliser un bipotentiostat pour contrôler simultanément le substrat et la sonde, ainsi qu'un système de positionnement ayant une précision à l'échelle micrométrique. Ce système permet par exemple le déplacement de la sonde sur la surface du substrat au cours des mesures, afin de réaliser des cartographies.

Quand la microélectrode est immergée loin du substrat dans une solution contenant une espèce électroactive, le courant total en régime stationnaire est donné par la relation [10] (Figure 17a):

$$i_s = 4nFD_oC_o^*a \quad \text{Équation 9}$$

Où n est le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday, D_o le coefficient de diffusion, C_o^* la concentration de l'espèce électroactive et a le rayon de l'électrode.

Cependant, lorsque l'on approche la sonde à une distance de quelques fois le rayon du substrat, ce dernier va perturber la couche de diffusion ce qui se traduit par une modification du courant de la sonde. Cette perturbation dépendra en particulier de la nature du substrat et de sa réactivité. C'est le mode de fonctionnement *feedback*.

Dans le cas où le substrat est une surface isolante (Figure 17 b), le substrat bloque la diffusion des espèces électroactives jusqu'à la sonde, diminuant ainsi le courant. Donc quand la distance sonde substrat diminue, le courant diminue et tend vers 0 pour une distance nulle. Ce mode de fonctionnement est connu sous le nom de *feedback* négatif. Inversement si le substrat a la capacité de réduire ou d'oxyder l'espèce générée par la sonde le courant mesuré à la sonde va dépendre de la réactivité du substrat. Ainsi, par exemple, pour une sonde impliquant un processus d'oxydation, quand la sonde est très proche du substrat une région de confinement apparaît. La diffusion de nouvelles espèces est donc physiquement limitée. Si le substrat est capable de réduire les espèces produites par la sonde, le cycle se complète et le courant de la sonde augmente (Figure 17 c). De cette façon, le courant de la sonde est lié à la distance entre la sonde et le substrat (mode *feedback* Positif).

Une autre possibilité d'application est l'utilisation de la sonde comme collecteur. Dans ce cas, la sonde, proche du substrat, va détecter les espèces générées par ce dernier. Comme le courant est directement proportionnel à la concentration, c'est une manière quantitative de détecter les espèces libérées par le substrat.

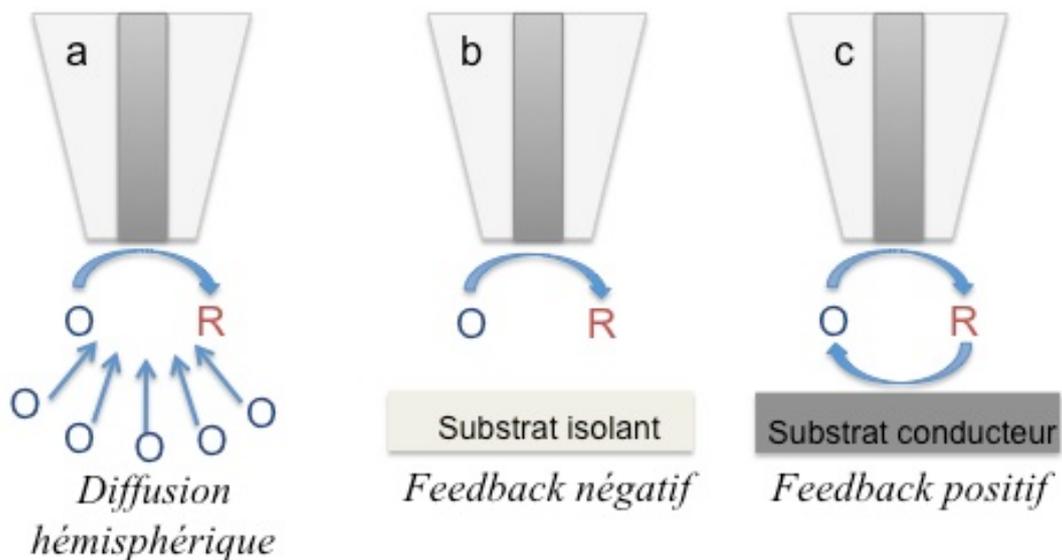


Figure 17 : Représentation des trois conditions présentées entre la sonde et le substrat (les principes de la SECM) où (a) représente une diffusion hémisphérique, (b) représente la sonde face à un substrat isolant, mode *feedback négatif* et (c) représente la sonde dans le mode *feedback positif*, face à un substrat conducteur.

2.4.3 Courbe d'approche

La courbe d'approche est une technique qui permet d'obtenir des informations sur la nature du substrat et sur la cinétique des réactions qui ont lieu sur ce substrat. Le système fonctionne dans le mode *feedback*, et consiste à suivre les variations du courant de la sonde pendant leur approche du substrat à une vitesse constante, en considérant une distance initiale de quelques fois le rayon du substrat. Dans ce cas, la courant en fonction de la distance sonde est tracée, en général en utilisant des paramètres adimensionnels. Pour la normalisation de la courbe d'approche (I_{norm}), le courant de la sonde (i_s) est divisé par le courant stationnaire (i_{ss}) (équation 10) mesuré loin du substrat. La distance normalisée (L) est obtenue en divisant la distance entre la sonde et le substrat (d) par le rayon de la sonde (a) (équation 11).

$$I_{norm} = \frac{i_s}{i_{ss}}$$

Équation 10

$$L = \frac{d}{a}$$

Équation 11

Ainsi comme cela a été mentionné dans le paragraphe précédent, lorsque la sonde s'approche d'un substrat isolant, le système est assimilable à une couche mince, empêchant la diffusion des espèces électroactives vers la sonde. Cela se traduit par une diminution du courant de la sonde (mode *feedback négatif*) et le courant normalisé tend alors vers zéro (Figure 18a).

Dans ce mode opératoire, la géométrie de la sonde est un paramètre important, car le facteur RG influence le profil du courant obtenu.

Dans le cas d'un substrat conducteur, l'espèce générée à la sonde peut réagir sur le substrat. Le résultat est une augmentation du courant due à la régénération des espèces formées (Figure 18b). Dans ce cas, la géométrie de la sonde ne joue pas de rôle significatif au niveau des courbes obtenues, contrairement à la cinétique de réaction qui implique une augmentation du courant. Plus la cinétique sur le substrat est rapide, plus grande est la réponse en courant, le cas limite étant obtenu pour un système Nerstien sur le substrat.

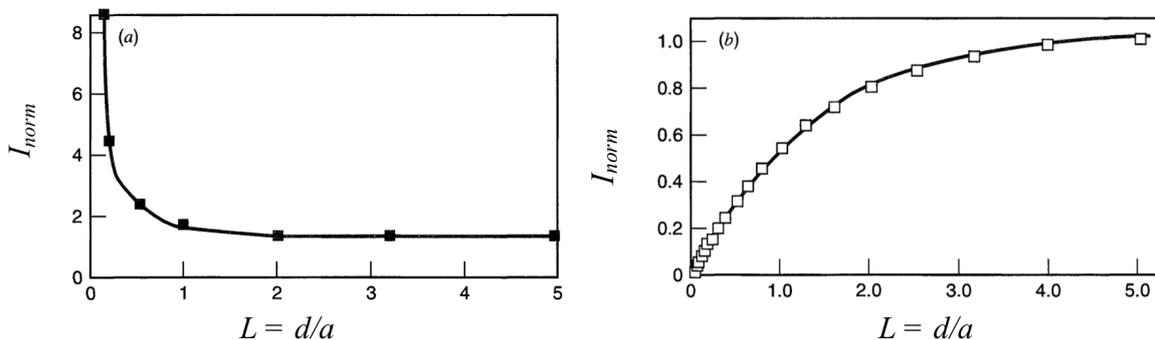


Figure 18 : courbes d'approche de SECM normalisées pour un substrat (a) conducteur (b) isolant [9] .

2.4.4 Mode générateur / collecteur

Le mode générateur / collecteur peut être appliqué de deux manières différentes. Dans l'une, la sonde agit comme électrode génératrice et le substrat comme collectrice (TG/SC), c'est-à-dire que la sonde génère des espèces électroactives qui vont être détectées par le substrat. Le deuxième mode correspond à l'inverse, le substrat est le générateur et la sonde la collectrice (SG/TC). Ces modes de fonctionnement sont comparables au système disque-anneau tournant.

Dans le mode TG/SC, lorsqu'il s'agit d'une espèce stable et d'une réaction électrochimiquement réversible, toutes les espèces générées par la sonde peuvent être collectées par le substrat quand la sonde se situe à une distance $a/d < 2$. Ce qui n'est pas le cas pour le mode SG/TC, car la sonde microscopique ne peut pas collecter toutes les espèces générées par un substrat macroscopique. Le coefficient de collection est dans ce cas très inférieur à 1. Cependant, avec les deux modes (TG/SC et SG/TC), des informations quantitatives peuvent être obtenues avec une bonne sensibilité.

Dans cette étude, le mode générateur / collecteur (TG/SC) a été utilisé pour démontrer la viabilité de la détection de l'hydrogène dans la solution M1 (milieu de culture de IRB représentatif des eaux interstitielles).

2.4.5 Autres modes d'applications

La SECM peut être utilisée selon différents modes que l'on adapte aux applications visées. On peut citer par exemple la technique d'interrogation de surface développée aussi par le groupe de Bard [9] qui permet la détection et la quantification des espèces adsorbées sur le substrat. Une sonde est placée proche de la surface du substrat pour générer des espèces titrantes qui vont réagir avec les espèces adsorbées sur le substrat. Un comportement feedback positif est observé jusqu'à ce que toutes les espèces adsorbées en surface soient consommées.

La SECM en mode courant alternatif a été récemment développée par Trinh et al. [52, 53]. Cette approche permet de caractériser la relaxation des taux de recouvrement des espèces adsorbées à l'électrode.

2.5 Spectroscopie d'Impédance Electrochimique

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est une technique puissante et souvent appliquée dans les études de corrosion pour la détermination de la cinétique des réactions électrochimiques et chimiques à l'interface. L'impédance permet l'étude des différents phénomènes mis en jeu en les séparant en fonction de leurs constantes de temps comme par exemple l'adsorption d'espèces électroactives, les différentes réactions électrochimiques et le transfert de matière. Cette technique est bien décrite dans la littérature [54-56].

Pour mesurer l'impédance d'un système électrochimique l'équipement nécessaire est constitué d'un potentiostat et d'un analyseur de fonction de transfert. Le système utilisé dans ce travail pour les mesures d'impédance est décrit dans le paragraphe 3.2.8.

L'impédance (Z) est une fonction de transfert où l'application d'un signal sinusoïdal, de faible amplitude à l'interface d'un matériau permet d'obtenir un signal de réponse, également sinusoïdal, de même fréquence mais avec une amplitude et une phase différentes.

L'impédance est une technique applicable à des systèmes linéaires. Cependant, les systèmes électrochimiques en général présentent une courbe courant - tension caractéristique non linéaire. Mais, en considérant seulement une petite partie de cette courbe, une relation linéaire entre les grandeurs ΔV et ΔI peut être observée (Figure 19).

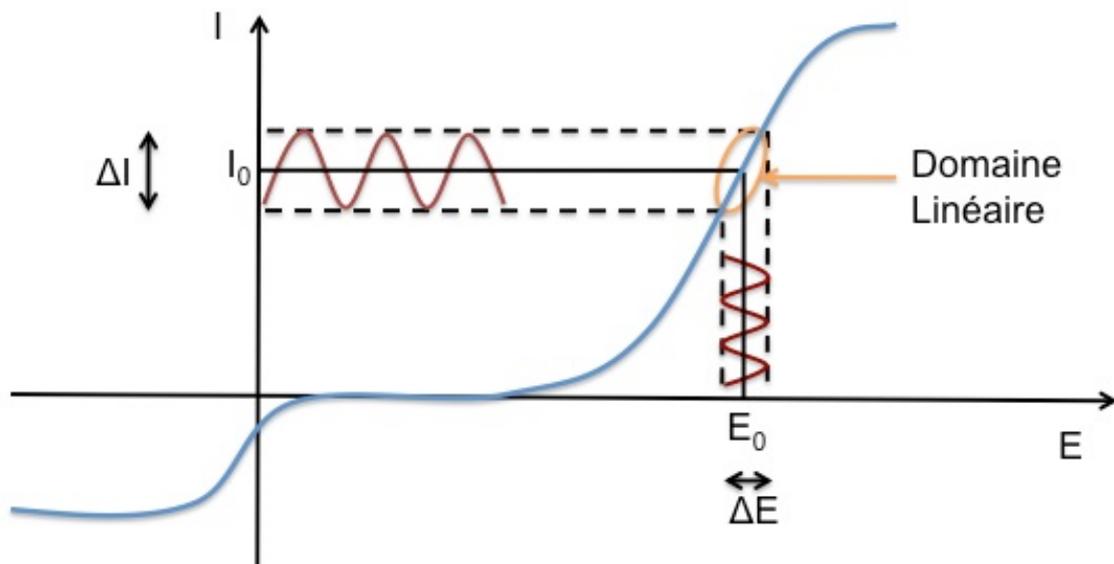


Figure 19 : Réponse linéaire en courant (ΔI) à une perturbation sinusoïdale en potentiel (ΔE) de faible amplitude autour d'une valeur de potentiel stationnaire (E_0).

La mesure d'impédance peut être obtenue suivant deux modes différents : galvanostatique ou potentiostatique. Le choix du mode de régulation dépend principalement des caractéristiques intrinsèques de chaque système électrochimique, la condition étant d'obtenir une réponse linéaire de la grandeur non-perturbée. Dans notre travail le mode potentiostatique a été appliqué. Ainsi le potentiel du substrat a été fixé et une perturbation de faible amplitude (pour garantir la linéarité du système) a été appliquée [57]:

$$E(t) = E_0 + \Delta E(t) \quad \text{Équation 12}$$

et

$$\Delta E(t) = \Delta E \sin(\omega t) \quad \text{Équation 13}$$

où $\omega = 2\pi f$ représente la pulsation de la perturbation (en $rad\ s^{-1}$) et f est la fréquence en Hz.

Par conséquent, la réponse en courant du système est :

$$I(t) = I_0 + \Delta I(t) \quad \text{Équation 14}$$

et

$$\Delta I(t) = \Delta I \sin(\omega t + \varphi) \quad \text{Équation 15}$$

où φ est le déphasage entre $E(t)$ et $I(t)$.

De cette façon, l'impédance est une grandeur complexe qui peut être définie comme la variation du potentiel sur la variation du courant à chaque pulsation :

$$Z(\omega) = \frac{\Delta E(\omega)}{\Delta I(\omega)} \quad \text{Équation 16}$$

L'impédance électrochimique peut être représentée, soit en coordonnées polaires (Z, φ) comme dans la relation exprimée dans l'équation 16, soit en coordonnées cartésiennes (ReZ, ImZ) [37] :

$$Z(\omega) = Z \exp(j\varphi) = ReZ + j ImZ \quad \text{Équation 17}$$

Les relations entre ces quantités sont :

d'une part,

$$|Z|^2 = (Re Z)^2 + (Im Z)^2 \quad \text{Équation 18}$$

et

$$\varphi = \arctan\left(\frac{Im Z}{Re Z}\right) \quad \text{Équation 19}$$

d'autre part,

$$Re Z = Z \cos \varphi \quad \text{Équation 20}$$

et

$$Im Z = Z \sin \varphi \quad \text{Équation 21}$$

où

- $|Z|$ est le module de l'impédance ;
- j est le nombre complexe tel que $j^2 = -1$;
- φ est la phase représentative du déphasage entre ΔV et ΔI ;
- $Re Z$ et $Im Z$ sont respectivement les parties réelle et imaginaire de $Z(\omega)$.

L'impédance est représentée en général par deux types de tracé. La représentation en coordonnées cartésiennes se fait dans le plan de Nyquist. Dans ce type de tracé, on trace l'impédance imaginaire négative en fonction de l'impédance réelle ($ReZ, -ImZ$).

La deuxième représentation, est la représentation de Bode correspond au logarithme du module de l'impédance et à la phase en fonction du logarithme de la fréquence.

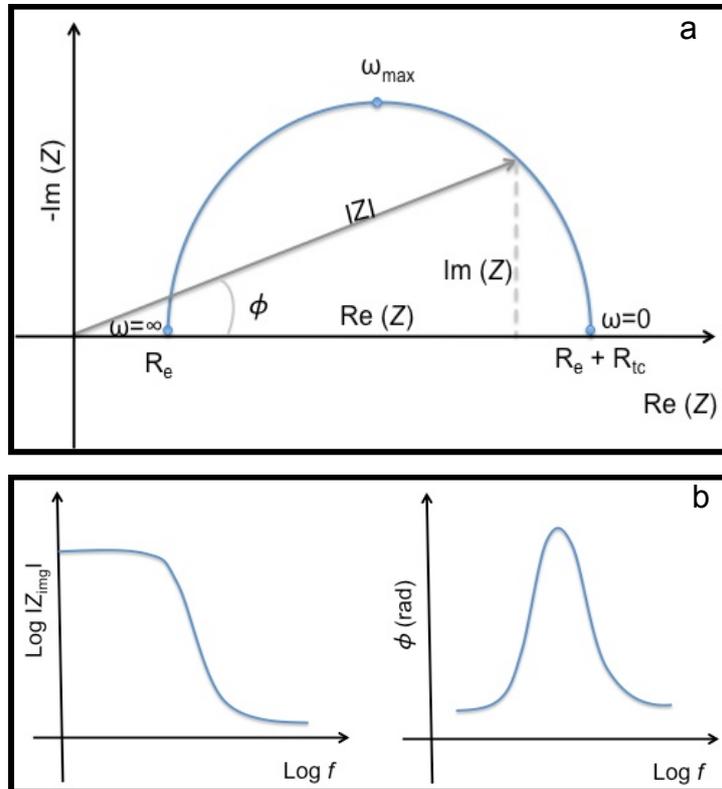


Figure 20 : Représentations de l'impédance d'une cellule électrochimique exemplaire dans le plan de Nyquist (a) et dans le plan de Bode (b).

La représentation de Nyquist présentée dans la Figure 20a illustre une réaction électrochimique où seulement le phénomène de transfert de charge détermine la cinétique à l'interface métal/solution. Il est possible d'identifier trois points importants, la résistance de l'électrolyte (R_e) à haute fréquence (HF), la résistance de transfert de charge en basse fréquence, et la fréquence caractéristique qui est directement liée à la capacité de double couche par l'équation 21.

$$\omega_{\max} = \frac{1}{C_{dc}(R_{tc})} \quad \text{Équation 22}$$

Le courant total obtenu dans cette configuration est la somme de deux types de courant, un courant faradique I_f , et un courant de charge de la double couche à l'interface, I_c . Ainsi, une cellule électrochimique peut être modélisée en considérant

une résistance d'électrolyte en série avec une capacité de double couche en parallèle avec une résistance de transfert de charge. Le circuit équivalent d'une telle cellule est représenté par la figure suivante :

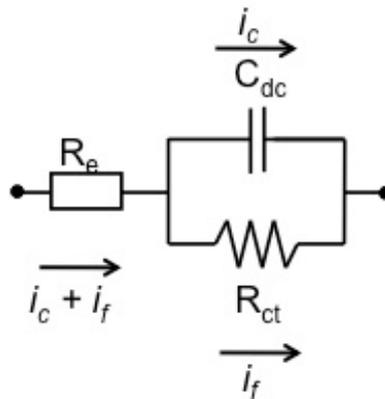


Figure 21 : Représentation d'un circuit électrique équivalent d'une cellule électrochimique.

La représentation de Bode (Figure 20 b), comprend d'une part le module $|Z|$ et d'autre part la phase φ en fonction du logarithme de la fréquence.

Dans quelques rares systèmes électrochimiques on peut observer une boucle purement capacitive, c'est-à-dire un demi-cercle parfait. En général, cette boucle est aplatie à cause de l'hétérogénéité de la réactivité de la surface analysée. Dans ce cas, la résistance de transfert de charge est associée à un élément à phase constante (CPE). L'association directe entre le CPE et la capacité de double couche n'est donc pas correcte ainsi, pour une électrode à réactivité distribuée, l'impédance est donc représentée par [54] :

$$Z(\omega) = R_e + \frac{1}{(j\omega)^\alpha Q} \quad \text{Équation 23}$$

où α et Q sont les paramètres du CPE. α représente l'inclinaison de la pente de la boucle capacitive. Quand α est égale à 1, le CPE est égale à la capacité. Lorsque la valeur de α décroît la courbe devient plus aplatie. On peut déterminer α en traçant le module de l'impédance imaginaire en fonction de la fréquence.

Une façon d'obtenir la capacité interfaciale ou la capacité effective (C_{eff}) est d'utiliser la formule développée par Brug et al. [58], qui peut être appliquée pour une électrode bloquante dans le cas où la réactivité du système est caractérisée pour une surface hétérogène.

$$C_{eff} = [QR_e^{(1-\alpha)}]^{1/\alpha}$$

Équation 24

Cette formule applicable dans le cas où la résistance de transfert de charge a une valeur beaucoup plus grande que la valeur de la résistance d'électrolyte. Quand la différence entre R_{tc} et R_e n'est pas assez significative la relation à appliquer est donnée par l'équation 25.

$$C_{eff} = \left[Q \left(\frac{1}{R_e} + \frac{1}{R_t} \right)^{(\alpha-1)} \right]^{1/\alpha}$$

Équation 25

2.6 Spectroscopie d'impédance électrochimique locale (SIEL)

L'impédance électrochimique est une technique qui s'applique à toute la surface de l'échantillon analysé, en moyennant ainsi la réactivité de l'électrode. Cependant, dans la réalité, les systèmes électrochimiques n'ont pas toujours un comportement idéal. En effet, l'hétérogénéité microstructurale du substrat peut engendrer des réactivités différentes que l'on ne pourrait pas observer par des techniques électrochimiques globales. Il est alors important de mettre en œuvre des techniques locales. Pour cette raison, l'utilisation de microélectrodes pour l'analyse de la différence de réactivité le long de la surface de l'électrode de travail est une technique importante pour élucider des mécanismes de corrosion localisée. Parmi ces techniques se démarque la Spectroscopie d'Impédance Electrochimique Locale (SIEL). Le principe de base de cette technique est similaire à la SIE et consiste à placer une bi-électrode au voisinage de l'échantillon (configuration d'une cellule électrochimique à 5 électrodes) pour mesurer le courant local.

Les mesures simultanées d'impédance locales et globales nécessitent un analyseur de fréquences à multivoies, une bi-électrode, qui joue un rôle d'électrode de référence locale, des amplificateurs de courants qui permettent l'amplification des signaux de la bi-électrode avant d'envoyer les données vers l'analyseur de fonction de transfert, qui permettra de calculer l'impédance locale à partir des courants locaux et de la différence du potentiel local.

La bi-électrode est utilisée donc pour mesurer la densité de courant locale (i_{loc}) en utilisant la loi d'Ohm :

$$i_{loc}(\omega) = \frac{\Delta V_{bi-électrode}(\omega)k}{d} \quad \text{Équation 26}$$

où :

- ΔV est la différence de potentiel, en courant alternatif, entre les deux points de la bi-électrode (V)
- k est la conductivité spécifique de l'électrolyte (en $\Omega^{-1}cm^{-1}$)
- d est la distance entre les deux points de mesure (en cm) comme illustré sur la Figure 22.

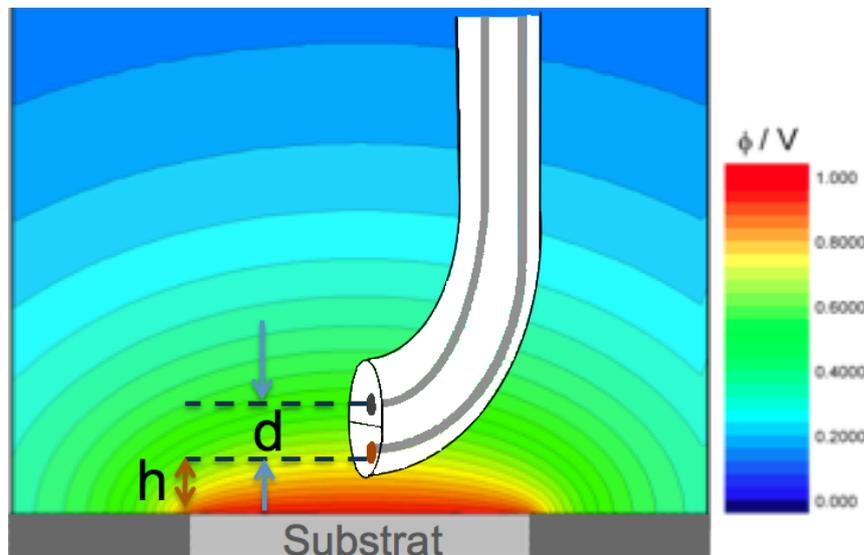


Figure 22 : Schéma de la pointe d'une bi-électrode au voisinage du substrat à disque plan et isolé avec la représentation des lignes de potentiel

L'analyse dimensionnelle de l'équation 26 nous montre que la valeur obtenue est en $A\ cm^{-2}$, ce qui représente donc une densité de courant. Par conséquent cette valeur mesurée ne prend pas en compte la taille de la surface analysée.

A partir de la mesure de courant local instantané, il est possible d'obtenir trois types d'impédances locales [59] : l'impédance locale, l'impédance interfaciale et l'impédance ohmique.

2.6.1 Impédance locale (z)

L'impédance locale est obtenue à partir de la différence de potentiel de l'électrode de travail par rapport à l'électrode de référence (positionnée loin de l'électrode de travail), en régime alternatif, et du courant local mesuré avec le système de bi-électrode.

$$z(\omega) = \frac{\tilde{V}(\omega) - \Phi_{ref}}{i_{loc}(\omega)} = \frac{\tilde{V}(\omega)}{\Delta V_{bi-electrode}(\omega)} \frac{d}{k} \quad \text{Équation 27}$$

2.6.2 Impédance interfaciale locale (z_0)

Pour la mesure de l'impédance interfaciale locale, on considère maintenant la différence entre le potentiel du substrat et le potentiel de la pointe de la bi-électrode positionnée à la limite intérieure de la couche de diffusion ($\tilde{V}(\omega) - \tilde{\Phi}_0(\omega)$) et le courant local. En autres termes, on mesure également le potentiel local pour évaluer l'impédance interfaciale locale.

$$z_0(\omega) = \frac{\tilde{V}(\omega) - \tilde{\Phi}_0(\omega)}{i_{loc}(\omega)} = \frac{\tilde{V}(\omega) - \tilde{\Phi}_0(\omega)}{\Delta V_{bi-electrode}(\omega)} \frac{d}{k} \quad \text{Équation 28}$$

Cependant, le positionnement de la sonde juste à l'extérieur de la double couche est impossible dans la réalité. Ainsi, la distance h entre la partie inférieure de la sonde et le substrat, représentée dans la Figure 22, peut être prise en considération pour l'obtention de l'impédance interfaciale (z_h)

$$z(h) = \frac{\tilde{V}(\omega) - \tilde{\Phi}_h(\omega)}{i_{loc}(\omega)} = \frac{\tilde{V}(\omega) - \tilde{\Phi}_h(\omega)}{\Delta V_{bi-electrode}(\omega)} \frac{d}{k} \quad \text{Équation 29}$$

2.6.3 Impédance ohmique locale (z_e)

À partir de la différence de l'impédance locale et de l'impédance interfaciale il est possible d'obtenir l'impédance ohmique locale comme il est démontré dans l'équation 30.

$$z_e(\omega) = z(\omega) - z_0(\omega)$$

Équation 30

2.6.4 Influence de la géométrie du substrat

Sur la Figure 22 on observe une différence de potentiel au voisinage de l'isolant de l'électrode. Une variation des lignes de courant peut également être observée en relation avec la géométrie de l'électrode comme cela est illustré sur la Figure 23. Au centre de l'électrode les lignes de courant sont normales à la surface de l'électrode ($i = i_n$). Au bord de l'électrode, une contribution radiale du courant doit être prise en compte. Ainsi le courant local est composé d'une composante normale (i_n) et d'une composante radiale (i_r).

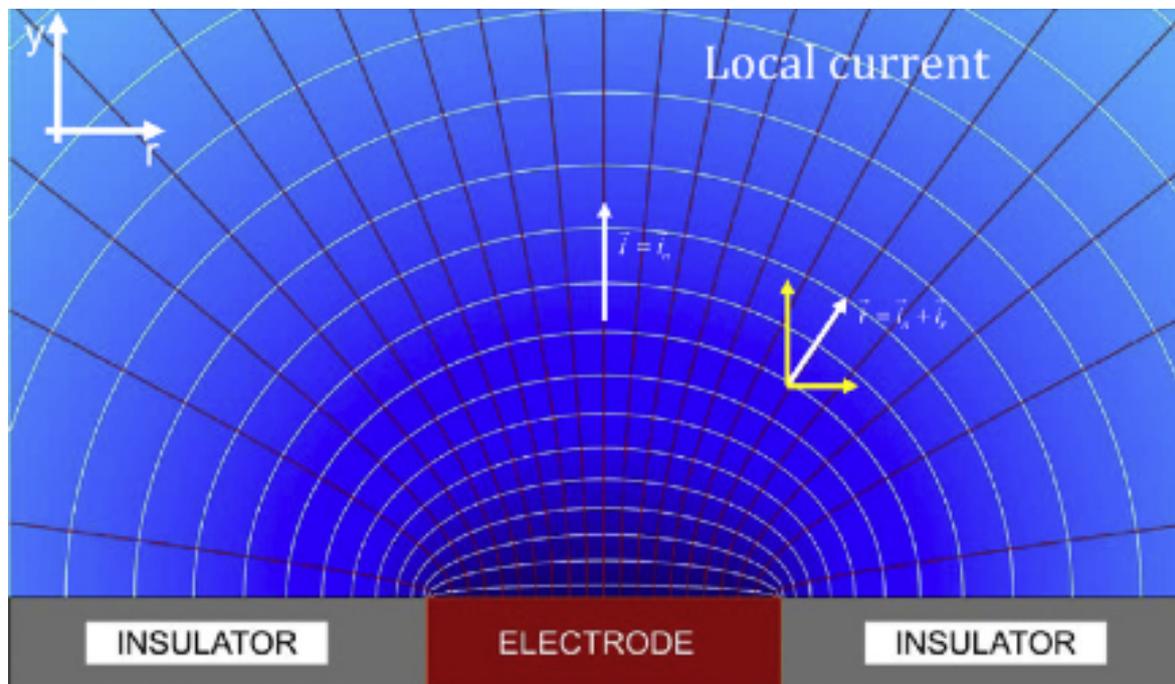


Figure 23 : Représentation de la distribution du courant et du potentiel d'une électrode à disque isolé.

La position de la bi-électrode sur le substrat pendant les mesures d'impédance locale a une influence sur la réponse obtenue. Une étude sur la contribution de la composante radiale a été faite par Ferrari *et al.* [60] en utilisant une tri-électrode pour évaluer la contribution des composantes radiales et normales. Ils ont constaté qu'au centre de l'électrode la contribution radiale peut être négligée,

tandis que proche de l'isolant (sur le bord de l'électrode), la contribution radiale est plus importante, influençant ainsi la réponse de l'impédance obtenue.

Frateur *et al.* [61] ont également étudié l'influence de la géométrie de l'électrode à l'aide d'un système formé par un puits au fond duquel l'électrode de travail est positionnée. Par conséquent les lignes de courant sont uniformes et la contribution radiale peut également être éliminée. C'est une façon d'obtenir un comportement idéal.

L'impédance ohmique a donc une contribution sur l'impédance locale ce qui se traduit dans le cas d'un système simple formé par une électrode disque-plan par une boucle inductive en haute fréquence, comme cela est montré dans le travail de Huang *et al.* [62]. Cette caractéristique n'est pas présente dans l'impédance interfaciale qui, grâce à la mesure du potentiel local au plus proche de l'interface, minimise la contribution de l'impédance ohmique.

3 Etude de la biocorrosion de l'acier au carbone

Ce chapitre présente les objectifs de ce travail, les matériaux et les méthodes utilisés pour étudier l'influence de la bactérie *Shewanella oneidensis* dans la biodétérioration de l'acier au carbone en conditions anaérobies.

Il présente aussi la description de la cellule développée exclusivement pour les mesures électrochimiques locales en conditions anaérobies en présence de bactéries.

3.1 Objectif

Pendant le processus de stockage des déchets d'HA, une grande quantité de matériel métallique sera insérée dans un environnement souterrain. Suite à la resaturation du milieu, l'eau entrera en contact des colis métalliques, entraînant leur corrosion qui modifiera les caractéristiques d'origine de ce système menant à la formation des oxydes de fer et d'hydrogène. Ainsi, la large disponibilité des accepteurs et des donneurs d'électrons, surtout dans cet environnement pauvre en matière organique, peut favoriser le développement des bactéries ferri-réductrices et hydrogènothopes [63].

L'objectif de cette étude est de caractériser l'interface électrochimique de l'acier au carbone en présence de *Shewanella oneidensis* MR-1, un modèle de bactérie ferri-réductrice et hydrogénotrophe afin d'explorer les mécanismes de la biocorrosion. Le principal atout de ce projet est le croisement de plusieurs techniques électrochimiques locales et globales pour mieux comprendre ces mécanismes.

3.2 Matériaux et méthodes

Les coupons d'acier au carbone A37 (0.12% C, 0.22% Si, 0.62% Mn, 0.008% Al, 0.012% S et P, 0.02% Ni, 0.03% Cr, 0.04% Cu, 0.005% Co and <0.005% Ti) ont été fournis par le CEA (matériau éligible pour composer les colis de stockage). En forme de bâtonnet avec un diamètre de 1 cm, l'électrode a été enrobée avec une peinture cataphorétique puis a été moulée avec une résine de fibre de verre de diallyphthalate (PRESI). L'électrode présente une surface d'exposition d'environ 0,8 cm². Avant chaque expérience, l'électrode a été polie avec un papier émeri (SiC) dont la rugosité du grain varie d'environ 25 µm (P600) à 8 µm (P2400) (en fonction des expériences) . Dans une seconde étape, elle a été stérilisée avec une solution d'éthanol dans un bain ultrasons pendant 15 minutes et rincée à l'eau distillée stérile. La dernière étape consiste en un séchage en conditions stériles. Sur la Figure 24 sont représentées les images MEB de l'échantillon d'acier au carbone après le polissage avec le papier émeri P2400 (Figure 24 a) et P600 (Figure 24 b). Comme espéré, l'utilisation d'une faible granulométrie permet d'obtenir un polissage sans aucune strie visible à l'échelle du micromètre.

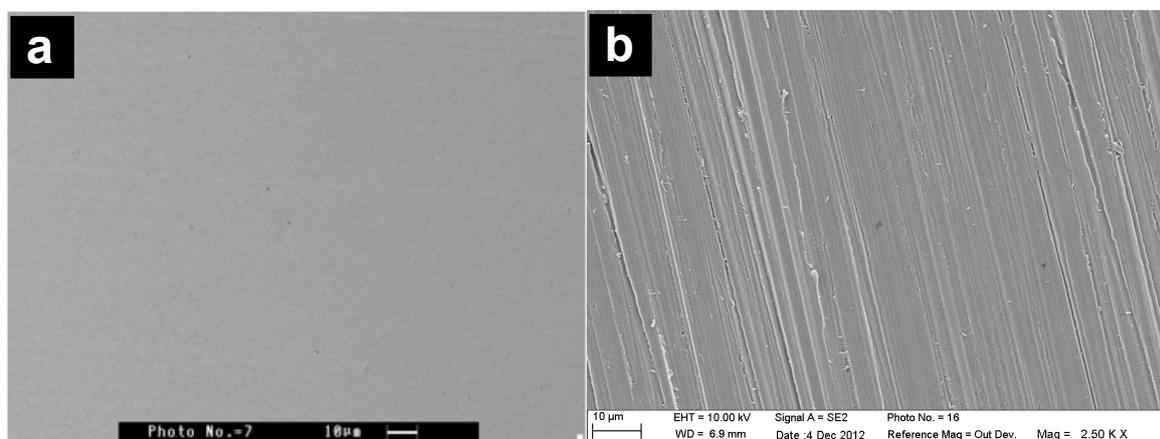


Figure 24 : Images MEB de l'acier au carbone après polissage (papier SiC grain (a) 2400 (b) 600).

3.2.1 Bactéries

Les cultures de *Shewanella oneidensis* strain MR-1 (ATCC 700550TM) ont été obtenues en conditions aérobies au début de la phase de croissance stationnaire, dans le milieu LB (Luria Bertani Broth), dont la composition est la suivante : 5 g.L⁻¹ NaCl, 10 g.L⁻¹ tryptone, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure après 24 heures à 30 °C. Les cellules de *Shewanella oneidensis* sont lavées 1 fois avec le milieu M1 stérile (voir

composition ci-après), puis centrifugées, le culot obtenu est repris dans le milieu M1, et servira d'inoculum. On utilise alors un réacteur de type batch, où l'oxygène est retiré grâce à un barbotage d'azote. La concentration de 10^8 cellules ml^{-1} a été déterminée par comptage en cellule THOMA.

3.2.2 Milieu de culture

Dans ce travail nous avons utilisé un milieu de culture pour des bactéries ferri-réductrices (M1) adapté par Esnault *et al.* [12], pour être représentatif de l'eau interstitielle des sites argileux (Tournemine ou Callovo-Oxfordien) [64, 65]. L'objectif de cette adaptation étant de respecter les ordres de grandeur des concentrations des divers éléments mesurés (en mmol) dans l'eau de ces sites et aussi de manière à offrir un milieu non limitant en besoins nutritifs pour le développement bactérien. La composition de ce milieu M1 est décrite dans le

Tableau 5 : Composition du milieu de culture M1

Tableau 5 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Le pH a été ajusté à 7 avec une solution de NaOH. Le milieu a été stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min, à l'exception des composants thermolabiles, comme, les vitamines et les carbonates, qui ont été stérilisés par filtration à 0,22 µm.

Tableau 5 : Composition du milieu de culture M1

Composé	Concentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9 mM
Na_2SeO_4	11 μM
HEPES tampon	17 mM
NaHCO_3	2 mM
K_2HPO_4	0,5 mM
KH_2PO_4	0,3 mM
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 μM
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5 μM
NaCl	10 μM
H_3BO_3	45 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,8 μM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2 μM
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 μM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,8 mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 mM
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4 μM
Arginine	0,11 M
Glutamate	0,13 M
Serine	0,19 M
Acide nicotinique	0,08 mM
Thiamine-HCl	0,01 mM
Biotine	0,40 μM

3.2.3 Cellule électrochimique pour des mesures électrochimiques locales en conditions anaérobiques.

Pour les mesures électrochimiques locales dans les conditions anaérobies, une cellule électrochimique spécifique avec 5 électrodes a été développée au laboratoire LISE avec l'aide du mécanicien Axel Desnoyers de Marbaix. Dans le couvercle, une membrane flexible a été adaptée pour qu'une sonde puisse être fixée

de façon à permettre son déplacement. Une ouverture a été pratiquée pour permettre l'insertion d'une allonge avec l'électrode de référence. Des septums ont été utilisés pour l'entrée et la sortie de l'air, pour l'insertion de la contre électrode et du fil de platine additionnel (pour les mesures d'impédance), et pour l'ajout des bactéries dans la cellule.

Une cellule en verre à double paroi a été utilisée pour réguler la température du système à 30°C (voir photo présentée figure n°25). La visualisation des électrodes, à travers la cellule est un facteur important pour le positionnement de la sonde. L'électrode de travail (substrat d'acier au carbone) a été fixée dans le fond de la cellule au moyen d'un support en plastique. Des anneaux en caoutchouc ont été utilisés pour garantir l'étanchéité de la cellule.

Un flux positif d'azote a été imposé avec des filtres de 20 µm de porosité (intégrés dans les tuyaux de silicone) pour garantir la stérilité du système.

L'isolement des filtres et de la sonde dans le support flexible a été réalisé à l'aide de colliers en plastique.

La cellule a été stérilisée avant chaque expérience avec une solution d'éthanol à 70% pendant 20 minutes, puis rincée avec l'eau stérile et exposée à la lumière UV pendant 15 minutes. La cellule a été assemblée avec 230 ml de solution M1 dans un environnement stérile et un flux d'azote a été connecté pour garantir les conditions anoxiques et la stérilité du système.

La solution est initialement désaérée par barbotage avec de l'azote pendant 2 heures puis, le flux d'azote est maintenu à la surface de la solution.

La cellule accouplée au système de positionnement est présentée sur la Figure 25.

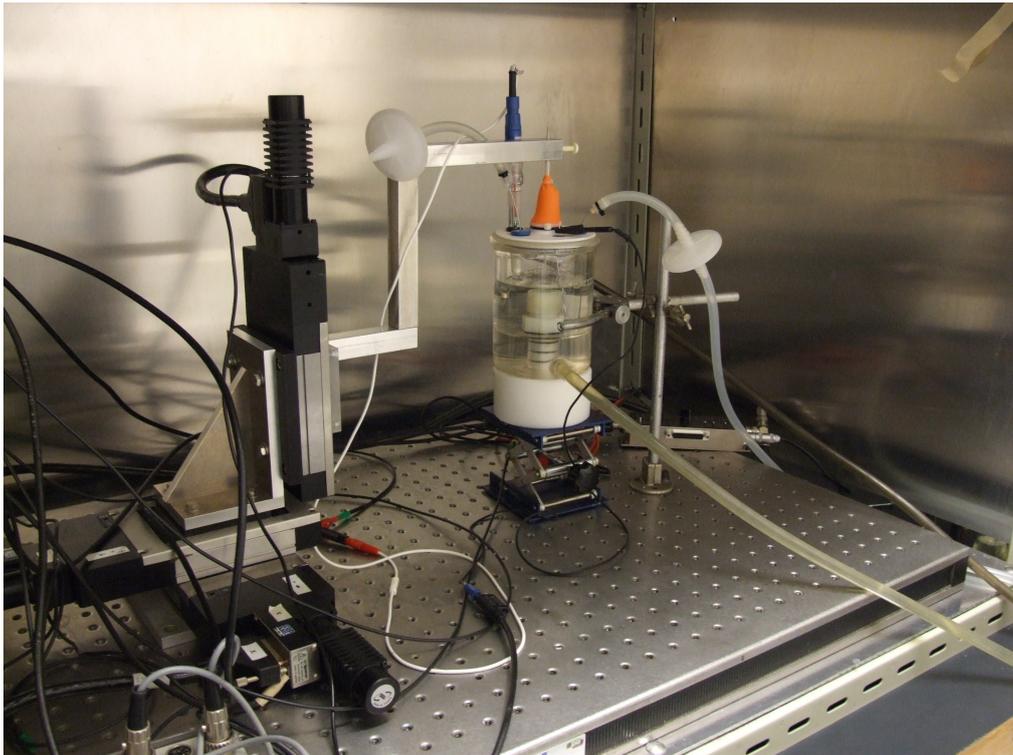


Figure 25 : Photo de la cellule pendant les analyses de chronoampérométrie.

Validation de la cellule électrochimique

D'un point de vue microbiologique, la validation de la cellule électrochimique a été réalisée dans le laboratoire DEN/DTN/SMTM/LMTE du CEA-Cadarache. L'objectif a été de vérifier la capacité de reproduction des conditions anaérobies et microbiologiques pour le développement des cultures de *Shewanella oneidensis*. La validation a été réalisée par l'observation visuelle de la variation de la coloration de la solution M1 résultant de la réduction bactérienne du citrate de fer (III) en présence de lactate comme donneur d'électron (Figure 26).



Figure 26 : Réacteurs discontinus avec cultures anaérobies de *Shewanella* - graduation de la coloration par rapport à la consommation de fer : $\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$

La cellule a été assemblée dans les conditions microbiologiques présentées précédemment. Une comparaison de l'évolution de la réduction de citrate de Fer(III) a été faite entre la cellule électrochimique et le flacon fermé. Après les ajustements du flux d'azote, la même coloration du milieu est obtenue dans le flacon et dans la cellule ce qui permet de conclure que les conditions microbiologiques nécessaires sont obtenues dans la cellule, comme présenté sur la Figure 27.

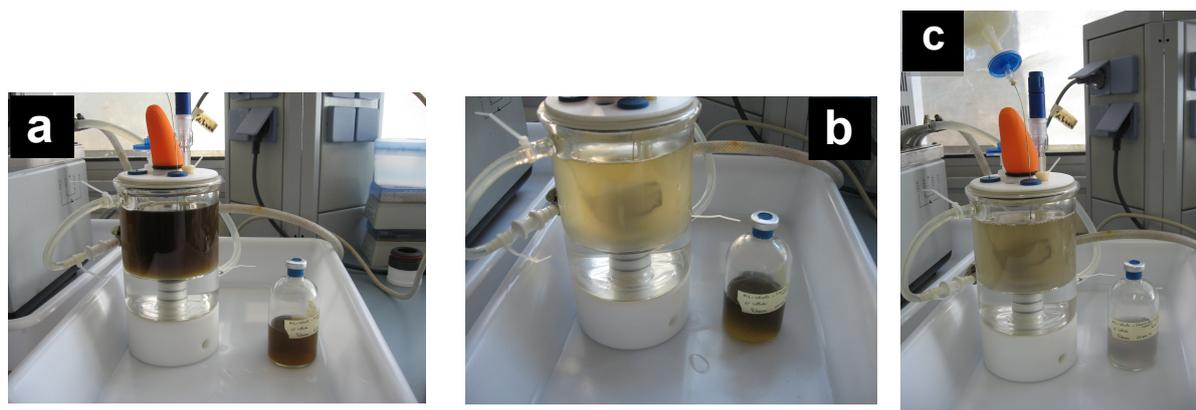


Figure 27 : Validation des conditions microbiologiques de la cellule électrochimique. (a) Début de la réaction ; (b) après 5 heures de réaction ; (c) après 24 heures de réaction.

3.2.4 La sonde pour le SECM et la polarisation linéaire

Une sonde de platine de 50 μm de diamètre a été fabriquée pour les mesures de SECM. Un fil de platine d'environ 2 cm de longueur est scellé dans un capillaire en verre à l'aide d'une microforge (Figure 28b). La connexion avec un connecteur est faite avec l'utilisation de la colle conductrice fluide chargée à l'argent. L'autre extrémité a été rigidifiée avec un couvercle plastique conique et de la résine époxy. Cette configuration permet de stériliser la microélectrode. De plus, la forme conique permet une bonne adaptation à la membrane flexible, permettant ainsi une bonne étanchéité de la cellule (Figure 28a).

La microélectrode a été polie avec du papier émeri, avec une rugosité finale de 4000. Avant chaque expérience, le courant de la sonde a été mesuré en réalisant une voltammétrie cyclique dans une solution de 10 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ et 0,5 M KCl, pour s'assurer du bon fonctionnement de la sonde et de son état de surface.

Puis, la sonde a été stérilisée avec une solution d'éthanol 70% avant son installation dans la cellule électrochimique.

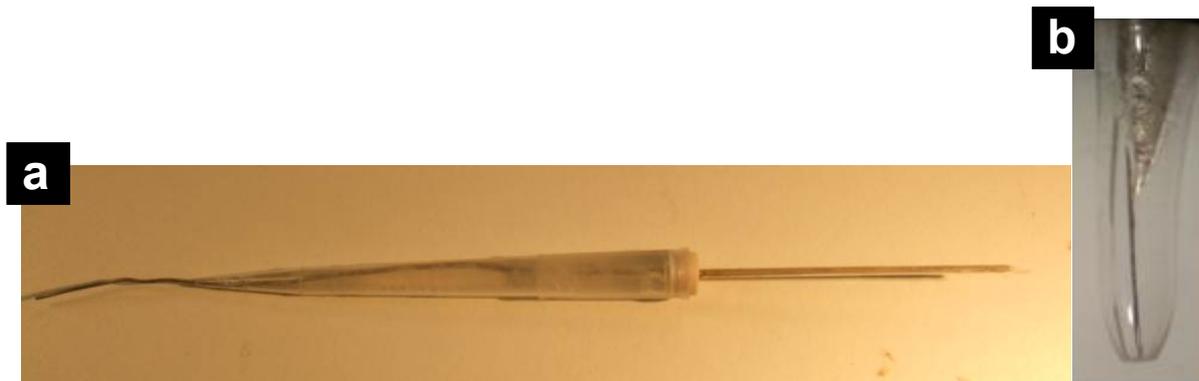


Figure 28 : Sonde fabriquée pour les mesures de SECM ; (a) photo de la sonde intégrale (b) zoom sur la pointe de la sonde.

3.2.5 Sonde utilisée pour les mesures d'impédance locale

Les fils d'argent et de platine (environ 2 cm de longueur) ont été soudés à des fils des plus grand diamètre enrobés en plastique. La partie latérale a été recouverte de peinture cathaphorétique.

La pointe d'un bi-capillaire a été courbée à 90° à l'aide de la flamme. Le capillaire a été coupé (environ 3 cm de longueur) et couplé à un support rétractile en plastique. Les fils en argent ont été insérés dans les deux compartiments séparés du capillaire et le fil de platine a été inséré dans le compartiment inférieur contenant déjà un fil d'argent. La structure en plastique a été scellée et l'intérieur a été rempli avec de la résine époxy.

La sonde a été polie avec du papier émeri P4000 de rugosité finale d'environ 5 μm .

Un dépôt de chlorure a été effectué sur les fils d'argent, par anodisation en polarisation à + 400 mV / ECS jusqu'à la stabilisation du courant (environ 20 s).

La sonde de platine insérée dans ce système a été utilisée pour générer / collecter l'hydrogène.

Avant chaque expérience, un test d'impédance locale a été réalisé dans une solution 10 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ et 0,5 M KCl, avec un substrat de Pt de 3 mm de diamètre, polarisé à + 250 mV / ECS pour vérifier le bon fonctionnement de la sonde.



Figure 29 : Tri-électrode fabriquée pour les mesures d'IP locales et génération d' H_2

3.2.6 Instrumentation pour les mesures de SECM.

Les analyses de SECM ont été effectuées avec un appareil développé au LISE. Le système de positionnement est composé d'un système à 3 axes (VP-25XA, Newport) et piloté par un encodeur de mouvement (ESP300, Newport). Ce système a permis un déplacement dans les 3 directions avec une précision de 100 nm. Les électrodes sont polarisées avec un bipotentiostat réalisé au LISE. Le dispositif expérimental est contrôlé également par un logiciel réalisé au laboratoire.

3.2.7 Instrumentation pour les mesures de dissolution du fer.

Les analyses de la dissolution du fer ont été effectuées avec des potentiostats fabriqués au LISE. Les données sont acquises à l'aide d'une carte d'acquisition connectée dans un ordinateur. Le système de positionnement est dans ce cas un système 3 axes (UTM25, Newport) avec une résolution spatiale de $0,2 \mu\text{m}$ sur chacun des axes.

3.2.8 Instrumentation pour mesures de LEIS

Le montage expérimental utilisé pour les mesures d'EIS et LEIS est représenté sur la Figure 30. Les mesures d'impédance globale et locale sont effectuées simultanément grâce à un analyseur de fonction de transfert (FRA) à 4 voies. Cet équipement est connecté à un potentiostat (*potentiostat 1*) réalisé au laboratoire (pour les mesures d'impédance globales) et à un amplificateur de courant également fabriqué au laboratoire (pour les mesures d'impédance locales). Ce système est contrôlé par un logiciel développé au laboratoire. Le système de

positionnement est le même que celui détaillé dans le montage précédent. Un deuxième potentiostat a été utilisé pour la génération de l'hydrogène par la sonde. L'utilisation du fil de Pt connecté à une capacité de $0,15 \mu\text{F}$ et court-circuité avec l'électrode de référence est nécessaire pour éviter les artefacts de mesure en hautes fréquences [66].

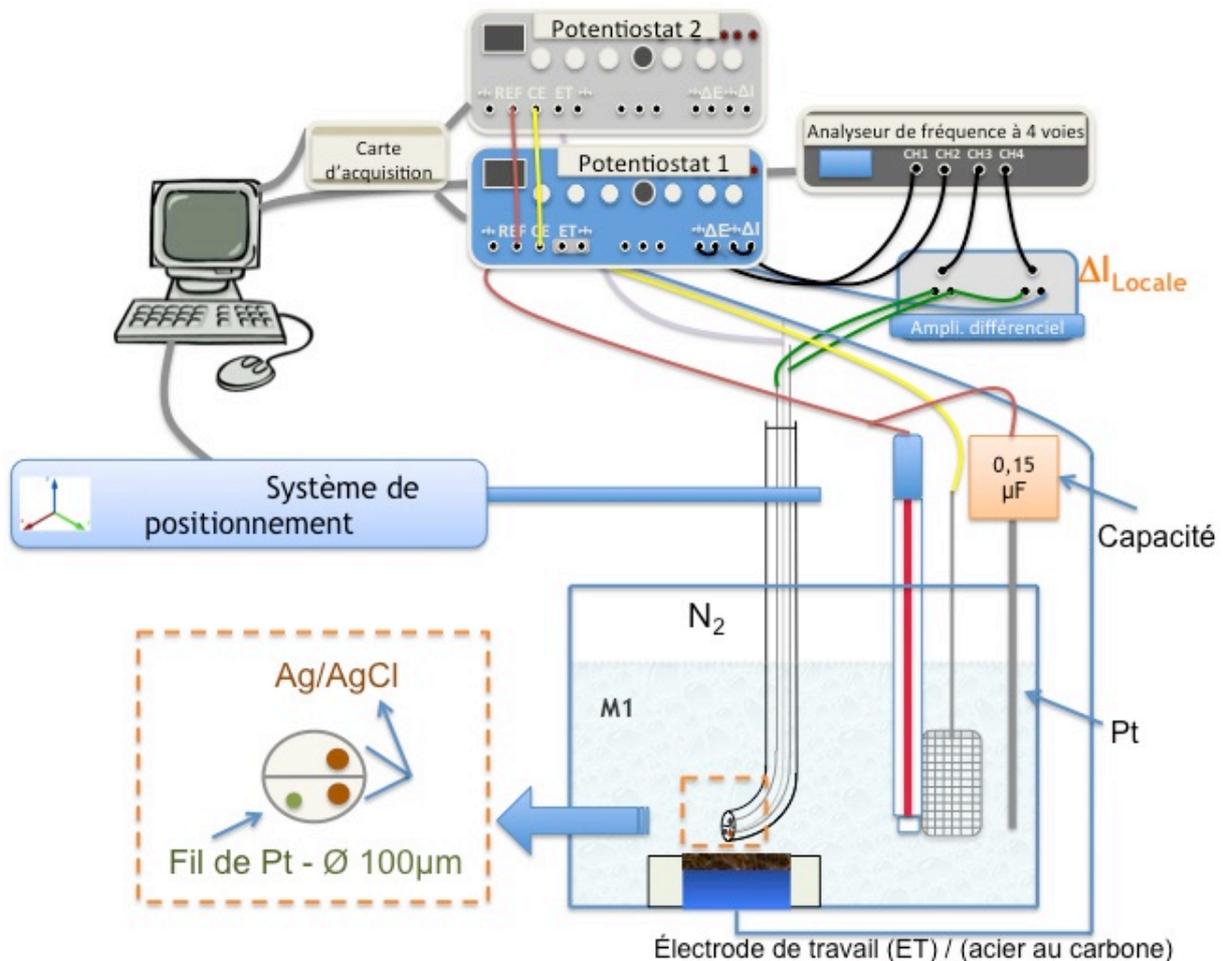


Figure 30 : Schéma du montage utilisé pour les mesures de LEIS

3.3 Résultats et discussion

Dans cette étude, l'hydrogène a été utilisé comme unique donneur d'électrons, et l'oxyde de fer III comme unique accepteur d'électrons. Une étude préliminaire a été réalisée afin de vérifier la détection de dihydrogène dans la solution utilisée comme électrolyte (solution M1). Ensuite, la consommation d'hydrogène par S.

oneidensis a été étudiée par SECM en comparant les quantités du dihydrogène réoxydé en conditions biotiques et abiotiques.

3.3.1 Détection du dihydrogène dans la solution M1

Pour ces analyses, une cellule à quatre électrodes a été utilisée. Une électrode à disque de platine de 0,5 cm de diamètre, isolée latéralement par une résine époxy a été utilisée comme substrat. Une sonde de platine de 50 μm de diamètre a été utilisée comme seconde électrode de travail pour la détection des espèces chimiques libérées par le substrat. La sonde a été polarisée à -0,2 V / SCE ; puis, une voltammétrie cyclique entre -0,2 V / ECS et -1,0 V / ECS a été réalisée sur le substrat. Simultanément, la sonde est polarisée anodiquement, afin de détecter les espèces libérées par la réaction électrochimique du substrat.

Les résultats relatifs à la génération / collection d'hydrogène sont présentés sur la Figure 31. On observe qu'à partir de 11 secondes, le substrat commence à générer H_2 de façon importante (augmentation significative de la pointe de la courbe courant temps). Simultanément, la sonde commence à détecter des espèces générées par le substrat, c'est-à-dire la sonde polarisée à -0,2 V / ECS réoxyde l' H_2 , phénomène qui se traduit par une augmentation du courant de la sonde. Une variation de la densité de courant de la sonde en fonction de la distance entre la sonde et le substrat peut être observée. Le point maximal de courant est obtenu à une distance d entre d_0 et $d_0+10\mu\text{m}$ (courbe verte). En éloignant la sonde à une distance plus grande que $d_0 + 10 \mu\text{m}$ on obtient une diminution progressive du pic de courant de la sonde. Il est possible d'observer aussi un déplacement du point maximal des courbes. Ces effets sont attribués aux processus de diffusion. La relation entre la distance de la sonde et le substrat en fonction de la variation du courant nous permet de mesurer et de quantifier la concentration en hydrogène.

Dans cette approche, la concentration peut être légèrement surestimée en particulier aux faibles distances sonde-substrat à cause de l'effet positive feedback que l'on peut obtenir avec le couple H^+/H_2 .

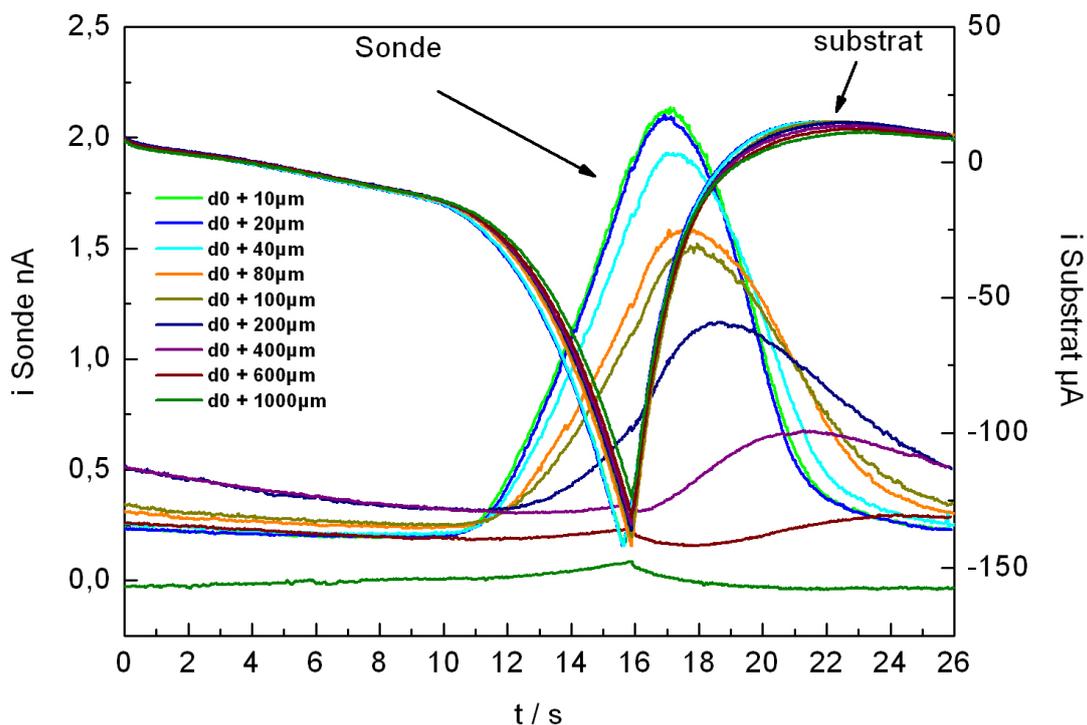


Figure 31 : Détection d'hydrogène par SECM dans la solution M1. Le potentiel du substrat a été balayé dans le domaine de réduction d'hydrogène à 15 mVs^{-1} alors que la sonde a été polarisée à $-0,2 \text{ V/ECS}$ pour la détection de l'hydrogène. La distance entre la sonde et le substrat était utilisée comme paramètre. Le minimum du courant sur le substrat a été observé à l'inversion de direction du balayage en potentiel.

3.3.2 Détermination de la consommation d'hydrogène par *Shewanella*

La technique de SECM a été utilisée dans le mode générateur/collecteur, afin de comparer la quantité d'hydrogène reoxydé en conditions biotiques et abiotiques et de déterminer la quantité de dihydrogène consommé par les bactéries pendant la corrosion de l'acier au carbone. Cette expérience a été réalisée en traçant les courbes de voltammétrie cyclique pour différentes distances entre la sonde et le substrat en acier au carbone.

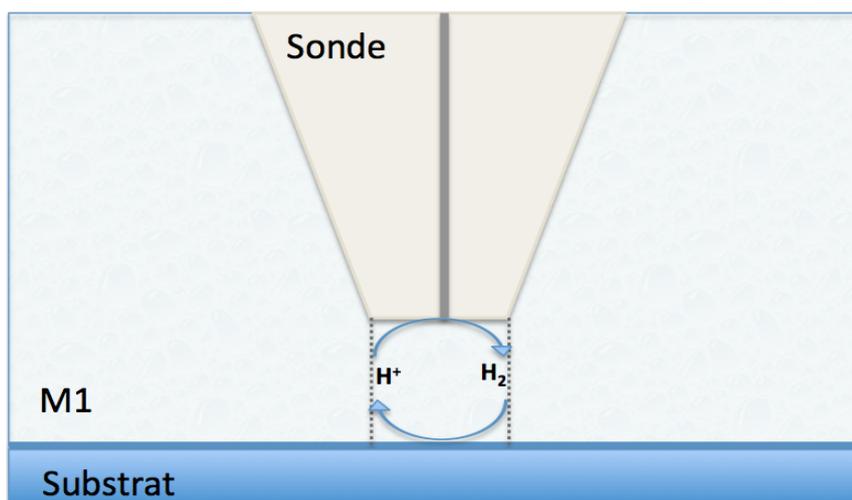


Figure 32 : Représentation de la réduction et oxydation de l'hydrogène dans la région de confinement entre la sonde et le substrat.

Pour les mesures de SECM, une sonde de platine de $50\ \mu\text{m}$ de rayon, comme décrit dans le paragraphe 3.2.4 a été utilisée. La Figure 33 présente un voltammogramme dans une solution de $10\ \text{mM}\ \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $10\ \text{mM}\ \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ et $0,5\ \text{M}\ \text{KCl}$ à une vitesse de $20\ \text{mVs}^{-1}$ pour caractériser la sonde de platine. Quand la sonde est loin du substrat, le rayon théorique peut être obtenu à partir de l'équation 11 (paragraphe 2.4.2):

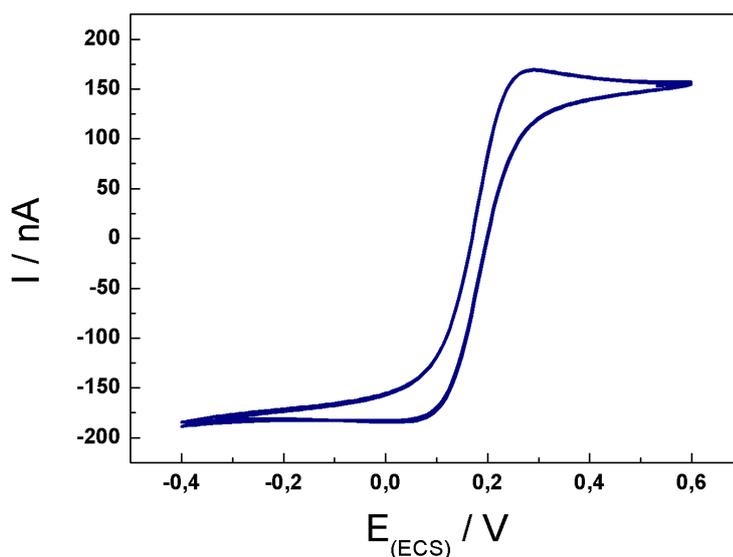


Figure 33 : CV de la sonde de $100\ \mu\text{m}$ de diamètre dans une solution $10\ \text{mM}\ \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $10\ \text{mM}\ \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ et $0,5\ \text{M}\ \text{KCl}$ à une vitesse de $20\ \text{mVs}^{-1}$.

Le montage de la cellule avec la solution M1 correspond également aux procédures décrites dans le paragraphe 3.2.3.

Une courbe d'approche a été effectuée avec une vitesse de $0,075 \mu\text{m s}^{-1}$ avec la sonde polarisée à $-0,9 \text{ V / ECS}$ (formation de H_2 mais en faible quantité pour ne pas être gêné par la formation de bulles), pour la détermination de la distance d_0 du substrat. Le substrat a été maintenu à l'OCP pendant toute la durée de l'expérience.

La courbe d'approche adimensionnelle de la sonde de Pt de $50 \mu\text{m}$ de diamètre vers le substrat d'acier au carbone en milieu M1 est représentée Figure 34. Sur cette courbe, la valeur du courant normalisé obtenue au contact entre la sonde et le substrat est d'environ 0,92. Ce point nous servira donc de référence (zéro absolu) pour la suite de l'expérience. Dans ce cas, l'allure de la courbe indique que le substrat n'est pas un isolant car le courant ne tend pas vers 0 lorsque la distance tend vers 0. La variation de courant indique plutôt que la cinétique de la réaction sur le substrat n'est pas rapide par comparaison avec un comportement de pure positive feedback pour lequel une croissance importante du courant est observée pour les faibles valeurs de la distance sonde / substrat.

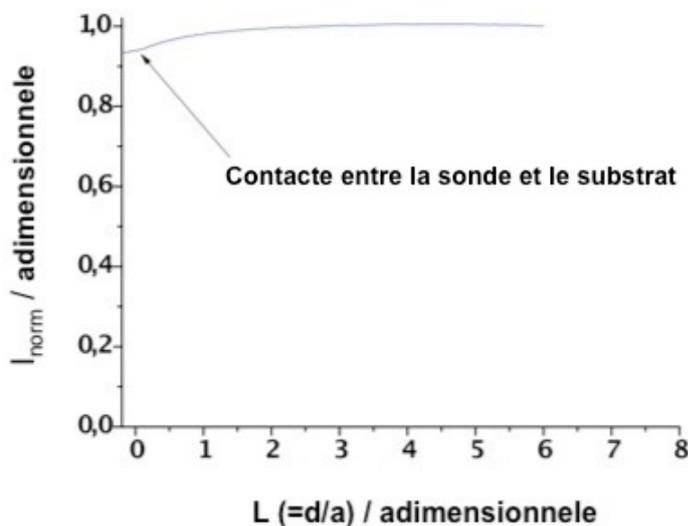


Figure 34 : Courbe d'approche d'une sonde de Pt de $50 \mu\text{m}$ de rayon à $-0,9 \text{ V / ECS}$ à une vitesse de $0,075 \mu\text{m s}^{-1}$.

Des voltammétries cycliques de la sonde de $-0,2$ à $-1,0 \text{ V/ECS}$ ont été effectuées à 15 mV s^{-1} , 72 h après le montage de la cellule électrochimique et pour différentes distances entre la sonde et le substrat en conditions abiotiques. Ensuite,

la cellule a été inoculée avec 30 ml de solution M1 + *Shewanella*. Les mesures de SECM en conditions biotiques ont été répétées 24 heures après l'inoculation des bactéries.

La charge a été calculée par l'intégration du pic de reoxydation du dihydrogène. Les valeurs obtenues ont été tracées par rapport à la distance entre la sonde et le substrat, pour la comparaison entre les conditions biotiques et abiotiques.

La Figure 35 représente un voltammogramme d'une sonde de Pt de 50 μm de diamètre à 15 mVs^{-1} à une distance de 80 μm du substrat dans une solution M1 en conditions biotiques (courbe rouge) et en conditions abiotiques (courbe bleu). Pendant le balayage cathodique, l'hydrogène est généré par la sonde et diffuse à travers de la couche mince entre la sonde et le substrat. Il peut alors être re-oxydé par la sonde (pendant le balayage anodique), mais aussi, il peut être consommé par la bactérie.

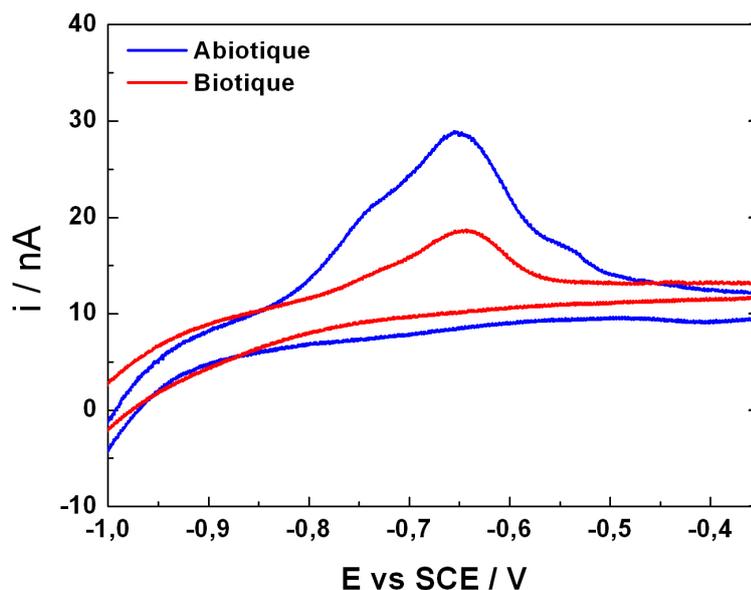


Figure 35 : Voltammogramme cyclique d'une électrode de Pt de 50 μm de diamètre à 15 mVs^{-1} positionnée à 80 μm du substrat dans des conditions biotiques (courbe rouge) et abiotiques (courbe bleu).

Le pic de reoxydation en conditions biotiques a une intensité plus faible que dans les conditions abiotiques, ce qui se traduit par une concentration en H_2 plus faible. Cela indique la consommation d'une partie de l'hydrogène par des bactéries.

La Figure 36 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** donne la charge de la reoxydation de H_2 pour différentes distances entre la sonde et le substrat. Les deux

courbes présentent un comportement très similaire, et la différence entre les deux courbes permet une évaluation de la consommation de H₂ par les bactéries.

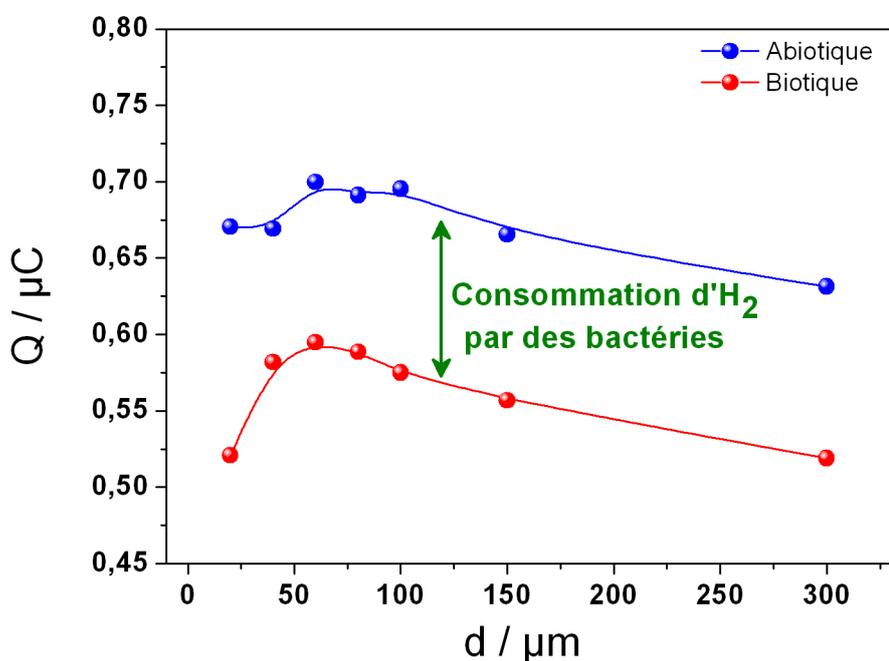


Figure 36 : Évolution de la quantité de H₂ oxydé par la µélectrode de Pt au cours du balayage en fonction de la distance sonde-substrat. La courbe rouge a été mesurée dans des conditions biotiques, et la courbe bleue en conditions abiotiques[67].

Une valeur moyenne de 0,12 µC a été obtenue pour la quantité de H₂ consommée. À partir de la loi de Faraday (équation 31). Cela correspond à environ 6 10⁻¹³ moles de H₂ consommées, et en tenant compte de la durée de l'expérience à la fois pour la génération CV et le dosage de H₂ (où le CV a été réalisé avec une vitesse de 15 mV/s et le calcul de la charge entre 350 mV et 1 V, (cf. Figure 35)) d'environ de 10⁻¹⁴ mole s⁻¹ dans des conditions biotiques.

$$m = \left(\frac{Q}{F}\right)\left(\frac{M}{z}\right)$$

Équation 31

où m représente la masse de la substance libérée à l'électrode en grammes, Q la charge électrique totale, F la constante de Faraday (96485 C mol⁻¹), M la masse molaire de la substance et z la valence de la substance.

Cette valeur correspond au petit volume formé entre la sonde (RG + fil de Pt) et le substrat, en acier au carbone, comme cela est représenté sur la Figure 37. Le volume exact formé est difficile à prévoir car la formation de cristaux peut réduire le volume réel. Pour une distance entre la sonde et le substrat d'environ $50\ \mu\text{m}$, un volume de $160\ \text{nL}$ peut être estimé. En considérant une valeur de $6 \cdot 10^{-13}$ moles de H_2 consommés, il est possible d'estimer une consommation de $4\ \mu\text{mol/L}$, ce qui correspond à un flux de dihydrogène consommé de $4 \cdot 10^{-13}$ moles $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$.

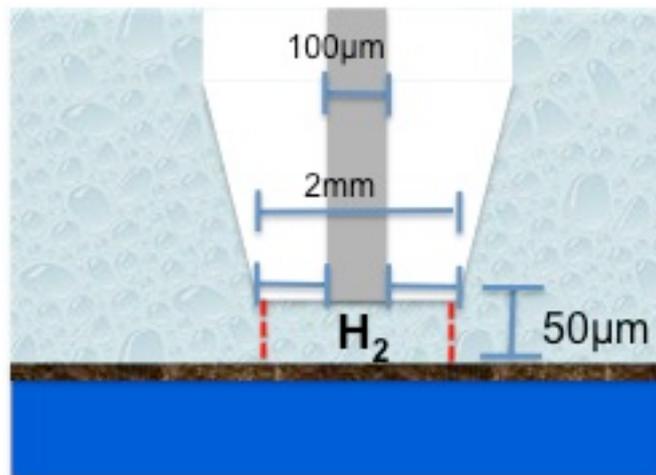


Figure 37 : représentation du volume obtenu entre la sonde et le substrat.

À titre de comparaison, la charge échangée au cours de la production de H_2 par la pointe est d'environ $9\ \mu\text{C}$, montrant qu'environ 1,5% de l'hydrogène produit est impliqué dans l'activité bactérienne. Cette faible valeur est cependant cohérente si l'on considère que d'une part la bactérie ne consomme pas tout l'hydrogène présent à son voisinage (il y a peut être aussi une limitation sur la quantité de Fe III disponible) et d'autre part une partie de l'hydrogène produit diffuse dans la solution autour ou loin de la bactérie.

3.3.2.1 Conclusions partielles.

À travers la technique de SECM utilisée en mode générateur / collecteur il est possible de mesurer, ou de contrôler la concentration en H_2 dissous lorsque la distance entre la pointe de la sonde et le substrat est inférieure à quelques fois le rayon de la microélectrode.

La technique du SECM a aussi été utilisée pour mettre en évidence la consommation de H₂ par des bactéries, en comparant l'intégration du courant (charge), obtenue en couche mince entre la sonde et le substrat, pendant la réoxydation de H₂ en conditions biotiques et abiotiques. Une charge plus faible a été observée dans des conditions biotiques, indiquant qu'une partie de l'hydrogène produit par la sonde est consommée par *Shewanella oneidensis*. En outre, un taux de consommation d'environ 10⁻⁴ mol·s⁻¹ a été mesuré, et un flux de H₂ consommé a été estimé à 4 10⁻¹³ moles s⁻¹ cm⁻² lorsque seuls les produits de corrosion sont utilisés comme nutriments énergétiques. On constate donc que l'on peut augmenter l'activité de la bactérie en lui fournissant localement plus dihydrogène.

3.3.3 Influence de la génération locale de l'hydrogène en condition de confinement dans la dissolution de l'acier au carbone

Différentes expériences de cartographie du substrat en milieu M1, ont été réalisées avec la sonde de Pt polarisée afin de générer de l'H₂ à 50 μm de la surface de l'électrode. Après 3 jours de réaction en conditions biotiques, la formation de cristaux de vivianite a été observée sur toute la surface de l'électrode d'acier au carbone (Figure 38 a). Par contre, au centre du substrat, où la sonde a été polarisée à -0,9 V/ECS pour la génération d'H₂, représentant une région de confinement de 3.9 x 10⁻⁸ cm³ environ, une formation plus prononcée de la minéralisation a été observée (Figure 38 b). L'analyse EDX d'un cristal isolé confirme la formation de phosphate de fer sous forme de vivianite (Figure 38 d et c).

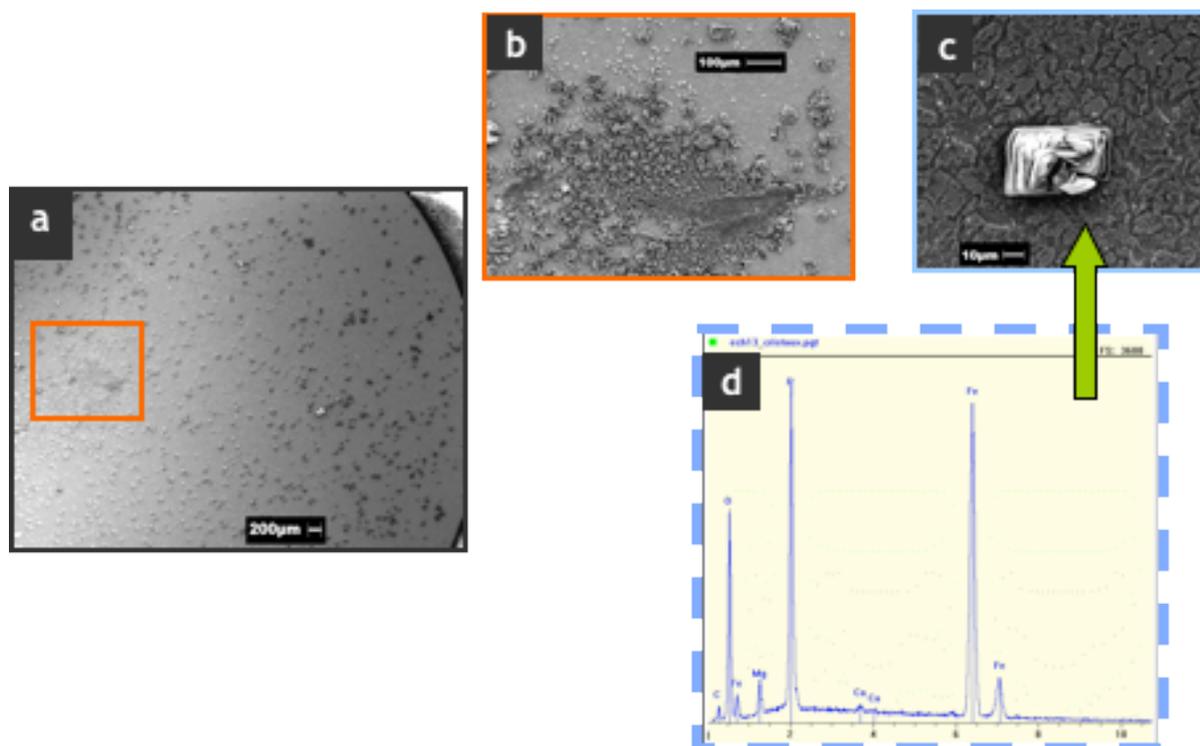


Figure 38 : (a) Observation de formation de cristaux de vivianite sur toute la surface de l'électrode ; (b) zoom de la partie centrale de l'électrode où la sonde est restée polarisée pour la génération de H₂ ; (c) image d'un cristal ; (d) analyse EDX de la formation cristallisée.

Cette observation suggère une influence de l'augmentation de la corrosion dans cette zone particulière. Les changements du pH local, le potentiel d'oxydoréduction, voire une augmentation de l'activité bactérienne due à une plus grande disponibilité de substrat énergétique (H₂) peuvent être considérés comme des facteurs potentiels influençant la minéralisation.

Pour mieux contrôler la cinétique de dissolution de l'électrode, le potentiel de circuit ouvert a été suivi pendant les premières 24 heures, puis le potentiel du substrat a été fixé au potentiel déterminé. L'hydrogène a été généré localement par la sonde qui a été positionnée à une distance de 50 µm du substrat. Ensuite, l'ajout du milieu M1 (condition abiotique) ou l'ajout de M1 + bactéries (conditions biotiques) a été réalisé.

La dissolution de l'acier a été suivie pendant 5 jours pour trois différentes conditions de corrosion (abiotique et biotique avec génération locale de H₂, biotique sans génération locale de H₂) en mesurant le courant total de l'électrode afin de révéler l'influence de la concentration locale en H₂ (Figure 39). Le courant de

dissolution a été mesuré et il a été montré qu'il dépend à la fois de la présence des bactéries et de la quantité de H₂ produit [68].

3.3.3.1 Résultats et discussion

Lorsque le potentiel de l'électrode d'acier est polarisé à l'OCP après 24 heures d'immersion, dans les conditions abiotiques et sans génération d'hydrogène (Figure 39, courbe a), les densités des courants sont de l'ordre de 0,5 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. En revanche, lorsque H₂ est généré, le courant de l'électrode d'acier augmente d'environ 1 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ et reste quasi stationnaire (Figure 39, la courbe b). Ce comportement peut être expliqué par le régime de positif feedback qui a lieu entre la sonde et le substrat. Dans des conditions biotiques, une augmentation constante du courant est observée pendant les 5 jours (Figure 39, courbe c).

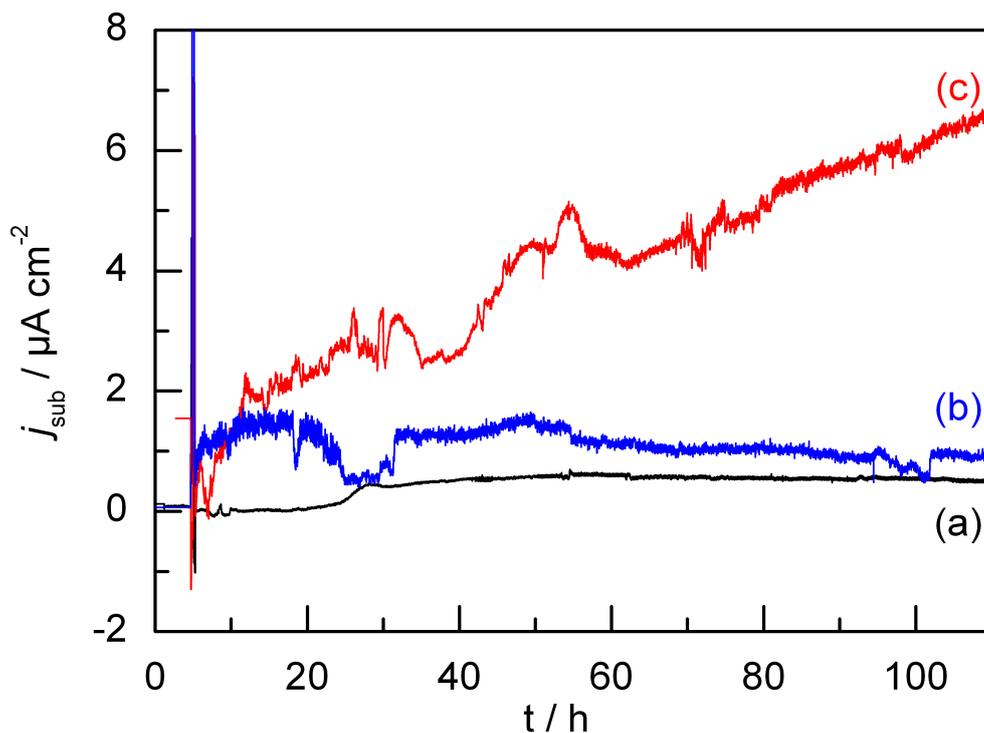


Figure 39 : (a) Réponse chronoampérométrique du substrat d'acier au carbone en conditions biotiques sans génération d'H₂ local. (b) Condition abiotique sur la génération locale d'H₂ par la sonde ; (c) en présence de *Shewanella oneidensis* et génération locale d'H₂ par la sonde.

La charge échangée au cours du processus de corrosion peut être calculée à partir de l'intégration du courant anodique mesuré pour chaque expérience (Tableau 6). Ces résultats indiquent clairement que dans les conditions biotiques et de production locale d'hydrogène, la dissolution de l'acier est considérablement

augmentée en raison de l'augmentation de l'activité bactérienne (plus on produit de l'hydrogène, plus la consommation du fer par les bactéries est importante). Il faut cependant noter que ces expériences ne permettent pas les mesures de l'hydrogène produit par le processus de corrosion, il est seulement possible de mesurer l'hydrogène produit par la sonde avec ce type d'expérience.

Tableau 6 : Détermination de la charge échangée (en millicoulombs) au cours de la corrosion dans des différentes conditions (calculée à partir des résultats présentés dans la Figure 17) avec les vitesses de corrosion respectives.

Conditions	Charge (dissolution de l'acier) (mC)	Charge (H ₂ génération) (mC)	Vitesse de corrosion (µm an ⁻¹)
Biotiques / sans sonde (Figure 39a)	216	----	7,3
Abiotiques / Avec sonde (Figure 39b)	430	100	14,5
Biotiques / Avec sonde (Figure 39c)	1400	100	48,0

On notera aussi que sous conditions abiotiques, la vitesse de corrosion est doublée, mais reste constante en fonction du temps alors qu'en milieu biotique, la vitesse de corrosion augmente pour toute la durée de l'expérience, elle devient 8 fois plus grande après une centaine d'heures de propagation.

Là encore, la minéralisation en oxydes de fer phosphatés a été observée sur la surface de l'acier au carbone. Il convient également de mentionner que des expériences plus longues (plus de 5 jours) sont difficiles à effectuer avec ces conditions expérimentales, car la distance entre la sonde et le substrat est faible (50 µm) de manière à confiner la génération H₂. On est alors dans une gamme de distance qu'il est possible de contrôler pendant quelques heures voir quelques jours mais guère au delà. Un autre inconvénient concerne la croissance des produits de corrosion en fonction du temps, la biocorrosion peut conduire à la pollution de la sonde au cours du temps en raison de l'accumulation des produits de corrosion ou du métabolisme bactérien entre la sonde et le substrat. Cela a pour effet de modifier la réactivité de la sonde et donc de potentiellement modifier la cinétique de la génération de l'hydrogène.

La Figure 40 représente la surface du substrat après la chronoampérométrie en conditions biotiques sans la sonde après 7 jours d'expérience. La formation de précipité de minéraux phosphatés ferreux calcinés a été formée sur la vivianite comme il est possible de constater sur la Figure 41.

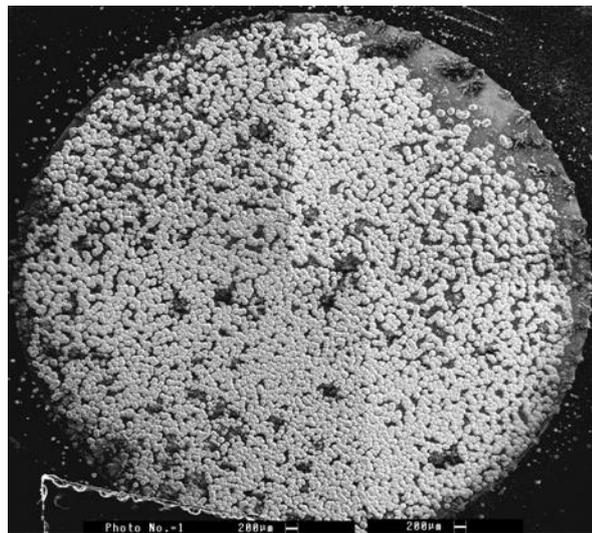


Figure 40 : Image MEB du substrat en conditions biotiques après 7 jours de chronoampérométrie en conditions biotiques sans sonde.

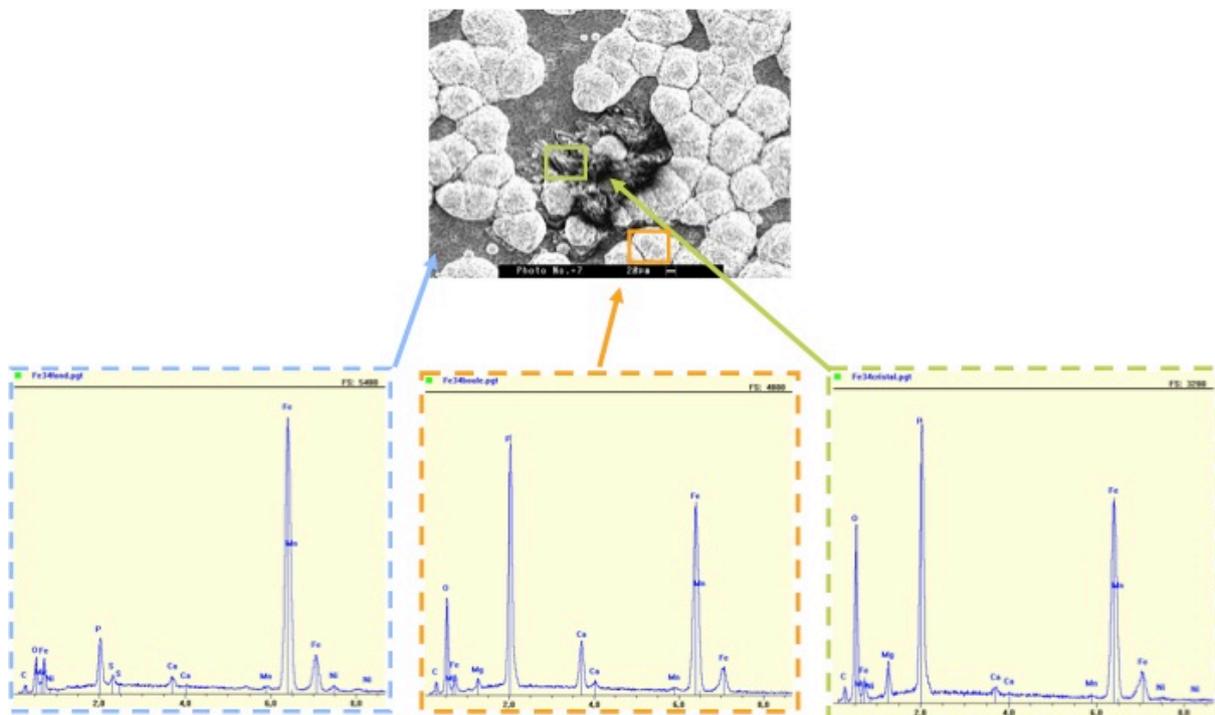


Figure 41 : Image MEB avec les analyses EDX des trois différentes régions du substrat indiquées par des flèches colorées (bleu : fond ; orange : boules blanches ; verte : cristaux gris)

La Figure 42 illustre la chronoampérométrie du substrat pendant la génération d' H_2 sur une période de 240 heures en conditions biotiques. Pendant cette période, des coupures (arrêt de la génération de H_2) ont été réalisées. Globalement il est possible de percevoir une influence de l'intermittence dans la génération d' H_2 par la sonde dans la courant du substrat.

Après 240 heures, la formation de vivianite a été observée sur la surface du substrat comme il est possible d'observer sur la Figure 44. Il est possible de déterminer sur la région centrale du substrat la position de la sonde pendant l'expérience. Au voisinage de cette région, une concentration importante de vivianite est observée, ainsi que, sur les bords de l'électrode. Cette réactivité particulière est à rapproché de la distribution de courant et de potentiel au niveau d'une électrode disque plan pour laquelle les effets de bord exacerbent la densité de courant locale.

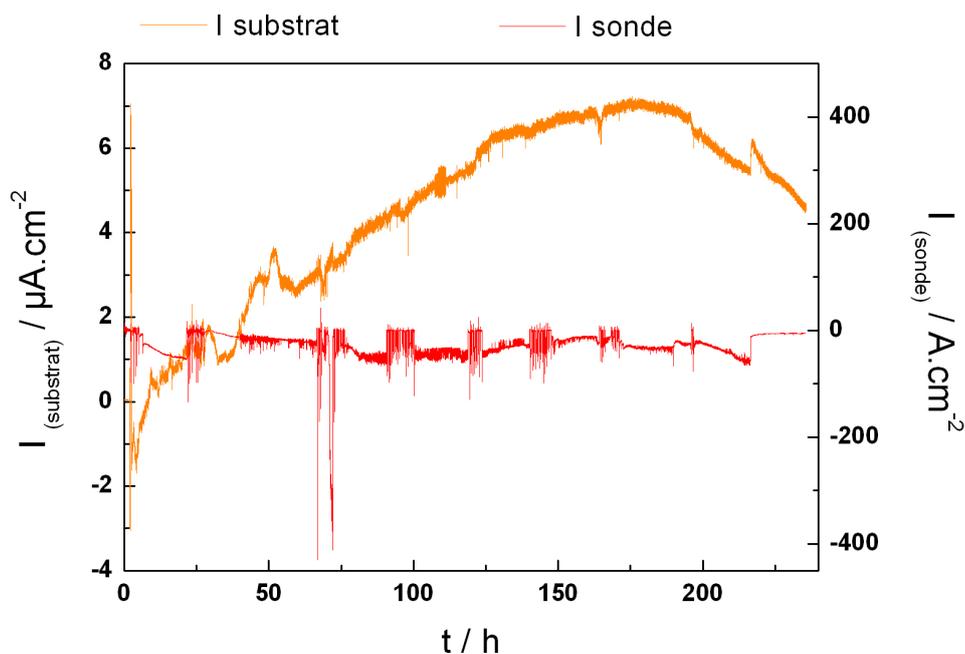


Figure 42 : Chronoampérométrie du substrat d'acier à -0.717 V / ECS par l'analyse de l'influence de la génération d'hydrogène en solution M1 en conditions biotiques.

Entre 21 et 28 heures, le courant du substrat présente un comportement irrégulier. Il est cependant possible de percevoir l'influence de la polarisation de la sonde (Figure 43 a). Après 66 heures d'expérience, en présence de génération de H_2 le courant du substrat est modifié, ce qui est mis en évidence par une diminution du courant pendant les périodes où l'on ne génère pas d'hydrogène et une

augmentation du courant lorsqu'on en produit (Figure 43 b). Après 160 heures, on ne peut plus associer les coupures d'H₂ avec la réponse du substrat. La quantité d'H₂ dissoute est probablement optimale pour la bactérie pour les temps très longs (Figure 43 c).

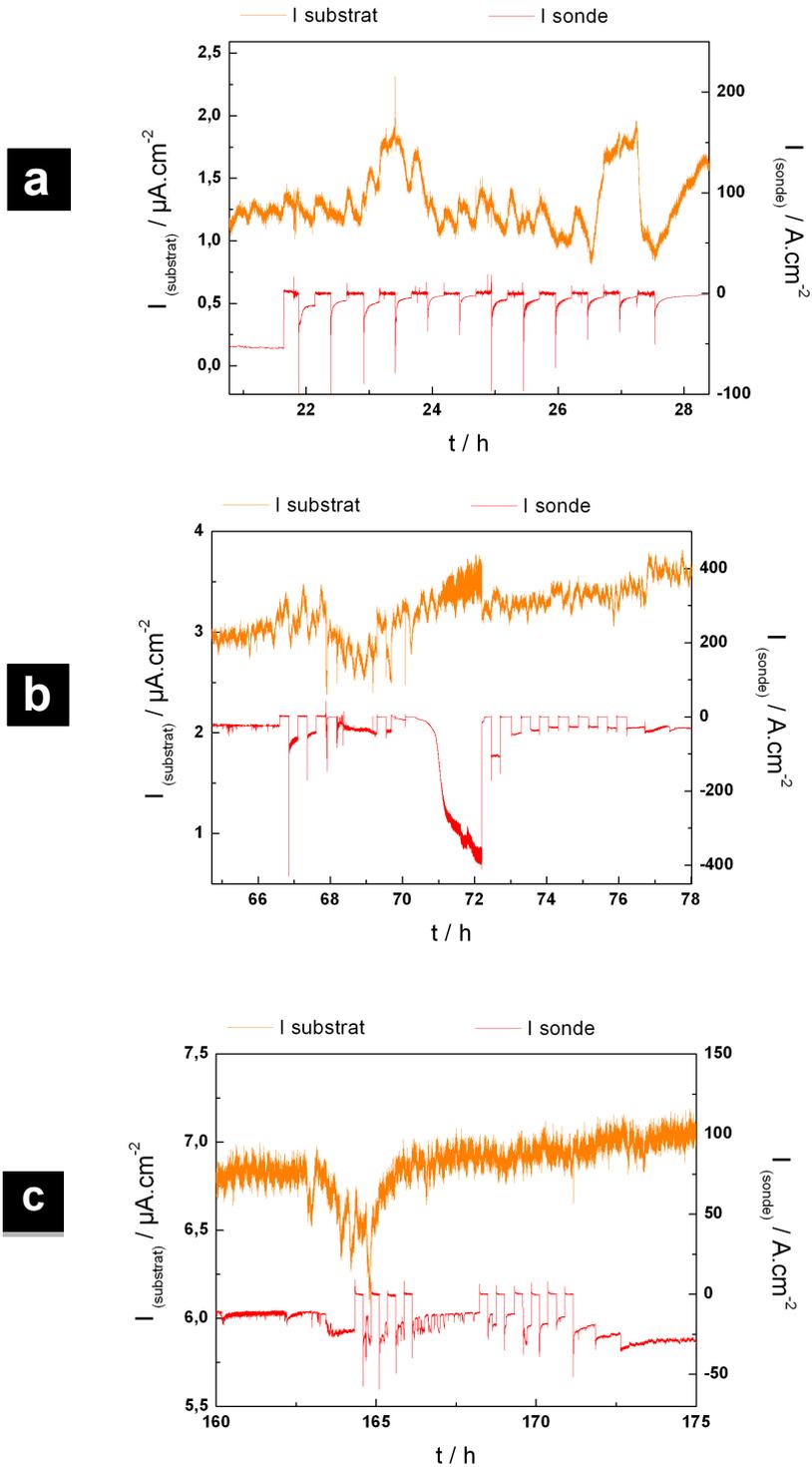


Figure 43 : Amplification des zones d'intermittence de génération d'H₂ avec des observations respectives.

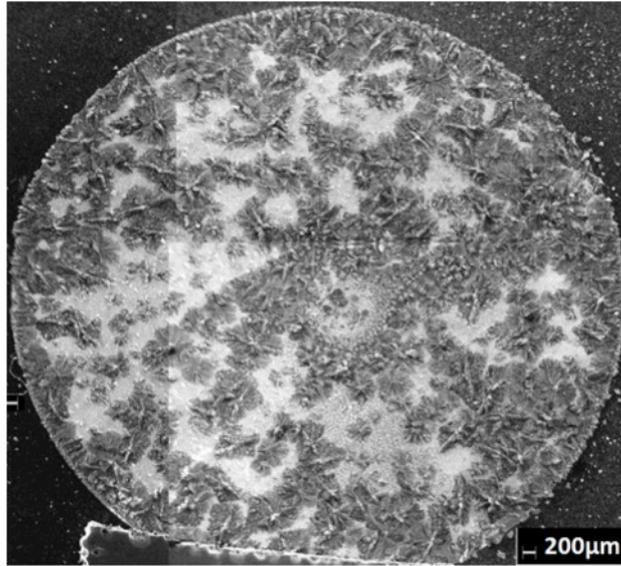


Figure 44 : Image MEB du substrat après 240 heures en conditions biotiques.

La Figure 45 illustre la répétition de l'expérience en conditions abiotiques.

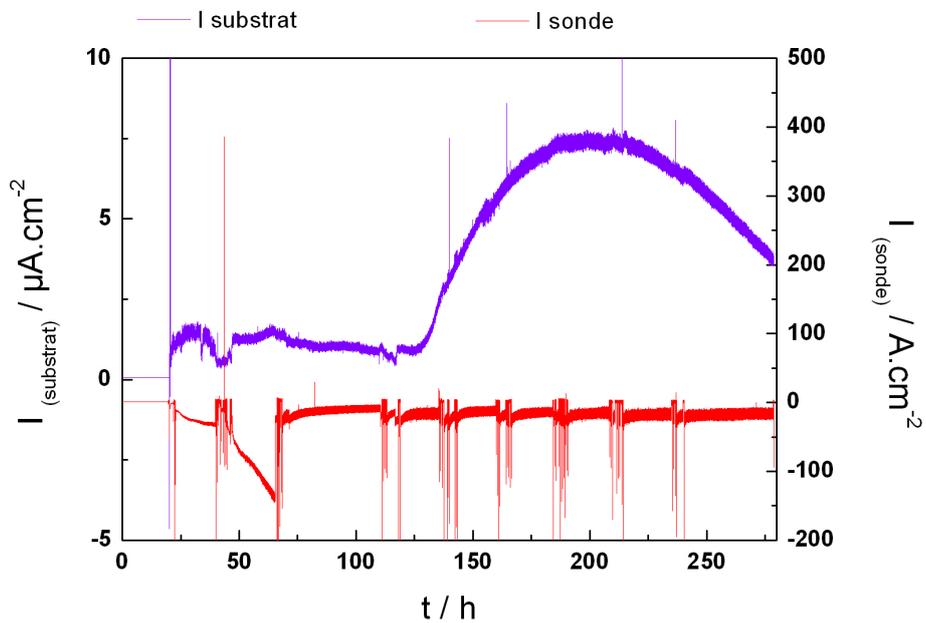
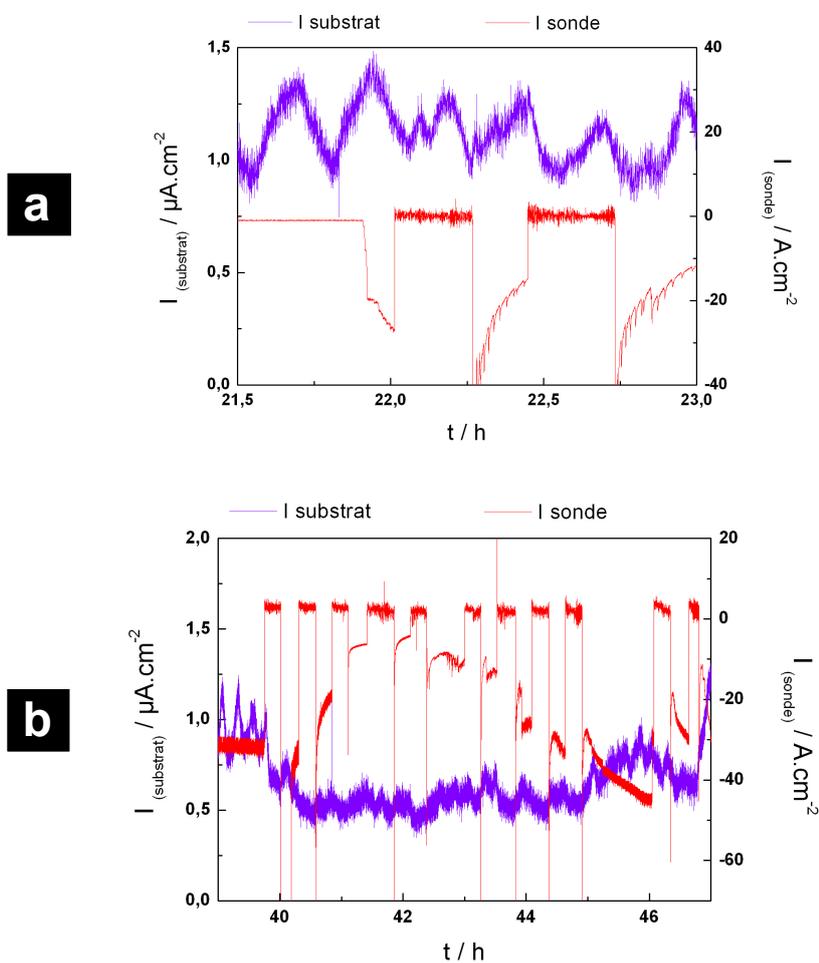


Figure 45 : Chronoampérométrie sur le substrat d'acier à $-0,717 \text{ V} / \text{ECS}$ pendant l'analyse de l'influence de la génération d'hydrogène en solution M1 en conditions abiotiques.

Après 20 heures de réaction, le courant du substrat présente un comportement périodique d'environ $0,5 \mu\text{A}$ d'amplitude avant la génération d' H_2 (Figure 46 a). Après 40 heures d'expérience, la génération d' H_2 modifie le courant du

substrat, ce qui est mis en évidence par une diminution du courant pendant les périodes où l'on ne génère pas d'hydrogène et une augmentation du courant lorsqu'on en produit (Figure 46b). Après 45 heures, une augmentation du courant de la sonde a eu lieu, ce qui entraîne une augmentation du courant du substrat. Une réduction du courant du substrat a été intimement liée au ajustement du courant de la sonde, pour ensuite présenter le même comportement pendant les pauses (Figure 46 c). A partir de 134 h débute une augmentation importante du courant du substrat avec le processus de pause et génération d'H₂ et il acquiert un comportement inverse (les pauses entraînent une augmentation du courant du substrat) (Figure 46 d).



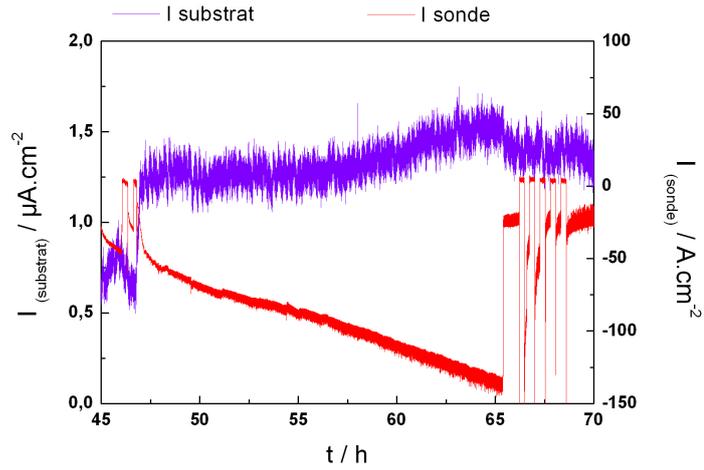
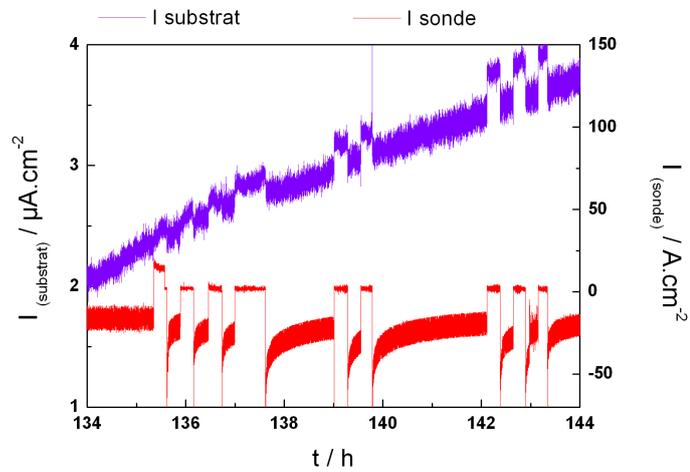
c**d**

Figure 46 : Amplification de la zone d'intermittence de génération d' H_2 avec des observations du phénomène en conditions abiotiques.

La Figure 47 montre le substrat après la chronoampérométrie en conditions biotiques. La formation de cristaux de vivianite a été observée sur toute la surface avec une formation plus importante sur les bords de l'électrode, mettant en évidence l'influence de la géométrie du substrat.

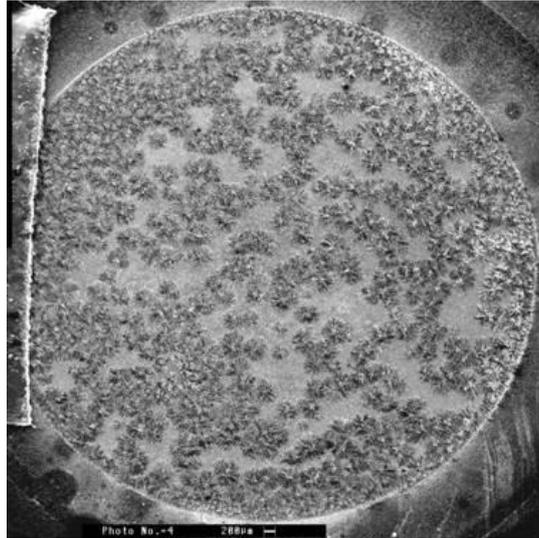


Figure 47 : Image MEB du substrat après 278 h en conditions abiotiques.

L'effet de la génération locale d' H_2 a été aussi observé dans le milieu M1 sans phosphate. Il est possible de percevoir une relation claire et directe sur la pause / génération de H_2 avec les variations de courant sur le substrat.

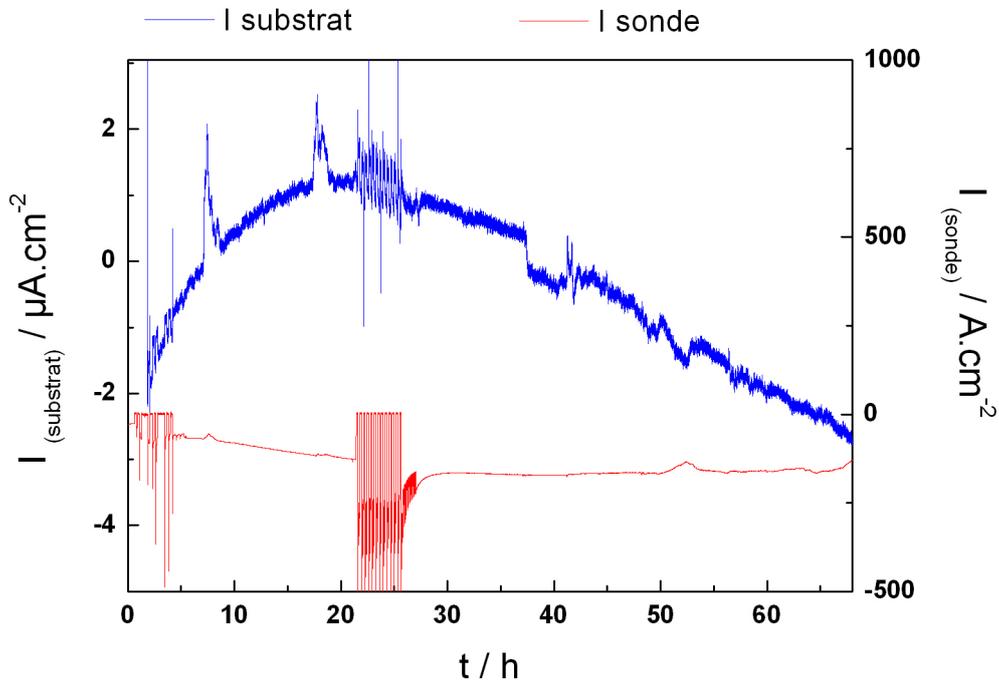


Figure 48 : Chronoampérométrie sur le substrat d'acier à -0.709 V /ECS par l'analyse de l'influence de la génération d'hydrogène en solution M1 (sans phosphate) en conditions biotiques

Après 2 heures, il est possible de percevoir une relation claire et directe sur la pause/ génération de H₂ avec les variations de courant sur le substrat (Figure 49 a). Après 20 heures, pour les temps plus longs, la période de génération de H₂ correspond aussi à une accélération de la vitesse des réactions sur le substrat (augmentation du courant) ou à une activité plus importante des bactéries (Figure 49 b).

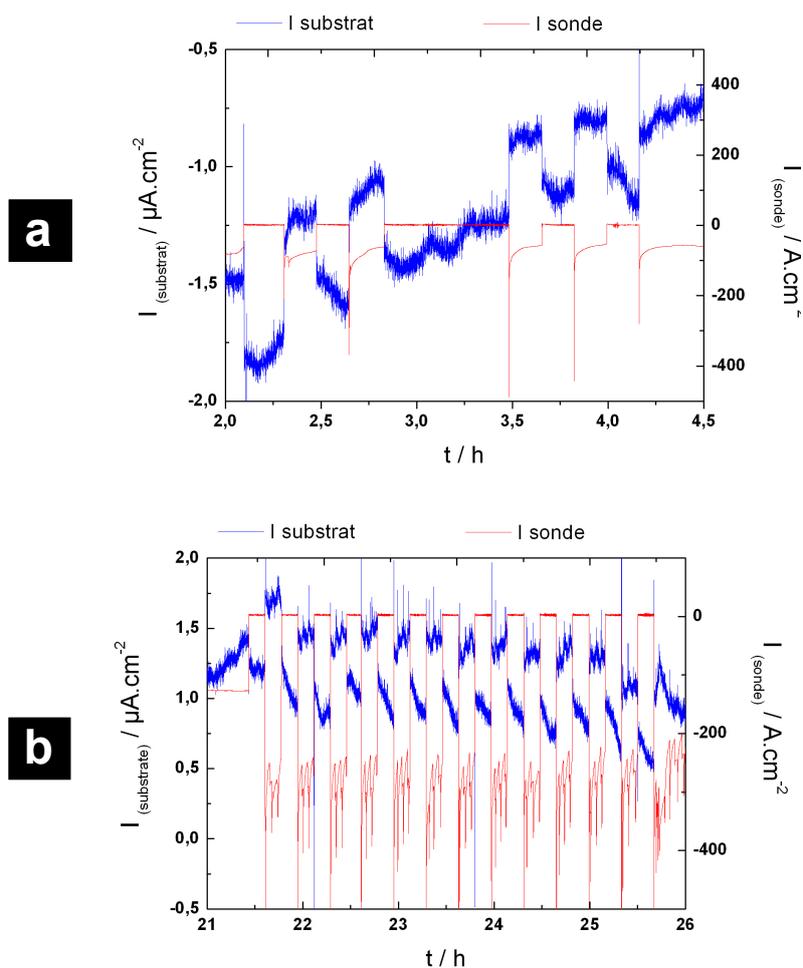


Figure 49 : Amplification de la zone d'intermittence de génération d'H₂ avec des observations du phénomène en conditions abiotiques.

Aucune minéralisation n'a été observée en absence de phosphate dans le milieu M1. Sur les images MEB, il est possible d'observer la présence d'inclusions sur substrat. Après les analyses MEB, le biofilm a été retiré à l'aide de papier absorbant et le substrat a été analysé au microscope optique pour permettre de mesurer la présence d'éventuelles piqûres. Cependant cette analyse permet de

conclure à une corrosion généralisée plutôt qu'à des processus locaux entraînant une corrosion localisée.

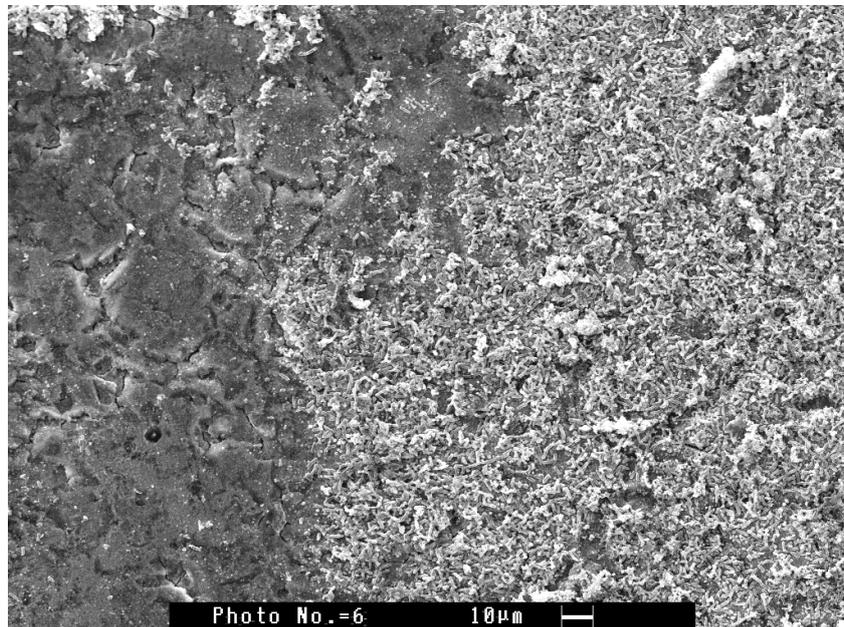


Figure 50 : Image MEB du substrat en acier après la chronoampérométrie en conditions biotiques sans phosphate.

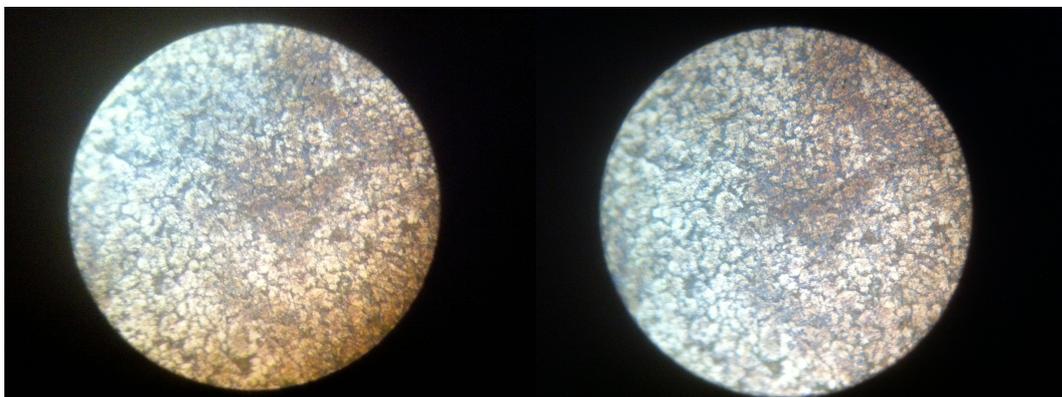


Figure 51 : Observation du substrat dans le microscope optique en deux mise au point différents.

3.3.3.2 Conclusions partielles.

Les charges échangées, mesurées au cours de 5 jours d'expérience, correspondant à l'hydrogène produit dans les expériences abiotiques (Figure 39b) et biotiques (Figure 39c) avec la sonde ont des valeurs comparables (environ 100 mC). Par contre, la réponse du substrat d'acier est très différente et se caractérise par la

mise en évidence de cinétiques différentes. Ainsi, une charge totale 3,2 fois plus élevée a été observée pour la corrosion de l'acier en présence des bactéries. Il faut bien noter que ce facteur est important puisque la génération d'hydrogène est réalisée en faible quantité au moyen d'une microélectrode.

En présence de *Shewanella* et lorsque l'on produit de l'hydrogène (Figure 39 a), la vitesse de corrosion de l'acier au carbone ($48 \mu\text{m}\cdot\text{an}^{-1}$) est 9,5 fois plus élevée que dans le cas sans production locale d'hydrogène ($7,3 \mu\text{m}\cdot\text{an}^{-1}$).

Une très grande quantité de H_2 (0,5 mol) a été générée localement dans un petit volume ($3,9 \times 10^{-8}$ L) entre la pointe et le substrat entraînant une importante augmentation de la charge de Fe^{2+} libéré par le substrat en comparaison avec l'expérience sans génération d'hydrogène. Cet effet suggère que la corrosion locale (dans le voisinage de la sonde) est plus élevée. Cependant, il faut aussi remarquer que la durée des expériences est de plusieurs jours, donc l'hydrogène peut aussi diffuser dans tout le volume de la cellule électrochimique s'il n'est pas consommé rapidement et localement au voisinage de son point de production. Il peut donc être éventuellement utilisé par d'autres bactéries qui ne sont pas dans le volume confiné formé par la sonde et le substrat d'acier. Ceci permet aussi d'expliquer et de comprendre pourquoi pour des temps longs nous observons une augmentation de la vitesse de corrosion sur l'ensemble de l'échantillon.

3.3.4 Etude de la corrosion localisée.

La corrosion localisée est un phénomène important qui peut grandement diminuer la durée de vie des structures. De prévision difficile, elle est le plus souvent déclenchée par une ou des conditions spécifiques qui peuvent être liées à des facteurs divers comme les caractéristiques de fabrication du matériau propre ou les conditions environnementales et leur évolution au fil du temps. Pour étudier la corrosion localisée à l'échelle du laboratoire en utilisant comme matériau d'étude une électrode de $0,78 \text{ cm}^2$, il est nécessaire d'essayer d'induire des conditions favorables pour la formation et le développement dans le temps de ce type de phénomène. Dans les résultats précédents, la présence d'hydrogène dans les conditions de confinement a été présentée comme un accélérateur notable de l'activité microbiologique. Pour cette raison, l'hydrogène a été choisi comme élément

déclencheur de la corrosion localisée afin de réaliser des analyses d'impédance électrochimique locale dans le but de remonter aux cinétiques locales de corrosion.

La formation de cristaux de vivianite dont la taille est de l'ordre de 300 μm peut gêner pour les analyses électrochimiques locales à cause des faibles distances nécessaires entre la sonde et le substrat pour ces mesures. Pour cette raison, le milieu d'étude M1 utilisée pour les analyses de l'impédance locale a été préparé sans les sels de phosphate. De plus, les interférences entre les différents éléments constituant le milieu de culture microbiologique peuvent produire des modifications dans les processus de corrosion, ce point ayant déjà été abordé dans la littérature [69]. Pour cette raison l'exclusion de différents éléments ou constituants du milieu de culture a été déjà décrite par Zegeye *et al.* [70]. En particulier, le phosphate est un élément constituant des acides nucléiques, des phospholipides, nucléotides et vecteurs énergétiques (ATP/ADP) essentielles à l'activité bactérienne. Par contre, en raison de leur croissance dans un milieu riche comme le milieu LB, les cellules ont déjà une certaine réserve de ce nutriment. En outre, la lyse des bactéries va aussi permettre un recyclage du phosphate. Un autre facteur important est la durée des expériences qui ne dépasse pas les 6 jours dans les conditions biotiques, ce qui permet de justifier aussi l'exclusion de cet élément dans la solution de composition M1.

L'influence des microorganismes dans l'accélération de la corrosion généralisée est déjà confirmée. Par contre, plus d'informations sont nécessaires pour mieux comprendre la corrosion localisée provoquée par des bactéries.

3.3.4.1 *Mise en place de l'expérience*

Les courbes de polarisation linéaires, en trois répétitions, obtenues à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ont été tracées pour l'étude du comportement de l'acier au carbone en présence de la solution M1 sans phosphate (Figure 52), le reste du protocole expérimentale étant identique à celui des expériences précédemment décrites.

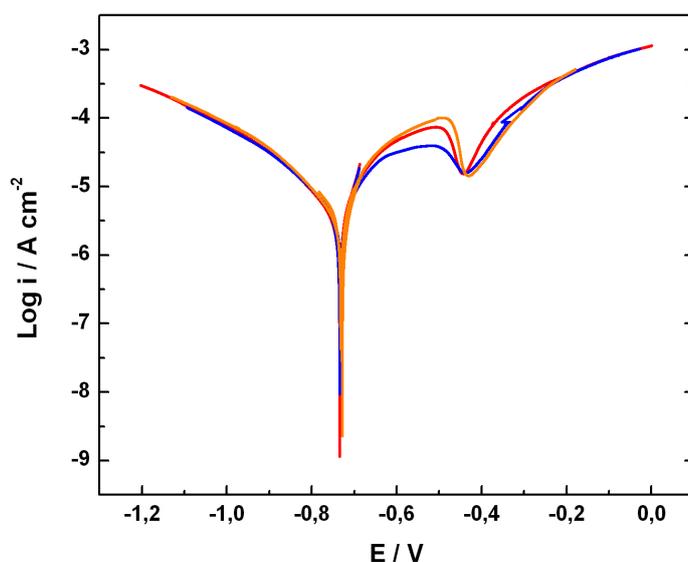


Figure 52 : Courbes de polarisation linéaires de l'acier au carbone à 0,1 mV par seconde en milieu M1 sans phosphate.

La condition de linéarité du système (acier au carbone au potentiel de l'OCP plus M1 sans phosphate) a été vérifiée avec des amplitudes de perturbation de 10 et 20 mV. Les résultats présentés ci-dessous dans la représentation de Nyquist (Figure 53) montrent une bonne reproductibilité dans le domaine des hautes fréquences avec un très léger décalage en basse fréquence, pour des fréquences de l'ordre de 0,1 Hz ou moins. Ce décalage n'est pas significatif et peu éventuellement être attribué à une lente évolution du système avec le temps. Ainsi, une amplitude de 20 mV vérifie les conditions de linéarité et a été choisie pour les mesures d'impédance. En effet, il est préférable de choisir la plus forte amplitude pour améliorer le rapport signal sur bruit dans le cas d'une impédance globale. Dans le cas particulier de la mesure d'impédance locale, la mesure du courant au moyen de deux sondes de potentiel au voisinage du substrat sera également facilité car on comprend facilement à partir de la loi de Poisson que plus l'amplitude de la perturbation appliquée au système sera grande, plus la différence de potentiel entre les deux microsondes de mesure le sera aussi.

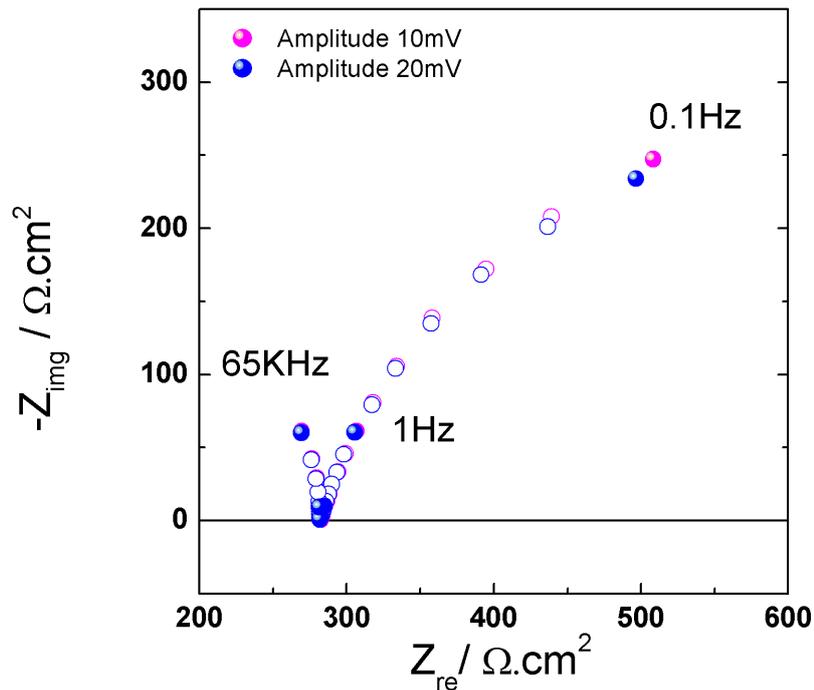


Figure 53 : Représentation de Nyquist de l'impédance d'un acier au carbone polarisé au potentiel de l'OCP pour la vérification de la linéarité pour des amplitudes de 10 et 20 mV.

Après avoir déterminé l'amplitude à utiliser, l'influence de la génération d' H_2 (Figure 54, courbe orange), et du barbotage en solution (Figure 54, courbe bleu) pendant les mesures d'impédance ont été étudiées en conditions abiotiques. Il est possible d'observer l'influence que la convection due au barbotage d'azote exerce sur la réponse électrochimique. En effet, la résistance de transfert de charge diminue de 2300 à 1750 $\Omega \text{ cm}^2$ environ. En absence de barbotage, la génération d' H_2 se caractérise par une légère influence sur la cinétique de corrosion avec une résistance de transfert de charge qui diminue d'environ 8%. A première vue, cette variation peut sembler faible, mais il faut cependant bien noter que la mesure présentée est une mesure globale alors que la génération de H_2 ne se fait que sur une surface restreinte de l'électrode d'acier.

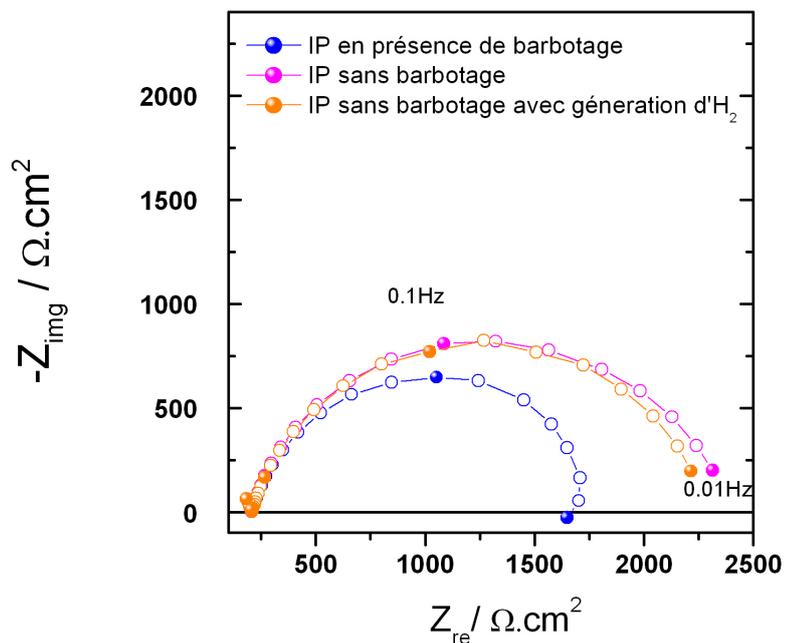


Figure 54 : Représentation de Nyquist obtenue à l'OCP avec une amplitude de 20 mV après 24 heures de réaction en solution M1, dans 3 différentes conditions : (courbe bleu) barbotage d'azote en solution ; (courbe rose) sans barbotage ; (courbe orange) en condition stationnaire en présence de génération locale d'H₂ par la sonde de Pt.

L'influence de ces différents paramètres peut être aussi observée sur les mesures d'OCP comme cela est illustré sur la Figure 55. Dès le départ du bullage d'azote dans la solution, une variation du potentiel de circuit ouvert est observée. Cette variation peut être due au processus d'agitation de la solution sous la forme d'une convection forcée due à la génération des bulles.

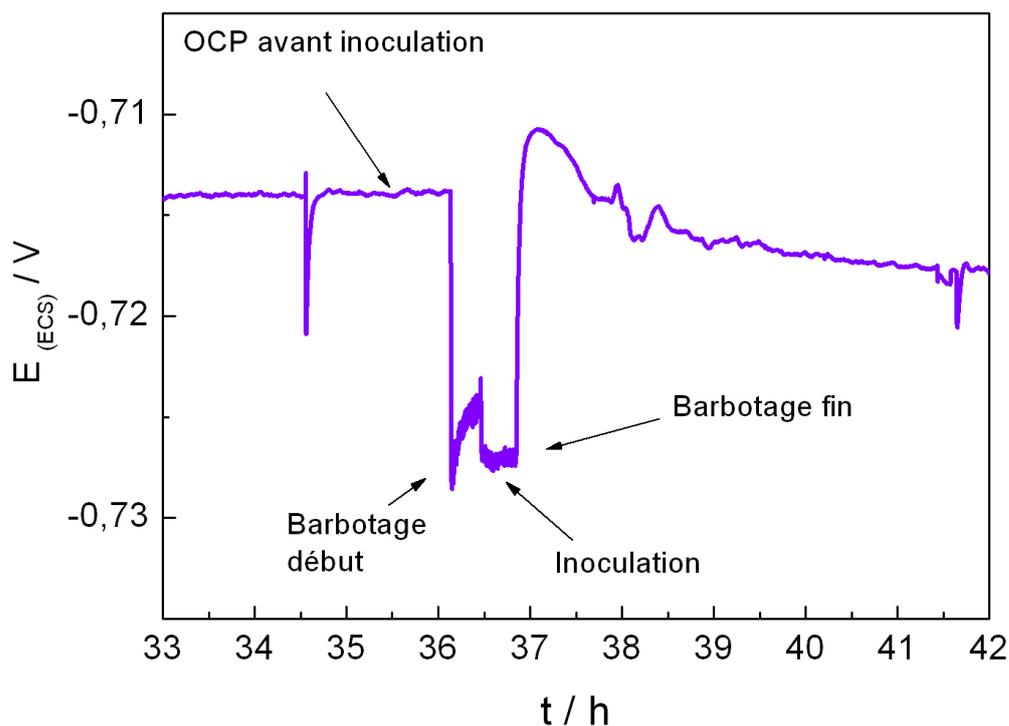


Figure 55 : Effet de l'influence du barbotage dans le potentiel de circuit ouvert.

Les contributions des courants anodiques et cathodiques dans le processus de corrosion ont aussi été étudiées par les mesures d'impédance. La Figure 56 représente les diagrammes de Nyquist pour trois conditions différentes de potentiel. La courbe rouge représente la réponse obtenue lors d'une polarisation de l'électrode à l'OCP, la courbe bleue représente le diagramme d'impédance obtenue avec le substrat polarisé à + 50 mV par rapport à l'OCP et la courbe verte représente le diagramme obtenu lorsque le substrat est polarisé à - 50 mV par rapport à l'OCP. Polariser le substrat à un potentiel plus anodique entraîne une réduction du courant cathodique ce qui se traduit par une augmentation de la résistance du transfert de charge cathodique. Dans le cas d'une polarisation plus cathodique, une augmentation du courant cathodique est observée et par conséquent une réduction de la résistance de transfert de charge cathodique.

Il est possible d'observer une grande variation du diamètre avec le potentiel. Ainsi, comme la variation de l'impédance électrochimique n'est pas monotone, l'impédance au potentiel de corrosion prend en compte à la fois les contributions anodique et la cathodique.

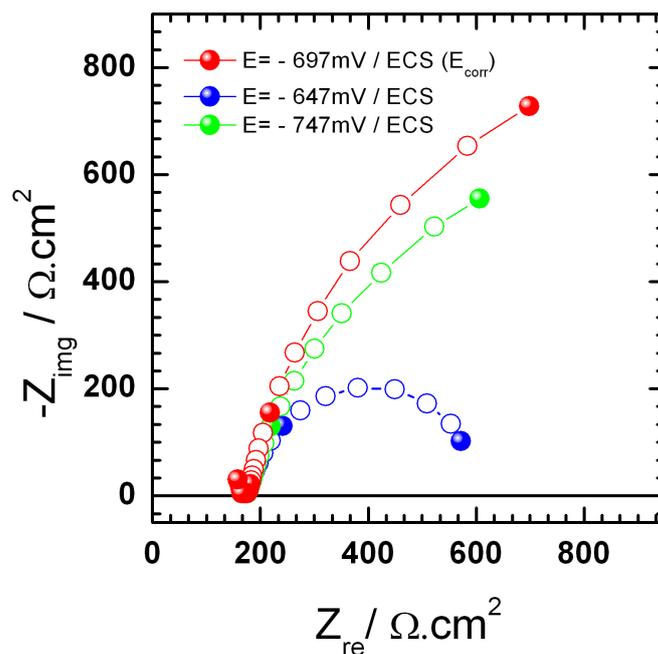


Figure 56 : Mise en évidence des contributions des impédances anodiques et cathodiques dans le processus de la corrosion de l'acier au carbone immergé en solution M1 (sans phosphate) en condition d'anaérobie.

La caractérisation et la vérification du bon fonctionnement de la bi-électrode ont été réalisées d'après les procédures décrites précédemment. La Figure 57 donne les diagrammes des impédances, globale, interfaciale locale et locales obtenues simultanément dans une solution de ferri/ferrocyanure de potassium. Pour cette expérience, le substrat est une électrode disque plan de platine de 5 mm de diamètre enrobée dans un isolant. Il est possible d'observer la similarité (forme et fréquences caractéristiques) de tous les diagrammes. Dans le domaine des hautes fréquences une boucle capacitive est attribuée à la capacité de double couche en parallèle avec la résistance de transfert de charge, et en basse fréquence, une droite avec une pente à 45° caractérise le phénomène de diffusion semi-infinie (impédance de Warburg). Il est important d'observer l'équivalence des constantes de temps avec les fréquences caractéristiques, effet qui indique que les mesures locales et globales caractérisent des phénomènes de même nature mais à des échelles différentes. La partie haute fréquence de l'impédance globale permet de déterminer la résistance d'électrolyte. Il est intéressant de remarquer que cette valeur est différente pour les deux impédances locales. En effet, l'impédance locale est définie par rapport à une mesure globale du potentiel, donc la résistance d'électrolyte doit être du même ordre

de grandeur que celle obtenue par la mesure de l'impédance globale. Par contre, l'impédance interfaciale locale est définie par rapport à une mesure locale de potentiel, ce qui a pour effet de minimiser la chute ohmique du système (donc la résistance d'électrolyte mesurée). On remarque cependant que sur l'expérience présentée, ce terme n'est pas nul puisqu'il est expérimentalement extrêmement difficile de se positionner juste à l'extérieur de la double couche. Enfin, on remarque que l'impédance locale présente une contribution inductive dans le domaine des hautes fréquences. Cette constante de temps et maintenant bien connue, elle est imputable à la géométrie de la cellule électrochimique et au fait qu'en solution, la composante radiale du courant n'est pas nulle, exceptée selon l'axe de symétrie de l'électrode [62].

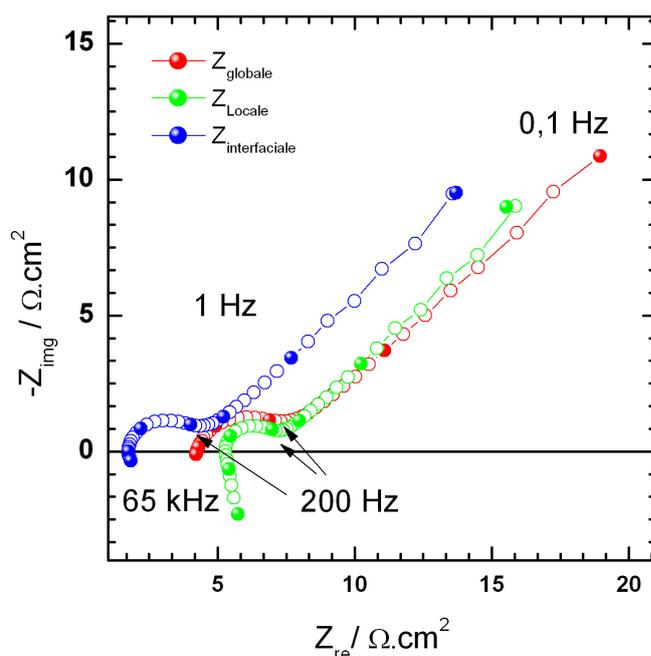


Figure 57 : Validation de la bi-électrode pour les mesures d'impédances locales obtenues avec un substrat de platine de 5 mm de diamètre, polarisé à + 250 mV / ECS dans une solution de 10 mM $K_3Fe(CN)_6$, 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ et 0,5 M KCl (par redox Fe^{3+} / Fe^{2+}); courbe rouge impédance globale, courbe verte impédance locale, courbe bleue impédance interfaciale locale.

3.3.4.2 Mesures d'impédance globales et locales.

Pour les mesures abiotiques, une sonde SECM a été utilisée. Le montage de la cellule a été effectué 27 heures avant le début des mesures d'impédance globales

en condition abiotique qui elles ont été réalisées sur une durée totale de six jours. Sur la Figure 58 sont représentées les mesures avant et après l'inoculation. La courbe rouge représente l'impédance globale avant l'inoculation. Dans le cas des expériences abiotiques l'inoculation a été faite par la solution M1 (sans phosphate) désaérée et sans bactérie, suivi d'un barbotage de 15 minutes. Après quatre heures, la mesure a été répétée (courbe bleue). On observe une réduction de la résistance de transfert de charge (d'environ 15 %) que l'on attribue à l'inoculation / barbotage. On observe que cette résistance continue à décroître pendant 20 heures après l'inoculation. Cependant le comportement est très variable et la résistance de transfert de charge augmente pour les durées plus longues pour dépasser la valeur initiale après 93 heures pour ensuite revenir à une boucle similaire à celle obtenue initialement après 130 heures. Il faut cependant noter que même si ces variations semblent globalement erratiques, leur amplitude reste modérée et l'ensemble des mesures se situe dans un domaine de valeurs comprises entre plus ou moins 20 % de la mesure initiale, ce qui en terme de corrosion, correspond à une faible évolution.

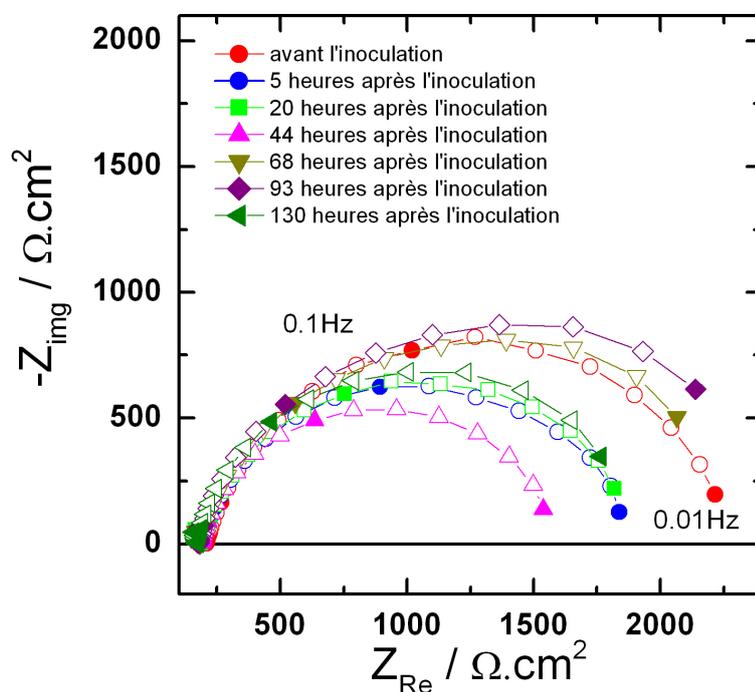


Figure 58 : Représentation de Nyquist des mesures d'impédance globale de l'acier au carbone en solution M1 (sans phosphate) en conditions abiotiques. Le substrat a été polarisé au potentiel de l'OCP. Les mesures ont été réalisées avec une amplitude de 20 mV.

Une analyse quantitative de ces diagrammes a été entreprise en termes de circuit équivalent. La boucle observée a été modélisée avec le circuit équivalent représenté Figure 59 et constitué par une résistance d'électrolyte (R_e) en série avec un CPE en parallèle avec la résistance de transfert de charge (R_{tc}).

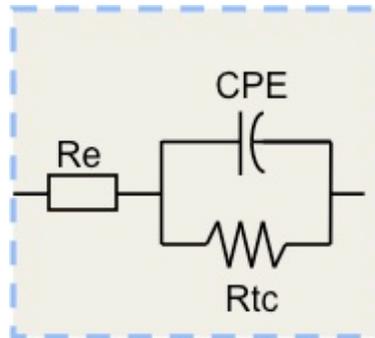


Figure 59 : Circuit équivalent utilisé pour la modélisation de la boucle capacitive obtenue en conditions abiotiques.

Les paramètres R_e , R_{tc} , Q et α obtenus par ajustement sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Paramètres (R_e , R_{tc} , Q et α) obtenues par simulation des résultats d'impédance globales en conditions abiotiques

	AVI	5 heures API	20 heures API	44 heures API	68 heures API	93 heures API	130 heures API
R_e ($\Omega \text{ cm}^2$)	207	188	187	186	181	175	173
R_{tc} ($\Omega \text{ cm}^2$)	2120	1710	1740	1420	2180	2190	1710
Q ($\text{s}^\alpha / \Omega \text{ cm}^2$)	$6,92 \cdot 10^{-4}$	$7,95 \cdot 10^{-4}$	$1,01 \cdot 10^{-3}$	$1,26 \cdot 10^{-3}$	$1,46 \cdot 10^{-3}$	$1,52 \cdot 10^{-3}$	$1,76 \cdot 10^{-3}$
α	0,82	0,82	0,82	0,83	0,82	0,83	0,86

AVI = Avant l'inoculation; API = Après l'inoculation

A partir de l'analyse de ces paramètres, il est possible de déterminer la capacité en utilisant la formule de Brug. Les valeurs de capacité ainsi obtenues sont présentées sur la Figure 60. Il est possible d'observer une augmentation quasi linéaire de la capacité avec le temps. Les valeurs de capacité obtenues sont très grandes pour une capacité de double couche. Ces valeurs très élevées peuvent être

attribuées à une augmentation de la surface géométrique du substrat en présence de la solution M1. En d'autres termes, on mesure une expansion de l'interface qui peut initialement être représentée par un système 2D puis qui évolue au cours du temps pour former une structure tridimensionnelle formée de produits de corrosion conducteur dont la mesure d'impédance permet d'avoir une mesure de la surface développée.

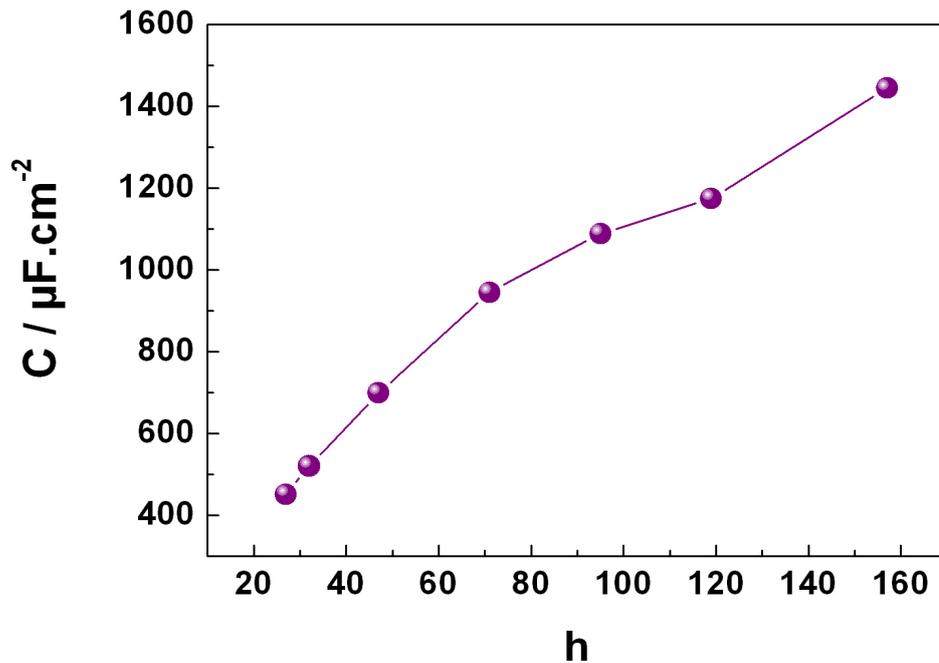


Figure 60 : Evolution de la capacité effective du substrat d'acier au carbone immergé dans la solution M1 (sans phosphate) dans des conditions anaérobies et abiotiques (décalage du début de l'expérience à cause du temps nécessaire pour obtenir un milieu aux conditions stables (d'environ 24h)).

Il est possible d'observer une variation irrégulière de la résistance de transfert de charge qui augmente ou qui diminue avec le temps. Cette variation est encore plus évidente sur la Figure 61 où sont représentés les diagrammes d'impédance pour une même expérience avec des mesures effectuées à intervalles rapprochés sur une période s'étendant du 2^{ème} au 4^{ème} jour.

Un zoom de la région des hautes fréquences est aussi représenté. On peut ainsi mettre en évidence l'évolution de la résistance d'électrolyte en fonction du temps. On observe une diminution continue que l'on attribue à la libération d'ions Fe^{2+} pendant le processus de corrosion ce qui peut se traduire par une augmentation

de la conductivité de la solution. On pourrait aussi supposer que le développement du film à la surface de l'électrode modifie de façon significative la surface géométrique du système, ce qui pourrait se traduire également par une diminution de la résistance d'électrolyte en fonction du temps. Cependant, les observations de l'électrode à différents stades du processus de corrosion ne semblent pas corroborer une telle hypothèse, et une variation de la conductivité de l'électrolyte semble être la cause la plus probable de ces variations.

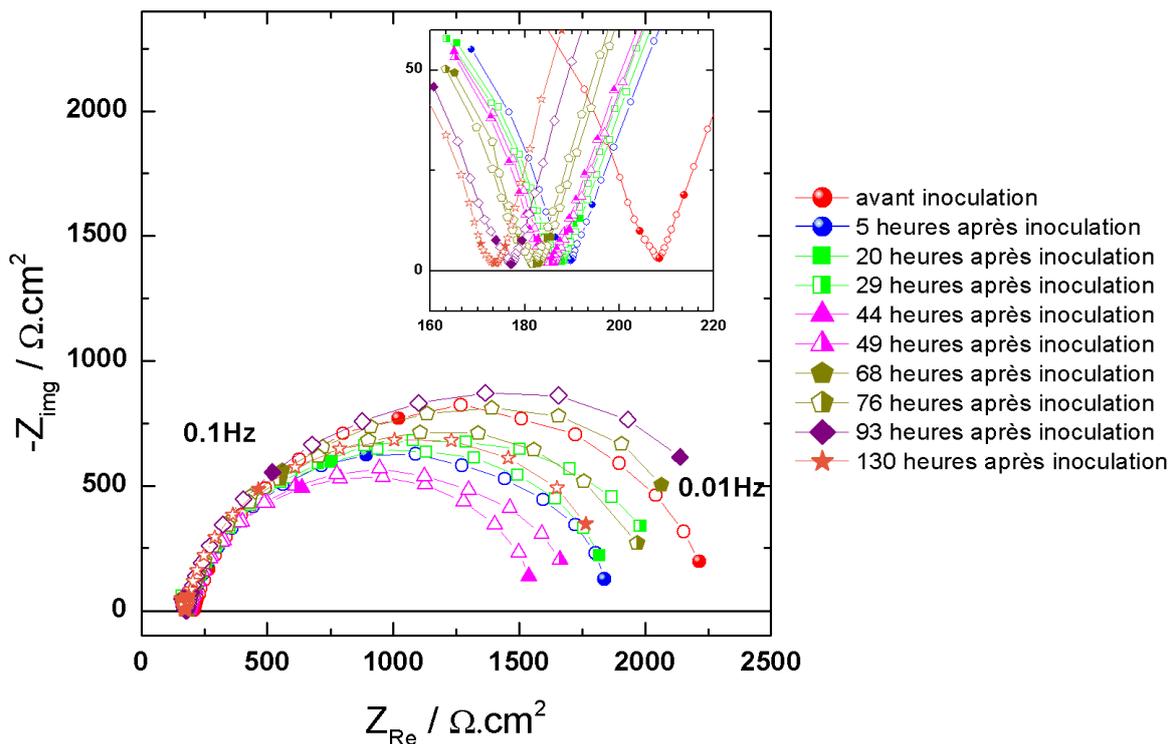


Figure 61 : Représentation de Nyquist des mesures d'impédance globales de l'acier au carbone en solution M1 (sans phosphate) en conditions abiotiques. Le substrat a été polarisé au potentiel de l'OCP. Les mesures ont été réalisées avec une amplitude de 20 mV en fonction du temps. L'insert correspond à un zoom sur la partie haute fréquence.

Un autre point important à observer sur le zoom du domaine des hautes fréquences, avec la possible présence d'artéfacts. Pour vérifier cette hypothèse, un système avec un fil de platine en série avec une capacité a été utilisé dans la cellule électrochimique en parallèle avec l'électrode de référence, comme cela été décrit dans la partie expérimentale 3.2.8. La Figure 62 montre la représentation Nyquist des diagrammes d'impédances obtenue sans (Figure 62 a) et avec le fil de platine (Figure 62 b). En présence du fil de platine la composante haute fréquence est

modifiée et laisse apparaître une boucle capacitive de faible amplitude. Cette boucle capacitive sera interprétée ultérieurement.

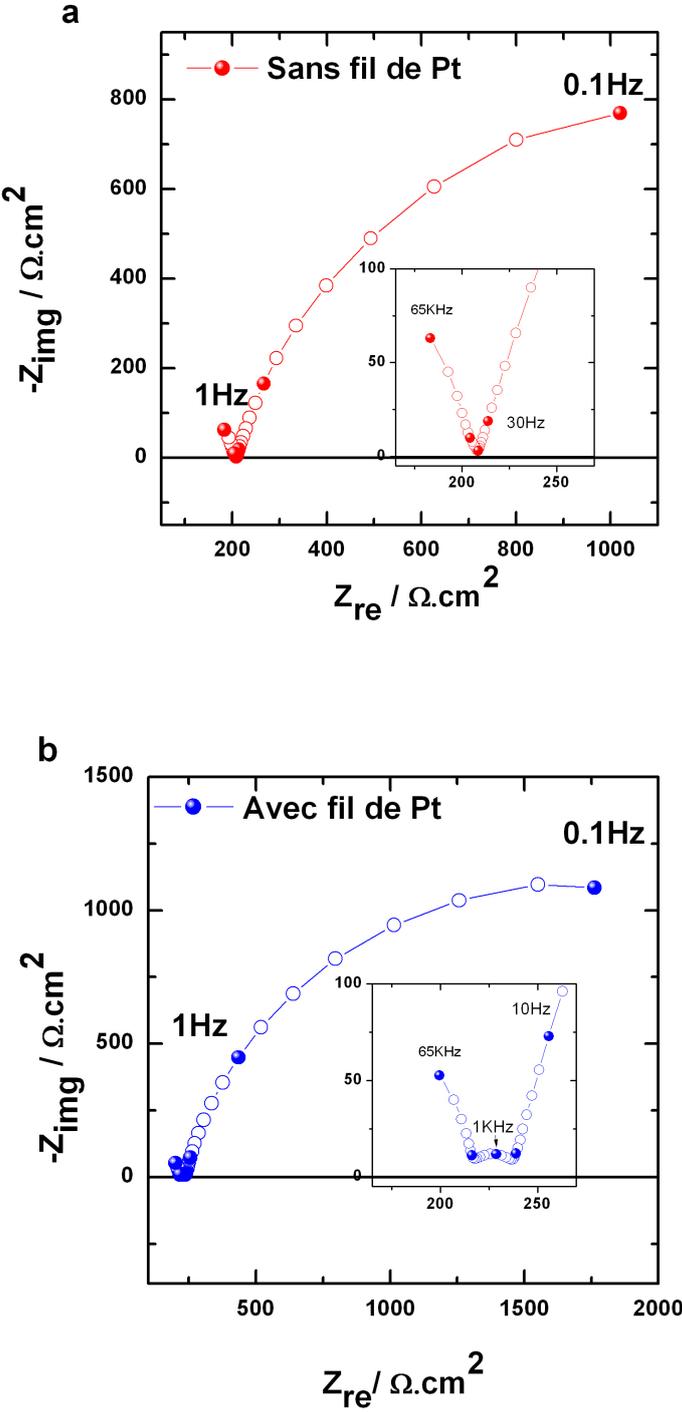
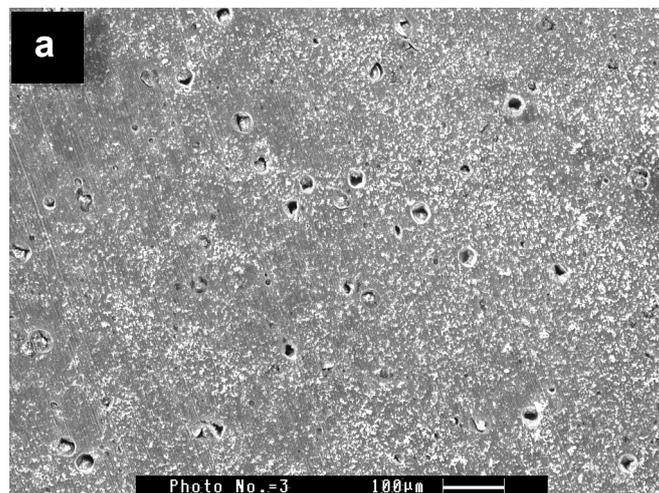


Figure 62 : Représentation de Nyquist de l'impédance globale en conditions abiotiques obtenue pour deux conditions différentes ; (a) sans fil de platine (b) avec un fil de platine connecté à une capacité de 0,15 μF en court-circuit avec l'électrode de référence.

Ainsi, dans les conditions présentées, l'utilisation du fil de Pt connecté à une capacité et court-circuité avec l'électrode de référence est nécessaire pour éviter les artefacts en hautes fréquences.

La Figure 63 montre des images MEB du substrat après 7 jours d'immersion dans la solution M1 sans phosphate, après les mesures d'impédance en conditions abiotiques. Il est possible d'observer la présence de plusieurs piqûres de tailles micrométriques distribuées sur toute la surface de l'échantillon (Figure 63 a). L'analyse d'EDS en fond de piqûre (Figure 63 b), identifie comme principal élément le fer. Les petits dépôts blancs répartis sur la surface autour des piqûres (Figure 63 c) ont également été analysés par EDS. La présence d'oxygène, ainsi que la présence de soufre et de calcium indique la formation d'oxydes sur la surface du substrat. L'élément carbone est aussi détecté (dans des proportions plus importantes que ce que l'on peut observer dans le cas d'une contamination de surface due à la présence de différentes impuretés) : nous avons attribué cet excès au carbone déposé par sputtering sur la surface de l'échantillon pour améliorer la résolution des images MEB. Ces dépôts de carbone nécessaire à l'obtention d'image MEB montrent que même si les produits de corrosion sont conducteurs leur conductivité reste cependant limitée.



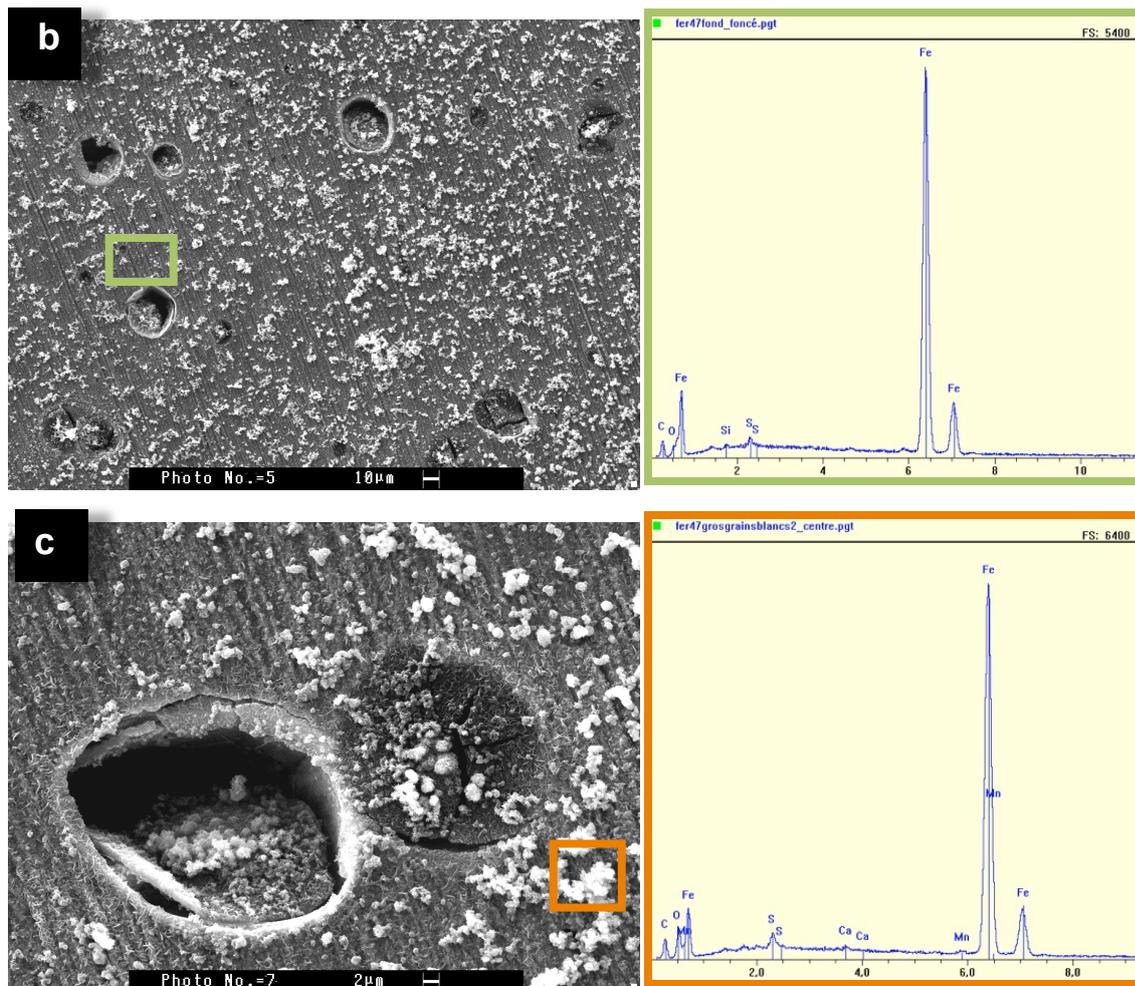


Figure 63 : Images MEB du substrat d'acier au carbone après 7 jours d'immersion après les mesures d'impédance globales en solution M1 sans phosphate. (a) image globale ; (b) amplification de l'image globale avec l'indication de la zone analysée (fond noir) avec leur image de EDS respective; (c) zoom sur les piqûres avec marquage de la zone analysée (dépôt blanc) par EDS

La Figure 64 montre les réponses de l'impédance globale pour le système d'acier au carbone dans le milieu M1 sans phosphate en conditions biotiques. Les premières mesures ont été réalisées après 14 heures d'immersion du substrat dans la solution M1. Grâce aux corrections des artefacts en haute fréquence il est possible de percevoir deux boucles capacitives.

Le même phénomène de diminution de la résistance d'électrolyte observée dans les conditions abiotiques (Figure 61) peut être aussi observé dans les conditions biotiques (Figure 64). Ces expériences ont été réalisées de façon concomitante avec les mesures d'impédance locale avec la génération d'hydrogène comme cela a été montré dans le schéma présenté Figure 30. La sonde de Pt de la tri-électrode a été polarisée à $-1 \text{ V} / \text{ECS}$ afin d'obtenir un courant continu d'environ -

50 nA ce qui permet de générer localement un flux constant d'hydrogène pour stimuler l'activité bactérienne. La remontée capacitive observée en haute fréquence (65 kHz à 10 kHz) est là encore attribuée à la présence d'artefacts, comme cela est décrit ans la littérature [41].

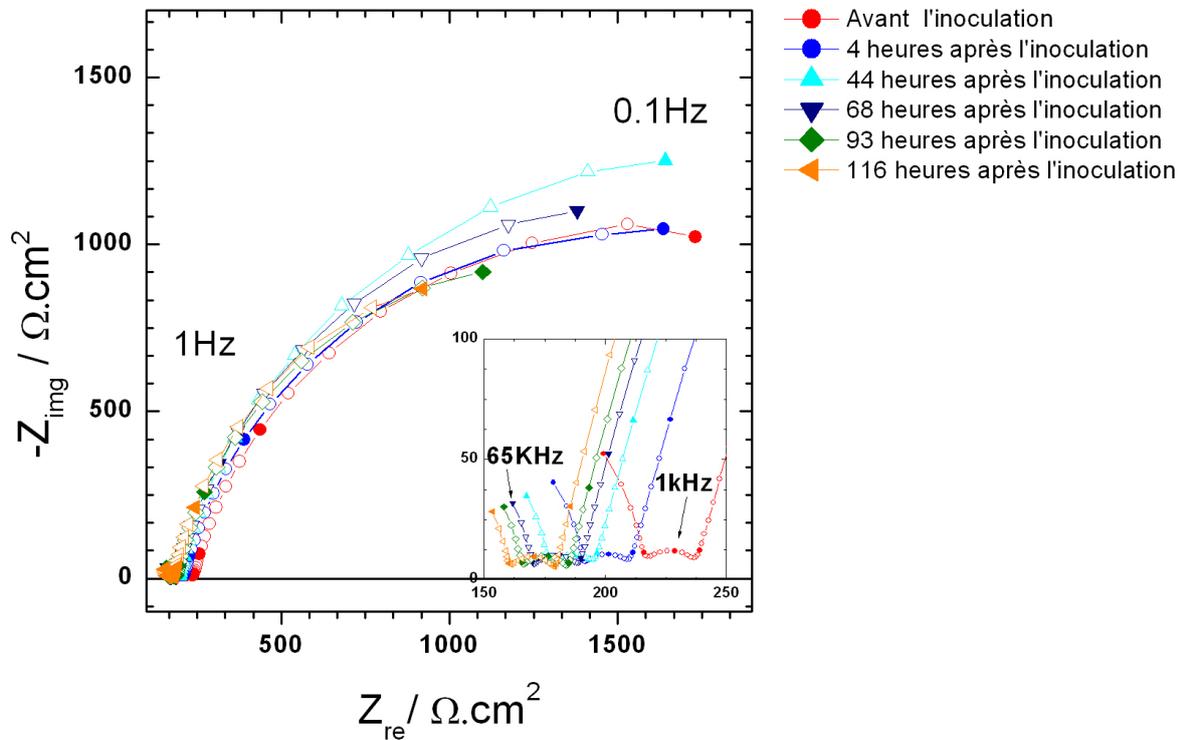


Figure 64: Représentation de Nyquist de l'impédance globale de l'acier au carbone dans le milieu M1 sans phosphate, en conditions biotiques.

Le système électrochimique peut donc être décrit avec deux constantes de temps. Une en haute fréquence, entre 10 kHz et 100 Hz et une pour des fréquences inférieures à 100 Hz. Les deux boucles ont été analysées séparément. La boucle haute fréquence a été ajustée avec un circuit électrique correspondant à une résistance d'électrolyte en série avec un CPE en parallèle avec une résistance R_{ox} (Figure 65).

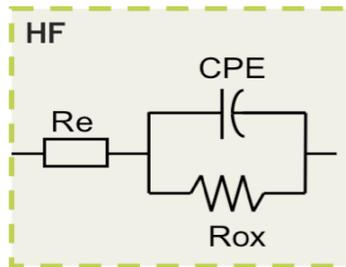


Figure 65 : Circuit électrique utilisé pour la modélisation de la boucle capacitive haute fréquence.

La boucle en basse fréquence a également été modélisée avec le circuit électrique illustré sur la Figure 66, constitué par un CPE en parallèle avec la résistance de polarisation.

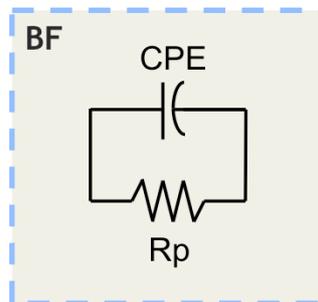


Figure 66 : Circuit électrique utilisé pour la modélisation de la boucle capacitive basse fréquence.

Les différents paramètres R_e , R_{tc} et R_{ox} , Q et α obtenus à partir de l'ajustement sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Compilation des paramètres (R_e , R_{ox} , R_{tc} , Q et α) obtenus par ajustement des résultats d'impédance globales en conditions biotiques.

		AVI	4 heures API	44 heures API	68 heures API	93 heures API	116 heures API
Haute fréquence	R_e ($\Omega \text{ cm}^2$)	211	187	173	167	163	157
	R_{ox} ($\Omega \text{ cm}^2$)	31,7	27,7	26,8	26,0	24,3	24,0
	Q ($\text{s}^{\alpha}/\Omega \text{ cm}^2$)	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$
	α	0,82	0,83	0,83	0,84	0,85	0,85
Basse fréquence	$R_e + R_{ox}$ ($\Omega \text{ cm}^2$)	236	208	192	185	183	178
	R_{tc} ($\Omega \text{ cm}^2$)	2770	2710	3330	2970	2490	2460
	Q ($\text{s}^{\alpha}/\Omega \text{ cm}^2$)	$4,6 \cdot 10^{-4}$	$4,9 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$6,1 \cdot 10^{-4}$	$8,2 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$
	α	0,83	0,83	0,83	0,84	0,85	0,86

AVI = Avant l'inoculation; API = Après l'inoculation

On observe ici encore une diminution constante de la résistance d'électrolyte au cours du temps.

De même, le terme R_{ox} présente une décroissance continue.

A partir de l'utilisation de la formule de Brug, la capacité a été calculée en haute fréquence (équation 25) et en basse fréquence (équation 24). Les valeurs des capacités obtenues en hautes et basses fréquences sont présentées respectivement sur les Figure 67 et 68.

L'amplitude de la boucle en haute fréquence permanence relativement constante. Les valeurs des capacités obtenues sont constantes avec une valeur d'environ $6,5 \mu\text{Fcm}^{-2}$. Les valeurs obtenues sont trop petites pour pouvoir être attribuées à une capacité de double couche mais elles peuvent être attribuées à une fine couche d'oxyde comme cela a été déjà décrit dans la littérature [43].

La capacitance associée à des couches d'oxyde ou à un revêtement peut être exprimée par [36]:

$$C = \frac{\varepsilon \varepsilon_0}{\delta}$$

Équation 32

où δ est l'épaisseur du film d'oxyde, ε est la constante diélectrique du matériau, et ε_0 est la permittivité du vide ($\varepsilon_0 = 8.8542 \times 10^{-14} F/cm$).

En faisant l'hypothèse que la constante diélectrique moyenne de la couche d'oxyde est de 10 (valeur fréquemment rencontrée dans la littérature), l'épaisseur de la couche est estimée entre 1 et 2 nm.

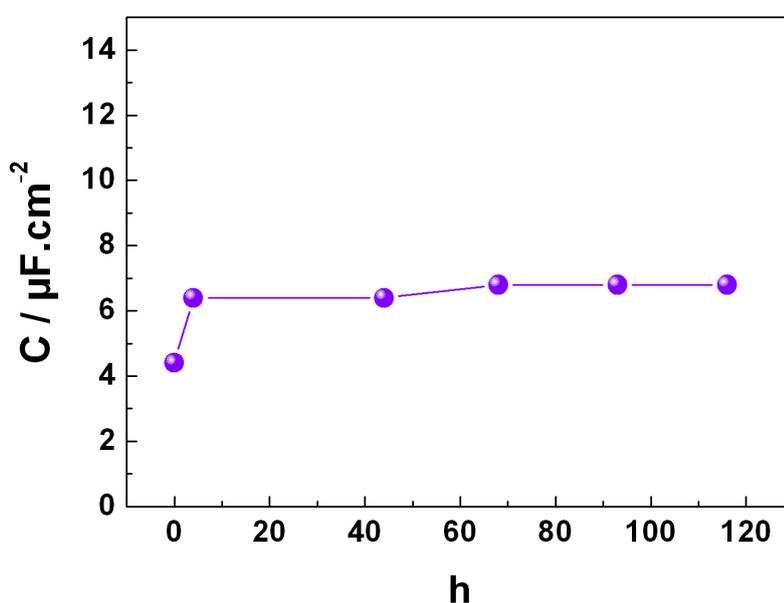


Figure 67 : Représentation graphique de la capacité effective obtenue en haute fréquence.

Pour le domaine des basses fréquences, la constante de temps est attribuée à la résistance de transfert de charge du processus de dissolution de l'acier. Il est possible d'observer une augmentation de la capacité de $300 \mu F cm^{-2}$ à $750 \mu F cm^{-2}$ (Figure 68). Ainsi comme dans les expériences abiotiques, ces valeurs sont considérées comme étant trop élevées par rapport aux valeurs typiques d'une capacité de double couche. Cependant, cette analyse ne prend pas en compte l'accumulation des produits de corrosion sur la surface de l'électrode ce qui augmente la surface réelle de l'électrode et donc impacte la valeur de la capacité que l'on mesure lorsqu'on la ramène à une unité de surface. Toutefois, ce qui a été

observé dans le cas de conditions biotiques, l'évolution de la capacité n'est pas linéaire, comme dans les conditions abiotiques.

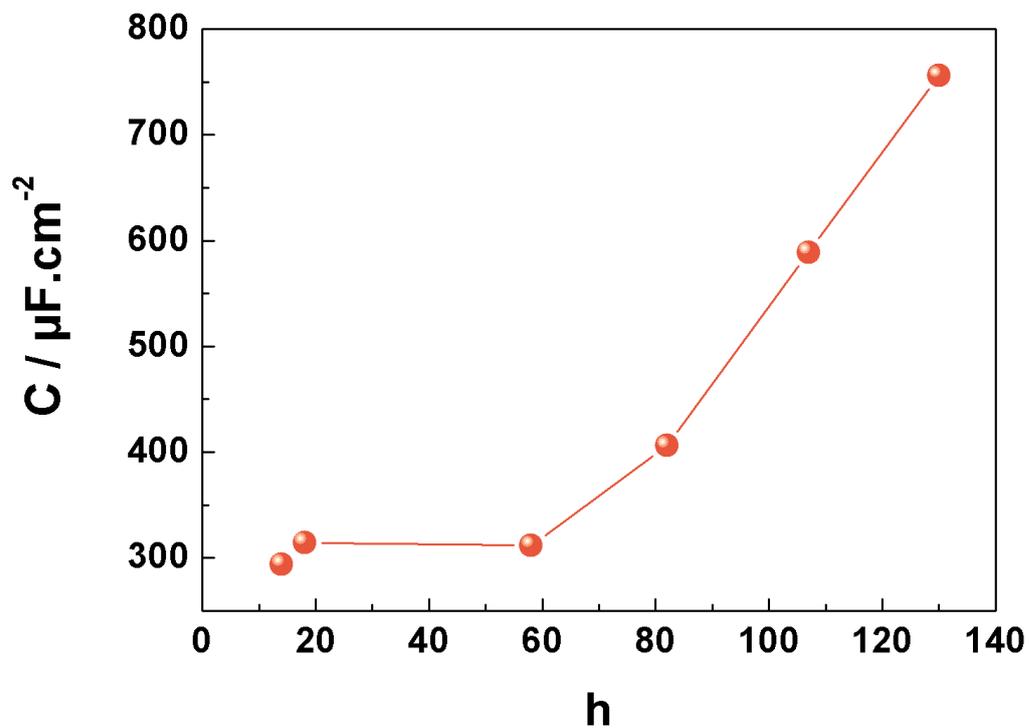


Figure 68 : Représentation de la capacité effective obtenue en basse fréquence.

Au cours de la même série d'expériences, des mesures d'impédance locale ont été effectuées en six différentes positions au-dessus du substrat d'acier. La Figure 69 illustre 3 points où la sonde a été positionnée pour la réalisation de ces mesures d'impédance locales.

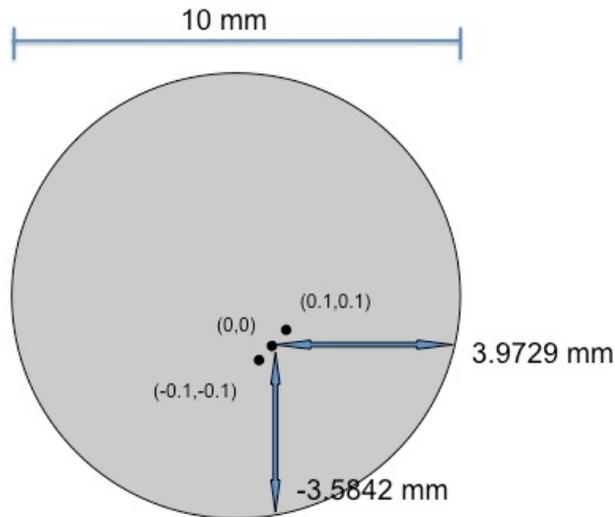


Figure 69 : Représentation du positionnement de la sonde sur le substrat pendant les mesures de l'impédance locale.

La Figure 70 donne quelques exemples de diagrammes LEIS obtenus au centre de l'électrode (Figure 70a) et à 1 mm du centre (Figure 70b). Les deux jeux de diagrammes sont très similaires. Dans le domaine des hautes fréquences, le comportement inductif est dû à la géométrie de la cellule, comme cela a déjà été décrit par Frateur *et al.* [61]. Cette composante inductive masque la première boucle capacitive, et seule la deuxième boucle correspondant au transfert de charge peut être analysée avec ces mesures. Il est intéressant de remarquer que, les valeurs de la résistance de transfert de charge sont indépendantes à la fois du temps et de l'emplacement de la sonde au-dessus du substrat (on notera toutefois que les mesures présentées sur ces figures sont réalisées à une distance plus proche du centre de l'électrode que du bord afin de minimiser à la fois les contributions liées à la géométrie de la cellule, mais aussi à l'influence de la composante radiale du courant qui n'est pas mesurée avec notre dispositif expérimental).

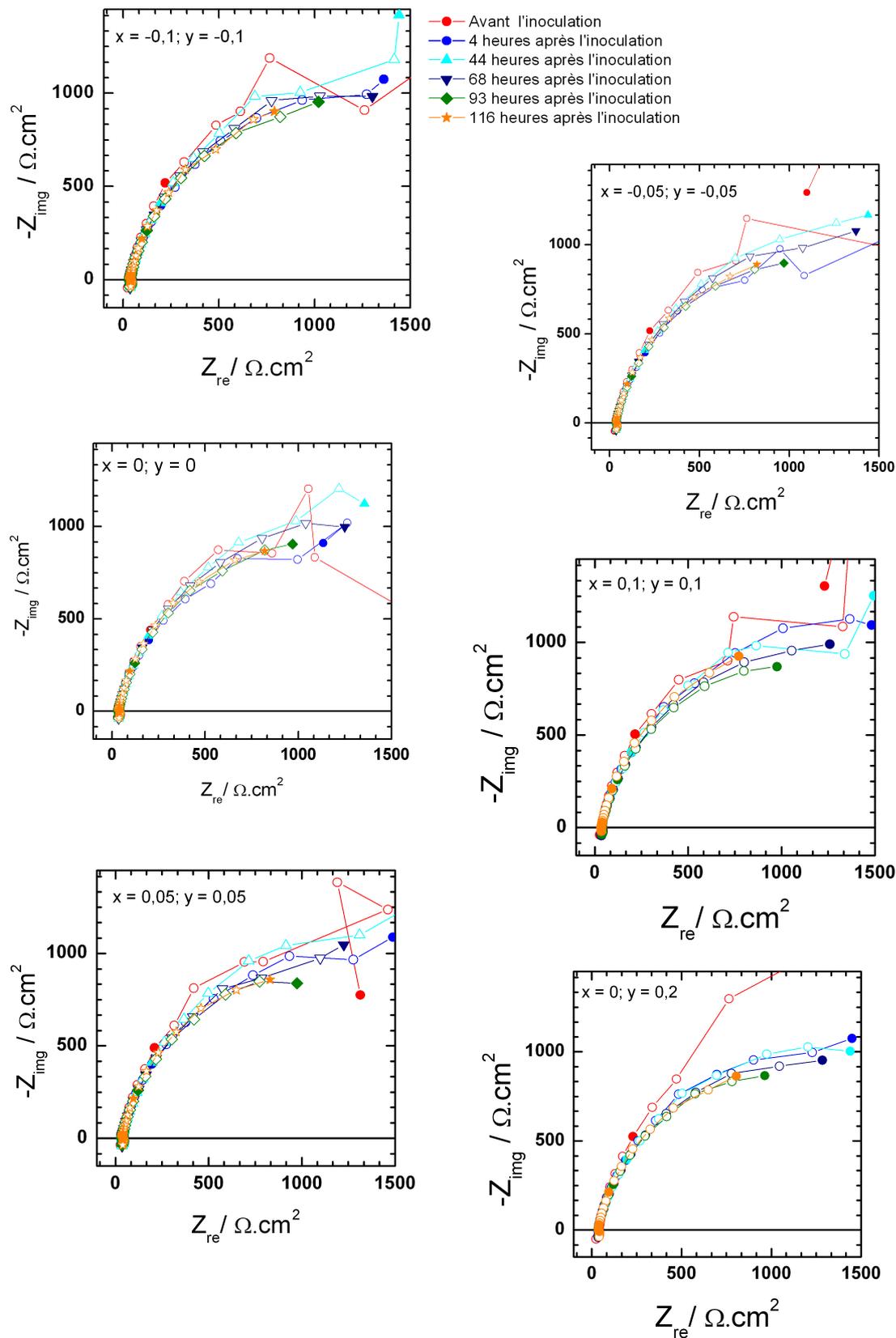


Figure 70 : Représentation de Nyquist de l'impédance interfaciale locale de l'acier au carbone dans le milieu M1 sans phosphate (conditions biotiques) pour six différentes positions indiquées sur la Figure 69.

Cela indique que, d'un point de vue local (la résolution spatiale de la configuration utilisée est d'environ 100 micromètres), la réactivité de l'interface ne dépend peu ou pas de la position. La boucle en basse fréquence a été aussi analysée avec le même circuit électrique que celui utilisé pour les mesures globales (Figure 66).

Comme cela a été observé pour les résultats présentés sur la Figure 71, la capacité obtenue à partir des mesures locales montre une même tendance en fonction du temps : les valeurs sont constantes dans les premières heures, puis après 60 heures, on observe une augmentation continue. Il faut quand même remarquer que d'un point à l'autre, la réactivité varie de plus de 10%, ce qui n'est pas négligeable.

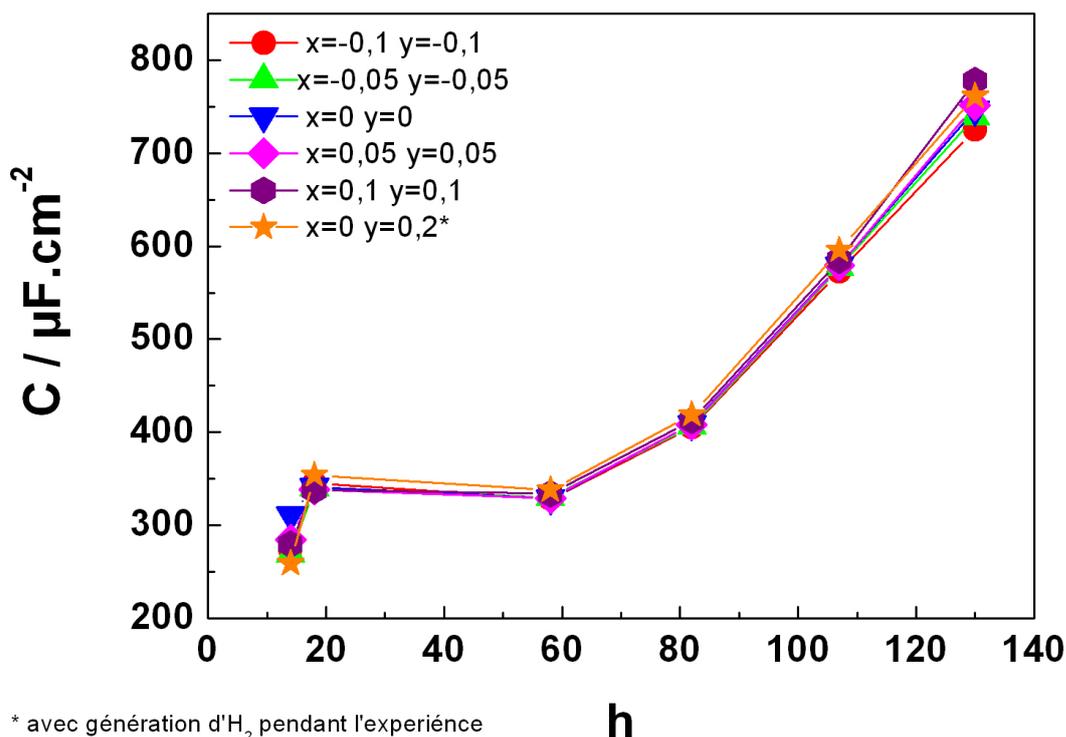


Figure 71 : Représentation de la capacité effective de l'impédance locale interfaciale obtenue en haute fréquence pour 6 différentes positions sur le substrat. La sonde a été polarisée avec une génération d'hydrogène pendant toute l'expérience pour la position représentée pour la courbe orange.

Ceci est en accord avec la variation de résistance de transfert de charge et suggère que *Shewanella oneidensis* influe sur la vitesse de réaction globale dans cet environnement, mais aucune corrosion locale n'a été mise en évidence par l'analyse des résultats électrochimiques. En outre, cela a été étayé par des observations au MEB post-mortem comme cela est présenté sur la Figure 72. L'aspect de l'acier est caractéristique d'une corrosion généralisée. Il est possible d'observer une grande différence entre les images obtenues pour les expériences en conditions abiotiques (Figure 63) et biotiques (Figure 72), les piqûres obtenues en conditions biotiques ne sont plus maintenant visibles. En outre, un examen attentif de la surface après différentes expériences n'a jamais permis de mettre en évidence une corrosion localisée exacerbée par la présence de bactéries.

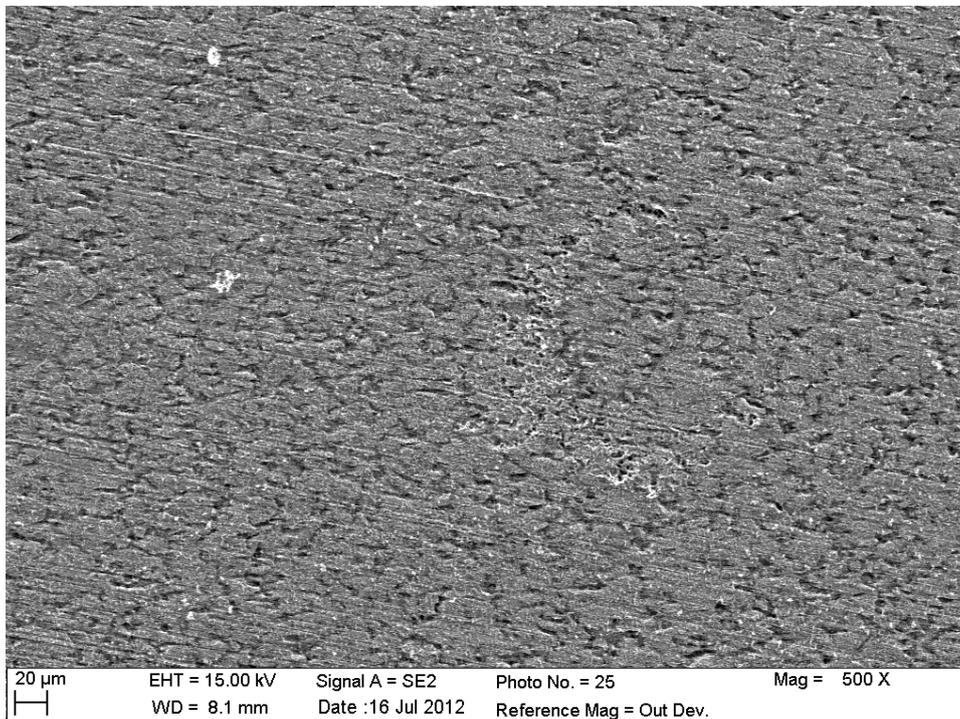


Figure 72 : SEM image de l'électrode d'acier au carbone après 7 jours d'immersion en solution M1 sans phosphate en conditions biotiques

Même sans préparation spécifique il est possible de mettre en évidence la présence de bactéries attachées à la surface du substrat comme le montre la Figure 73. En dépit de la destruction possible des cellules en raison du vide utilisé pour l'analyse au MEB, certaines bactéries présentent une morphologie normale, de plus, il est possible de constater la présence de diplobacilles, ce qui indique que les cellules sont en phase de multiplication. La présence de dépôts sur les bactéries

peut être des oxydes de fer(II) il n'a cependant pas été possible de les identifier ambiguïté par des analyses EDX. Ces oxydes peuvent inhiber l'action bactérienne à long terme.

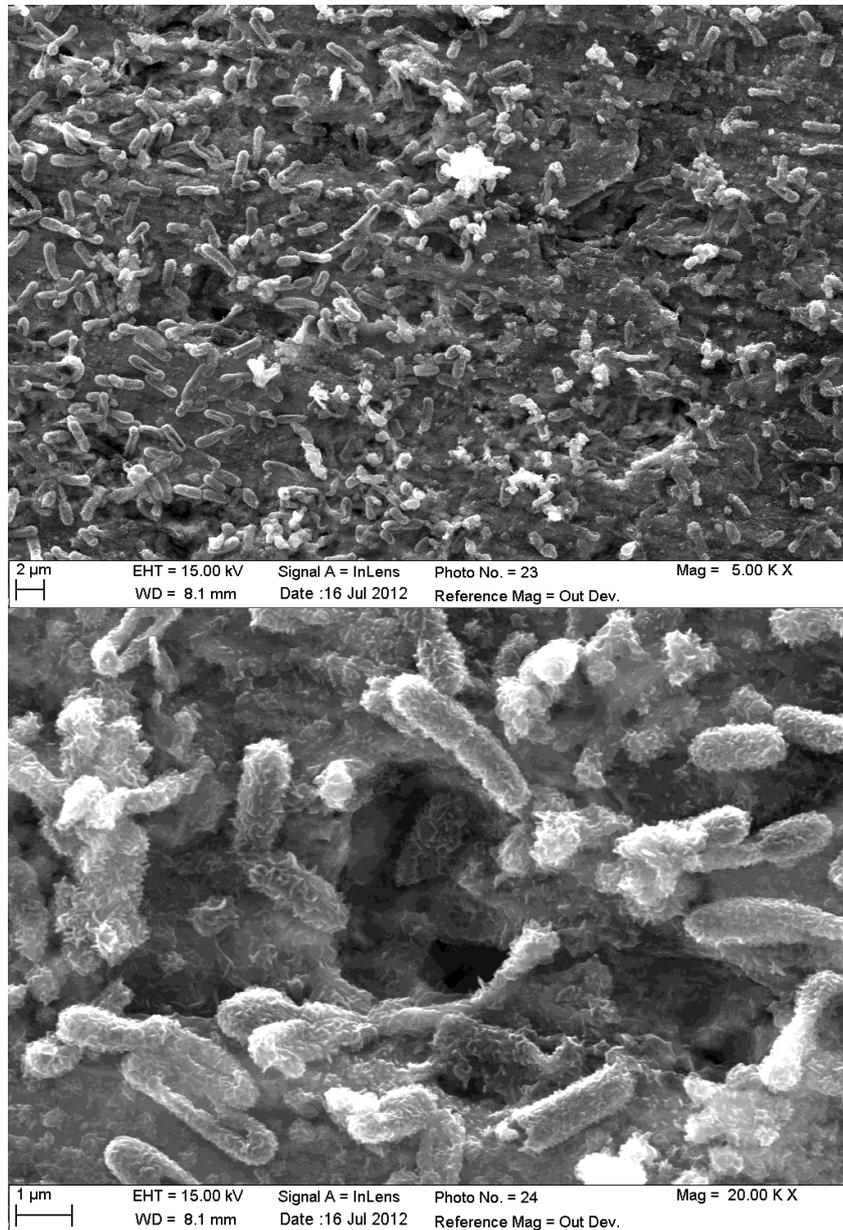


Figure 73 : Images MEB des bactéries attachées à la surface du substrat.

3.3.5 Conclusion partielles :

Des mesures d'impédance sur l'acier au carbone dans la solution M1 sans phosphate ont été réalisées en conditions abiotiques et biotiques.

En conditions abiotiques une boucle capacitive a été observée sur les mesures d'impédance globale. Cette boucle a été ajustée avec un circuit équivalent comprenant la résistance d'électrolyte et un CPE en parallèle avec la résistance de transfert de charge. A partir de l'analyse de ces paramètres, l'évolution de capacité au cours du temps a été obtenue. Les valeurs très élevées obtenues ont été attribuées à l'augmentation de la surface due au processus de la corrosion de l'acier. Ses capacités ont eu une évolution linéaire croissante. La résistance d'électrolyte diminue en fonction du temps dû à la libération des ions de Fe^{2+} en solution. Les valeurs de R_{tc} présentent des variations assez irrégulières en fonction du temps, cependant leurs amplitudes sont proches des valeurs initiales ce qui ne correspond pas à un comportement corrosif évolutif.

Les images post-mortem par microscopie électronique à balayage ont révélé la présence de petites piqûres réparties sur la totalité de la surface.

En conditions biotiques[67] , deux boucles capacitives ont été observées. La boucle haute fréquence a été ajustée avec un circuit équivalent constitué par la résistance d'électrolyte et un CPE en parallèle avec la résistance de la couche d'oxyde. Les valeurs de capacité qui ont été obtenues avec la formule de Brug sont caractéristiques d'une fine couche d'oxydes. La deuxième boucle capacitive a été ajustée avec le même circuit équivalent que pour les conditions abiotiques. Elle présente une phase constante dans les premières 60 heures, suivie d'une évolution linéaire comme cela a aussi été observé dans les conditions biotiques. Les mesures d'impédance locales ont été effectuées simultanément avec les mesures d'impédance globale. Ces mesures nous ont permis de mettre en évidence seulement la seconde constante de temps. Les valeurs de capacités locales présentent la même tendance que les valeurs globales, et aucune variation avec la position, même en présence de génération locale d'hydrogène n'a pu être mise en évidence. Cela indique un mécanisme de corrosion généralisée. Les images MEB ont révélé la présence de bactéries attachées à la surface de l'électrode et un aspect homogène de corrosion au contraire des images par les conditions abiotiques où des petites piqûres ont été observées.

3.3.6 Etude géochimique de l'influence de IRB dans le processus de la biocorrosion de l'acier au carbone

En parallèle à ce travail, une autre thèse (également dans le cadre du projet BIOCOR), dont la thématique est « l'étude géochimique sur l'influence des IRB dans le processus de biodétérioration de l'acier au carbone »[68] sera soutenue en décembre 2013 par Marta Kerber Schütz au laboratoire de Modélisation des Transferts dans l'Environnement du CEA de Cadarache. Les deux études utilisent le même acier au carbone, ainsi que la même composition du milieu (M1). Cependant, ces études ont été réalisées en réacteurs de batch sous une atmosphère d'azote (90 %) et CO₂ (10%). L'évolution de l'H₂ libéré par la corrosion de l'acier en phase gazeuse ainsi que le dosage de Fe²⁺ en solution ont été suivis pendant une période de 5 mois. En conditions abiotiques, dans les premiers 20 jours de suivi expérimental, l'évolution de H₂ et de Fe²⁺ ont progressé linéairement avec une stœchiométrie de 1 : 1, ce qui correspond à une réaction globale de la corrosion anaérobie du fer selon la réaction suivante : $Fe^0 + 2H_2O \rightarrow Fe^{2+} + 2OH^- + H_2$. Cependant, dans les conditions biotiques, une augmentation de la libération de Fe²⁺ en solution avec une libération de l'hydrogène en phase gazeuse a été observée après un période de 5 jours. Ce qui indique une augmentation de la corrosion en présence de *Shewanella*. La concentration de H₂ est toutefois moins importante que la concentration de Fe²⁺ ce qui indique que l'hydrogène a été consommé par des bactéries pendant le processus de réduction dissimilative des oxydes de fer(III). À partir de 20 jours, une précipitation de fer est observée. La concentration de l'ion Fe²⁺ en solution a alors atteint sa valeur maximale et est stable.

Les vitesses de corrosion en conditions biotiques et abiotiques sont présentées dans la Figure 74. Il est possible de constater une augmentation de la vitesse de corrosion en conditions biotiques dans les premiers 5 jours, suivie d'une réduction constante. Cependant la vitesse de corrosion dans les conditions biotiques reste toujours supérieure à celle mesurée dans des conditions abiotiques.

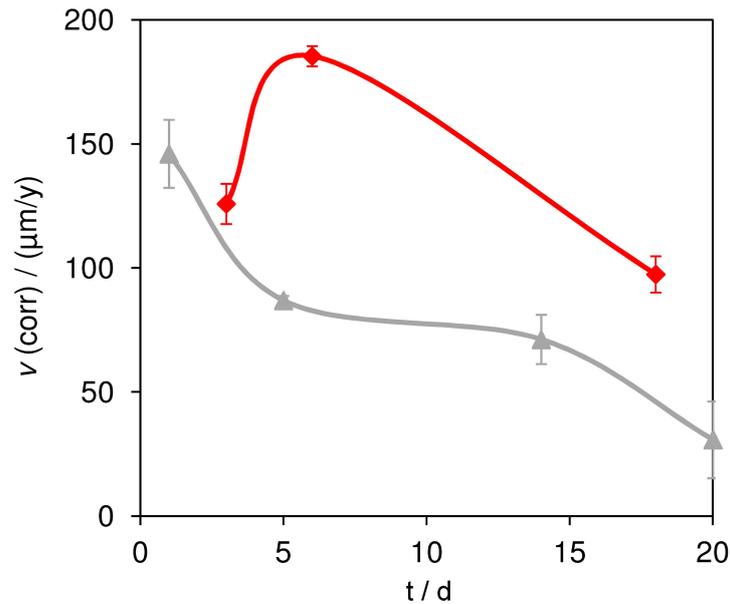


Figure 74 : Vitesse de corrosion ($\mu\text{m an}^{-1}$) en fonction du temps (jours) mesurée pendant les expériences géochimiques ($n=3$): courbe rouge conditions biotiques; courbe gris, conditions abiotiques.

Les analyses de spectroscopie Raman des coupons après cinq mois de réaction indiquent la présence de vivianite et magnétite comme les deux principales phases minérales (Annexe I). Par contre en conditions biotiques l'intensité des bandes de vivianite est plus importante, et une réduction significative de la concentration en magnétite est observée. En outre, ces bandes sont larges, ce qui suggère un faible facteur de cristallisation. Ce résultat indique que les bactéries peuvent réduire la magnétite en accélérant la corrosion. Les images MEB (Annexe I) ont également indiqué une différence dans la morphologie, dans la composition et dans la cristallinité des produits de corrosion en présence de bactéries.

4 Conclusion et perspectives

Pendant le processus de stockage des déchets nucléaires de Haute Activité, la formation de dihydrogène et d'oxydes de fer(III) est attendue par le processus naturel de la corrosion en milieu anoxique et saturé. La présence de ces donneurs et accepteurs d'électrons, en particulier dans cet environnement pauvre en substrat énergétique, suggère le développement de bactéries hydrogénotrophes et ferri-réductrices.

L'activité bactérienne peut mettre en danger les structures lorsqu'elle est susceptible de favoriser la corrosion localisée. Ainsi, l'objectif de cette étude a été de mettre en évidence les mécanismes de corrosion associés à une bactérie modèle présentant une activité ferriréductrice et hydrogénotrophe (*Shewanella oneidensis*) en utilisant seulement l'hydrogène et les oxydes de fer III résultants de la corrosion anaérobie comme substrats énergétiques. Une partie importante de ce travail a consisté en la mise en place de procédures expérimentales pour l'étude de la biocorrosion localisée. Le choix s'est porté sur les techniques électrochimiques globales et locales, afin d'essayer de mettre en évidence la corrosion localisée induite par la présence de ces bactéries. Selon nos connaissances, c'est la première fois que les techniques de microscopie électrochimique à balayage (SECM) et de spectroscopie d'impédance électrochimique locale (SIEL) ont été utilisées simultanément. Il est également important de souligner la difficulté pour obtenir des résultats fiables et reproductifs dans des conditions microbiologiques et en anaérobie.

Dans ce travail, la consommation d'hydrogène par *Shewanella* a été estimée à environ $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui correspond à un flux de dihydrogène consommé de $4 \cdot 10^{-13} \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Cette valeur a été obtenue à partir de la différence de la charge en hydrogène ré-oxydé au moyen du SECM après 24 heures de contact bactéries/métal. Elle est représentative d'un petit volume (160 nL) formé entre la sonde et le substrat.

Le plus souvent, les problèmes résultants de la biocorrosion débutent dans une zone sensible d'une grande structure, ce qui se traduit par une différence de

réactivité locale. Ainsi reproduire un phénomène qui peut se développer au sein de structures de grande surface sur une surface inférieure à 1cm^2 (test en laboratoire) est un défi à la recherche scientifique. Cette étude a essayé de résoudre cette question en utilisant le dihydrogène comme un inducteur de la corrosion localisée.

La génération locale de dihydrogène a été mise en évidence comme un facteur influençant le processus de biocorrosion, en utilisant la technique de chronoampérométrie, la génération locale d'hydrogène augmente la libération de Fe^{2+} d'un facteur de 7. Cependant, le mécanisme selon lequel l'hydrogène peut influencer ce processus n'est pas complètement élucidé.

Tout d'abord, la génération d'une espèce électroactive sur la surface de l'électrode va favoriser une altération de la réactivité du substrat, ce qui explique l'obtention d'une charge plus élevée de Fe^{2+} en conditions abiotiques. Un deuxième facteur est la grande disponibilité de ce substrat énergétique, lorsqu'il est maintenu en conditions de confinement. Ainsi, dans cette situation la disponibilité des oxydes de Fe(III) peut être un facteur limitant de la biocorrosion. D'autres facteurs comme la modification du pH peuvent aussi être considérés.

L'influence de la génération locale d'hydrogène a été mise en évidence par des techniques de mesure d'impédance. Une réduction de 8% de la résistance de transfert de charge est observée lorsque le dihydrogène est généré par la sonde. Il est important de souligner que cette valeur n'est pas négligeable car ces résultats sont obtenus à partir de mesures globales alors que la génération d'hydrogène est localisée. Cependant, pendant les analyses d'impédance locales, la corrosion localisée n'a pas été mise en évidence. Il est donc possible de conclure que pour de courtes périodes d'exposition (environ cinq jours), la bactérie *Shewanella oneidensis* favorise un mécanisme de corrosion généralisée.

La biocorrosion est un mécanisme assez complexe et dépendant de plusieurs facteurs tels que la disponibilité des nutriments, les interactions microbiologiques, la composition en substances polymériques extracellulaires (EPS), le temps d'exposition. Cependant des phénomènes de biocorrosion peuvent se produire sur des périodes de temps plus longs dus au changement des conditions environnementales ou des conditions du métabolisme bactérien.

Sur le contexte du stockage géologique, cette étude nous amène deux résultats positifs de l'activité microbiologique :

- La consommation du dihydrogène par des bactéries, ce qui peut diminuer l'accumulation prévue de ce gaz dans les galeries du stockage (en réduisant les risques d'endommagement des propriétés des barrières géologiques ainsi que la fragilisation des matériaux métalliques),

- et un second effet protecteur, qui se traduit par l'absence de la corrosion localisée (au moins sur la durée correspondant à nos essais) en présence de *Shewanella oneidensis*.

Comme perspectives futures, des études sur le long terme doivent être réalisées afin de mieux comprendre ces mécanismes. L'étude d'autres espèces, ainsi que l'extension de ce travail à des cas plus proches de la réalité du terrain comme l'étude de cultures mixtes sont aussi souhaitables.

5 Références

1. Andra. (2005) Andra, Dossier 2005 Argile. Tome Evolution phénoménologique du stockage géologique.
2. Andra. (2005) Andra, Dossier 2005 Argile; Synthesis: Evaluation of the feasibility of a geological repository in an argillaceous formation_Meuse/Haute-Marne site.
3. (2005), A. (2005) Andra, Dossier argile 2005, Tome Architecture et gestion du stockage géologique - . Rapport Andra n°C RP ASTR 04-0032.
4. (2013) Andra - Les déchets de haute activité (HA).
5. Andra. (2012) Inventaire national des matières et déchets radioactifs 2009.
6. Feron, D., Crusset, D., and Gras, J.M. (2008) Corrosion issues in nuclear waste disposal. *Journal of Nuclear Materials* **379**, 16-23.
7. Marcus, P. (2002) *Corrosion Mechanisms in Theory and Practice*.
8. Gabrielli, C., and Takenouti, H. (2010) Méthodes électrochimiques appliquées à la corrosion: Techniques stationnaires_COR810.
9. J. Bard, A., and R. Faulkner, L. (2001) *Electrochemical Methods : Fundamentals and applications*.
10. Plieth, W. (2008) *Electrochemistry for Materials Science*. Elsevir, Oxford
11. David, D. (2005) Andra, Analogie archéologique et corrosion, Collection Sciences et Techniques. In: Andra scientific report.
12. Esnault, L., Jullien, M., Mustin, C., Bildstein, O., and Libert, M. (2011) Metallic corrosion processes reactivation sustained by iron-reducing bacteria: Implication on long-term stability of protective layers. *Physics and Chemistry of the Earth* **36**, 1624-1629.
13. Neff, D., Reguer, S., Bellot-Gurlet, L., Dillmann, P., and Bertholon, R. (2004) Structural characterization of corrosion products on archaeological iron: an integrated analytical approach to establish corrosion forms. *Journal of Raman Spectroscopy* **35**, 739-745.
14. Odziemkowski, M.S., Schuhmacher, T.T., Gillham, R.W., and Reardon, E.J. (1998) Mechanism of oxide film formation on iron in simulating groundwater solutions: Raman spectroscopic studies. *Corrosion Science* **40**, 371-389.
15. Lee, D., Nishikawa, H., Oda, Y., and Noguchi, H. (2013) Small fatigue crack growth characteristics and fracture surface morphology of low carbon steel in hydrogen gas. *International Journal of Fracture* **179**, 147-156.
16. Libert, M., Bildstein, O., Esnault, L., Jullien, M., and Sellier, R. (2011) Molecular hydrogen: An abundant energy source for bacterial activity in nuclear waste repositories. *Physics and Chemistry of the Earth* **36**, 1616-1623.
17. Pedersen, K. (1999) Subterranean microorganisms and radioactive waste disposal in Sweden. *Engineering Geology* **52**, 163-176.
18. Pedersen, K. (1996) Investigations of subterranean bacteria in deep crystalline bedrock and their importance for the disposal of nuclear waste. *Canadian Journal of Microbiology* **42**, 382-391.

19. Urios, L., Marsal, F., Pellegrini, D., and Magot, M. (2012) Microbial diversity of the 180 million-year-old Toarcian argillite from Tournemire, France. *Applied Geochemistry* **27**, 1442-1450.
20. Christofi, N., and Philp, J.C. (1991) MICROBIOLOGY OF SUBTERRANEAN WASTE SITES. *Experientia* **47**, 524-527.
21. Renshaw, J.C., Lloyd, J.R., and Livens, F.R. (2007) Microbial interactions with actinides and long-lived fission products. *Comptes Rendus Chimie* **10**, 1067-1077.
22. Ohnuki, T., Kozai, N., Sakamoto, F., Ozaki, T., Nankawa, T., Suzuki, Y., and Francis, A.J. (2010) Association of Actinides with Microorganisms and Clay: Implications for Radionuclide Migration from Waste-Repository Sites. *Geomicrobiology Journal* **27**, 225-230.
23. Sand, W. (2003) Microbial life in geothermal waters. *Geothermics* **32**, 655-667.
24. Liermann, L.J., Hausrath, E.M., Anbar, A.D., and Brantley, S.L. (2007) Assimilatory and dissimilatory processes of microorganisms affecting metals in the environment. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **22**, 867-877.
25. Gottschalk, G. (1986) *Bacterial Metabolism*. Springer.
26. Javaherdashti, R. (2011) Impact of sulphate-reducing bacteria on the performance of engineering materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**, 1507-1517.
27. Deniau, I., Devol-Brown, I., Derenne, S., Behar, F., and Largeau, C. (2008) Comparison of the bulk geochemical features and thermal reactivity of kerogens from Mol (Boom Clay), Bure (Callovo-Oxfordian argillite) and Tournemire (Toarcian shales) underground research laboratories. *Science of the Total Environment* **389**, 475-485.
28. Stroes-Gascoyne, S., Hamon, C.J., Dixon, D.A., and Martino, J.B. (2007) Microbial analysis of samples from the tunnel sealing experiment at AECL's Underground Research Laboratory. *Physics and Chemistry of the Earth* **32**, 219-231.
29. Sakurai, K., and Yoshikawa, H. (2012) Isolation and identification of bacteria able to form biofilms from deep subsurface environments. *Journal of Nuclear Science and Technology* **49**, 287-292.
30. Beech, I.B., Sunner, J.A., and Hiraoka, K. (2005) Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International Microbiology* **8**, 157-168.
31. Neal, A.L., Rosso, K.M., Geesey, G.G., Gorby, Y.A., and Little, B.J. (2003) Surface structure effects on direct reduction of iron oxides by *Shewanella oneidensis*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **67**, 4489-4503.
32. (2013) Corrodys - Expert en corrosion et biocorrosion marine - La biocorrosion.
33. Briandet, R., Fechner, L., Naïtali, M., and Dreanno, C. (2012) Biofilms, quand les microbes s'organisent.
34. Bergel, A. (2007) Recent advances in electron transfer between biofilms and metals. *Biohydrometallurgy: from the Single Cell to the Environment* **20-21**, 329-334.
35. Hernandez, M., Marchand, E.A., Roberts, D., and Peccia, J. (2002) In situ assessment of active *Thiobacillus* species in corroding concrete sewers using fluorescent RNA probes. *International Biodeterioration & Biodegradation* **49**, 271-276.
36. Satoh, H., Odagiri, M., Ito, T., and Okabe, S. (2009) Microbial community structures and in situ sulfate-reducing and sulfur-oxidizing activities in biofilms developed on mortar specimens in a corroded sewer system. *Water Research* **43**, 4729-4739.

37. Beech, W.B., and Sunner, J. (2004) Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology* **15**, 181-186.
38. Zhou, J.Z., He, Q., Hemme, C.L., Mukhopadhyay, A., Hillesland, K., Zhou, A.F., He, Z.L., Van Nostrand, J.D., Hazen, T.C., Stahl, D.A., Wall, J.D., and Arkin, A.P. (2011) How sulphate-reducing microorganisms cope with stress: lessons from systems biology. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 452-466.
39. Muyzer, G., and Stams, A.J.M. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 441-454.
40. Dinh, H.T., Kuever, J., Mussmann, M., Hassel, A.W., Stratmann, M., and Widdel, F. (2004) Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature* **427**, 829-832.
41. Du, Z.W., Li, H.R., and Gu, T.Y. (2007) A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances* **25**, 464-482.
42. El-Naggar, M.Y., Wanger, G., Leung, K.M., Yuzvinsky, T.D., Southam, G., Yang, J., Lau, W.M., Nealson, K.H., and Gorby, Y.A. (2010) Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *PNAS* **107**.
43. Meitl, L.A., Eggleston, C.M., Colberg, P.J.S., Khare, N., Reardon, C.L., and Shi, L. (2009) Electrochemical interaction of *Shewanella oneidensis* MR-1 and its outer membrane cytochromes OmcA and MtrC with hematite electrodes. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **73**, 5292-5307.
44. Okamoto, A., Nakamura, R., and Hashimoto, K. (2011) In-vivo identification of direct electron transfer from *Shewanella oneidensis* MR-1 to electrodes via outer-membrane OmcA-MtrCAB protein complexes. *Electrochimica Acta* **56**, 5526-5531.
45. Carmona-Martinez, A.A., Harnisch, F., Fitzgerald, L.A., Biffinger, J.C., Ringeisen, B.R., and Schroeder, U. (2011) Cyclic voltammetric analysis of the electron transfer of *Shewanella oneidensis* MR-1 and nanofilament and cytochrome knock-out mutants. *Bioelectrochemistry* **81**, 74-80.
46. Reardon, C.L., Dohnalkova, A.C., Nachimuthu, P., Kennedy, D.W., Saffarini, D.A., Arey, B.W., Shi, L., Wang, Z., Moore, D., McLean, J.S., Moyles, D., Marshall, M.J., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K., and Beliaev, A.S. (2010) Role of outer-membrane cytochromes MtrC and OmcA in the biomineralization of ferrihydrite by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Geobiology* **8**, 56-68.
47. Wigginton, N.S., Rosso, K.M., Lower, B.H., Shi, L., and Hochella, M.F., Jr. (2007) Electron tunneling properties of outer-membrane decaheme cytochromes from *Shewanella oneidensis*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **71**, 543-555.
48. Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., Culley, D.E., Reed, S.B., Romine, M.F., Saffarini, D.A., Hill, E.A., Shi, L., Elias, D.A., Kennedy, D.W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealson, K.H., and Fredrickson, J.K. (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11358-11363.
49. Kotloski, N.J., and Gralnick, J.A. (2013) Flavin Electron Shuttles Dominate Extracellular Electron Transfer by *Shewanella oneidensis*. *Mbio* **4**.
50. **Fritz-Feuugas, F., Cornet, A., and Tribollet, B.** (2008) Biodétérioration des matériaux : Action des micro-organismes, de l'échelle nanométrique à l'échelle macroscopique. Ellipses.

51. Souto, R.M., Izquierdo, J., Santana, J.J., and Gonzalez, S. (2013) SCANNING MICROELECTROCHEMICAL TECHNIQUES A HIGHLY SENSITIVE ROUTE TO EVALUATE DEGRADATION REACTIONS AND PROTECTION METHODS WITH CHEMICAL SELECTIVITY. *European Journal of Science and Theology* **9**, 71-89.
52. Trinh, D., Keddam, M., Novoa, X.R., and Vivier, V. (2011) Alternating-Current Measurements in Scanning Electrochemical Microscopy, Part 1: Principle and Theory. *Chemphyschem* **12**, 2169-2176.
53. Trinh, D., Keddam, M., Novoa, X.R., and Vivier, V. (2011) Alternating Current Measurements in Scanning Electrochemical Microscopy, Part 2: Detection of Adsorbates. *Chemphyschem* **12**, 2177-2183.
54. Tribollet, B., and E. Orazem, M. (2008) *Electrochemical Impedance Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc.
55. Barsoukov, EvgenijMacdonald, and Ross, J. (2005) *Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
56. Macdonald, D.D. (2006) Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta* **51**, 1376-1388.
57. Gabrielli, C. (1995) *Electrochemical Impedance Spectroscopy: Principles Instrumentation, and Applications*.
58. Brug, G.J., Vandeneeden, A.L.G., Sluytersrehabach, M., and Sluyters, J.H. (1984) THE ANALYSIS OF ELECTRODE IMPEDANCES COMPLICATED BY THE PRESENCE OF A CONSTANT PHASE ELEMENT. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **176**, 275-295.
59. Huang, V.M., Wu, S.L., Orazem, M.E., Pebere, N., Tribollet, B., and Vivier, V. (2011) Local electrochemical impedance spectroscopy: A review and some recent developments. *Electrochimica Acta* **56**, 8048-8057.
60. Ferrari, J.V., De Melo, H.G., Keddam, M., Orazem, M.E., Pebere, N., Tribollet, B., and Vivier, V. (2012) Influence of normal and radial contributions of local current density on local electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta* **60**, 244-252.
61. Frateur, I., Huang, V.M.W., Orazem, M.E., Pebere, N., Tribollet, B., and Vivier, V. (2008) Local electrochemical impedance spectroscopy: Considerations about the cell geometry. *Electrochimica Acta* **53**, 7386-7395.
62. Huang, V.M.-W., Vivier, V., Orazem, M.E., Pebere, N., and Tribollet, B. (2007) The apparent constant-phase-element behavior of an ideally polarized blocking electrode - A global and local impedance analysis. *Journal of the Electrochemical Society* **154**, C81-C88.
63. Libert, M., Schütz, M.K., Esnault, L., Féron, D., and Bildstein, O. (2013) Impact of microbial activity on the radioactive waste disposal: insights for the long term prediction of biocorrosion processes. *Bioelectrochemistry*.
64. Vinsot, A., Mettler, S., and Wechner, S. (2008) In situ characterization of the Callovo-Oxfordian pore water composition. *Physics and Chemistry of the Earth* **33**, S75-S86.
65. Gaucher, E.C., Blanc, P., Bardot, F., Braibant, G., Buschaert, S., Crouzet, C., Gautier, A., Girard, J.P., Jacquot, E., Lassin, A., Negrel, G., Tournassat, C., Vinsot, A., and Altmann, S. (2006) Modelling the porewater chemistry of the Callovian-Oxfordian formation at a regional scale. *Comptes Rendus Geoscience* **338**, 917-930.
66. Tran, A.T., Huet, F., Ngo, K., and Rousseau, P. (2011) Artefacts in electrochemical impedance measurement in electrolytic solutions due to the reference electrode. *Electrochimica Acta* **56**, 8034-8039.

67. Moreira, R., Schutz, M.K., Libert, M., Tribollet, B., and Vivier, V. (2013) Influence of hydrogen-oxidizing bacteria on the corrosion of low carbon steel: Local electrochemical investigations. *Bioelectrochemistry*.
68. SCHÜTZ, M.K., MOREIRA, R., BILDSTEIN, O., LARTIGUE, J.-E., SCHLEGEL, M.L., TRIBOLLET, B., VIVIER, V., and LIBERT, M. (2013) **Combined geochemical and electrochemical methodology to quantify corrosion of carbon steel by bacterial activity**. Accepted for publication on the *Bioelectrochemistry* journal (doi: 10.1016/j.bioelechem.2013.07.003).
69. Borch, T., Masue, Y., Kukkadapu, R.K., and Fendorf, S. (2007) Phosphate imposed limitations on biological reduction and alteration of ferrihydrite. *Environmental Science & Technology* **41**, 166-172.
70. Zegeye, A., Mustin, C., and Jorand, F. (2010) Bacterial and iron oxide aggregates mediate secondary iron mineral formation: green rust versus magnetite. *Geobiology* **8**, 209-222.

Annexe I



Contents lists available at ScienceDirect

Bioelectrochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioelechem

Combined geochemical and electrochemical methodology to quantify corrosion of carbon steel by bacterial activity

Marta K. Schütz^{a,d,*}, Rebeca Moreira^c, Olivier Bildstein^a, Jean-Eric Lartigue^a, Michel L. Schlegel^b, Bernard Tribollet^c, Vincent Vivier^c, Marie Libert^a

^a CEA, DEN, DTN/SMTM/LMTE, 13108 Saint Paul lez Durance, France

^b CEA, DEN, DANS/DPC/SCP/LRSI, F91191 Gif-sur-Yvette, France

^c UPR 15 du CNRS, Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, Université Pierre et Marie Curie, T22, 4 Place Jussieu, 75252 Cedex 05 Paris, France

^d Aix-Marseille Université, Sciences de l'Environnement, 13545 Aix en Provence, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2012

Received in revised form 1 June 2013

Accepted 28 July 2013

Available online xxxx

Keywords:

Biocorrosion

Iron-reducing bacteria

Dihydrogen

SEM micrographs

Raman microspectroscopy

Chronoamperometry

ABSTRACT

The availability of respiratory substrates, such as H₂ and Fe(II,III) solid corrosion products within nuclear waste repository, will sustain the activities of hydrogen-oxidizing bacteria (HOB) and iron-reducing bacteria (IRB). This may have a direct effect on the rate of carbon steel corrosion. This study investigates the effects of *Shewanella oneidensis* (an HOB and IRB model organism) on the corrosion rate by looking at carbon steel dissolution in the presence of H₂ as the sole electron donor. Bacterial effect is evaluated by means of geochemical and electrochemical techniques. Both showed that the corrosion rate is enhanced by a factor of 2–3 in the presence of bacteria. The geochemical experiments indicated that the composition and crystallinity of the solid corrosion products (magnetite and vivianite) are modified by bacteria. Moreover, the electrochemical experiments evidenced that the bacterial activity can be stimulated when H₂ is generated in a small confinement volume. In this case, a higher corrosion rate and mineralization (vivianite) on the carbon steel surface were observed. The results suggest that the mechanism likely to influence the corrosion rate is the bioreduction of Fe(III) from magnetite coupled to the H₂ oxidation.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Disposal of high-level nuclear waste (HLW) in deep geological repositories is increasingly considered as a reliable solution in many countries. In France, for example, the current option explored is to store the vitrified HLW in stainless steel containers, conditioned in carbon steel overpacks which are then emplaced in a deep underground repository (about 500 m deep) in an argillaceous formation (claystone). This is known as a multi-barrier system, designed to ensure long-term radionuclide confinement. One of the purposes of the multi-barrier system is to prevent water circulation around the metallic packages, thus preventing corrosion in water-saturated conditions.

However, knowledge about steel corrosion processes, especially over a long time period, must still be expanded to ensure that geological disposals will remain safe over a period of several hundred thousand years. The main issues related to steel corrosion are the influences of physico-chemical conditions (e.g. water saturation, pressure, temperature, pH, redox potential), and consequently microbial activity on the durability of the different metallic packages.

Several studies reveal the presence of microorganisms in most of the deep clay formations already investigated, such as the Callovo-Oxfordian argillite and Opalinus clay [1,2]. Therefore, an impact of the microbial activity can be expected with respect to the various phenomena that may occur within the repository, such as (i) radionuclide migration through clay formations (including effects of biofilms); (ii) build-up of the gas phase by microbial gas production; and (iii) Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) or biocorrosion [3,4] which is discussed in this study.

Energetic substrates and nutrients are available to support microbial activity under geological conditions. Nutrients may be present either as soluble species in the groundwater or in minerals (solid-associated forms). Among the energetic substrates, H₂ is expected to be one of the most efficient substrates (acting as an electron donor) [5]. It can be produced by radiolytic dissociation of water or by anoxic aqueous metallic corrosion [6,7]. Moreover, Fe(III) from clay minerals [8,9] and corrosion products, such as magnetite (Fe₃O₄) [10–14], could be a significant electron acceptor for anaerobic microbial respiration (by dissimilatory processes). The availability of such substrates may sustain the development of hydrogen-oxidizing bacteria (HOB) and iron-reducing bacteria (IRB), which in turn could have an impact on geochemical and corrosion processes in deep geological environments.

Several studies have dealt with the impact of sulfate-reducing bacteria (SRB) [15–18] on corrosion processes. In contrast, the impact of the

* Corresponding author at: CEA, DEN, DTN/SMTM/LMTE, 13108 Saint Paul lez Durance, France. Tel.: +33 4 42254942; fax: +33 4 42256272.

E-mail address: martakerber@gmail.com (M.K. Schütz).

IRB species have been only marginally investigated. Their role in biocorrosion is still under debate; either an inducing or an inhibitory effect by formation of a protective biofilm on metal surface has been hypothesized [19–21]. Recent studies have investigated the impact of IRB species on metallic corrosion processes under geological disposal conditions [22–24]. The IRB can use Fe(III) from magnetite or other Fe(III) (hydr)oxides as electron acceptor in the presence of H₂ as electron donor. An alteration of the (hydr)oxide layers with a possible reactivation of the corrosion process may thus occur as a consequence of the Fe(III) bacterial respiration [22].

This study investigates the effect of the HOB and IRB activities on the corrosion rate of carbon steel in the presence of H₂ as the sole electron donor. These investigations are supported by geochemical and electrochemical techniques. Geochemical analysis allows the monitoring of the metal dissolution and the formation of Fe(II,III) solid corrosion products during the bacterial oxidation of H₂ produced by corrosion. Local electrochemical techniques allow to generate a high H₂ concentration for bacterial metabolism and then to probe the bacterial reaction in terms of modification of the local potential.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial culture

The *Shewanella oneidensis* strain MR-1 (ATCC 700550™) was chosen as a model of IRB and HOB. Cultures were obtained aerobically at the beginning of the stationary growth phase in a Luria Bertani Broth (LB) medium (5 g L⁻¹ NaCl, 10 g L⁻¹ tryptone, 5 g L⁻¹ yeast extract) after 24 h at 30 °C under sterile conditions. Bacterial cells were harvested from the LB medium by centrifugation (4000 rpm for 20 min), washed once with sterile minimal medium (M1) and then inoculated in the batch reactors (initial concentration 10⁸ cells mL⁻¹ counted by epifluorescence method with LIVE/DEAD® BacLight™ kit). The chemically defined minimal medium (M1) was prepared according to Kostka and Nealson (1998) [25]. However, minor modifications were made to the composition [22] in order to obtain a representative solution of the groundwater found in the argillaceous formations for geological disposal in France. The final composition is shown in Table 1.

Table 1
M1 minimal medium composition.

Compound	Concentration
(NH ₄) ₂ SO ₄	9 mM
Na ₂ SeO ₄	11 μM
HEPES	17 mM
NaHCO ₃	2 mM
K ₂ HPO ₄ ^a	0.5 mM
KH ₂ PO ₄ ^a	0.3 mM
CoSO ₄ ·7H ₂ O ^b	5 μM
NiSO ₄ ·6H ₂ O ^b	5 μM
NaCl ^b	10 μM
H ₃ BO ₃ ^c	45 μM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O ^c	0.8 μM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O ^c	3 μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O ^c	0.2 μM
MnSO ₄ ·H ₂ O ^c	1 μM
MgSO ₄ ·7H ₂ O ^c	0.8 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O ^c	0.4 mM
FeSO ₄ ·7H ₂ O ^c	4 μM
Arginine ^d	0.11 mM
Glutamate ^d	0.13 mM
Serine ^d	0.19 mM
Nicotinic acid ^e	0.08 mM
Thiamine-HCl ^e	0.01 mM
Biotine ^e	0.40 μM

^a Phosphate buffer solution.

^b Metals supplement solution.

^c Basal salts solution.

^d Amino acid solution.

^e Vitamins solution.

The pH was adjusted to ca. 7 with NaOH and then the medium was sterilized by autoclaving (120 °C for 20 min), except for the thermolabile components (e.g. amino acids) which were filter-sterilized (0.22 μm) and added to the autoclaved medium.

2.2. Carbon steel coupons

Corrosion studies were performed with low carbon steel coupons A37 supplied by the French Alternative Energies and Atomic Energy Commission (CEA). They contain 0.12% C, 0.22% Si, 0.62% Mn, 0.008% Al, 0.012% S, 0.012% P, 0.02% Ni, 0.03% Cr, 0.04% Cu, 0.005% Co and <0.005% Ti. Carbon steel is a corrosion-allowance material which is expected to have nearly-uniform corrosion in a reducing environment, and has been therefore considered as a candidate material for packages used in the geological disposal.

The cylindrical coupons were laterally insulated from the solution by a diallyl phthalate glass-fiber resin (Presi) in order to expose only an active surface of 0.8 cm². Then, the coupons were polished with 600 grit SiC abrasive paper and sterilized with ethanol by sonication for 15 min prior to the experiments.

2.3. Batch experiments

All experiments started under strictly sterile conditions in batch reactors at 30 °C under an anaerobic atmosphere. Both abiotic and biotic conditions were investigated.

2.3.1. Geochemical techniques

The geochemical experiments were performed in triplicate in 140 mL of M1 medium under an N₂/CO₂ (90:10%) atmosphere. The corrosion reaction was monitored as a function of time by gas and solution analyses. The aqueous Fe concentration was analyzed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES, Varian, VISTA-MPX) after 0.02 μm filtration and 2% (v/v) HNO₃ acidification. The analysis of H₂ in the headspace was carried out by Micro Gas Chromatography (Varian, CP-4900) using a thermal conductivity detector with N₂ as carrier gas. The total H₂ concentration was calculated as the sum of the concentrations in the gas and the aqueous phases (determined using Henry's law).

2.3.2. Electrochemical techniques

The electrochemical measurements were performed with a home-made Scanning Electrochemical Microscope (SECM) [26,27] in a 4-electrode cell configuration elaborated specifically for anaerobic and sterile conditions. The double wall glass cell was equipped with the carbon steel working electrode (WE1) placed in the bottom of the cell, and with a platinum probe of 50 μm in radius acting as a second mobile working electrode (WE2) for generating H₂. The cell was sealed with a Teflon cover and the platinum WE2 probe was placed through a nitrile flexible support on the cover, perpendicular to WE1, in a way to allow its displacement for the measurements. The WE2 microelectrode was positioned with the help of motorized stages driven by a motion controller (Newport) with Labview software. Both working electrodes used as reference a saturated calomel electrode (SCE) and a platinum grid as counter electrode.

The disassembled cell and the platinum WE2 probe were sterilized prior to the experiments with 70% ethanol solution for 20 min; then rinsed with sterilized water in a laminar flow chamber and finally UV-irradiated for 15 min. The lugging capillary (for holding the reference electrode) and the platinum grid counter electrode were sterilized in autoclave. The cell was assembled under sterile conditions and 230 mL of M1 medium was introduced and deaerated for 2 h under an N₂ atmosphere. The N₂ flow was maintained at the cell headspace (near to the liquid surface) so as to ensure the anaerobic conditions during the whole electrochemical measurements. A supplementary N₂

bubbling of the bulk solution was also carried out during inoculation of the electrochemical cell.

An approach curve was performed at a rate of $7.5 \mu\text{m s}^{-1}$ with the probe polarized at -0.9 V/SCE and the substrate held at Open Circuit Potential (OCP). Such approach curve allowed the contact point between the steel substrate and the apex of the probe to be determined with a spatial resolution better than a fraction of micrometer. Then, the microelectrode was repositioned at $50 \mu\text{m}$ from the substrate and polarized for generating locally H_2 (Scheme 1). The use of SECM for generation or collection of H_2 in solution has already been described in the literature [28,29].

2.4. Characterization of the coupon surface

Steel coupon surfaces in the geochemical experiments were analyzed, after 5 months of reaction, by Raman microspectroscopy and Scanning Electron Microscopy (SEM). The coupon surfaces of the electrochemical experiments were analyzed only by SEM. The samples for the Raman analysis were kept in anoxic conditions in small confining boxes and the measurements were performed through a glass window ($500 \mu\text{m}$ thick) using a LabRam HR800 (Horiba Jobin Yvon) spectrometer equipped with a Nd-YAG laser at 532 nm and a $50\times$ long range objective lens. The laser power was 50 mW attenuated by a factor of 100. The acquisition time ranged from 60 to 600 s depending on the spectral quality. The Raman spectra are presented in this study without smoothing or line fitting. The spectra analysis was performed by comparing the significant bands with literature data [30–34]. SEM studies were performed at 20 keV and 5.3 nA with a Leica Stereoscan 440 microscope coupled with Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) for elemental semi-quantitative analyses (Princeton Gamma-Tech). The samples were slightly rinsed with deionised water, dried with N_2 gas and stored in plastic containers until analysis. The coupons were carbon coated prior to the SEM analysis.

3. Results and discussion

3.1. Geochemical results

Under anaerobic conditions, carbon steel corrosion (simplified as Fe in the Eqs. (1) & (3)) is described by iron oxidation as the anodic

reaction (Eq. (1)) and water reduction as the cathodic reaction (Eq. (2)):



According to the overall reaction (Eq. (3)), the molecular stoichiometry of $\text{Fe}:\text{H}_2$ produced by corrosion is 1:1:



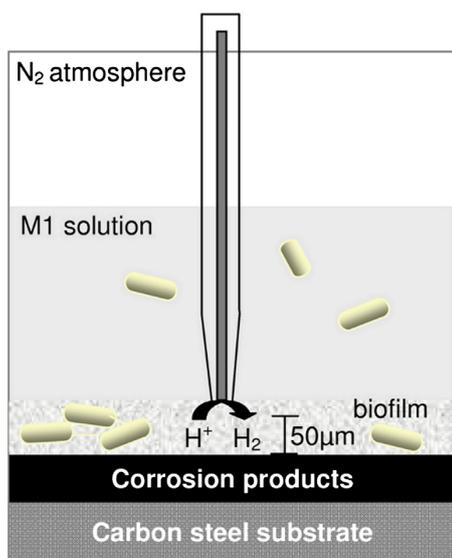
Fig. 1 shows the evolution of Fe and H_2 produced by carbon steel corrosion.

In abiotic conditions, equimolar H_2 and dissolved Fe are released, which is in good agreement with the stoichiometry of Eq. (3). Effective biocorrosion was evidenced by the larger amounts of Fe and H_2 produced at about 5 days compared to abiotic conditions. Moreover, in the presence of bacteria, H_2 concentration remains much lower when compared to dissolved Fe concentration. Such evidence suggests that bacteria consume the soluble H_2 in the aqueous phase for respiration. Several studies have indeed shown that H_2 is an important energetic substrate, especially in disposal environments where only low amounts of biodegradable organic matter are available [5,7,35].

The pH in the bulk solution was initially equal to 6.47 and only a slight increase was observed at the end of the experiments for both abiotic and biotic conditions, with values of 6.54 and 6.62, respectively (data not shown).

A black layer and a white precipitate (over the black layer) were progressively formed on the coupon surface in both abiotic and biotic conditions, suggesting a reaction between the surface and species in solution which also resulted in a decrease in the aqueous Fe concentration after 20 days of reaction (results not shown in Fig. 1). The Raman analysis for the solid corrosion products formed in abiotic conditions (Fig. 2a) revealed the presence of vivianite ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) (i & iii) and magnetite (ii) as the most abundant mineral phases. In contrast, for the biotic conditions (Fig. 2b), the intensity of vivianite bands is greater (i & iii); the intensity of magnetite band significantly decreases (ii); and relatively intense bands appear in the region 1440 cm^{-1} (iv), which may indicate cellular compounds (e.g. lipids, enzymes like hydrogenase) on the coupon surface. The magnetite band is broad, suggesting formation of a mineral phase with poor crystallinity.

The SEM analysis also revealed vivianite as a corrosion product for both abiotic (Fig. 3a & b) and biotic (Fig. 3e & f) conditions. A modification in the morphology of this mineral was observed in the presence of bacteria. Moreover, in biotic conditions the black layer morphology and chemical composition are modified (Fig. 3g & h), compared to those in



Scheme 1. Sketch of the experimental setup for the local H_2 generation by the platinum probe in a close vicinity of the carbon steel substrate.

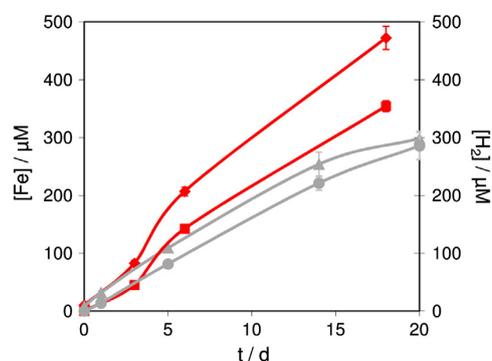


Fig. 1. Production of Fe and H_2 by carbon steel corrosion during the geochemical experiments ($n = 3$): Fe (◆,▲) and H_2 (■,●) concentrations (μM) as function of time (days). Biotic conditions (◆,■) and abiotic conditions (▲,●).

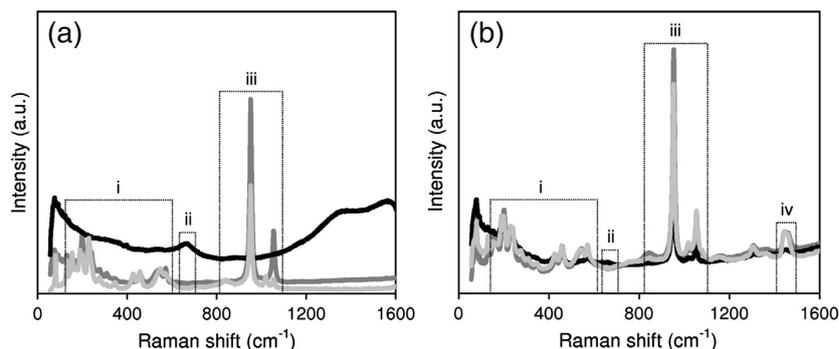


Fig. 2. Raman spectra of corrosion products detected on steel coupons reacted during 5 months in the geochemical experiments. (a) Abiotic conditions: vivianite (i) and (iii); magnetite (ii). (b) Biotic conditions: vivianite (i) and (iii); magnetite (ii); and cellular compounds (iv). Each spectrum in the figures is representative of the signal collected on the sample surface.

abiotic conditions (Fig. 3c & d). Both Raman and SEM analyses point out a modification of the composition and crystallinity of corrosion products by the bacterial activity.

The literature proposes different mechanisms of bacterial-induced corrosion. Widdel's group have hypothesized that, in the case of SRB and methanogenic species, corrosion is enhanced by direct electron transfer from metal to bacterial cells [18,36]. In contrast, we can assume that, in the case of IRB species, dissimilatory reduction of Fe(III) promotes the solubilization and removal of (hydr)oxide layers, exposing carbon steel surfaces to corrosion [21,22]. To date, direct contact, nano-wires and electron shuttling have been proposed as strategies for dissimilatory Fe(III) reduction from insoluble substrates [37]. Our results corroborate these findings, showing that *S. oneidensis* can reduce Fe(III) from magnetite using soluble H_2 produced during the corrosion process as an electron donor.

3.2. Electrochemical results

Fig. 4 shows the OCP variation of the carbon steel electrode in the M1 solution. Such measurement indicates the variation of the difference of potential between the carbon steel working electrode and the reference electrodes at the equilibrium state over time. The OCP remains stable at -714 mV/SCE during the first 16 h of the experiment. Then, the supplementary N_2 bubbling of the solution for 1 h is accompanied by a small decrease of the potential (about 23 mV). The OCP is slightly perturbed upon addition of the *S. oneidensis* inoculum, but then it slightly decreases and stabilizes at ca. -718 mV/SCE after a few hours.

After mapping experiments (data not shown), in which the platinum probe was polarized to generate H_2 , we noticed a formation of solid phases over the entire surface of the steel substrate (Fig. 5a). SEM micrograph of the substrate at the position where the H_2 was locally generated (target area in Fig. 5a) is shown in Fig. 5b. A more important mineralization was observed on this specific area, in the vicinity of the probe, where H_2 was kept in a confinement volume (ca. 3.9×10^{-8} cm³). This observation suggests an influence of the corrosion increase in this localized area. Changes in the local pH, redox potential, or even the enhancement of the bacterial activity due to a greater availability of energetic substrate (H_2) can be considered as potential factors for the mineralization effect. The EDS analysis of a single crystal (Fig. 5d & c, respectively) shows the formation of iron phosphate as vivianite.

During the corrosion process two phenomena take place simultaneously – the anodic reaction (Eq. (1)) and the cathodic reaction (Eq. (2)). At the equilibrium (OCP), the net current in the substrate is zero. When the potential of the steel electrode is set to a value greater than the OCP, the anodic dissolution of the substrate is favored. We thus biased the substrate state in order to control the kinetics

of dissolution and we locally generated H_2 through the probe brought to the vicinity of the substrate. The distance between the steel substrate and the probe was set at $50 \mu\text{m}$ by performing a preliminary approach curve [38]. With such a device (sketched in Scheme 1), it was possible to reproduce and to control the different processes that usually take place simultaneously on the steel electrode.

The steel dissolution was monitored over 5 days for different corrosion conditions by measuring the total current of the electrode in order to reveal the influence of the local H_2 concentration (Fig. 6). The corrosion rate was shown to depend on the presence of both bacteria and the H_2 that was generated. When the potential of the steel electrode is biased at OCP, in the abiotic conditions and without H_2 generation (Fig. 6, curve a), the current remains in the range of $0.5 \mu\text{A cm}^{-2}$. In contrast, when H_2 is generated, the current of the steel electrode increases to about $1 \mu\text{A cm}^{-2}$ and remains in a quasi steady-state regime (Fig. 6, curve b). The positive feedback regime that takes place between the probe and the substrate explains this behavior [38]. In biotic conditions, a steady increase of the current is observed during 5 days (Fig. 6, curve c).

The integration of the anodic current of each experiment provides the exchanged charge during the corrosion process (Table 2). These results clearly indicate that in biotic conditions and with local H_2 generation, the corrosion magnitude is significantly increased due to an increase of the bacterial activity (the more dihydrogen is produced, the more the consumption of iron by the bacteria). It is noteworthy that these experiments do not allow the measurements of the H_2 produced by the corrosion process, only the H_2 generated by the probe.

Again, the carbon steel surface exhibited a mineralization as iron phosphate. It should also be mentioned that longer experiments (more than 5 days) are usually difficult to perform in such experimental conditions, since the distance between the probe and the substrate is small ($50 \mu\text{m}$) so as to confine the H_2 generation. Hence, the biocorrosion can lead to accumulation of corrosion or biological products between the probe and the substrate. Bacterial adhesion on the carbon steel surface can also be observed after the experiments, as shown in Fig. 7, which is another indication of the bacterial action on the corrosion process.

3.3. Corrosion rate results

The corrosion rates were obtained from the results of the geochemical and electrochemical experiments. In the case of geochemical measurements, the corrosion rate was estimated from the aqueous Fe concentration (shown in Fig. 1), according to Eq. (3) and assuming no precipitation of corrosion products during the first 20 days of reaction. In contrast, in the case of electrochemical measurements, the charges for steel corrosion obtained for 5 days were converted considering the

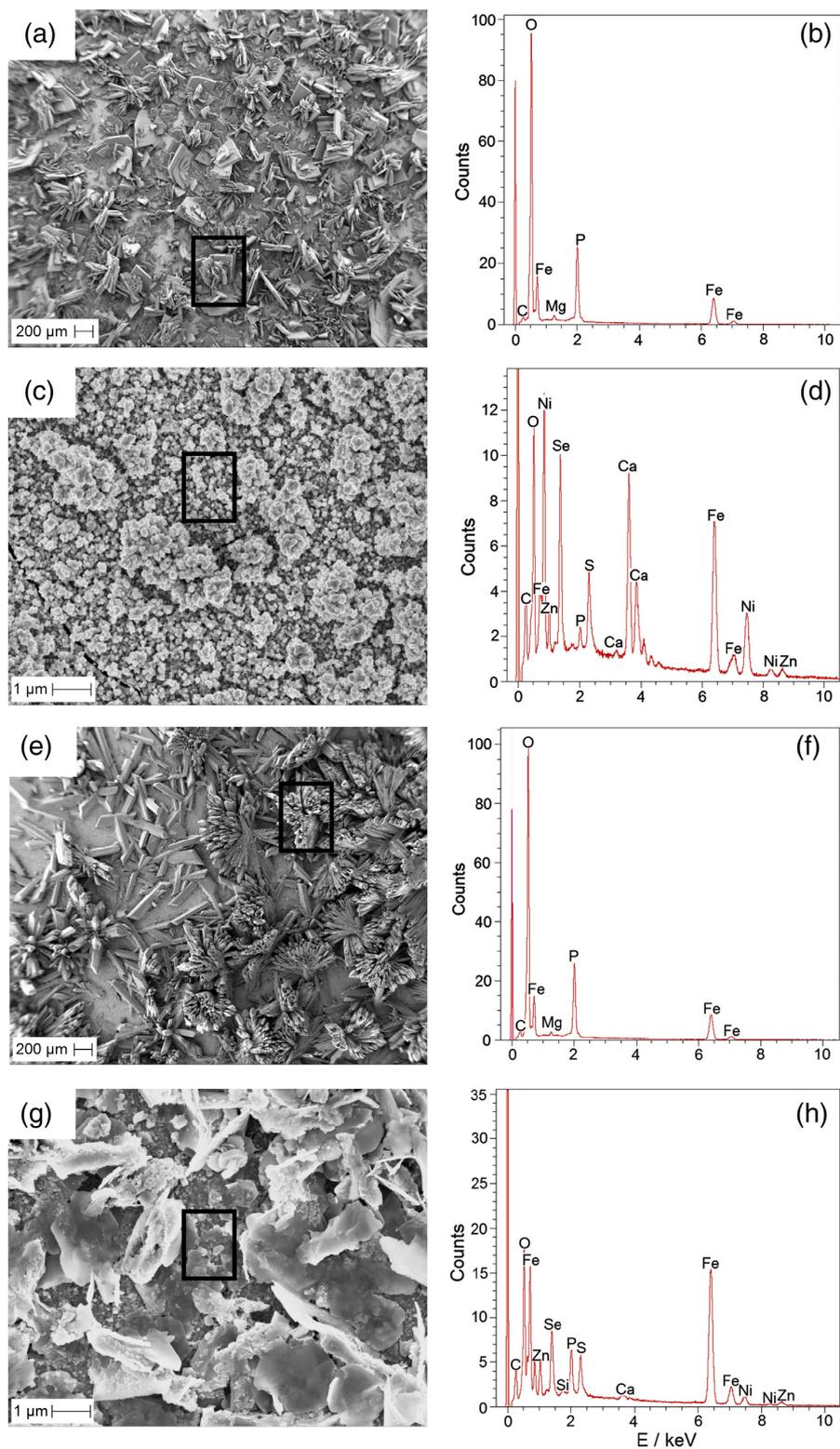


Fig. 3. SEM micrographs and EDS spectra of corrosion products formed by carbon steel corrosion after 5 months in the geochemical experiments. (a–d) Abiotic conditions: precipitate formed over the black layer (a, b) and black layer (c, d). (e–h) Biotic conditions: precipitate formed over the black layer (e, f) and black layer (g, h). The rectangle on SEM images corresponds to the areas analyzed by EDS.

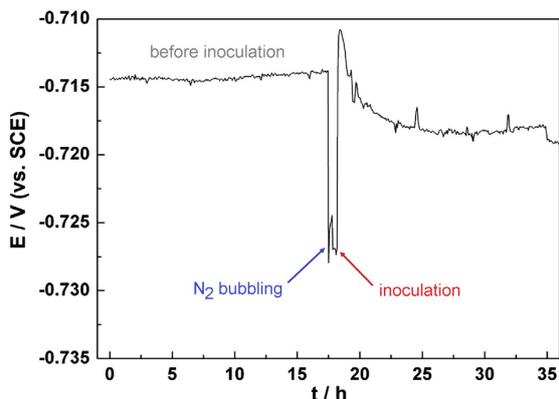


Fig. 4. Evolution of the OCP (V vs. SCE) as function of time (hours) of the carbon steel substrate before and after inoculation of *Shewanella oneidensis* during the electrochemical experiments.

general value for steel ($j = 86.3 \mu\text{A cm}^{-2}$ equals a corrosion rate of 1 mm year^{-1}) [39].

Fig. 8 and Table 2 show the corrosion rates obtained from the geochemical and electrochemical results, respectively. Fig. 8 shows that the short-term corrosion rate is higher than the long-term one for both abiotic and biotic conditions. The bacterial effect on the corrosion rate tends to decrease with time, suggesting a depletion of nutrients because of experimental conditions (batch reactors) leading to a limitation of bacterial development. Average rates are estimated at $100 \mu\text{m year}^{-1}$

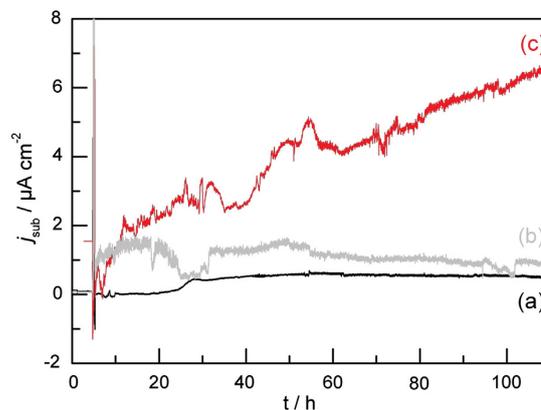


Fig. 6. Chronoamperometric response ($\mu\text{A cm}^{-2}$) as function of time (hours) of the carbon steel substrate in biotic conditions for electrochemical experiments. (a) No local H_2 generation by the probe. (b) Without *Shewanella oneidensis* under a local H_2 generation by the probe. (c) With both *Shewanella oneidensis* and local H_2 generation by the probe.

and $30 \mu\text{m year}^{-1}$ for biotic and abiotic conditions, respectively, after a period of about 20 days.

The corrosion rates obtained by the electrochemical results (Table 2) show values that are significantly smaller when compared to the geochemical results because of the choice of the potential applied for the measurements. At OCP, anodic and cathodic currents are contributing to the overall reaction and, in this case, the cathodic reaction (water reduction) is not taken into account and the anodic current (steel dissolution) value is therefore underestimated. Although the corrosion rate

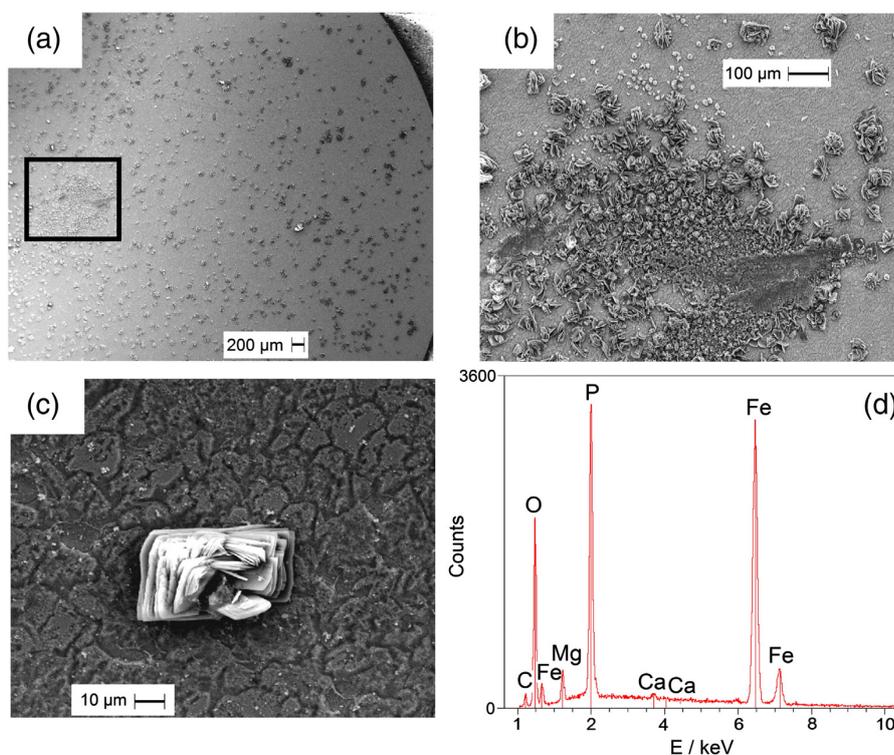


Fig. 5. SEM micrographs of carbon steel coupon reacted during 3 days in biotic conditions in the electrochemical experiments. (a) Global view of the coupon surface. (b) View of the center where the H_2 generating probe was placed. (c) View of a single crystal formed. (d) EDS spectrum of the crystal shown in Figure c.

Table 2

Determination of the exchanged charge (in millicoulomb) during the corrosion in different conditions (calculated from results presented in Fig. 6) with the respective corrosion rates.

Experiment	q (st corr) / (mC) ^a	q (H ₂ generation) / (mC) ^b	v (corr) / (μm/y) ^c
With bacteria without probe (Fig. 6a)	216 ± 11	–	7.3 ± 0.4
With probe without bacteria (Fig. 6b)	430 ± 22	100 ± 5	14.5 ± 0.7
With probe and bacteria (Fig. 6c)	1400 ± 70	100 ± 5	48.0 ± 2.4

^a Charge (steel corrosion).

^b Charge (H₂ generation).

^c Corrosion rate.

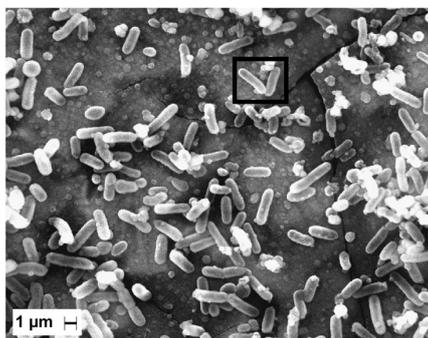


Fig. 7. SEM micrograph showing attachment of bacteria on the carbon steel surface after 10 days in the electrochemical experiments. The rectangle on SEM image indicates the cells of *Shewanella oneidensis*. No fixation treatment was performed for the analysis.

values obtained in the electrochemical and geochemical experiments cannot be directly compared, they demonstrate a clear influence of the bacterial activity. The corrosion rates are shown to be greater in biotic than abiotic conditions with both techniques.

4. Conclusions

Safe disposal of HLW is a key issue of waste management. The current disposal concept relies on a multi-barrier system which includes different metallic packages (stainless steel, carbon steel). Over time, production of H₂ and Fe(II,III) solid corrosion products is expected due to the anoxic aqueous corrosion. Such corrosion products can provide respiratory substrates for bacterial activities. Therefore, the influence of the biological parameter on corrosion has to be also evaluated in order to demonstrate the safety of the disposal system.

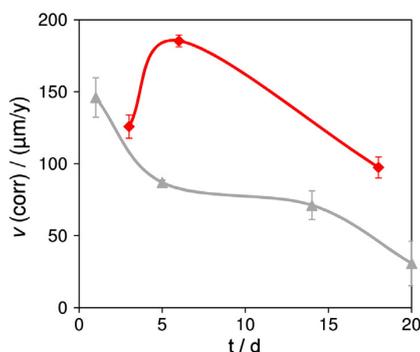


Fig. 8. Corrosion rate (μm year⁻¹) as function of time (days) measured at the outset of the geochemical experiments (n = 3): biotic (◆); and abiotic (▲) conditions.

This study demonstrates that the corrosion process is enhanced by a factor of 2–3 in presence of bacteria. The geochemical results showed that after 5 days a greater amount of Fe and H₂ is produced during corrosion in comparison with abiotic conditions. Moreover, the consumption of the soluble H₂ in the aqueous phase by bacteria is evidenced as well as a modification in the composition and crystallinity of the solid corrosion products (magnetite and vivianite) on the carbon steel surface. Still, the electrochemical results showed a higher mineralization (vivianite) and corrosion rate in the presence of bacteria when H₂ is generated in a small confinement volume (ca. 3.9 × 10⁻⁸ cm³). So, our results suggest that *S. oneidensis* likely induces corrosion by reduction of Fe(III) from magnetite using soluble H₂ produced by the corrosion process as electron donor.

However, it remains to be determined if the bacterial activity will have a similar long-term effect on the corrosion rate under disposal conditions. A modeling approach, including calibrated parameters according to the results of the short-term experiments, could be used to extrapolate the corrosion kinetics and predict biocorrosion processes on a long-term scale.

Acknowledgments

The authors thank Damien Féron (CEA Saclay, France) for the carbon steel samples, Paul Soreau (IBEB, CEA Cadarache, France) for the ICP-OES analysis and Françoise Pillier (LISE, UPR15, France) for the SEM analysis. This research has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement n° 238579 by the BIOCOR ITN project (website: www.biocor.eu/).

References

- [1] S. Stroes-Gascoyne, C.J. Hamon, D.A. Dixon, J.B. Martino, Microbial analysis of samples from the tunnel sealing experiment at AECL's Underground Research Laboratory, Phys. Chem. Earth. 32 (2007) 219–231.
- [2] S. Poulain, C. Sergeant, M. Simonoff, C. Le Marrec, S. Altmann, Microbial investigation of Opalinus clay, an argillaceous formation under evaluation as a potential host rock for a radioactive waste repository, Geomicrobiol. J. 25 (2008) 240–249.
- [3] M.J. Keith-Roach, F.R. Livens, Microbial interactions with radionuclides – summary and future perspectives, Interactions of Microorganisms with Radionuclides, Elsevier, 2002, pp. 383–391.
- [4] S. Stroes-Gascoyne, J.M. West, An overview of microbial research related to high-level nuclear waste disposal with emphasis on the Canadian concept for the disposal of nuclear fuel waste, Can. J. Microbiol. 42 (1996) 349–366.
- [5] L.H. Lin, G.F. Slater, B.S. Lollar, G. Lacrampe-Couloume, T.C. Onstott, The yield and isotopic composition of radiolytic H₂, a potential energy source for the deep subsurface biosphere, Geochim. Cosmochim. Acta 69 (2005) 893–903.
- [6] G. Galès, M.F. Libert, R. Sellier, L. Coumac, V. Chapon, T. Heulin, Molecular hydrogen from water radiolysis as an energy source for bacterial growth in a basin containing irradiating waste, FEMS Microbiol. Lett. 240 (2004) 155–162.
- [7] M. Libert, O. Bildstein, L. Esnault, R. Sellier, Molecular hydrogen: an abundant energy source for bacterial activity in nuclear waste repositories, Phys. Chem. Earth. 36 (2011) 1616–1623.
- [8] J.E. Kostka, J.W. Stucki, K.H. Nealson, J. Wu, Reduction of structural Fe(III) in smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* strain MR-1, Clays Clay Miner. 44 (1996) 522–529.
- [9] J.E. Kostka, J. Wu, K.H. Nealson, J.W. Stucki, The impact of structural Fe(III) reduction by bacteria on the surface chemistry of smectite clay minerals, Geochim. Cosmochim. Acta 63 (1999) 3705–3713.
- [10] J.E. Kostka, K.H. Nealson, Dissolution and reduction of magnetite by bacteria, Environ. Sci. Technol. 29 (1995) 2535–2540.
- [11] M.K. Schütz, M. Libert, M.L. Schlegel, J.E. Lartigue, O. Bildstein, Dissimilatory iron reduction in presence of hydrogen: a case of microbial activity in the nuclear waste disposal, Procedia Earth Planet. Sci. 7 (2013) 409–412.
- [12] O. Bildstein, L. Trotignon, M. Perronnet, M. Jullien, Modelling iron-clay interactions in deep geological disposal conditions, Phys. Chem. Earth. 31 (2006) 618–625.
- [13] F.A. Martin, C. Bataillon, M.L. Schlegel, Corrosion of iron and low alloyed steel within a water saturated brick of clay under anaerobic deep geological disposal conditions: an integrated experiment, J. Nucl. Mater. 379 (2008) 80–90.
- [14] M.L. Schlegel, C. Bataillon, K. Benhamida, C. Blanc, D. Menut, J.-L. Lacour, Metal corrosion and argillite transformation at the water-saturated, high temperature iron-clay interface: a microscopic-scale study, Appl. Geochem. 23 (2008) 2619–2633.
- [15] V.L. Rainha, L.T.E. Fonseca, Kinetic studies on the SRB influenced corrosion of steel: a first approach, Corros. Sci. 39 (1997) 807–813.
- [16] D. Féron, I. Dupont, G. Novel, Influence of microorganisms on the free corrosion potential of stainless steels in natural seawaters, in: D. Thierry (Ed.), Aspects of Microbiologically Induced Corrosion, The Institute of Material, London, 1997, pp. 103–139.

- [17] I.B. Beech, Sulfate-reducing bacteria in biofilms on metallic materials and corrosion, *Microb. Today* 30 (2003) 115–117.
- [18] H. Venzlaff, D. Enning, J. Srinivasan, K.J.J. Mayrhofer, A.W. Hassel, F. Widdel, M. Stratmann, Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria, *Corros. Sci.* 66 (2013) 88–96.
- [19] M. Dubiel, C.H. Hsu, C.C. Chien, F. Mansfeld, D.K. Newman, Microbial iron respiration can protect steel from corrosion, *Appl. Environ. Microb.* 68 (2002) 1440–1445.
- [20] K. Lee, D.K. Newman, Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (2003) 134–139.
- [21] L.K. Herrera, H.A. Videla, Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63 (2009) 891–895.
- [22] L. Esnault, M. Jullien, C. Mustin, O. Bildstein, M. Libert, Metallic corrosion processes reactivation sustained by iron-reducing bacteria: implication on long-term stability of protective layers, *Phys. Chem. Earth.* 36 (2011) 1624–1629.
- [23] M. Libert, L. Esnault, D. Féron, Biocorrosion en conditions de stockage géologique de déchets radioactifs, *Mater. Tech.* 99 (2011) 581–589.
- [24] R. Moreira, M.K. Schütz, M. Libert, B. Tribollet, V. Vivier, Local Electrochemical Measurements Applied to Biocorrosion, *Bioelectrochem.* 2013. (this issue).
- [25] J.E. Kostka, K.H. Nealson, Isolation, cultivation, and characterization of iron- and manganese-reducing bacteria, *Techniques in Microbial Ecology*, Oxford University Press, New York, 1998, p. 468.
- [26] C. Gabrielli, S. Joiret, M. Keddad, H. Perrot, N. Portail, P. Rousseau, V. Vivier, A SECM assisted EQCM study of iron pitting, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 7706–7714.
- [27] M. Keddad, N. Portail, D. Trinh, V. Vivier, Progress in scanning electrochemical microscopy by coupling with electrochemical impedance and quartz crystal microbalance, *Chem. Phys. Chem.* 10 (2009) 3175–3182.
- [28] P.G. Nicholson, S. Zhou, G. Hinds, A.J. Wain, A. Turnbull, Electrochemical activity mapping of model fuel cell catalyst films using scanning electrochemical microscopy, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 4525–4533.
- [29] D. Trinh, M. Keddad, X.R. Novoa, V. Vivier, Alternating current measurements in scanning electrochemical microscopy, part 2: detection of adsorbates, *Chem. Phys. Chem.* 12 (2011) 2177–2183.
- [30] D.L.A. Faria, S.V. Silva, M.T. Oliveira, Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides, *J. Raman Spectrosc.* 28 (1997) 873–878.
- [31] M. Hanesch, Raman spectroscopy of iron oxides and (oxy)hydroxides at low laser power and possible applications in environmental magnetic studies, *Geophys. J. Int.* 177 (2009) 941–948.
- [32] L. Bellot-Gurlet, D. Neff, S. Réguer, J. Monnier, M. Saheb, P. Dillmann, Raman studies of corrosion layers formed on archaeological irons in various media, *J. Nano Res.* 8 (2009) 147–156.
- [33] R.L. Frost, W. Martens, P.A. Williams, J.T. Klopogge, Raman and infrared spectroscopic study of the vivianite-group phosphates vivianite, baricite and bobierrite, *Mineral. Mag.* 66 (2002) 1063–1073.
- [34] R.L. Frost, M.L. Weier, Raman spectroscopic study of vivianites of different origins, *Neues Jb. Mineral. Monat.* 10 (2004) 445–463.
- [35] F.H. Chapelle, K. O'Neill, P.M. Bradley, B.A. Methé, S.A. Ciuffo, L.L. Knobel, D.R. Lovley, A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens, *Nature* 415 (2002) 312–315.
- [36] H.T. Dinh, J. Kuever, M. Mußmann, A.W. Hassel, M. Stratmann, F. Widdel, Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms, *Nature* 427 (2004) 829–832.
- [37] Y.-S. Luu, J.A. Ramsay, Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe(III) as an energy source, *World J. Microb. Biotechnol.* 19 (2003) 215–225.
- [38] J. Kwak, A.J. Bard, Scanning electrochemical microscopy. Theory of the feedback mode, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1221–1227.
- [39] C. Lemaître, N. Pébère, D. Festy, *Biodétérioration des matériaux*, EDP Sciences, 1998.



Olivier Bildstein received his PhD in geochemistry (1998) from the University of Strasbourg. He is a senior research engineer at the French Commission for Atomic Energy and Alternative Energies (CEA) since 2000, after a postdoctoral stay at LLNL (California, USA). His previous affiliations include a doctoral fellowship at the French Institute for Petroleum (1994–1998) and a position as hydrogeologist at the French Geological Survey (BRGM) (1993). His research focuses on numerical modeling of reactive, multicomponent, and multiphase flow and transport with application to long term evolution of materials in radioactive waste disposal, subsurface pollution/remediation, and potential bacteria mediated processes.



Jean-Eric Lartigue received his PhD in experimental geochemistry (1994) from the University of Marseille (France). He is a research engineer at the French Commission for Atomic Energy and Alternative Energies (CEA) since 1998 after a postdoctoral fellowship at CEA (1995–1998). His research focuses on water rock-interactions with: a) experimental measurements of minerals and conditioning matrices for long live radionuclide dissolution kinetic rates law and b) reactive-transport modeling of materials' long term behavior in a radioactive waste disposal context.



Michel L. Schlegel was received at the Ecole Normale Supérieure de Lyon in 1992. He received his PhD degree at the University of Grenoble in 2000 and worked as a postdoctoral fellow at the University of Colorado at Boulder from 2000 to 2001. He is now a research engineer and a senior expert at the Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives. His research topics include metal corrosion and speciation of trace (radio)elements in complex environmental matrices (complexation, interaction with mineral surfaces).



Bernard Tribollet after his graduation from the "Ecole Supérieure d'Électricité" (1973), joined the laboratory of I. Epelboin (now LISE-CNRS UPR 15) where he prepared a PhD under his supervision. In 1981, with the support of a NSF fellowship, he spent one year as a visiting scientist at the University of California, Berkeley under the supervision of Prof. John Newman. His current research field concerns different problems: mass transport, electrodedissolution, corrosion and in particular biocorrosion. He co-authored, with Prof. Mark Orazem of the University of Florida, a textbook on impedance spectroscopy published in 2008 as part of the Electrochemical Society Series (Wiley).



Vincent Vivier was born in Saint-Maur (France) in 1971. He received his PhD in 2000 under the supervision of Dr. L.T. Yu in Thiais (France). In 2002, he joined the Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (CNRS-UPR 15). His current research field concerns the characterization of heterogeneous interface reactivity by means of local electrochemical techniques and electrochemical impedance spectroscopy.



Marta K. Schütz received a BS degree in Industrial Chemistry from the Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil in 2007; completed her MSc in Materials Science and Engineering in March 2010 at the same University. Now she is a PhD student at the French Commission for Atomic Energy and Alternative Energies (CEA). She is working on biocorrosion phenomena implicated on the radioactive waste geological disposal. The overall objective of her study is to better understand the impact of bacterial activities (notably IRB species) on the corrosion products (dihydrogen and iron (hydr)oxides) and on the rate of anoxic corrosion.



Rebeca Moreira has graduated in Food Engineering with a Master degree in Quality Control in Food and Drink Industries in Rio de Janeiro, Brazil. Started the PhD study in 2010 as a member of the BIOCOR Program at the Laboratory of Interfaces and Electrochemical Systems (University Pierre et Marie Curie), Paris, France. The subject of her work is the study of biocorrosion of carbon steel using local electrochemical techniques.



Marie Libert received her PhD in biochemistry (1986) from the University of Technology of Compiègne-France. She is a senior research engineer at the French Commission for Atomic Energy and Alternative Energies (CEA) since 1998. Her previous affiliation includes a doctoral fellowship at the same university. Her research focuses on different fields such as the effect of microorganisms on long term behavior of materials used in nuclear repository, biocorrosion, impact of radioactive emission on biota, and anaerobic microbiology. She was and she is a European expert on several international research programs.

Annexe II



Contents lists available at ScienceDirect

Bioelectrochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioelechem

Influence of hydrogen-oxidizing bacteria on the corrosion of low carbon steel: Local electrochemical investigations

Rebeca Moreira ^{a,b}, Marta K. Schütz ^c, Marie Libert ^c, Bernard Tribollet ^{a,b}, Vincent Vivier ^{a,b,*}

^a CNRS, UPR15, Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, F-75005 Paris, France

^b UPMC Univ Paris 06, UPR15, LISE, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France

^c CEA/DEN/DTN/SMTM/LMTE, 13108 Saint Paul lez Durance, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2012

Received in revised form 14 June 2013

Accepted 4 October 2013

Available online xxxx

Keywords:

Biocorrosion

Carbon steel

Hydrogen-oxidizing bacteria (HOB)

SECM

Local electrochemical impedance spectroscopy

ABSTRACT

Low carbon steel has been considered a suitable material for component of the multi-barrier system employed on the geological disposal of high-level radioactive waste (HLW). A non negligible amount of dihydrogen (H_2) is expected to be produced over the years within the geological repository due to the anoxic corrosion of metallic materials and also to the water radiolysis. The influence of the activity of hydrogen-oxidizing bacteria (HOB) and iron-reducing bacteria (IRB) on carbon steel corrosion is considered in this study because of the high availability of energetic nutrients (H_2 , iron oxides and hydroxides) produced in anoxic disposal conditions. Local electrochemical techniques were used for investigating the activity of IRB as a promoter of local corrosion in the presence of H_2 as electron donor. A local consumption of H_2 by the bacteria has been evidenced and impedance measurements indicate the formation of a thick layer of corrosion products.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The safe disposal of radioactive waste is a major concern for the nuclear energy industry. The high level radioactive waste (HLW) should be maintained for years in deep clay formations in order to prevent the migration of radionuclides. Thus, many different kinds of materials such as carbon steel, stainless steel, glass, concrete and clay are employed on the waste repository aiming to act as a multi-barrier system [1]. However, the anoxic corrosion of the metallic materials is expected due to the changes in the environmental conditions around the buried structures such as resaturation of the repository with time. In this context, corrosion products like iron oxides (i.e. magnetite, Fe_3O_4) or hydroxides, and dihydrogen (H_2) are also expected to be formed according to the following reactions (Eqs. (1)–(8)) [1]:

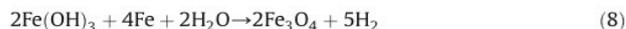
In aerobic condition



In anaerobic condition



Mineral transformation and phase transition



The production of dihydrogen poses two major problems. On the one hand, it represents a significant threat to the repository when accumulated for a long time in the surrounding clay because it may damage the barrier properties of the geological formation, affecting the safety of the repository. On the other hand, dihydrogen also represents a new energy source for microbial growth, especially in such anoxic environments with low content of biodegradable organic matter.

Several studies have already pointed out the possibility of micro-biological life in the deep geological disposal [2–5], and both biological activity and biofilm formation may influence the metallic corrosion rate. These phenomena are usually known as microbiologically influenced corrosion (MIC), which can represent a huge problem

* Corresponding author at: CNRS, UPR15, Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, F-75005 Paris, France. Tel.: +33 1 44274158; fax: +33 1 44274074.
E-mail address: vincent.vivier@upmc.fr (V. Vivier).

when promoting local metal dissolution by different mechanisms which vary with the microbial species and chemistry of the colonized metal surface [6]. For instance, in such confined environment, some iron-reducing bacteria (IRB) are able to use simultaneously dihydrogen as electron donor and ferric iron as electron acceptor for their anaerobic respiration [7,8]. In this study, *Shewanella oneidensis* was chosen as an IRB and hydrogen-oxidizing bacteria HOB model microorganism. It is a facultative anaerobic bacterium [9] able to use different compounds as electron donor, such as lactate, formate, pyruvate, amino acids and also dihydrogen [10]. According to El-Naggar et al. [11] the respiration rate of *S. oneidensis* strain MR-1 is 2.6×10^6 electrons per cell per second using lactate as electron donor. In addition, some mechanisms of IRB species using electron transfers from solid substrates have already been described in the literature, such as:

- the use of mediators which can act as electron shuttles transferring electrons from the cells to the acceptors compounds [12,13];
- the direct contact of cells with solid substrate through multiheme cytochromes at the external membrane [14];
- the use of conductive intracellular filaments (i.e. nanowires) [11].

It is well-known that the presence of microorganisms can influence the corrosion rate [6,15–19], but is not well elucidated if IRB are able to induce local corrosion. The overall influence of microorganism on corrosion mechanism is still under debate since it depends on many factors [6].

Electrochemical techniques such as cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were already proved to be powerful tools for corrosion investigations. Valuable parameters can be gathered about the kinetics of interfacial processes from the measurements of current or potential. However, these results are obtained as an average behavior of the whole interface, which render difficult the elucidation of the local corrosion mechanisms [20–23]. Therefore, the use of local techniques is needed to describe the interface reactivity.

The objective of this study is to characterize the electrochemical interface by both local and global techniques during biocorrosion of low carbon steel in the presence of *S. oneidensis* used as model of IRB and HOB. Scanning electrochemical microscopy (SECM), which has been widely described by Bard et al. [24–26] and subject of numerous reviews [27–29], and local electrochemical impedance spectroscopy pioneered by Isaacs et al. [21,30] were used as electrochemical techniques. Carbon steel has been considered as candidate material for the multi-barrier system due to the low corrosion rate under reducing conditions. In a previous study [31], corrosion products, iron oxides (e.g. magnetite) and H_2 were shown to favor the hydrogen-oxidizing IRB development in the context of active corrosion of metallic radioactive waste containers. Moreover, the size of bacterial cells is in the range of a few micrometers to a few tens of micrometers. Such dimension makes possible to perform local electrochemical measurements even in the biofilm environment. A microelectrode can also be used for generating locally H_2 in the close vicinity of the bacterial cells.

2. Experimental

2.1. Bacterial culture

The cultures of *S. oneidensis* strain MR-1 (ATCC 700550™) were obtained aerobically at the beginning of the stationary growth phase in Luria Bertani Broth (LB) medium ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ tryptone, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ yeast extract) after 24 h at 30°C . *S. oneidensis* cells were harvested from the LB medium by centrifugation (4000 rpm for 20 min), washed once with sterile minimal medium (M1) and then inoculated in electrochemical reactor (initial concentration of $10^8 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ counted by THOMA counting chamber). The chemically defined minimal medium (M1) was prepared according to Esnault et al. [31]. The composition consisted in a mixture of 9 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM NaHCO_3 , 0.8 mM

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 45 μM H_3BO_3 , 10 μM NaCl, 4 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 μM $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 μM $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 11 μM Na_2SeO_4 , 1 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.8 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 17 mM HEPES buffer, amino acids (0.11 mM arginine, 0.13 mM glutamate, 0.19 mM serine), and vitamins (0.08 mM nicotinic acid, 0.01 mM thiamine-HCl, 0.40 μM biotine). The pH was adjusted to ca. 7 with NaOH and then the medium was sterilized by autoclaving (120°C for 20 min), except for the thermolabile components (e.g. amino acids) which were filter-sterilized ($0.22 \mu\text{m}$). For local impedance experiments this medium was prepared without phosphate ions in its composition.

2.2. Carbon steel coupons

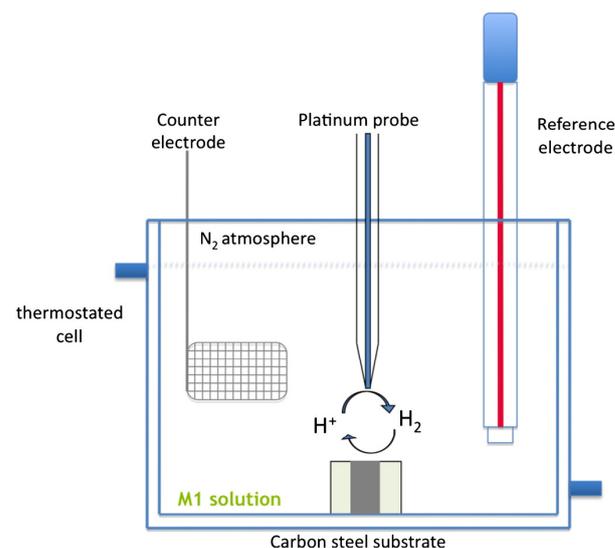
Low carbon steel coupons A37 (0.12% C, 0.22% Si, 0.62% Mn, 0.008% Al, 0.012% S and P, 0.02% Ni, 0.03% Cr, 0.04% Cu, 0.005% Co and <0.005% Ti) were obtained from the CEA (Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives – France). Rod-shaped coupons (1 cm in diameter) were laterally insulated with a cathaphoretic paint and then molded in a diallylphthalate glass-fiber resin (Presi), leaving a disk area of 0.79 cm^2 exposed to the solution. Prior to each experiment, the electrode was polished with emery paper (P600 grit SiC) and sterilized with ethanol by sonication for 15 min.

2.3. Electrochemical experiments

2.3.1. Scanning electrochemical microscopy (SECM)

Preliminary experiments for the detection of H_2 were performed in a 0.5 M sulfuric acid solution with a platinum electrode of 0.5 cm in diameter as substrate and a platinum microelectrode of $20 \mu\text{m}$ in radius.

For the experiments related to the study of carbon steel corrosion, the electrochemical measurements were performed with a homemade scanning electrochemical microscope (SECM), which consisted in a 4-electrode cell configuration depicted in Scheme 1, elaborated specifically for anaerobic and sterile conditions. A double-wall glass cell thermostated at 30°C allowed the carbon steel working electrode (WE1) to be placed in the bottom of the cell in a face up position. The reference and the counter electrodes consisted in a saturated calomel reference electrode (SCE) and a platinum gauze, respectively. The cell was closed with a Teflon cover where a flexible nitrile bracket was adapted. Throughout this flexible support, a platinum tip of $50 \mu\text{m}$ in diameter, acting as a second mobile working electrode for generating



Scheme 1. Sketch of the SECM setup used in this study.

H₂ in solution (see Results and discussion section), was placed perpendicular to WE1. A home-made bi-potentiostatic workstation coupled with high gain and low noise current to voltage converters were used. The microelectrode was positioned with the help of motorized stages allowing a spatial resolution of 200 nm along the 3-axis and was driven by a motion controller (Newport). All experiments were computer controlled with a Labview software [32,33]. The disassembled cell and the electrodes were sterilized prior to experiments with 70% ethanol solution for 20 min; and then rinsed with sterilized water in laminar flow chamber followed by UV irradiation for 15 min. Whenever possible, the instrumentation was sterilized in an autoclave. The cell was assembled under sterile conditions and 260 mL of M1 medium was introduced and deaerated for 2 h under N₂ atmosphere. The N₂ flow was maintained at the headspace of the cell (near to the liquid surface) so as to ensure the anaerobic conditions during the whole duration of the electrochemical measurements.

The contact point between the substrate and the probe (i.e. the distance 0) was determined by performing an approach curve [24,34]. Then, the SECM was used in generation/collection mode [35,36] for investigating the role of H₂ for different distances between the probe and substrate.

2.3.2. Local electrochemical impedance spectroscopy (LEIS)

Similarly to the SECM, LEIS consisted in using a micro probe for measuring the local current density [21,37–39]. The two devices require some similar apparatus, in particular for positioning the probe in the vicinity of the substrate. The LEIS is based on the measurement of the local potential difference in solution with a bi microreference electrode (dual Ag/AgCl microelectrodes) positioned close to the substrate as sketched in Scheme 2. These microreference electrodes were obtained from the anodization of silver microelectrodes in a potassium chloride solution. The local AC-current density $i_{loc}(\omega)$ was obtained through Ohm's law using [40]:

$$i_{loc}(\omega) = \frac{\Delta V_{probe}(\omega)\kappa}{d} \quad (9)$$

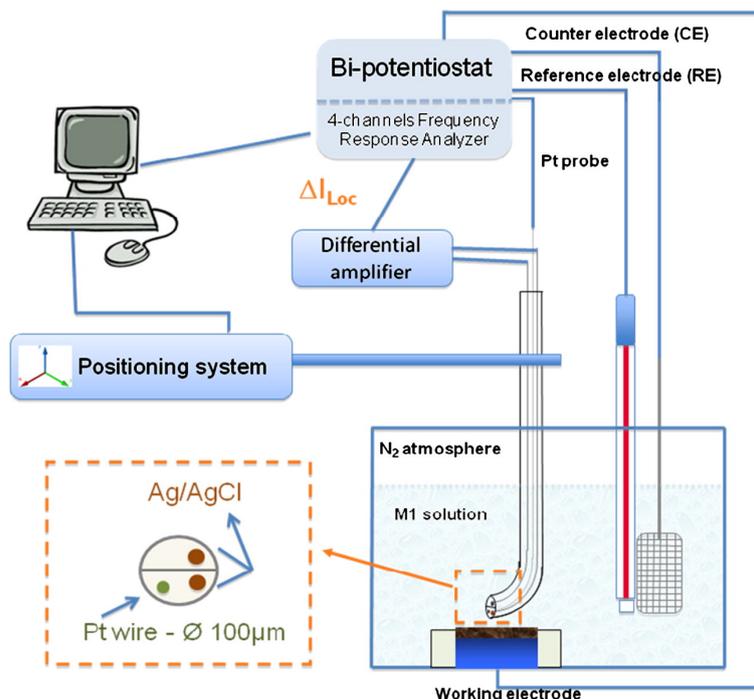
where κ is the electrolyte conductivity, $\Delta V_{probe}(\omega)$ is the AC potential difference between the two probes, and d is the distance between the two probes. The local impedance (z) involves the electrode potential measured with respect to a reference electrode located far from the electrode surface and the local current according to [38–40]:

$$z(\omega) = \frac{\tilde{V}(\omega) - \Phi_{ref}}{i_{loc}(\omega)} = \frac{\tilde{V}(\omega)}{\Delta V_{probe}(\omega)\kappa} d \quad (10)$$

where $\tilde{V}(\omega) - \Phi_{ref}$ represents the AC potential difference between the electrode surface and the reference electrode in the bulk solution. Similarly to other scanning probe techniques, the spatial resolution of the LEIS is governed by the size of the probe and the distance between the probe and the steel substrate. The measurements were carried out with a four-channel frequency response analyzer (Solartron 1254) and the potential difference between the two microelectrodes was amplified with a home-made differential amplifier. For this study, a specific tri-microelectrode was devised (Scheme 2) allowing the generation of H₂ and local microbiological activity to be induced with the platinum microelectrode (similarly to the generation/collection mode of the SECM), and the simultaneous local electrochemical impedance measurement with the two Ag/AgCl microreference electrodes.

2.4. Characterization of the coupon surface

Steel coupon surfaces were analyzed at the end of the experiments by scanning electron microscopy (SEM). These investigations were performed with a Leica Stereoscan 440 microscope coupled with EDS elemental semi-quantitative analyses (Princeton Gamma-Tech) at 20 keV and 5.3 nA. The samples were slightly rinsed with deionised water, dried with N₂ gas and stored in plastic containers until analysis. The coupons were coated with carbon prior to SEM analysis.



Scheme 2. Sketch of the LEIS setup used in this study.

3. Results and discussions

The results of the preliminary experiments related to the generation/ collection of H_2 in solution are illustrated in Fig. 1. These experiments were performed in a 0.5 M sulfuric acid solution with a 0.5 cm diameter platinum electrode as substrate. The potential of the substrate was swept at 15 mV s^{-1} in the H_2 evolution reaction domain (Fig. 1a), whereas the dissolved H_2 generated by the substrate was simultaneously monitored as a function of time with a platinum microelectrode biased at 0.3 V (vs. SCE) for different tip-to-substrate distances (Fig. 1b). The current peak observed after about 11 s corresponds to the beginning of the reverse scan of the Pt substrate. It is noteworthy that the current of the substrate does not depend on the tip-to-substrate distance (Fig. 1a). Conversely, the response of the probe strongly depends on this distance. First, there is a further delay in the response of the probe, which corresponds to a longer time for the electrogenerated species to reach the microelectrode when it is positioned far from the substrate. Second, due to the concentration gradient of these species from the Pt substrate to the bulk solution, the peak intensity of the current recorded at the microelectrode decreases with the distance. However, these experiments clearly evidence the possibility of dosing H_2 dissolved in solution with a microelectrode positioned at a distance smaller than a few microelectrode radii.

Fig. 2 shows the CV curves of a platinum probe at 15 mV s^{-1} positioned at $80 \mu\text{m}$ of the interface in abiotic (blue curve) and biotic (red curve) conditions for 72 h and 24 h after inoculation, respectively. These two curves were obtained successively during the same experiment and at the same location for the probe. During the cathodic scan, H_2 is generated at the probe and diffuses towards the interface where it can be consumed by the bacteria. The anodic scan corresponds to the re-oxidation of H_2 remaining in solution. It is noteworthy that the electrochemical cell formed by the microelectrode and the substrate is a thin layer in that case. This is the reason why the anodic peaks observed

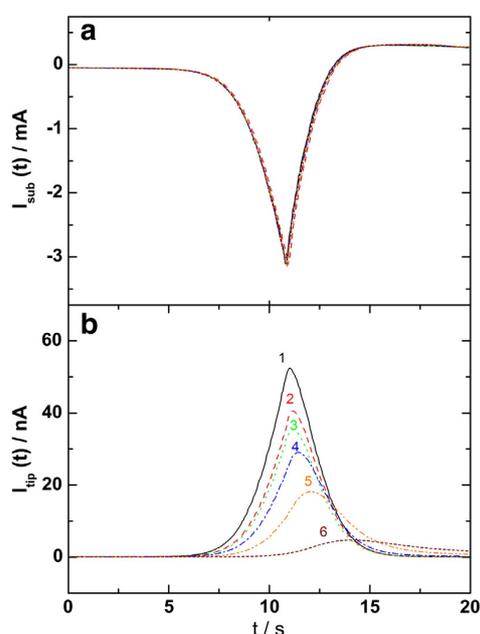


Fig. 1. Dihydrogen detection with the SECM in H_2SO_4 solution. The potential of the Pt substrate was swept in the hydrogen reduction reaction domain at 15 mV s^{-1} (curve a), whereas the platinum probe was biased at 0.3 V (vs. SCE) for dissolved dihydrogen detection (curve b), with the tip-to-substrate distance as a parameter. The minimum in current observed after 11 s on curves of (a) corresponds to the inversion of the potential scan direction.

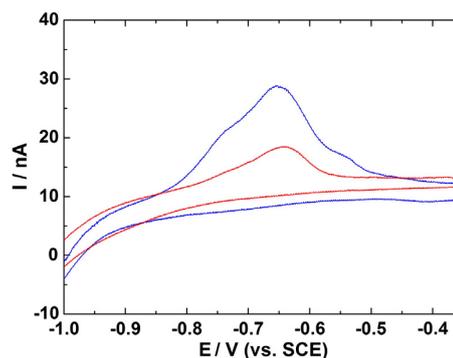


Fig. 2. Cyclic voltammograms of a Pt microelectrode of $50 \mu\text{m}$ in diameter at 15 mV s^{-1} positioned at $80 \mu\text{m}$ from the steel substrate in abiotic (blue curve) and biotic (red curve) conditions for 72 h and 24 h after inoculation, respectively. The curves presented are a zoom of the anodic domain. (For interpretation of the references to colors in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

for both cases are ascribed to the dihydrogen oxidation. Moreover, the amount of H_2 determined from the peak area is larger in abiotic conditions, indicating a consumption of H_2 by the bacteria.

This result is confirmed by Fig. 3 in which the exchanged charge for different microelectrode-to-substrate distances is reported for biotic (red curve) and abiotic (blue curve) conditions. Interestingly, the two curves exhibit very similar behavior and the difference between the two curves provides an evaluation of the H_2 consumption by the bacteria. A mean value of about $0.12 \mu\text{C}$ was obtained for the amount of H_2 consumed. From Faraday's law, this corresponds to about $6 \cdot 10^{-13} \text{ mol}$ of H_2 , and taking into account the duration of the CV experiment for both generation and dosing of H_2 , this corresponds to a H_2 consumption rate of about $10^{-14} \text{ mol}^{-1}$ for biotic conditions. For comparison, the charge exchanged during the H_2 production by the tip was about $9 \mu\text{C}$ showing that only 1 to 1.5% of the H_2 generated is involved in the bacterial activity.

Fig. 4 shows the global impedance diagrams of the steel coupon for biotic conditions. These experiments were performed with H_2 generation by the probe polarized at -1 V/ECS and generating a DC current of about 50 nA, as shown in the experimental setup of Scheme 2. The high frequency loop between 65 kHz and 10 kHz is ascribed to artifacts as already described in the literature [41], and the electrochemical system can be readily described with two time

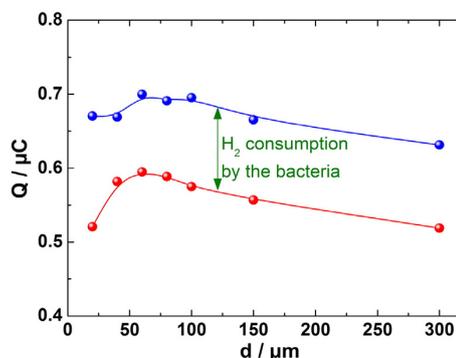


Fig. 3. Evolution of the amount of H_2 oxidized at the Pt microelectrode during the backward scan of potentials as a function of the tip-to-substrate distance. The red curve was measured in abiotic conditions and the blue one in biotic conditions. Symbols are experimental measurements. (For interpretation of the references to colors in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

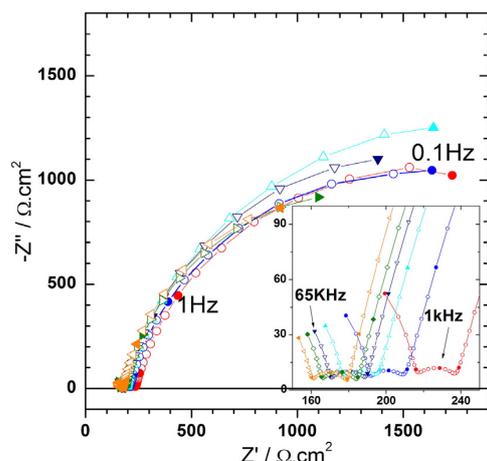


Fig. 4. Evolution of the global electrochemical impedance diagrams at the corrosion potential in presence of bacteria with time as parameter. Electrode surface $A = 0.79 \text{ cm}^2$. ● before inoculation; ● after 4 h; ▲ after 44 h; ▼ after 68 h; ► after 93 h; ◆ after 116 h.

constants. The high frequency time constant ($10 \text{ kHz} < f < 100 \text{ Hz}$) is characterized by an amplitude of about $30 \text{ } \Omega\text{cm}^2$ and does not significantly vary with time. Such value is small and cannot be attributed to a charge transfer resistance, but to a thin corrosion layer product which has already been described for carbon steel in sterile artificial sea water [42]. In addition, the analysis of this flattened capacitive loop allows a constant phase element to be determined, and from the use of Brug formula [43,44], a capacitance is obtained (Fig. 5). This capacitance is about $7 \text{ } \mu\text{Fcm}^{-2}$ and is time independent. Assuming a permittivity of 10 for the corrosion products, the thickness of the layer is in the range of 1 to 2 nm. As shown in Fig. 4, in the low frequency domain ($f < 100 \text{ Hz}$), a second time constant can also be evidenced. The amplitude of the loop is independent of the duration of the experiment ($3000 \text{ } \Omega\text{cm}^2$) and is ascribed to the charge transfer resistance of the steel dissolution process. The fitting of this low frequency time constant also needs the use of a constant phase element (CPE), and as previously mentioned, the use of Brug formula allows the double layer capacitance to be obtained. Its variations are reported in Fig. 6 and show an increase with time after 60 h (whereas in abiotic condition, a continuous increase with time was obtained) from $300 \text{ } \mu\text{Fcm}^{-2}$ to $750 \text{ } \mu\text{Fcm}^{-2}$ after five days. Such unusual high values for double layer capacitance can be explained by the accumulation of corrosion product over the electrode surface and the 3D architecture of the interface in the presence of biological material [42,45]. Thus, the constant value of the charge transfer resistance indicates that the carbon

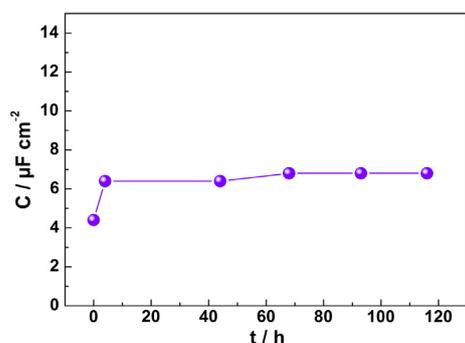


Fig. 5. Evolution of the capacitance in high frequency range.

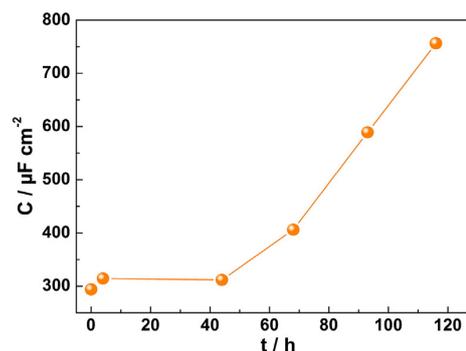


Fig. 6. Evolution of the capacitance in low frequency range.

steel is dissolving at a constant rate, whereas the increase of the double layer capacitance is linked to the growth of the system formed by the bacteria and the corrosion products.

During the same set of experiments, local impedance measurements were performed on various locations above the steel substrate. Fig. 7

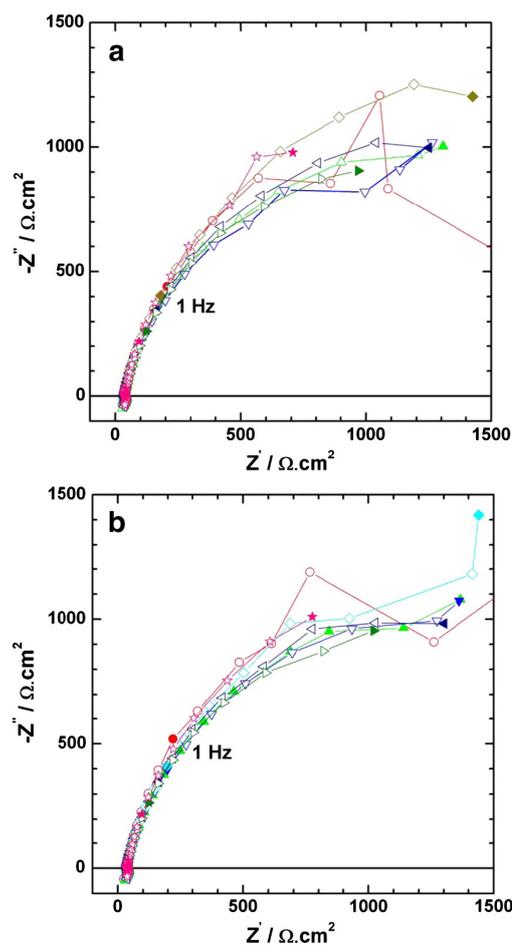


Fig. 7. Evolution of the local electrochemical impedance diagrams in the presence of bacteria with time as parameter. (a) at the electrode center, and (b) at 1 mm from the electrode center. Electrode surface $A = 0.79 \text{ cm}^2$. ○ before inoculation; ▲ after 1 h; ▼ after 4 h; ◆ after 44 h; ◆ after 68 h; ► after 93 h; ☆ after 116 h.

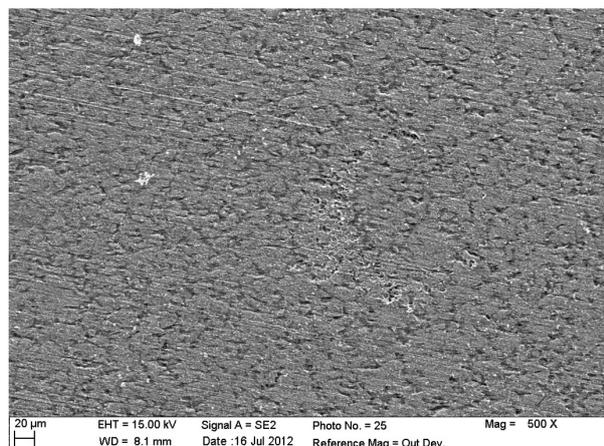


Fig. 8. SEM image of the carbon steel substrate after 5 days of immersion in the M1 solution in biotic conditions.

shows some examples of LEIS diagrams obtained at the electrode center (Fig. 7a) and at 1 mm from the center (Fig. 7b). Both set of diagrams are very similar. In the high frequency domain, the inductive behavior is due to the cell geometry, as already described by Frateur et al. [37,46]. This inductive component hides the first capacitive loop, and only the second loop corresponding to the charge transfer can be used for the fitting. Interestingly, the values of the charge transfer resistance are independent of both time and location. This indicates that from a local point of view (the spatial resolution of the setup used is about 100 µm) the reactivity of the interface does not depend on the position. In addition, the double layer capacitance obtained from local measurements shows the same trends with time (i.e. a continuous increase), but this value remains constant for various locations at different times. This is in agreement with the charge transfer resistance variation and suggests that *S. oneidensis* influences the overall reaction rate in this environment, but no local corrosion could have been evidenced from the analysis of electrochemical results. In addition, this was supported by post-mortem SEM observations as shown in Fig. 8. The visual appearance of steel is characteristic of a generalized corrosion and a close examination of the surface after different experiments never allowed evidencing localized corrosion.

4. Conclusions

This work shows that local electrochemical techniques are applicable for the investigation of biocorrosion using *S. oneidensis* as a model of iron-reducing bacteria as well as hydrogen-oxidizing bacteria. The dissolved H_2 concentration in H_2SO_4 solution can be measured or controlled by SECM with the generation/collection mode when the distance between the tip and the substrate is smaller than a few microelectrode radii. The charge of the H_2 re-oxidation, in the thin layer between the probe and the substrate, was compared for biotic and abiotic conditions. A small charge was observed for biotic conditions indicating that an amount of the H_2 generated by the probe was consumed by *S. oneidensis*. Therefore, the use of the scanning electrochemical microscopy allowed evidencing the H_2 consumption by the bacteria. Moreover, H_2 consumption rate of about $10^{-14} \text{ mol s}^{-1}$ was measured when only corrosion products were used as energetic substrates.

Two capacitive loops were observed in the global impedance measurements from the experiments performed with the M1 medium for biotic conditions. The high frequency loop can be attributed to a thin layer of corrosion products due to the small and constant values

of capacitance ($9.5 \mu\text{Fcm}^{-2}$). A thickness in the range of 1 to 2 nm was estimated for this layer. The charge transfer resistance of the steel dissolution process was attributed to the low frequency range. The high capacitance values measured are caused by the spatial distribution of species in the biofilm in combination with growth of a film of corrosion products. General corrosion was clearly evidenced by local electrochemical results and SEM observations. Thus, starting from the general idea that biocorrosion is associated to localized corrosion; this work clearly shows that in the case of *S. oneidensis*, generalized corrosion predominates for short-time experiments.

These local descriptions of electrochemical processes offer new perspectives for investigating the relevant activity of a given microorganism, or to studying the concomitant effect of actual environment in combination to the presence of bacteria.

Acknowledgments

This research was funded by the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) by the BIOCOR project. The authors wish to thank Damien Féron (CEA Saclay, France) for the carbon steel samples and Françoise Pillier (LISE, UPR15, France) for SEM analysis.

References

- [1] D. David, Analogue archéologique et corrosion, Collection Sciences et Techniques, Andra scientific report, Bio Intelligence Service, Paris, 2005. 1–76.
- [2] S. Stroes-Gascoyne, Microbial occurrence in bentonite-based buffer, backfill and sealing materials from large-scale experiments at AECL's Underground Research Laboratory, Appl. Clay Sci. 47 (2010) 36–42.
- [3] K. Pedersen, Investigations of subterranean bacteria in deep crystalline bedrock and their importance for the disposal of nuclear waste, Can. J. Microbiol. 42 (1996) 382–391.
- [4] S. Stroes-Gascoyne, C.J. Hamon, D.A. Dixon, J.B. Martino, Microbial analysis of samples from the tunnel sealing experiment at AECL's Underground Research Laboratory, Phys. Chem. Earth 32 (2007) 219–231.
- [5] L. Urios, F. Marsal, D. Pellegrini, M. Magot, Microbial diversity of the 180 million-year-old Toarcian argillite from Toumemire, France, Appl. Geochem. 27 (2012) 1442–1450.
- [6] W.B. Beech, J. Sunner, Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals, Curr. Opin. Biotechnol. 15 (2004) 181–186.
- [7] D.R. Lovley, D.E. Holmes, K.P. Nevin, Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction, Adv. Microb. Physiol. 49 (2004) 219–286.
- [8] M. Libert, O. Bildstein, L. Esnault, M. Jullien, R. Sellier, Molecular hydrogen: an abundant energy source for bacterial activity in nuclear waste repositories, Phys. Chem. Earth 36 (2011) 1616–1623.
- [9] T. Perez-Gonzalez, C. Jimenez-Lopez, A.L. Neal, F. Rull-Perez, A. Rodriguez-Navarro, A. Fernandez-Vivas, E. Ianez-Pareja, Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*, Geochim. Cosmochim. Acta 74 (2010) 967–979.
- [10] K.H. Nealson, A. Belz, B. McKee, Breathing metals as a way of life: geobiology in action, Anton Leeuw. Int. J. G. 81 (2002) 215–222.
- [11] M.Y. El-Naggar, G. Wanger, K.M. Leung, T.D. Yuzvinsky, G. Southam, J. Yang, W.M. Lau, K.H. Nealson, Y.A. Gorby, Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2010) 18127–18131.
- [12] E.D. Brutinel, J.A. Gralnick, Shuttling happens: soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 93 (2012) 41–48.
- [13] D.R. Lovley, Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches, Curr. Opin. Biotechnol. 17 (2006) 327–332.
- [14] Z.W. Du, H.R. Li, T.Y. Gu, A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy, Biotechnol. Adv. 25 (2007) 464–482.
- [15] D.A. Jones, P.S. Amy, A thermodynamic interpretation of microbiologically influenced corrosion, Corrosion 58 (2002) 638–645.
- [16] J.P. Busalmen, M. Vazquez, S.R. de Sanchez, New evidences on the catalase mechanism of microbial corrosion, Electrochim. Acta 47 (2002) 1857–1865.
- [17] G.D. Schrott, P.S. Bonanni, L. Robuschi, A. Esteve-Nunez, J.P. Busalmen, Electrochemical insight into the mechanism of electron transport in biofilms of *Geobacter sulfurreducens*, Electrochim. Acta 56 (2011) 10791–10795.
- [18] S. Da Silva, R. Basseguy, A. Bergel, Electron transfer between hydrogenase and 316L stainless steel: identification of a hydrogenase-catalyzed cathodic reaction in anaerobic mic. J. Electroanal. Chem. 561 (2004) 93–102.
- [19] I.B. Beech, S.A. Campbell, Accelerated low water corrosion of carbon steel in the presence of a biofilm harbouring sulphate-reducing and sulphur-oxidising bacteria recovered from a marine sediment, Electrochim. Acta 54 (2008) 14–21.
- [20] H.S. Isaacs, The localized breakdown and repair of passive surfaces during pitting, Corros. Sci. 29 (1989) 313–323.

- [21] R.S. Lillard, P.J. Moran, H.S. Isaacs, A novel method for generating quantitative local electrochemical impedance spectroscopy, *J. Electrochem. Soc.* 139 (1992) 1007–1012.
- [22] G. Galicia, N. Pebere, B. Tribollet, V. Vivier, Corrosion study of an AZ91 magnesium alloy by EIS and LEIS, *ECS Trans.* 1 (2006) 157–168.
- [23] K.S. de Assis, F.V.V. de Sousa, M. Miranda, I.C.P. Margarit-Mattos, V. Vivier, O.R. Mattos, Assessment of electrochemical methods used on corrosion of superduplex stainless steel, *Corros. Sci.* 59 (2012) 71–80.
- [24] A.J. Bard, F.R.F. Fan, J. Kwak, O. Lev, Scanning electrochemical microscopy. Introduction and principles, *Anal. Chem.* 61 (1989) 132–138.
- [25] C. Lee, J. Kwak, A.J. Bard, Application of scanning electrochemical microscopy to biological samples, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 1740–1743.
- [26] A.J. Bard, F.R.F. Fan, D.T. Pierce, P.R. Unwin, D.O. Wipf, F. Zhou, Chemical imaging of surfaces with the scanning electrochemical microscope, *Science* 254 (1991) 68–74.
- [27] M.V. Mirkin, W. Nogala, J. Velmurugan, Y. Wang, Scanning electrochemical microscopy in the 21st century. Update 1: five years after, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 21196–21212.
- [28] M. Keddam, N. Portail, D. Trinh, V. Vivier, Progress in scanning electrochemical microscopy by coupling with electrochemical impedance and quartz crystal microbalance, *ChemPhysChem* 10 (2009) 3175–3182.
- [29] G. Wittstock, M. Burchardt, S.E. Pust, Y. Shen, C. Zhao, Scanning electrochemical microscopy for direct imaging of reaction rates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46 (2007) 1584–1617.
- [30] F. Zou, D. Thierry, H.S. Isaacs, A high-resolution probe for localized electrochemical impedance spectroscopy measurements, *J. Electrochem. Soc.* 144 (1997) 1957–1965.
- [31] L. Esnault, M. Jullien, C. Mustin, O. Bildstein, M. Libert, Metallic corrosion processes reactivation sustained by iron-reducing bacteria: implication on long-term stability of protective layers, *Phys. Chem. Earth* 36 (2011) 1624–1629.
- [32] C. Gabrielli, M. Keddam, N. Portail, P. Rousseau, H. Takenouti, V. Vivier, Electrochemical impedance spectroscopy investigations of a microelectrode behavior in a thin-layer cell: experimental and theoretical studies, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 20478–20485.
- [33] C. Gabrielli, F. Huet, M. Keddam, P. Rousseau, V. Vivier, Scanning electrochemical microscopy imaging by means of high-frequency impedance measurements in feedback mode, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 11620–11626.
- [34] J. Kwak, A.J. Bard, Scanning electrochemical microscopy. Theory of the feedback mode, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1221–1227.
- [35] G. Wittstock, Imaging localized reactivities of surfaces by scanning electrochemical microscopy, *Top. Appl. Phys.* 85 (2003) 335–364.
- [36] C.M. Sanchez-Sanchez, J. Rodriguez-Lopez, A.J. Bard, Scanning electrochemical microscopy. 60. Quantitative calibration of the SECM substrate generation/tip collection mode and its use for the study of the oxygen reduction mechanism, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3254–3260.
- [37] I. Frateur, V.M. Huang, M.E. Orazem, B. Tribollet, V. Vivier, Experimental issues associated with measurement of local electrochemical impedance, *J. Electrochem. Soc.* 154 (2007) C719–C727.
- [38] V.M.-W. Huang, V. Vivier, M.E. Orazem, N. Pebere, B. Tribollet, The apparent constant-phase-element behavior of an ideally polarized blocking electrode: a global and local impedance analysis, *J. Electrochem. Soc.* 154 (2007) C81–C88.
- [39] V.M. Huang, S.-L. Wu, M.E. Orazem, N. Pebere, B. Tribollet, V. Vivier, Local electrochemical impedance spectroscopy: a review and some recent developments, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 8048–8057.
- [40] H.S. Isaacs, The effect of height on the current distribution measured with a vibrating electrode probe, *J. Electrochem. Soc.* 138 (1991) 722–728.
- [41] A.T. Tran, F. Huet, K. Ngo, P. Rousseau, Artefacts in electrochemical impedance measurement in electrolytic solutions due to the reference electrode, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 8034–8039.
- [42] H. Castaneda, X.D. Benetton, SRB-biofilm influence in active corrosion sites formed at the steel-electrolyte interface when exposed to artificial seawater conditions, *Corros. Sci.* 50 (2008) 1169–1183.
- [43] G.J. Brug, A.L.G. van den Eeden, M. Sluyters-Rehbach, J.H. Sluyters, The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element, *J. Electroanal. Chem.* 176 (1984) 275–295.
- [44] B. Hirschorn, M.E. Orazem, B. Tribollet, V. Vivier, I. Frateur, M. Musiani, Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 6218–6227.
- [45] L.V. Nielsen, L.R. Hilbert, Microbial corrosion of carbon steel by sulfate-reducing bacteria: electrochemical and mechanistic approach, *Eur. Fed. Corros. Publ.* 22 (1997) 11–24.
- [46] I. Frateur, V.M.-W. Huang, M.E. Orazem, N. Pebere, B. Tribollet, V. Vivier, Local electrochemical impedance spectroscopy: considerations about the cell geometry, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 7386–7395.



Rebeca Moreira is graduated in Food Engineering with a Master degree in Quality Control in Food and Drink Industries in Rio de Janeiro, Brazil. She started the PhD study in 2010 as a member of the BIOCOR Program at the Laboratory of Interfaces and Systems Electrochemistry (University Pierre et Marie Curie), Paris, France. The subject of her work is the study of the biocorrosion of carbon steel using local electrochemical techniques.



Marta K. Schütz received a BS degree in Industrial Chemistry from the Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil in 2007 and completed her MSc in Materials Science and Engineering in March 2010 at the same University. Now she is a PhD student at the French Commission for Atomic Energy and Alternative Energies (CEA). She is working on biocorrosion phenomena implicated on the radioactive waste geological disposal. The overall objective of her study is to better understand the impact of bacterial activities on the corrosion products (specially hydrogen and iron (hydr)oxides) and on the rate of anoxic corrosion.



Marie Libert received her PhD in biochemistry (1986) from the University of Compiègne-France. She is a senior research engineer at the French Commission for Atomic Energy and Alternative Energies (CEA) since 1998. Her previous affiliation includes a doctoral fellowship at the same university. Her research focuses on different fields such as the effect of microorganisms on long term behavior of materials used in nuclear repository, biocorrosion, impact of radioactive emission on biota, anaerobic microbiology. She was and she is a European expert on several international research programs.



Bernard Tribollet, after his graduation from the "Ecole Supérieure d'Electricité" (1973), joined the laboratory of I. Epelboin (now LISE-CNRS UPR 15) where he prepared a PhD under his supervision. In 1981, with the support of a NSF fellowship, he spent one year as visiting scientist at the University of California, Berkeley under the supervision of Prof. John Newman. His current research field concerns different problems: mass transport, electrodisolution, corrosion and in particular biocorrosion. He co-authored, with Prof. Mark Orazem of the University of Florida, a textbook on impedance spectroscopy published in 2008 as part of the Electrochemical Society Series (Wiley).



Vincent Vivier was born in Saint-Maur (France) in 1971. He received his PhD in 2000 under the supervision of Dr. L.T. Yu in Thiais (France). In 2002, he joined the Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (CNRS-UPR 15). His current research field concerns the characterization of heterogeneous interface reactivity by means of local electrochemical techniques and electrochemical impedance spectroscopy.

Etude électrochimique des mécanismes de la biocorrosion à l'interface de l'acier au carbone en présence de bactéries ferri-réductrices et hydrogénotrophes dans le contexte de stockage des déchets nucléaires

Résumé

La sûreté du stockage de déchets nucléaires est un sujet de préoccupation majeure. Il est prévu de stocker les déchets de haute activité pendant des millions d'années dans des conteneurs métalliques enfouis dans des formations argileuses à une profondeur de 500 m. La resaturation du milieu va entraîner l'arrivée d'eau au contact du colis provoquant la corrosion des matériaux métalliques en milieu anoxique, avec production d'hydrogène et de produits de corrosion comme des oxydes de fer III. Cette production d'hydrogène représentera une nouvelle source énergétique pour le développement bactérien. La croissance des biofilms bactériennes dans l'environnement des conteneurs en acier carbone pourrait contribuer à la biocorrosion. L'objectif de cette étude était de caractériser les interfaces électrochimiques afin de comprendre les mécanismes de la biocorrosion de l'acier au carbone mis en jeu en présence de *Shewanella oneidensis*, une bactérie ferri-réductrice et hydrogénotrophe. Pendant cette étude les oxydes de fer III et l'hydrogène formés à partir de la corrosion anaérobie ont été utilisés comme donneur et accepteur d'électrons respectivement pour le métabolisme bactérien. Le taux de consommation d'hydrogène a été estimé à l'aide de la technique de microscopie électrochimique à balayage. Enfin, l'influence de la génération locale d'hydrogène a été évaluée par chronoampérométrie. Finalement, le mécanisme de la corrosion généralisée a été mis en évidence à partir des techniques d'impédance globale et locale.

MOTS CLES : Biodégradation, Spectroscopie d'impédance, Déchets radioactifs

Electrochemical study of biocorrosion mechanisms at the carbon steel interface in presence of iron-reducing and hydrogenotrophic bacteria in the nuclear waste disposal context

Résumé

The safety of deep geological repository for nuclear waste is a very important and topical matter especially for the nuclear industry. Such as nuclear fuel the high-level waste has to be stored for time frames of millions of years in metallic containers. Typically these containers should be placed in deep geological clay formations. Corrosion processes, will take place after the resaturation of the geological medium and under the prevalent anoxic conditions lead to the generation of hydrogen. The particular environment of geological repositories does not provide much biodegradable substances. This is the reason that hydrogen represents a suitable energy source for hydrogenotrophic bacteria. Thereby formed bacterial biofilms on the containers may contribute to a process of fast decay of the steel, the so called biocorrosion. The aim of this study is to characterize the electrochemical interfaces in order to obtain the mechanisms of biocorrosion of carbon steels in presence of iron-reducing and hydrogenotrophic bacterium *Shewanella oneidensis*. The products of corrosion processes, namely hydrogen and iron (III) oxides are used as electron donor and acceptor, respectively. The amount of hydrogen consumed by *Shewanella* could be estimated with 10^{-4} mol s⁻¹ using SECM. The influence of the local hydrogen generation was evaluated via chronoamperometry. When hydrogen was locally generated above a carbon steel substrate an accelerated corrosion process can be observed. Using LEIS, the mechanism of the generalised corrosion process was shown.