

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Ecole Nationale Polytechnique d'Alger  
Département de Génie de l'Environnement  
Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement



## THESE

Présentée en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences en  
Génie de l'Environnement

par

*Yamina Djemai- Zeghlache*  
*Magister en Microbiologie*

**Etude de l'adhésion des cellules algales sur des supports métalliques immergés dans les cultures industrielles et phénomènes électrochimiques induits**

*Soutenue le 1<sup>er</sup> Juillet 2015 devant le Jury:*

Monsieur	KERBACHI	RABAH,	Président	Prof., ENP
Mme	BELHANECHÉ	NAIMA,	Rapporteur	Prof., ENP
Mme	OUAFI	SAIDA,	Examinatrice	Prof., USTHB
Mme	CHABANE	DJAMILA,	Examinatrice	MCA, USTHB
Monsieur	DEMRI	BOUALEM,	Examineur	Prof., ENP
Monsieur	KEFFOUS	AISSA,	Examineur	Dir.Recherche,CRTSE

**A**

**MA**

**MERE**

## *R*emerciements

*Tout d'abord, je tiens à remercier Madame Naima Belhaneche, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique, d'avoir bien voulu prendre la direction de cette thèse et de m'avoir accueillie au sein de son équipe, qu'elle trouve ici, l'expression de ma reconnaissance.*

*Je remercie spécialement, Monsieur Rabah Kerbachi, Professeur à l'ENP, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à Mesdames et Messieurs :*

*Madame Saida Ouafi, Professeur à l'USTHB*

*Madame Djamila Chabane Maitre de Conférences à l'USTHB*

*Monsieur Keffous Aissa Directeur de Recherche au CRTSE*

*Monsieur Boualem Demri Professeur*

*D'avoir bien voulu évaluer ce modeste travail.*

*Je voudrais aussi exprimer toute ma gratitude à Hélène De Baynast et Fabrice Audonnet, Maitres de conférences à l'Université Blaise Pascal - Institut Pascal (Clermont – Ferrand) ainsi qu'à David Duchez qui ont permis la réalisation d'une partie de ce travail, merci à tous les trois.*

*Je remercie également Cyril Breton et Monsieur Michel Alexandre de l'Ecole Centrale Paris pour l'aide qu'ils m'ont apportée lors de la réalisation du dispositif expérimental de la première partie de ce travail.*

*Enfin, je ne saurais jamais assez remercier mon amie Zakia de Paris, qui m'a épaulée dans les moments difficiles; merci Zako pour tout.*

*Un grand merci à Razika, Dalila, Karima pour leur disponibilité lors de la préparation de la soutenance.*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC : Courant alternatif

AGPI : Acides gras polyinsaturés

AISI : American Iron and Steel Institute

APC: Allophycocyanine

ATP : Adenosine Triphosphate

C: Carbone

CLSM :Confocal laser scanning microscopy

CMI : Corrosion microbienne influencée

Cr :Chrome

DC : Courant direct

E.C.S: Electrode au Calomel Saturé

EPS: Extra Polysaccharides

FISH :Hybridation *in situ* en fluorescence

MEB :Microscopie Electronique à Balayage

Mn :Manganèse

Mo :Molybdène

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate ,

N : Azote

Ni: Nickel

PAM: Pulse Amplitude Modulation

PBR : Photo bioréacteur

PBRB: Photobioreacteur à biofilms

PC : Phycocyanine

PE : Phycoérythrine

PEBD: Polyéthylène basse densité

PEHD: Polyéthylène haute densité

PET: Polyéthylène téréphtalate

PMMA: Poly méthyl méthacrylate

PVC : Polychlorure de vinyle

SAG: Sammlung von Algenkulturen Pflanzenphysiologischer Göttingen, Institut der Universität

## *Liste des Abréviations*

---

SIE: Spectroscopie d'Impédance Electrochimique

SS: Stainless Steel

UNS: Unified Numbering System.

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre I

Figure 1: Représentation de la parenté phylogénétique de certains groupes d'algues.....	8
Figure 2 : Image représentant la diversité des formes des microalgues .....	10
Figure 3 : Schéma représentatif des réactions de photosynthèse dans les deux phases [41].....	15

### Chapitre II

Figure 4 : Représentation schématique de la formation de biofilms cas d'une monoespece [76].....	23
Figure 5: Schéma montrant les facteurs qui influent sur l'adhésion des microorganismes.....	26
Figure 6 : schéma représentant un biofilm marin ou macrofouling [19].....	30

### Chapitre IV

Figure 7 : Représentation du diagramme de Nyquist.....	50
Figure 8 : Schématisation d'un équivalent circuit électrique.....	50
Figure 9: Photographie des cellules de <i>Porphyridium purpureum</i> prise au cours de la croissance (X 40).....	52
Figure 10 : Courbe de croissance théorique de <i>Porphyridium</i> en batch.....	54
Figure 11 : Principales formes des courbes potentiel-temps.....	57

### Chapitre V

Figure 12a: Photographie du dispositif expérimental utilisé .....	62
Figure 12b : Simulation et mode d'immersion des échantillons .....	62
Figure 13: Evolution de la croissance de <i>Porphyridium</i> en fonction du temps corrélation avec la production des pigments.....	65
Figure 14 : Evolution du potentiel de corrosion libre en fonction du temps pour l'ensemble des échantillons en présence d'algues.....	66
Figure 15 : Evolution du potentiel de corrosion libre en présence (MA) et en absence (MS) d'algues (échantillons à demi – plongés) en fonction du temps .....	67

Figure 16 : Evolution du potentiel de corrosion libre en présence et en absence d'algues échantillons plongés verticalement .....	68
Figure 17 : Evolution du potentiel de corrosion libre en fonction du temps en présence (MA) et en absence (MA) d'algues ( échantillons plongés horizontalement) .....	68
Figure 18: Oscillations du potentiel de corrosion libre enregistrées en phase de latence.....	69
Figure 19: Oscillations du potentiel de corrosion libre, enregistrées en phase exponentielle .....	69
Figure 20 : Effet de la photopériode sur le potentiel de corrosion libre et durée de l'oscillation (24heures).....	71
Figure 21: Nombre de cellules adhérentes en fonction des échantillons.....	73
Figure 22: Micrographies des échantillons à moitié immergés obtenues par microscope électronique : DP1000 (a, b) et DP500 (c,d) : (a) partie aérienne qui présente des biofilms, (b) partie immergée , absence de biofilms, (c) partie aérienne des débris d'algues mortes, (d) partie immergée nette.....	72
Figure 23: Observation de la surface de l'échantillon plongé horizontalement et poli à 1000 (a) avant immersion, (b) (c) après immersion.....	73
Figure 24 : Observation de la surface de l'échantillon plongé horizontalement poli à 500, (a) avant immersion (métallurgique),( b) après immersion(MEB).....	73
Figure 25 : Observation de la surface de l'échantillon plongé verticalement, poli à 1000, (a) représente l'échantillon avant immersion, (b) et(c) représentent le même échantillon prélevé à la fin de l'expérience mais après exploration au MEB, sur deux champs différents.....	73
Figure 26 : Observation de la surface de l'échantillon plongé verticalement, poli à 500,(a) représente l'état de surface avant l'expérience mais ( b)et (c) après immersion ; exploration au MEB, sur deux champs différents.....	73

## Chapitre VI

Figure 27 : Photographie du dispositif ayant servi au suivi de l'expérience témoin.....	
Figure 28 : Dispositif expérimental de culture de <i>Porphyridium purpureum</i> (lumière continue).....	83
Figure 29 : Photographie de la cellule électrochimique et disposition des électrodes.....	84
Figure 30 : Courbe de croissance de <i>Porphyridium</i> (lumière continue): nombre de cellules en fonction du temps.....	85

Figure 31 : Evolution de l'impédance en fonction du temps (diagramme de Nyquist).....86

Figure 32 : Schéma de l'équivalent circuit électrique obtenu après modélisation.....87

Figure 33:Micrographies obtenues par microscopie électronique à balayage illustrant la cinétique de formation du biofilm sur l'acier 304L. (a) après 3j ; (b) après 7j ;(c) après 9j ;(d) après 16 j .....88

## Chapitre VII

Figure 34: Schéma de l'installation expérimentale pour le suivi de la croissance microalgale et mesure électrochimiques.....91

Figure 35 : Evolution de la croissance microalgale en fonction du temps .....93

Figure 36:Evolution du potentiel de corrosion en présence en fonction du temps présence et en absence d'algues.....94.

Figure 37 : Evolution de l'impédance en fonction du temps..... 95

Figure 38 : Micrographies obtenues par MEB montrant la cinétique de formation du biofilm en fonction de la durée d'immersion : (a,b) 3 jours, (c,d) 6 jours, (e,f) 10jours.....96

Figure 39 : Etat de surface de l'acier inoxydable observé par microscope métallographique, (a) après 10 jours d'immersion et après décrochage du biofilm, ( b) avant immersion .....97

---

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau1 : Caractéristiques des principales lignées d'algues, d'après De Reviers [34].....9

Tableau2: Matériaux de construction de Photobioréacteurs adapté de [138]..... 42

Tableau3 : Composition chimique des aciers inoxydables (304L et 316L) en pourcentage massique.....58

Tableau 4:Evolution de la résistance de polarisation obtenue lors des mesures d'impédance.....95

---

# 7 ABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>6</b>
<b>CHAPITRE I : LES MICROALGUES .....</b>	<b>6</b>
<b>I.1 .Introduction.....</b>	<b>6</b>
<b>I.2 .Classification des algues .....</b>	<b>6</b>
I.2.1. Classification au sein du phylum en différents embranchements.....	8
I.2.2. Classification sur la base de la taille de l'appareil végétatif.....	8
I.2.3. Classification des algues sur la base des pigments .....	10
I.2.4. Classification sur la base écologique.....	13
<b>I.3. Métabolisme des microalgues .....</b>	<b>13</b>
I.3 .1 Métabolisme autotrophique et phototrophique .....	13
I.3 .2. Le métabolisme hétérotrophique et notion de mixotrophie .....	15
I.3.3. Métabolisme symbiotique.....	16
<b>I.4. De l'intérêt industriel de la culture des algues.....</b>	<b>16</b>
<b>I.5. Effet délétère des algues.....</b>	<b>17</b>
<b>I. 6. Conclusion.....</b>	<b>18</b>
<b>CHAPITRE II LES BIOFILMS MICROBIENS.....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.Introduction.....</b>	<b>20</b>
<b>II.2. Définition et historique.....</b>	<b>22</b>
<b>II. 3. Les biofilms bactériens .....</b>	<b>22</b>
II.3.1. Mécanismes de formation des biofilms .....	22
II. 3.1. 1 .Film primaire .....	23
II.3.1.2. Déplacement du microorganisme vers la surface du support .....	23
II. 3. 1. 3. Adhésion réversible, adhésion irréversible .....	24
II.3.1.4. Croissance et maturation du biofilm .....	24
II. 3. 1. 5. Décrochement ou détachement .....	25
II.3.2. Influence des facteurs sur l'adhésion des cellules .....	25
II.3.2.1. Le matériau.....	26
II.3.2.2. L'environnement.....	27
II.3 .2.3. Le microorganisme.....	27

<b>II.4. Les biofilms algaux.....</b>	<b>28</b>
II.4.1. Mécanismes d'adhésion des microalgues, biofouling et immobilisation.....	28
II.4.2. Formation des biofilms d'algues dans différents milieux.....	29
II.4.2.1. Dans les milieux ouverts.....	29
II.4.2.2. Dans les milieux clos industriels.....	31
<b>II.5. Conséquences de la formation du biofilm microbiens sur les matériaux.....</b>	<b>31</b>
<b>II.6. Action des biofilms et impact électrochimique de microalgues sur les matériaux.....</b>	<b>33</b>
II.6.1. Action corrosive et ennoblement du potentiel de corrosion .....	33
II.6.2. Action algale inhibitrice de la corrosion.....	35
<b>II.7. Conclusion .....</b>	<b>35</b>
<b>CHAPITRE III : PHOTOBIOREACTEURS ET MATERIAUX .....</b>	<b>36</b>
<b>III.1. Les différents types d'installation permettant la culture des microalgues.....</b>	<b>36</b>
<b>III.2. Les photobioréacteurs.....</b>	<b>37</b>
III.2.1. Les types de photobioréacteurs .....	37
III.2.2. Les matériaux de construction d'un photobioréacteur .....	38
III.2.3. Les critères de sélection des matériaux .....	38
III.2.4. Les matériaux en contact avec les microalgues.....	40
<b>III.3. Place des aciers dans le photobioréacteurs.....</b>	<b>42</b>
III.3.1. Caractéristiques des aciers inoxydables.....	42
III.3.2. Comportement des aciers inoxydables en milieu biologique .....	43
<b>III.4. Conclusion.....</b>	<b>44</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>45</b>
<b>CHAPITRE IV: METHODOLOGIE .....</b>	<b>45</b>
<b>IV.1. Introduction .....</b>	<b>45</b>
<b>IV.2. Approche méthodologique .....</b>	<b>45</b>
IV.2.1. Suivi de la formation des biofilms et leur caractérisation.....	45
IV.2.1.1. Microscopie électronique à balayage .....	46
IV.2.1.2. Mesure d'impédance.....	47
<b>IV.3. Suivi de la croissance et quantification des cellules adhérentes.....</b>	<b>49</b>

IV .3.1.Milieux de culture .....	49
IV.3.2. Estimation de la croissance algale.....	49
IV.3.3.Caractéristiques de l'espèce choisie comme modèle d'étude: <i>Porphyridium purpureum</i> .....	50
IV.3.3.2.Caractéristiques de la cellule.....	51
IV. 3 3.3.Croissance en batch ou en milieu discontinu.....	52
IV.3.3. 4 .Conditions de culture.....	53
IV.3.3 .5. Particularités métaboliques de <i>Porphyridium</i> .....	55
<b>IV.4. Suivi du potentiel de corrosion ouvert ou Ecorr ou potentiel d'abondon.....</b>	<b>55</b>
<b>IV.5. Matériaux utilisés pour les trois expériences.....</b>	<b>57</b>
<b>Chapitre V: Comportement électrochimique de l'acier 316l dans une culture de porphyridium, en batch non contrôlé sous photopériode et étude de l'adhésion de ces cellules .....</b>	<b>58</b>
<b>V.1.Objectif.....</b>	<b>58</b>
<b>V.2. Matériel et méthodes.....</b>	<b>59</b>
V.2.1. Préparation des échantillons ou électrodes de mesure.....	59
V.2.2. Matériel biologique.....	59
V.2.3. Mise en culture de <i>Porphyridium purpureum</i> .....	59
V.2 .3.1 .Milieu de culture.....	59
V.2.3.2. Préculture .....	59
V.2 .4. Culture dans le réacteur.....	60
V.2.4.1 Dispositif expérimental.....	60
V.2.4 .2 . Stérilisation du matériel.....	61
<b>V.3.Déroulement des manipulations.....</b>	<b>62</b>
V.3.1. Mesure de l'absorbance.....	62
V.3.2 .Mesure du potentiel de corrosion.....	62
V.3.3. Mesure des facteurs abiotiques et réajustement de divers paramètres.....	62
<b>V.4. Arrêt de l'expérience et retrait des échantillons.....</b>	<b>63</b>
V.4.1.Estimation des cellules algales adhérentes au support métallique après décrochage aux ultrasons.....	63
V.4.2. Etude microscopique.....	63

<b>V.5.Résultats</b> .....	63
V.5.1. Croissance et production des pigments.....	63
V.5.2. Evolution du potentiel de corrosion libre.....	64
V.5.2.1. Milieu avec algues.....	64
V.5.2.2.Milieu sans algues (Témoin).....	68
V.5.2.3. Evolution de Ecorr en fonction du milieu d'immersion et en fonction de la phase de croissance.....	68
V.5.3. Nombre de cellules adhérentes et microscopie.....	70
V.5.3.1. Nombre de cellules adhérentes.....	70
V.5.3.2. Analyse microscopique.....	71
<b>V.6. Discussion</b> .....	73
V. 6.1. Effet de l'éclairement.....	75
V.6.2.Effet du milieu d'immersion.....	75
V.6.3. Effet de la température.....	77
V.6.4. Effet de la souche et de ses capacités métaboliques.....	76
V. 6.5. Effet du matériau.....	77
V.6. 6. Effet de la position des échantillons.....	78
<b>V.7. Conclusion</b> .....	80
 CHAPITRE VI ;Essai de caractérisation de biofilms sur support en acier inoxydable de type 304L, de <i>Porphyridium purpureum</i> par méthode de spectroscopie d'impédance électrochimique.	
VI.1. Objectif.....	81
VI .2.Matériel et méthodes .....	81
VI .2 .1 . Matériau utilisé et préparation des échantillons.....	81
VI .2.2.Experience témoin.....	81
VI.2.3.Mise en culture de <i>Porphyridium purpureum</i> et suivi de la croissance .....	82
VI .2.4 Mesure de l'impédance .....	83
VI .2.5. Analyse par microscopie électronique à balayage.....	84
<b>VI.3.Résultats</b> .....	85
VI .3 .1. Evolution de la croissance.....	85
VI.3 .2 . Mesure d'impédance et modélisation par le logiciel Zplot .....	85
VI.3 .3 .Analyse par microscopie électronique à balayage .....	86
<b>VI.4.Discussion</b> .....	88

<b>VI.5.Conclusion</b> .....	88
<b>VII .Comportement de l'acier 316L dans une culture plurialgale et étude de la formation du biofilm</b> : .....	89
<b>VII .1.Objectif</b> .....	89
<b>VII.2. Matériel et méthodes</b> .....	89
VII.2. 1.Prélèvement ,matériau testé et origine du matériel biologique .....	89
VII.2.2. Dispositif expérimental conditions de culture et axénisation.....	89
VII.2.3.Déroulement des expérimentations.....	90
VII .2.3.1.Mesures électrochimiques .....	91
VII.2 .3 2. Suivi de la croissance.....	91
VII.2.3.3. Contrôle de la pureté de la culture.....	91
VII.2.4. Arrêt et retrait des échantillons.....	91
VII.2.4.1.Observation des aciers par microscopie électronique à balayage .....	91
<b>VII.3.Résultats</b> .....	91
VII.3.1.Evolution du pH et de l'oxygène dissous .....	91
VII .3.2. Evolution de la croissance multialgale .....	92
VII.3.3.Evolution du potentiel de corrosion libre :.....	92
VII.3.4. Mesures d'Impédance.....	93
VII .3.5.Analyse microscopique .....	94
<b>VII .4.Discussion</b> .....	96
<b>VII. 5 Conclusion</b> .....	97
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	98
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	100
<b>ANNEXES</b> .....	116

# *I*NTRODUCTION *G*ENERALE



# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les algues microscopiques ou micro algues sont un groupe important et diversifié d'organismes photosynthétiques en majorité eucaryotes à l'exception des cyanobactéries qui présentent des cellules procaryotes. Ces microorganismes peuplent des écosystèmes aquatiques (eau douce, marine et environnements extrêmes) et terrestres humides, jouent un rôle important dans la production d'oxygène et de matières organiques et occupent une place privilégiée dans la chaîne trophique. Ils sont ainsi majoritaires dans la composition du phytoplancton de ces écosystèmes au sein desquels ils sont les producteurs primaires. Par le phénomène énergétique de la photosynthèse, ils convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique par l'intermédiaire des pigments.

Du fait de leur complète autonomie trophique, nécessitant peu et produisant beaucoup, ces organismes intéressent, de plus en plus, les industriels, non seulement pour leur richesse nutritionnelle, ils sont une source de protéines, utilisée pour l'alimentation humaine ou animale, mais également, et surtout, par leur capacité à générer des substances à forte valeur ajoutée (les pigments, les acides gras, les polysaccharides, les composés bioactifs, les vitamines).

Le rôle de ces organismes dans la valorisation des déchets n'est pas non plus négligeable, dès lors qu'on voit fleurir des procédés de traitement d'eaux usées utilisant les algues. Les biofilms algaux sont des systèmes biologiques complexes, leur formation optimisée sur différents matériaux et leur culture offrent des avantages uniques dans les technologies de traitement des eaux usées pour la production des biocarburants, d'autant plus qu'ils offrent des effluents de qualité meilleure comparés aux procédés utilisant des cellules algales libres ou planctoniques [1, 2]

Les algues sont devenues ainsi le centre des projets de recherche pour le développement durable. C'est sous la forme fixée ou immobilisée que les algues sont les plus utilisées. Les avantages des systèmes à biofilms de microalgues sont multiples, entre autres, la production d'une concentration importante de biomasse facilement récoltable. L'intérêt grandissant des scientifiques pour l'étude de l'adhésion des cellules microbiennes et microalgales, en particulier, sur différents matériaux en vue d'un procédé d'immobilisation contrôlé permettant

d'extraire ces métabolites, sans difficulté, sans dommages pour le matériau et sans perte de biomasse, est tout à fait justifié [3].

Cependant, la mise en œuvre industrielle de la culture de ces algues en photobioréacteur, le déroulement de la croissance optimisée sous des conditions abiotiques stressantes et l'extraction de ces produits ( biofuel, les polysaccharides) peuvent être confrontés à divers problèmes d'ordre pratique liés à la culture elle-même, tels les aspects de contamination par les bactéries ou les protozoaires et l'agrégation des cellules entre elles, mais le problème majeur rencontré est celui de la fixation des cellules ou biofouling sur les supports qui pourrait engendrer des phénomènes de biocorrosion ou de biodétérioration selon le matériau en question, perte de biomasse et difficultés dans la récolte.

D'une part, l'étude de la fixation ou adhésion des microorganismes sur support peut également servir à améliorer les immobilisations de cellules et à optimiser les procédés dans lesquels elles sont impliquées, dans ce cas précis, l'adhérence des cellules microalgales sur des surfaces solides peut être économiquement rentable, par exemple lors de la récolte de la biomasse immobilisée [4] et, d'autre part, à faciliter le nettoyage des cuves en évitant l'adhésion d'algues sur les matériaux.

Donc « Biofouling » et immobilisation sont deux phénomènes liés par le facteur adhésion, comprendre le phénomène d'adhésion, c'est empêcher l'un et favoriser l'autre.

Les photobioréacteurs, environnement où a lieu la culture des microalgues, sont usinés à partir de divers matériaux, acier, PVC, verre ou d'autres matériaux qui sont élaborés ou formulés au fur à mesure des besoins de l'industrie. Ces matériaux sont choisis dans le but essentiel d'améliorer le design des photobioréacteurs pour un meilleur rendement en tenant compte des conditions de croissance des organismes photosynthétiques, en premier lieu la demande en lumière, ainsi que la lutte contre l'agrégation des cellules ou « Biofouling ». L'état de surface de ces matériaux en raison de leur utilisation répétée, ou sous l'effet de la lumière, de l'oxygène photosynthétique à long terme, peut subir des modifications pouvant favoriser ou non l'adhésion des cellules. La stérilisation peut aussi modifier les propriétés des surfaces des matériaux [5] ce qui pourrait influencer aussi le pouvoir d'adhésion des cellules.

Notre choix de travailler sur des supports en acier inoxydable vient du fait que ces éléments métalliques sont introduits dans ces photobioréacteurs. Aussi, les cultures industrielles de

microalgues utilisent des procédés, faisant appel à la présence de pièces de nature métallique telle que l'acier (sondes, agitateurs, panneaux). Les aciers inoxydables sont souvent choisis pour leurs propriétés de résistance à la corrosion. Cependant, malgré leur caractère d'inoxidabilité, ces alliages ne sont pas totalement immunisés contre la corrosion : des dégradations par piqûre ou par cavernes sont fréquemment observées. De nature électrochimique, ces formes de corrosion sont régies par l'oxygène : sa réduction sur la surface des aciers inoxydables constitue en effet « le moteur » déterminant de leur corrosion [6]. Donc, l'influence de l'oxygène natif produit par les algues sur le comportement à la corrosion des aciers inoxydables (et en particulier sur le courant cathodique) doit être pris en considération [7], car même si ce phénomène est principalement lié à la présence de sulfato-réducteurs et aux bactéries produisant de l'acide, cependant, la production des polysaccharides exocellulaires (EPS), ainsi que la respiration et l'émission de O<sub>2</sub> par les organismes photosynthétiques peuvent être en partie responsable de ce phénomène [8]

D'autre part, des études menées par Pisciotta en 2010 [9] et par McCormick en 2011 [10] ont démontré clairement qu'il y a une activité exoélectrogénique présente dans les micro-algues due à leur métabolisme photosynthétique, ce qui pourrait générer un phénomène électrochimique. Ainsi, les aciers étant des matériaux semi conducteurs, ils pourraient jouer le rôle de cathode.

De plus, certaines microalgues, surtout les microalgues bleues, ont un potentiel enzymatique qui leur permet de solubiliser des métaux dans le processus de biolixiviation [11,12]. Ce phénomène est identique au processus de biominéralisation, ce qui peut présumer une action corrosive. On doit ajouter à cela l'existence d'une hétérotrophie, c'est à dire l'utilisation de substrat organique comme source d'énergie en absence de lumière, chez certaines microalgues qui pourraient produire des acides organiques, issus de la fermentation et initier ainsi une corrosion.

Les polysaccharides extracellulaires (EPS) sont également impliqués dans la corrosion microbienne influencée (CMI), leur interaction avec le fer et autres métaux peut augmenter la cinétique de la corrosion des métaux. Les microalgues et, en particulier *Porphyridium* qui en produit beaucoup, pourraient être candidates à une action corrosive. Les conditions de culture telles que la lumière et la composition du milieu de culture peuvent aussi avoir un impact sur le comportement des aciers. Toutes ces données justifient l'intérêt de notre travail.

La bibliographie est riche quand il s'agit de biofilms bactériens, de leur modélisation, et de leur impact sur les métaux [13-19]. Par contre, il existe peu de données concernant les biofilms d'algues et leur impact électrochimique sur ces matériaux. Les quelques études rencontrées sont celles concernant les cyanobactéries [20], les chlorelles [21] et les microalgues halophiles [22, 23].

L'objectif de notre étude, est, en premier lieu, de suivre le comportement électrochimique des aciers inoxydables dans deux types de culture :

- Une culture microalgale monospécifique, mettant en croissance une microalgue rouge *Porphyridium purpureum*. C'est une souche référencée et axénique très exploitée en biotechnologie, et donc, industriellement très importante. Elle est parmi les souches microalgales les plus étudiées, sa capacité à produire en abondance des extra polysaccharides la rend intéressante.
- Une culture plurialgale contenant un consortium d'espèces de microalgues marines non identifiées pouvant se trouver en culture industrielle.

En deuxième lieu, de mettre en évidence les phénomènes d'adhésion des microalgues sur ces supports métalliques et leur impact électrochimique, de façon générale, et la biocorrosion en particulier.

A cet effet, après une introduction générale, la première partie de cette thèse sera consacrée à une synthèse bibliographique sur les différents éléments qui entrent dans cette étude : microalgues, biofilms, photobioréacteurs, matériaux et biocorrosion. Cette partie est composée de trois chapitres : chapitre I, chapitre II et chapitre III.

La deuxième partie du mémoire consacrée à l'étude expérimentale comprend quatre chapitres:

- **Le chapitre IV** qui décrit le matériel utilisé ainsi que les différentes méthodes et techniques expérimentales utilisées sous forme de généralités méthodologiques.
- Les trois chapitres suivants se rapportent à l'étude expérimentale proprement dite :

Chaque chapitre comprend une partie matériel et méthodes, suivie des résultats et discussion et enfin une conclusion.

- **Chapitre V:** Comportement électrochimique de l'acier 316L dans une culture de *Porphyridium*, en batch non contrôlée, sous photopériode 12h :12h (lumière /obscurité) et étude de l'adhésion de ces cellules (Mesure du potentiel de corrosion libre ou ouvert, suivi de la croissance de la microalgue, et la production des pigments, et étude des états de surface par microscopie électronique et métallurgique).
- **Chapitre VI :** Caractérisation de biofilms, *Porphyridium purpureum*, sur support en acier inoxydable de type 304L par Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE) et Microscopie Electronique à Balayage (MEB).
- **Chapitre VII :** Comportement de l'acier 316L dans une culture microalgale ou consortium d'algues issues d'eau de mer, sous photopériode 12h : 12h, lumière / obscurité. Cette étude a but une comparaison et une mise en évidence de l'effet d'un consortium microalgal sur le comportement électrochimique des aciers inoxydables. Des microalgues non identifiées issues de l'eau de mer ont été utilisées, pour cette ultime expérience.

Nous achèverons la présentation de ce travail par une conclusion générale et une ouverture vers des perspectives et applications possibles dans différents domaines pouvant enrichir cette étude.

# ***P***ARTIE ***B***IBLIOGRAPHIQUE



## CHAPITRE I: LES MICROALGUES

### I.1. Introduction

Avant l'apparition de la vie, l'atmosphère de la terre était riche en gaz carbonique et en méthane. C'est dans ces conditions hostiles que les premiers microorganismes sont apparus : les cyanobactéries, il y a 3,5 milliards d'années et les eucaryotes photosynthétiques, il y a 1,8 milliards d'années [24]. Ces organismes sont à l'origine de la formation de la couche d'ozone et de l'atmosphère respirable qui existe dans la biosphère.

Comme tous les organismes autotrophes et phototrophes oxygéniques, les microalgues sont capables, grâce à la photosynthèse, d'absorber le dioxyde de carbone, de libérer de l'oxygène dans l'environnement et de convertir l'énergie provenant de la lumière en une matière organique constituant la base de la chaîne trophique des autres êtres vivants. Leur place de producteurs primaires dans les écosystèmes aquatiques où ils forment le phytoplancton, fait d'eux des éléments de connexion entre le monde minéral et le monde organique. Il faut ajouter à cela que certaines microalgues sont dotées de la capacité de fixer l'azote moléculaire ce qui renforce leur autonomie trophique. En effet, de nombreuses espèces dites diazotrophes appartenant aux groupes des cyanobactéries, ont la capacité d'assimiler directement l'azote minéral atmosphérique ( $N_2$ ) en mobilisant une enzyme inexistante chez les eucaryotes photosynthétiques, la nitrogénase [25].

Les espèces marines des phylums chlorophylliens, réparties dans tous les océans (jusqu'à 150 m de profondeur), constituent une biomasse qui fournit plus de 60% de la production annuelle d'oxygène, très loin devant les plantes continentales (1 % pour la forêt équatoriale) [26, 27].

### I.2. Classification des algues

Algues, macroalgues, microalgues, cyanobactéries, cyanophycées, ces termes sont utilisés tour à tour dans la littérature pour désigner les microorganismes photosynthétiques oxygéniques. Par opposition aux microorganismes phototrophes mais anaéroxygéniques, certaines espèces bactériennes pouvant être phototrophes, autotrophes mais ne libèrent pas d'oxygène car la source d'électron est autre que  $H_2O$ .

Historiquement, la classification des êtres vivants initiée par Linné en 1735 [28], basée sur l'observation, en tenant compte des caractères phénétiques, a évolué vers la classification moderne proposée par Woese et Fox en 1977 [29], dont la principale assise est l'étude phyllogénétique, les moyens d'investigations étant plus élaborés.

Jusqu'à présent, les botanistes considèrent les algues comme étant des végétaux. Cette considération a été établie sur la base des caractères morphologiques. Ainsi, les algues ou phycophytes sont des végétaux qui, avec les fougères (pteridophytes) les mousses (bryophytes) et les champignons (Mycota) et à la limite les lichens (association de champignons et d'algues), constituent le grand ensemble des cryptogames [30]. L'appareil végétatif est appelé Thalle, c'est-à-dire, végétal sans racine ni tige ni feuille. De ce fait, elles sont classées dans le groupe des thallophytes chlorophylliens. La chlorophylle, bien que toujours présente, peut être masquée par d'autres pigments qui imposent leurs colorations.

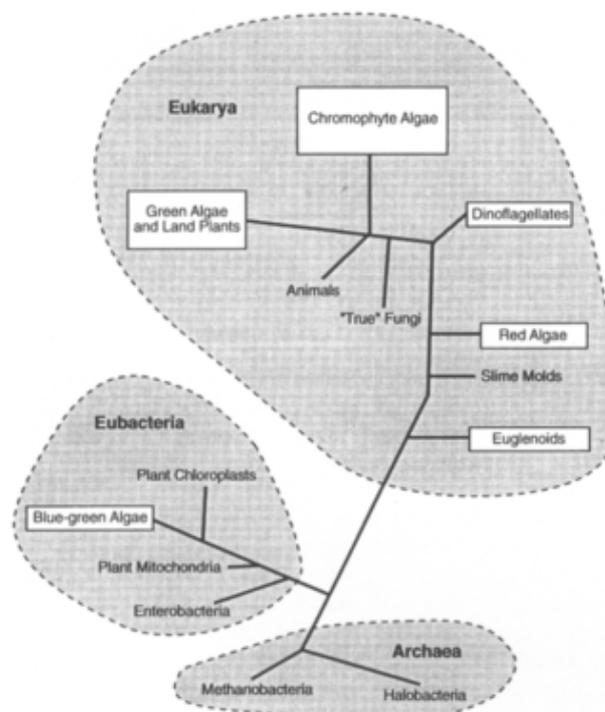
D'un autre côté, les microbiologistes les rangent dans le règne des protistes établi par Haeckel en 1866 [31]. Ils considèrent que ce sont des microorganismes du fait de l'absence de différenciation cellulaire. En effet, une même cellule effectue toutes les fonctions vitales, quelle que soit la longueur de l'appareil végétatif qu'on retrouve chez les algues pluricellulaires. L'absence de tissu différencié est une particularité qui les distingue fondamentalement des organismes supérieurs. Toutes les algues eucaryotes sont classées dans le groupe des protistes supérieurs, les algues procaryotes ou algues bleu-vert ou cyanobactéries sont rangées avec les bactéries dans les protistes inférieurs.

En définitive, les algues ont une classification mixte construite sur des espèces de microalgues eucaryotes, qui ont été caractérisées sur la base des propriétés phénotypiques comme la morphologie, l'anatomie cellulaire, l'ultrastructure, le métabolisme et la physiologie et qui ont été décrites et identifiées selon le Code international de Nomenclature Botanique, et des espèces procaryotes appartenant au groupe des cyanophyceés, qui ont été traitées par des bactériologistes selon la taxonomie des procaryotes sous la Nomenclature Bactérienne, en combinaison avec le système botanique servant de base de référence [32]. Enfin, Woese et al en 1990 [33], sur la base des caractères phylogénétiques, ont présenté une classification plus simplifiée où tous les êtres vivants sont regroupés dans trois domaines: *Archaea*, *Bacteria*, et

*Eukarya*, les algues se retrouvent à cheval entre le domaine Bacteria pour les cyanobactéries et *Eucarya* pour les microalgues eucaryotes.

### I.2.1. Classification au sein du phylum en différents embranchements

Classer les espèces au sein de ce groupe si diversifié en respectant les rangs hiérarchiques sans chevauchement n'est pas très aisé. Du point de vue taxonomique, comme pour tous les êtres vivants, la classification des algues est sujette à remaniement. L'unité de base de la systématique des êtres vivants est l'espèce. Ce taxon est souvent le plus stable, les autres rangs de la classification, famille, classe, embranchement, etc., pouvant varier en fonction des progrès des connaissances phylogénétiques. Les algues ne constituent pas un groupe évolutif unique, mais désignent toute une série d'organismes pouvant appartenir à des groupes phylogénétiques très différents [34], ce qui tend à rendre la classification de ces organismes très complexe. La figure 1 met en relief la distance phylogénétique des groupes d'algues. Cette étude étant basée l'analyse de l'ARN ribosomal, on voit que les algues vertes sont proches des végétaux supérieurs.



**Figure 1: Représentation de la parenté phylogénétique de certains groupes d'algues [35]**

**Plusieurs modèles de classification ont été proposés par les spécialistes en phycologie :**

Selon De Reviere (2002) [34], de nombreux critères, en particulier, les critères écologiques, physiologiques ou biochimiques interviennent dans la phylogénie des algues comme les structures cellulaires, le mode de nutrition, l'habitat ou même la nature et la localisation des pigments et glucanes de réserve. La position des algues dans le monde vivant a été discutée, par de nombreux auteurs et beaucoup de phylums appartenant à ces organismes ont une position encore incertaine (annexes). Malgré une extrême diversité et complexité structurale, tant d'un point de vue macroscopique que microscopique, les algues peuvent néanmoins être classées en une dizaine d'embranchements comme indiqué sur le tableau 1.

**Tableau 1 : Caractéristiques des principales lignées d'algues, d'après De Reviere [34]**

Caractéristiques			
Embranchements	Types de chlorophylle	phycobilliprotéines	Polysaccharides de réserve
<i>Bacillariophyta</i>	a,c	—	chrysolaminarane
<i>Chlorophyta</i>	a,b	—	Amidon intraplastidial
<i>Chrysophyta</i>	a,c	—	chrysolaminarane
<i>Cryptophyta</i>	d,c	PE*	amidon periplastidique
<i>Cyanophyta</i>	a	PC*PE	glycogène
<i>Dinophyta</i>	a,c	—	amidon cytoplasmique
<i>Euglenophyta</i>	a,b	—	paramylon cytoplasmique
<i>Phaeophyta</i>	a,c	—	laminarane, mannitol
<i>Rhodophyta</i>	a,d	PC,PE,APC*	Amidon florideen
<i>Xanthophyta</i>	a,c	—	Chrysolaminaranes

APC\*: Allophycocyanine PE\*: Phycoérythrine PC\*: Phycocyanine

**I.2.2. Classification sur la base de la taille de l'appareil végétatif**

La taille de l'appareil végétatif constitue un élément de différenciation entre les algues microscopiques et macroscopiques qui est extrêmement varié depuis la relative simplicité d'une cellule unique jusqu'à la complexité marquante des formes multicellulaires [36].

La taille du thalle algal varie entre 1µm à 75m. Ainsi, selon ce critère on peut diviser les algues en microalgues et en macroalgues.

- Microalgues

Le terme «micro-algues» est généralement employé dans son sens le plus étroit pour désigner les algues microscopiques eucaryotes et les cyanobactéries comprenant une série d'espèces variées de taille généralement comprise entre 0,5 µm et 1mm, invisibles à l'œil nu.

- Macroalgues

Ce terme s'emploie surtout au pluriel, macroalgues, et désigne essentiellement les algues pluricellulaires, c'est-à-dire, des algues dont l'appareil végétatif individuel (soit disposé sous forme de colonies ou filament ou formée d'une seule cellule) est visible à l'œil nu.

Ainsi, quelques algues microscopiques, donc des microalgues, sont également pluricellulaires. A l'inverse, il existe des algues unicellulaires qui sont des macroalgues. L'appellation de macroalgue sera donc restreinte à la possibilité de voir l'appareil végétatif à l'oeil nu. Les caulerpes ou les fucus sont des macroalgues.

### I.2 .3. Classification des algues sur la base des pigments

Les pigments sont des molécules qui absorbent la lumière. C'est leur première fonction, mais ils contribuent aussi lorsqu'ils sont associés aux formes des cellules algales, à enrichir la biodiversité algale en dotant cette flore de couleurs chatoyantes exceptionnelles (Figure 2).



**Figure 2:** Image représentant la diversité des formes et des couleurs des microalgues (Web1)

Les pigments qui sont présents dans les cellules algales sont de deux variantes :

- Des pigments de base représentés par la chlorophylle. Elle est de plusieurs types a, b,c, et d. Toutes les algues possèdent de la chlorophylle *a*. Malgré cette caractéristique commune, certains phylums se distinguent par la présence de chlorophylles *b* ou *d*. Les algues vertes renferment, comme les plantes supérieures et contrairement aux autres algues, de la chlorophylle *b* tandis que les algues rouges possèdent en faible quantité de la chlorophylle *d* [37].
- Des pigments surnuméraires ou accessoires associés à la chlorophylle en l'occurrence les phycobiliprotéines qui se composent de trois familles :

Les phycoérythrine (rouges), les phycocyanines (bleues) et les allophycocyanines (bleu turquoise), ce qui permet de différencier les algues par leur couleur. Ainsi, les pigments surnuméraires masquent la couleur verte des microalgues qui est initialement déterminée par la chlorophylle.

Andersen, en 1992 [38] et Cavalier-Smith en 1993 [39] reconnaissent aux pigments une valeur essentielle dans la classification des algues eucaryotes qui peuvent être classées en trois groupes majeurs : Rhodophytes (algues rouges) Chromophytes (algues brunes), Chlorophytes (algues vertes), mais pour ces auteurs, le débat sur leur sous-classification reste ouvert. Les algues bleues (cyanophytes) formeront le quatrième groupe malgré leur appartenance aux procaryotes.

Pérez en 1997 [26] divise les algues selon leur couleur en cinq groupes : les Cyanobiontes (algues bleues), les Rhodobiontes (algues rouges), les Chlorobiontes (algues vertes), les Chrysobiontes (algues brunes) et enfin les Dinobiontes (algues rousses). Il y inclut les algues bleues et partage le groupe des algues brunes en algues brunes au sens strict et algues rousses.

Nous utiliserons, indifféremment, les termes de microalgue et algue pour désigner les organismes aquatiques photosynthétiques oxygéniques. Par mesure de commodité en allant dans le sens de la simplification, nous retiendrons la classification des algues eucaryotes qui

est déterminée par trois embranchements, et les algues procaryotes rangées dans les cyanophytes. C'est la classification qui est la plus utilisée dans la littérature et qui comprend :

### **Algues rouges ou Rhodophytes**

L'association de la phycoérythrine à d'autres pigments chlorophylliens est à l'origine de la coloration rosâtre des plastes de ces algues. Les Rhodophycées sont des organismes pluricellulaires d'origine marine divisés en deux grands groupes, en fonction de leur cycle de reproduction : les Bangiophycées et les Floridéophycées. Les algues rouges sont capables de vivre et d'effectuer la photosynthèse à des profondeurs d'eau plus importantes que les algues vertes alors qu'elles ne reçoivent plus qu'une partie de la lumière du soleil. Elles possèdent aussi un appareil pigmentaire complexe et efficace leur permettant d'absorber des photons pour une très large gamme de longueurs d'onde. Ceci s'explique par les conditions naturelles en eaux profondes où elles se développent, sous les populations d'algues vertes. Nous pouvons trouver dans leur composition de la chlorophylle *a* et *d* et des phycobiliprotéines (phycoérythrine et phycocyanine) [40]. *Porphyridium purpureum* est une microalgue rouge. Ses caractéristiques seront détaillées dans le chapitre méthodologie.

### **Algues brunes ou chromophytes**

De structure généralement pluricellulaire et de dimensions très variables, la majorité de ces algues vivent en milieu marin et présentent une couleur brunâtre résultant de l'association de pigments dominants, à savoir la xanthophylle et la fucoxanthine. Au sein de ce groupe, sont classées les diatomées, d'une importante diversité de taille et de forme en fonction des espèces, se distinguent par l'élaboration d'une paroi siliceuse, la frustule. Parmi les Haptophyceae, les coccolithophoridées élaborent des structures complexes composées de carbonate de calcium [41].

### **Algues vertes ou Chlorophytes**

Elles sont de formes très variées, uni- ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles *a* et *b*. La couleur verte caractéristique des algues vertes est principalement due à la présence de chlorophylle *a* et *b* dans la même proportion que les plantes supérieures auxquelles sont associés carotènes et xanthophylles. La photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures. La plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieux marins, mais certaines espèces peuvent également se développer sur le sol [26, 42].

### **Algues bleues ou Cyanophytes**

Les cyanobactéries ont une morphologie proche des algues et sont capables de réaliser une photosynthèse oxygénique. Cependant, elles ne possèdent pas certains organites intracellulaires propres aux eucaryotes (noyau, mitochondrie, chloroplaste).

#### **I.2 .4. Classification sur la base écologique**

Cette classification se fait sur la base de l'habitat ou biotope dont sont issus ces organismes et leurs particularités physiques et chimiques. Beaucoup de propriétés biologiques sont de nature écologique car elles déterminent les relations entre organismes et environnement. Elles ont souvent une valeur taxonomique car des organismes très proches peuvent différer considérablement quant à leurs caractéristiques écologiques [36].

Les **algues marines** se retrouveront dans les eaux océaniques qui sont caractérisées par une concentration de NaCl avoisinant de 35g/l et un pH tampon alcalin. **Les algues d'eaux douces ou dulçaquicoles** sont hébergées dans les eaux continentales, eaux de surfaces ou eaux de source, très riches en éléments minéraux. **Les algues extrémophiles** [43-45] vivent dans les milieux extrêmes où les conditions abiotiques sont hostiles à la majorité des organismes vivants (pH très bas ou très élevé, forte salinité et concentration en métaux). Les algues étant des organismes qui possèdent une grande adaptation, leur présence est notée également dans les environnements terrestres relativement humides à secs, elles forment le groupe des **algues terrestres**. Elles colonisent toutes les surfaces soumises à une humidité abondante, se développant ainsi et également sur divers substrats terrestres tels que des plantes, des roches, le sol ou encore... sur les murs des bâtiments dans ce cas on les appelle **algues aérophiles ou aéroterrestres**.

La classification peut également se faire sur leur forme fixée dans le fond des écosystèmes aquatiques ou bien sur leur forme libre, elles seront qualifiées de **benthiques** dans le premier cas, de **planctoniques** ou **pélagiques** dans le second.

#### **I.3. Métabolisme des microalgues**

Les microalgues sont dotées d'un métabolisme très diversifié, qui va de l'autotrophie obligatoire à l'hétérotrophie, au mutualisme.

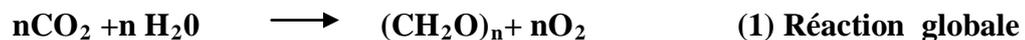
### I.3 .1 Métabolisme autotrophique et phototrophique

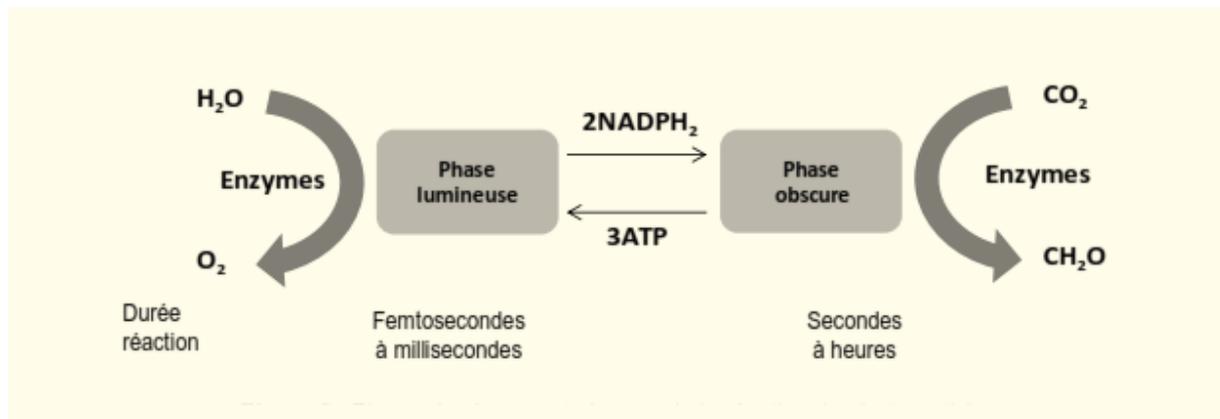
Les algues sont des organismes autotrophes, ils utilisent le carbone minéral sous forme de  $\text{CO}_2$  ou carbonate  $\text{CO}_3$  et sont essentiellement des organismes phototrophes. Par le processus de photosynthèse, ils transforment le carbone inorganique en carbone organique. La captation de la lumière se fait grâce aux pigments, principalement, la chlorophylle. Le chloroplaste est le siège de la photosynthèse chez les algues eucaryotes. Chez les cyanobactéries, elle se passe dans les thylacoïdes.

Ce processus énergétique, (schématisé en figure 3) se compose d'une série de réactions d'oxydoréduction complexes se résumant essentiellement en deux étapes :

- une première réaction dite « phase claire ou phase lumineuse » durant laquelle une réaction photochimique d'oxydation ou photolyse de l'eau se produit et qui a lieu au niveau de la membrane des thylacoïdes. Cette réaction dépend de la lumière, aboutit à la formation **d'ATP et  $\text{NADPH}+\text{H}^+$** .
- La seconde « la phase sombre ou obscure », à ce stade une réaction de réduction se produit et va permettre la fixation du carbone, grâce à l'énergie obtenue durant la phase précédente selon le « **cycle de Calvin** ». Cette réaction se situe dans le stroma. Elle est indépendante de la lumière mais cela ne veut nullement dire qu'elle se fait durant la nuit.

Le résultat de ces deux processus aboutit à la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique entraînant la production d'oxygène, de sucres et des métabolites secondaires.





**Figure 3 : Schéma représentatif des réactions de photosynthèse ayant lieu dans les deux phases [41]**

Dans les écosystèmes aquatiques, la lumière est un facteur limitant car elle ne pénètre pas au delà d'une certaine profondeur, c'est ce qu'on nomme la couche euphotique qui varie de plusieurs mètres dans les eaux continentales jusqu'à environ 200 mètres pour les eaux océaniques. La chlorophylle ne fonctionnant que dans un éventail limité de radiations, d'autres pigments assurent le relais, comme le carotène. Les caroténoïdes captent l'énergie qu'ils transfèrent à la chlorophylle.

### **I.3.2 Le métabolisme hétérotrophique et notion de mixotrophie**

La mixotrophie se définit comme étant la capacité des organismes à assimiler, à la fois, du carbone inorganique et du carbone organique. Bien que certaines espèces soient photoautotrophes obligatoires, nombreux micro-organismes classés actuellement comme les micro-algues sont en fait hétérotrophes obligatoires [46, 47] et d'autres sont capables de métabolisme hétérotrophe et photoautotrophes successivement ou simultanément [46-50]. Ce mode de nutrition qui permet l'assimilation directe des substances organiques, de façon plus ou moins indépendante de la photosynthèse et qui permet la croissance algale à l'obscurité, sur des milieux contenant des matières organiques, est connu depuis longtemps [51]. Les algues sont en effet capables d'utiliser et d'assimiler des substances organiques dissoutes [46] et même particulières par phagotrophie [52].

### I.3.3 Métabolisme symbiotique

Une relation symbiotique de type trophique entre deux organismes vivants est une association qui est bénéfique aux deux partenaires. Par exemple, une algue s'associe avec un champignon qui lui permet de se fixer sur les rochers en s'assurant des métabolites qui lui serviront de nutriments. Certaines diatomées peuvent vivre en symbiose avec des cyanobactéries pour effectuer la fixation d'azote moléculaire. Dans l'environnement aquatique naturel, les microalgues coexistent toujours avec les bactéries. Les interactions entre les micro-algues et des bactéries sont nombreuses [53]. Par exemple, en ce qui concerne l'échange  $O_2 / CO_2$  dans une interaction symbiotique, les microalgues peuvent produire  $O_2$  par la photosynthèse pour la consommation par les bactéries aérobies tandis que les bactéries libèrent  $CO_2$  qui est utilisé par des microalgues [54- 56]. D'un autre côté, les algues et les bactéries peuvent également entrer en compétition pour les nutriments [57]. Le phytoplancton et les bactéries présentent des relations complexes pouvant aller de la symbiose au parasitisme [58].

### I.4 .De l'intérêt industriel de la culture des algues

La littérature concernant l'application industrielle des microalgues est abondante en raison de l'intérêt pour ces micro-organismes qui a considérablement augmenté au cours des dernières décennies [59-65]. Leur rapidité de croissance proche de celle des bactéries et leur production en biomasse qui est considérable comparée aux végétaux supérieurs en fait d'excellents outils d'exploitation industrielle.

Les microalgues et cyanobactéries s'affirment comme une bioressource végétale nouvelle et prometteuse dans un grand nombre d'applications, allant de la production de pigments et d'acides gras polyinsaturés à celle de biocarburants, en passant par celle de fourrage pour écloseries de poissons ou de dépollution d'effluents industriels gazeux (fixation de  $CO_2$ ) ou liquides (fixations de nitrates, phosphates, métaux...), compte tenu de leurs applications attrayantes dans les secteurs pharmaceutique parapharmaceutiques et de nombreux autres domaines [59, 63, 65]. A travers cette littérature on peut recenser plusieurs domaines d'application où les potentialités métaboliques des algues sont exploitées, actuellement.

**Dans le domaine environnemental et bioénergie :** Domaine de prédilection où les scientifiques s'évertuent à trouver des solutions peu coûteuses et productives pour pallier

aux problèmes de la pollution : éradication des pollutions et valorisation des déchets sont deux objectifs souvent recherchés dans un environnement intoxiqué.

Les microalgues sont utilisées dans le traitement des eaux usées, soit sous forme de biomasse morte dans ce cas, on utilise des parties de la cellule algale comme la paroi, qu'on assimile à un « biomatériau ». C'est le phénomène d'adsorption largement appliqué dans les procédés d'éliminations des métaux par exemple. Soit exploiter la propriété que possèdent certaines espèces microalgales, en milieu aquatique, d'accumuler ou concentrer un polluant dans leur cytoplasme : c'est le phénomène de **bioaccumulation**. La cellule algale peut aussi par un processus passif provoquer l'adsorption des métaux c'est le phénomène de **biosorption**.

La biomasse vivante est utilisée sous forme de culture pour une transformation ou biotransformation (**valorisation**) d'un composé indésirable en une ressource énergétique comme les biocarburants.

Dans la gestion des ressources en eau, les algues sont utilisées comme un indice biologique ou indicateur qui permet le contrôle de qualité de l'eau car ils sont sensibles aux changements environnementaux [66]. Les diatomées s'avèrent être de bons indicateurs de pollution par les métaux, Ce sont des espèces indicatrices positives (espèce sentinelle) qui prolifèrent dans les eaux riches en métaux et peuvent être utilisées lors des tests de biosurveillance.

**Dans le domaine pharmaceutique, parapharmaceutique et cosmétique :** Plusieurs extraits de microalgues se retrouvent dans le marché de la cosmétique, par exemple, l'astaxantine qui a été reconnue pour ses propriétés protectrices à base de lipides (crèmes et lotion) qui peuvent bénéficier d'extrait de microalgues pour ses propriétés nutritives et protectrices. De plus, les extraits de microalgues sont utilisés pour pigmenter les produits cosmétiques [67, 68].

**Dans le domaine de l'agriculture :** les algues sont utilisées comme fertilisants en particulier les espèces fixatrices d'azote.

### **I .5. Effet délétère des algues**

Les microalgues ne sont pas que des organismes beaux et bénéfiques dont on peut extraire des molécules bioactives à intérêt médical. Elles peuvent avoir des effets néfastes sur la

santé des êtres humains et des animaux. Une prolifération rapide et massive des algues à la surface des écosystèmes aquatiques dans des conditions environnementales favorables à leur développement peut occasionner le phénomène de « **bloom** » ou eaux colorées.

Bien que les blooms puissent se produire naturellement et fassent partie du cycle annuel de développement des algues, certaines algues peuvent produire des blooms nuisibles.

En particulier, les cyanobactéries peuvent former des masses et écumes vertes toxiques flottant sur la surface de l'eau et pouvant atteindre une épaisseur de plusieurs centimètres le long des bords du plan d'eau. Environ 6 % de la flore phytoplanctonique, sont capables de produire des toxines, libérées dans le milieu (**exotoxines**) ou piégées dans la cellule (**endotoxines**) [67].

## **I.6.Conclusion**

Malgré leur exigence vis-à-vis de lumière et l'humidité, les microalgues sont des microorganismes unicellulaires, largement distribués dans l'environnement aquatique qui se sont adaptés à des environnements différents avec une grande diversité de taille de forme et de couleur et de potentiels métaboliques. Il est possible de trouver différentes variétés d'algues sur le sol, dans l'air, dans la glace et même en éléments anthropiques telles que les façades des bâtiments. On les rencontre aussi dans les eaux saumâtres et très salées et certains milieux extrêmes. Cette diversité importante est difficile à évaluer.

### **Combien d'espèces existent actuellement à l'échelle de la planète? Quelle est la proportion de valorisation des microalgues ?**

Il serait vain de vouloir évaluer le nombre d'espèces existant sur la planète bleue néanmoins quelques spécialistes ont tenté de le faire. Guiry en 2012 [68] dans son écrit avance qu'il existe approximativement 30 000 espèces de microalgues découvertes et identifiées et une estimation de 70 000 possibles. Alors que pour d'autres auteurs tels que Andersen et al , 1997 [69] et Sharma and Rai, 2011 [70], ce groupe rassemblerait plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions d'espèces selon leur estimation, parmi lesquelles 47000 espèces sont décrites.

En dépit de l'intérêt commercial ( voir annexe1) qu'on accorde à ces organismes et leur utilité dans la production de métabolites à valeur ajoutée, il faut souligner, cependant que le nombre d'espèces qui sont valorisées est restreint. il s'évalue à quelques dizaines d'espèces appartenant essentiellement aux genres, *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunalliena*. Il reste beaucoup d'espèces possédant un potentiel métabolique intéressant qui n'ont pas été identifiées encore et physiologiquement caractérisées, leur potentiel attend une exploitation dans la production de biomolécules de grande valeur biotechnologique [71- 74].

## CHAPITRE II: LES BIOFILMS MICROBIENS

### II.1. Introduction

La formation de biofilms concerne tous les milieux naturels qu'ils soient aquatiques (aquifères, lacs, rivières, mers) ou simplement humides ainsi que les tissus vivants (tissus épithéliaux, dents, racines...), les biomatériaux médicaux (ustensiles médicaux, prothèses...), les dispositifs industriels et sanitaires (climatiseurs, réseaux de distribution d'eau potable, coques de navire...). Les façades de bâtiments, sur les roches, les pierres et les sédiments. Leur développement est souvent associé à de lourds enjeux sociétaux : dégradation des installations portuaires, bio-salissures des coques de navire, contamination des équipements des industries agroalimentaires et des réseaux d'eau potable, infections nosocomiales, etc. Un biofilm peut être formé par une seule espèce bactérienne (ex. modèle à *Pseudomonas aeruginosa*) ou former un assemblage diversifié de microorganismes eucaryotes unicellulaires hétérotrophes ou photosynthétiques [50,75].

Le terme biofilm désigne initialement les bactéries fixées. La recherche sur les biofilms bactériens est plus avancée que celle concernant les biofilms de microalgues car ils ont été découverts plus tôt. Leur action dans le domaine médical (biofilms pathogènes) et dans le domaine de la biodétérioration des matériaux, principalement, la biocorrosion (bactéries sulfato-réductrices) n'est plus à démontrer, et cela, suite à leur effet plus remarquable, qui est dû surtout à la rapidité de leur croissance. Le temps de génération de la majorité des bactéries étant plus court que celui des microalgues.

Pour notre part, nous nous sommes focalisés sur la compréhension de la formation de biofilms algaux ; ceux-ci étant peu étudiés, nous allons nous appuyer sur les modèles concernant les biofilms bactériens pour faire ressortir les similitudes et les différences existant entre les biofilms issus de ces deux groupes de microorganismes, tout en sachant que bactéries et microalgues peuvent cohabiter et se retrouver dans un même biofilm, et que les microalgues sont des eucaryotes à l'exception des cyanobactéries qui sont des procaryotes.

Toute surface ou support, au départ stérile, immergé dans un milieu aqueux ou relativement humide, est spontanément colonisé par des formes vivantes qui vont s'arranger en amas présentant une architecture ou structure bien définie et s'agglomérer par le biais de polysaccharides exocellulaires. Ce microécosystème va évoluer et arriver à un stade de stabilité permettant à tous les éléments de former une entité. Ces éléments qui sont au nombre de trois: microorganisme ou macroorganisme, surface inerte ou vivante ou matériau et milieu vont interagir pour former un biofilm, celui-ci est le plus souvent spécifique et dépendant de ces trois paramètres.

Les termes associés au biofilm sont **adhérence, adhésion, bioadhésion, attachement**. Ils signifient pratiquement la même chose. Tous démontrent l'action de la fixation cellulaire et l'aspiration à un état sessile stable « préféré » par les microorganismes par rapport à l'état planctonique ou libre.

Le **biofouling** ou **fouling**, terme anglo-saxon, est aussi une appellation du biofilm, mais qui a une consonance négative car il suggère à priori l'action néfaste des biofilm. En langue française, le terme de biosalissure ou salissure biologique est souvent utilisé. **Le microfouling** est utilisé lorsque le biofilm se trouve à un stade primaire et est composé d'organismes microscopiques bactéries champignons diatomées microalgues ou des larves d'invertébrés. **Le macrofouling** désigne un biofilm qui a évolué vers un stade secondaire. Il comprend des macroorganismes, macroalgues, invertébrés.

Le terme **immobilisation**, ou système cellulaire fixe, issu du concept du **biomimétisme**, ou de **bioinspiration**, est une application directe de l'adhésion naturelle exploitée dans les procédés industriels en vue d'un meilleur rendement.

## II. 2. Définition et historique

Le terme biofilm est un terme anglo-saxon signifiant pellicule biologique la forme sessile ou fixée est préférée par les microorganismes (bactéries, algues, champignons), la forme planctonique ou libre étant un état transitoire.

Characklis en 1990 [76] définit le biofilm comme étant une communauté microbienne adhérente à une surface et fréquemment incluse dans une matrice de polymères exocellulaires qui serait un ciment permettant la fixation des cellules entre elles et sur la surface. Cette matrice est aussi appelée couche muqueuse ou polysaccharides extracellulaires. Cette définition a été appliquée surtout aux biofilms bactériens ou procaryotes et s'est étendue aux eucaryotes.

Comme toute notion scientifique ou idée, la notion de biofilm a un historique. Le concept de biofilm a émergé et coïncidé avec l'expérience de Henrici en 1933 [77], qui permit à ce scientifique de décrire des communautés bactériennes fixées sur des lames. Il émit alors l'hypothèse que la plupart des bactéries vivant en milieux aqueux et étant en contact avec un support sont organisées sous forme de communautés sessiles attachées à une surface, et non pas sous forme planctonique. Ensuite, cette hypothèse a évolué avec les travaux de Zobell qui confirma vers 1935 [78] que les substrats solides immergés dans un milieu marin, favorisaient le développement des bactéries sur leur surface.

Enfin en 1978, Costerton [79] et son équipe proposèrent les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des micro-organismes. Ils proposèrent pour la première fois le terme de « biofilms » en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des micro-organismes.

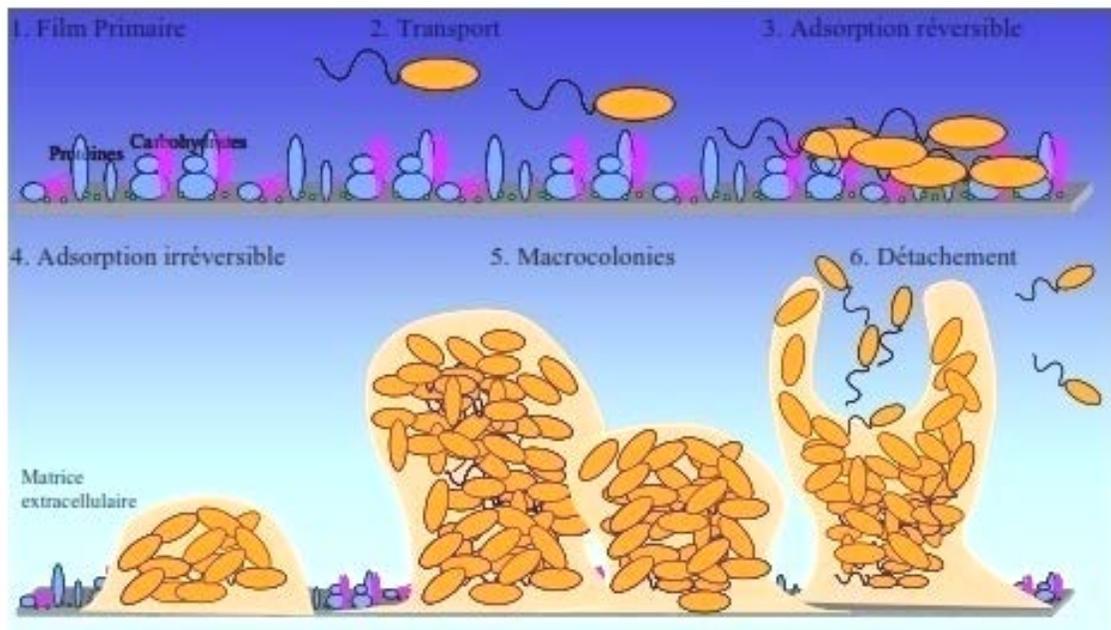
## **II. 3. Les biofilms bactériens**

### **II. 3. 1. Mécanismes de formation des biofilms**

Le modèle de formation des biofilms rapporté généralement dans la bibliographie est bactérien (Figure 4) car pour ces microorganismes la littérature est très riche. Plusieurs modèles ont été décrits suivant le milieu d'immersion, mais les étapes essentielles qui sont souvent rapportées sont les suivantes. :

- Formation du film primaire ou film conditionnant ;
- Déplacement du microorganisme vers la surface du support ;
- Adhésion réversible, adhésion irréversible ;
- Croissance ou maturation ;

- Détachement ou migration ou érosion.



**Figure 4 : Représentation schématique de la formation de biofilms cas d'une monoespèce [76]**

### II. 3.1. 1 .Film primaire

La première étape de la constitution du biofilm débute avec la mise en place de ce que l'on appelle le film primaire ou film conditionnant. Dès les premiers instants d'immersion du matériau, celui-ci réagit avec le milieu d'immersion, des substances chimiques soit organiques soit minérales ou les deux, vont s'adsorber sur la surface du support et préparer la fixation des microorganismes.

Très tôt ce « film » a été décrit par Zobel en 1943 [80], cet auteur montra que de très faibles quantités de nutriments organiques s'adsorbent sur le verre qu'il a utilisé comme support et que cette concentration de matière organique favoriserait la formation de communautés bactériennes fixées sur les surfaces.

D'origine chimique, le film primaire, est composé de macromolécules dont la composition varie avec le milieu d'immersion, de la nature du matériau et du microorganisme [81-84]. Si on considère que l'adhésion d'un microorganisme sur une surface donnée résulte des forces d'attraction- répulsion qui existent entre le matériau inerte et le vivant, on peut supposer que le

film primaire modifie les propriétés physicochimiques de surface de façon à influencer l'adhésion des microorganismes.

### **II.3.1.2. Déplacement du microorganisme vers la surface du support**

Pour qu'un microorganisme adhère à une surface, il faut qu'il soit à sa proximité. Grâce à ce rapprochement, les forces d'attraction qui s'établissent entre le microorganisme et le matériau vont augmenter, et favoriser le contact et, ensuite, l'adhésion. Le déplacement du microorganisme vers la surface se fait de plusieurs façons: si le microorganisme est doté d'appareils locomoteurs (pili, flagelle) il se déplacera grâce à ces appendices, c'est un mouvement actif et orienté vers la surface. Dans le cas contraire, c'est-à-dire lorsque ces microorganismes sont immobiles, ils suivent le mouvement du fluide dans lequel ils sont en suspension (mouvement brownien, sédimentation, écoulement) [85]. Dans le premier cas, il y a dépense d'énergie. Dans le deuxième cas, c'est un mouvement passif qui ne nécessite pas d'énergie.

### **II. 3. 1. 3. Adhésion réversible, adhésion irréversible**

L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement. L'état planctonique pourrait se réduire au passage de la bactérie d'une surface à l'autre [86]. Cette étape est très importante. C'est d'elle que dépend la fixation des cellules qui, en s'accumulant, vont construire le biofilm qui devient ainsi une entité ou unité. L'adhésion peut être de deux types soit réversible soit irréversible.

La distinction entre les deux phases vient du fait que les cellules s'adsorbent sur la surface pour un certain temps et ensuite certaines peuvent se détacher sous l'influence de facteurs physiques, chimiques ou biologiques, l'adsorption réversible faisant appel à des forces de liaisons plus faibles que celles concernant l'adsorption irréversible [76]. Il semblerait que la différence entre le phénomène d'adhésion réversible et irréversible soit de nature génétique. Davies et al. en 1993 [87] et Lejeune en 2003 [88] ont stipulé que le phénomène d'adhésion agirait sur le potentiel génétique des cellules. Par leurs études, ces auteurs ont montré que des gènes seraient activés à la suite du contact entre une bactérie et la surface montrant un état physiologiquement différent entre une bactérie en suspension et une bactérie adhérente.

#### **II.3.1.4. Croissance et maturation du biofilm**

Aussitôt que les cellules consolident leur adhésion sur le support par le phénomène d'adhésion irréversible, il se produit une multiplication au sein du biofilm ce qui aboutit à la formation de microcolonies ; ces microcolonies vont s'organiser en plusieurs unités de façon à former un micro écosystème fonctionnel grâce à un flux d'énergie et de matière. Ces micro-colonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm et, d'autre part, d'évacuer les déchets. Le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'exopolysaccharides et être utilisé par les bactéries. Un gradient de nutriments et d'oxygène est observable depuis le sommet du biofilm jusqu'à sa base où l'on a un micro-environnement anaérobie. Cette observation conforte l'idée selon laquelle l'état métabolique d'une bactérie à l'intérieur d'un biofilm dépend de sa localisation au sein de la structure [86].

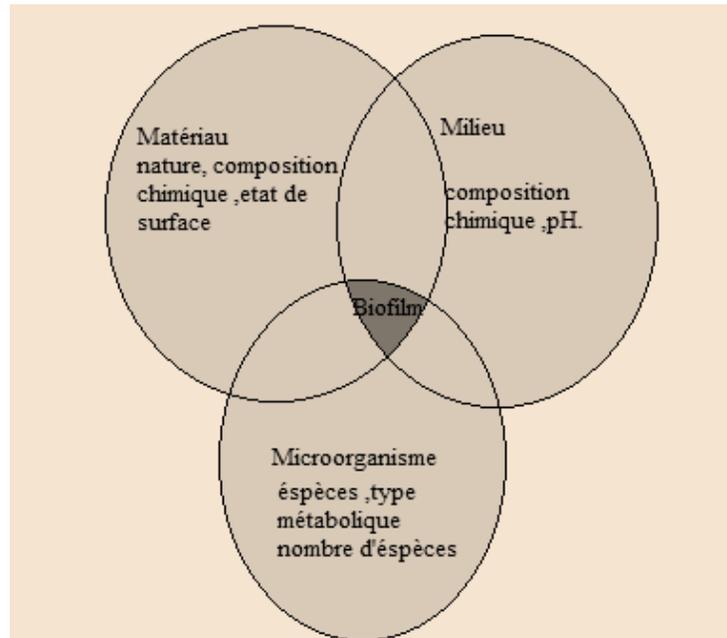
#### **II. 3. 1. 5. Décrochement ou détachement des cellules**

Une fois le biofilm mature formé, il doit être capable, par sa cohésion interne et l'adhérence à la surface du substrat, de résister aux forces de détachement. Parfois les biofilms se détachent en partie à cause d'une adhésion insuffisante. Si les forces entre le biofilm et la surface du substrat, par l'organisme adhérent au départ, sont faibles, un biofilm entier peut se détacher dans des conditions environnementales de cisaillement [89].

Au sein du biofilm, les cellules peuvent communiquer entre elles en libérant des molécules dans le milieu ou en détectant des molécules libérées par d'autres cellules ; ce phénomène de communication est appelé "Quorum sensing" et permet de réguler la densité de population. Ce mécanisme a été découvert chez la bactérie marine *Vibrio fischeri* [90, 91]. Ce quorum sensing existe chez beaucoup d'autres espèces bactériennes. Ce phénomène est comparable à l'effet de masse décrit par les écologistes, système de régulation dans les populations, lorsque l'effectif arrive à une valeur maximale et que le territoire est surexploité, il y a migration d'une partie de la population.

#### **II.3.2. Influence des facteurs sur l'adhésion des cellules**

A partir de travaux antérieurs, nous pouvons proposer un schéma en figure 5 montrant les différents paramètres mis en jeu lors de la formation du biofilm.



*Figure 5 : Schéma montrant les facteurs qui influent sur l'adhésion des microorganismes*

### II.3 2.1. Le matériau

Le substrat ou surface va agir par ses caractéristiques, c'est-à-dire, sa composition chimique, l'état de sa surface et son hydrophobicité.

- La composition chimique : Il a été montré que la composition chimique d'un substrat métallique influence le taux de formation du biofilm et la distribution des cellules au sein de ce microfouling, dans l'eau de mer pendant les premières heures d'exposition [92].
- La rugosité des matériaux : Par définition, la rugosité est l'ensemble des irrégularités d'une surface à caractère micrographique et macrographique. Généralement, les surfaces usinées, ne sont pas parfaites elles présentent des irrégularités dues aux procédés d'obtention, de fabrication, aux outils ainsi qu'à la matière. L'influence de la rugosité du support sur la capacité d'adhésion des bactéries est un facteur qui est très discuté dans la littérature, il est objet à controverse on ne sait pas exactement si une forte rugosité d'un matériau favorise l'adhésion des microorganismes par rapport à une surface moins rugueuse.

Pedersen et al. en 1990 [93] ont comparé le développement de biofilms sur des échantillons d'acier inoxydable présentant différents états de surface, exposés à de l'eau potable municipale après 167 jours. Ils constatent qu'un acier inoxydable mat rugueux était 1,4 fois plus recouvert de micro-organismes que l'acier électro poli. Selon ces auteurs, ces surfaces rugueuses possèdent une surface active plus importante et protègent les cellules des forces de cisaillement dues à l'écoulement.

En revanche, pour d'autres auteurs, la rugosité permet de réduire la surface de contact entre le micro-organisme et le support, favorisant ainsi son détachement [94].

Certains auteurs rapportent que la rugosité des matériaux influence l'adhésion au-dessus d'une valeur de rugosité moyenne de  $0,9\mu\text{m}$  [95]. D'autres auteurs tels que Scheuerman et al. en 1998 [96], affirment, qu'au dessus de  $10\mu\text{m}$ , la rugosité n'a plus d'influence sur l'adhésion. Pour ces auteurs, il apparaît alors, que, pour que la rugosité influence l'adhésion des micro-organismes, la valeur de la rugosité moyenne du support doit être de l'ordre de grandeur du diamètre de l'élément biologique étudié.

### **II.3.2.2. L'environnement**

Le milieu ou l'environnement où vit le microorganisme est défini par l'ensemble des facteurs abiotiques qui conditionnent la croissance du microorganisme (pH,  $\text{O}_2$ , composition chimique, etc.) et par conséquent influencent aussi le taux d'adhésion des cellules sur les matériaux.

### **II.3 .2.3. Le microorganisme**

Le microorganisme agit par son métabolisme par ses propriétés de surfaces, par sa morphologie, par sa taille par sa phase de croissance.

## **II.4. Les biofilms algaux**

Dans les biofilms polymicrobiens formés dans les milieux ouverts, les algues sont citées accessoirement, mais l'intérêt pour la culture des algues et leur potentiel biotechnologique a incité les chercheurs à mieux comprendre les biofilms formés par les algues. Plusieurs

appellations sont utilisées pour désigner les biofilms formés à partir de cellules algales ou communautés algales fixées : « **tapis algal** », « **colonie** », « **mat** » ces termes ont été souvent rapportés [97]. Mais c'est le terme de biofilm qui a été le plus souvent utilisé [98-103].

On retrouve dans la littérature le terme de « biofilm photosynthétique » très bien défini par Callow en 2000 [104] qui s'applique à une communauté hétérogène et complexe, comprenant non seulement des organismes autotrophes photosynthétiques mais aussi des hétérotrophes, se fixant sur une surface qui reçoit suffisamment d'humidité et de lumière. Au sein de ces biofilms, les microalgues sont dominantes surtout les algues brunes appartenant au groupe des Diatomées.

#### **II.4 .1. Mécanismes d'adhésion des microalgues, biofouling et immobilisation**

Le mécanisme d'adhésion et la formation des biofilms microalgaux a été étudié surtout chez les diatomées. Ces microalgues étant responsable de biofouling en milieu naturel et se trouvant dominantes dans les biofilms aquatiques générateurs de biocorrosion, les scientifiques se sont focalisés en premier lieu sur la compréhension du rôle de ces microalgues, et, en deuxième lieu, sur celui des autres espèces microalgales, le plus souvent, accompagnatrices des diatomées qui sont les microalgues vertes ou chlorophycées.

Le premier intérêt de l'étude de l'adhésion des diatomées est dirigé vers une lutte contre les salissures ou anti fouling. Par ailleurs, l'intérêt croissant pour l'exploitation commerciale des microalgues et l'utilisation des procédés d'immobilisation dans les cultures industrielles pour les optimiser a fait que la recherche fondamentale sur les mécanismes d'adhésion des microalgues s'est développée et a été orientée vers l'étude des facteurs qui favorisent cette adhésion ainsi que sa nature réversible ou irréversible.

L'immobilisation des microalgues a été étudiée pour différentes espèces algales sur des supports de différentes natures [105-107]. Peu d'articles rapportent des phénomènes d'immobilisation de microalgues sur des aciers mais certains font état des phénomènes d'adhésion de diatomées ou de chlorelles sur des aciers inoxydables [108 -111].

Les paramètres qui influencent l'adhésion des cellules microalgales sont principalement l'hydrophobicité du substrat et celle de la cellule, l'âge et la concentration cellulaire, ainsi que les conditions de culture (disponibilité nutritionnelle, régime d'écoulement, conditions physicochimiques : pH, concentration en oxygène, présence de bactéries...) [110].

Pirt et Walach en 1978 [113] ont noté que les cellules microalgales appartenant à l'espèce *Chlorella* adhèrent plus fortement aux parois du bioréacteur lorsque la concentration en fer est limitante par défaut. L'adhérence des cellules d'algues est censée impliquer la sécrétion de substances polymériques extracellulaires [113, 114].

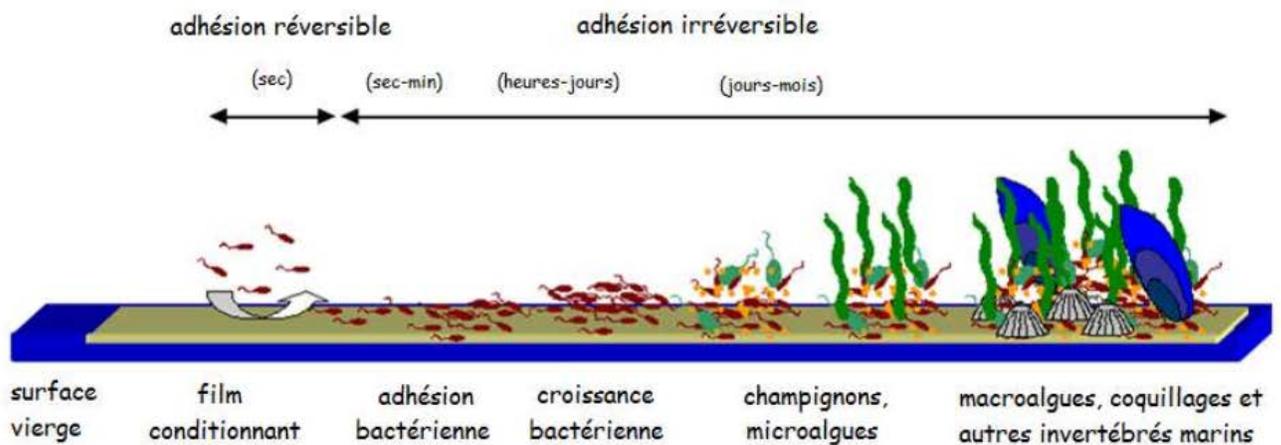
## **II.4.2. Formation des biofilms d'algues dans différents milieux**

### **II.4.2.1 .Dans les milieux ouverts**

Dans la nature, le support ou substratum peut être une roche, des sédiments, une coque de bateaux, un support métallique une façade etc. .... Ainsi la formation de biofilms phototrophes concerne tous les milieux aquatiques naturels (aquifères, lacs, rivières, mers). Généralement, la présence d'une espèce donnée est régie par un intérêt trophique ou métabolique si bien qu'il existe une évolution ou une dynamique dans ce biofilm selon la libération de métabolites et les modifications qui ont lieu à la surface des supports. Les espèces qui sont nombreuses (bactéries, algues, champignons, protozoaires) se mettent en place avec une succession qu'on retrouve dans n'importe quelle colonisation d'un milieu donné. On pourrait croire que la première espèce ou espèce pionnière qui colonise une surface la « viabilise » pour la suivante par des modifications chimiques et physiques. La colonisation d'un support par les microorganismes est comparable à celle qui a lieu dans un écosystème où il y a une succession de populations qui est dépendante des facteurs abiotiques et biotiques.

Le biofilm peut être composé soit d'un nombre limité d'espèces microbiennes soit d'une très grande variété d'organismes comme les bactéries, champignons, algues, levures et parfois même des petits protozoaires et métazoaires. Les microorganismes qui composent le biofilm peuvent avoir une diversité phénotypique et génétique qui leur assure un avantage évolutif et un avantage écologique par rapport aux communautés suspendues [115].

Il est clair, que dans un biofilm en milieu ouvert, qui est une microniche ou microcosystème fonctionnel, il existe une cohésion trophique et métabolique. Plusieurs espèces de microalgues sécrètent des acides organiques et sont des producteurs primaires des nutriments qui sont nécessaires pour soutenir les autres espèces de salissures [50]. Les algues étant des organismes photosynthétiques peuvent alimenter les organismes aérobies en oxygène au sein du biofilm .



**Figure 6 : schéma représentant un biofilm marin ou macrofouling [19]**

La Figure 6 illustre bien la formation d'un biofilm hétérogène en fonction du temps dans un milieu marin qui est, tout à fait, représentatif d'un milieu ouvert. Ce biofilm se compose, généralement, de plusieurs espèces ou consortium retenues par des polysaccharides. Les polysaccharides ou mucilages sont hygroscopiques, retiennent l'eau et entraînent également une élévation du taux d'humidité du matériau sous-jacent, propice à l'accélération du processus de colonisation par d'autres organismes. En outre, la croissance d'algues et de cyanobactéries s'accompagne de la production de déchets cellulaires nécessaires au développement de communautés hétérotrophes, telles que des champignons [50]. Le biofilm, au départ, est constitué d'espèces bactériennes et forme le microfouling. Les principaux micro-organismes eucaryotes d'origine marine salissants sont les diatomées, les champignons et les protozoaires et les organismes dominants sont les diatomées. Ensuite, le biofilm évolue vers le macrofouling dont

les composants les plus importants sont des espèces aquatiques telles que les crabes, les polychètes, les macroalgues et les moules [116].

#### **II.4 .2.2. Dans les milieux clos industriels**

Un milieu clos où a lieu la culture industrielle peut s'apparenter à un bioréacteur ou fermenteur, lorsqu'il s'agit de culture hétérotrophique; photobioréacteur, espace de culture des organismes photosynthétiques. Quel que soit l'objectif recherché, soit production de biomasse soit de métabolites. Le nombre d'espèces est très restreint surtout lorsqu'il s'agit d'un milieu clos ainsi dans les cultures industrielles, ce biofilm sera composé de cellules appartenant à une seule espèce ou deux dans le cas des cultures mixtes ou non axéniques. Dans le cas de ce type de cultures, que ce soit en batch, ou croissance en continu, on peut présumer que les facteurs environnementaux existant, étant des facteurs de stress, le plus souvent, il s'agit de cultures optimisées et modélisées, vont agir sur la formation de biofilms.

**On peut se poser la question si dans le cas des cultures mono spécifiques, les cellules pionnières sont différentes des cellules qui viennent après, ces cellules agissent elles physiquement ou chimiquement ?**

#### **II.5. Conséquences de la formation du biofilm sur les matériaux**

L'action d'un biofilm sur un matériau donné est difficile à comprendre et à cerner car, le biofilm étant construit sur une entité vivante qui est caractérisée par un métabolisme, le plus souvent versatile, il existe une dualité d'action, c'est-à-dire, qu'un même organisme peut avoir deux actions contradictoires : il peut détériorer ou protéger un matériau selon les conditions du milieu.

**Deux phénomènes sont décrits dans la littérature, pour définir l'impact négatif des microorganismes sur les matériaux, le phénomène de biocorrosion, et le phénomène de biodétérioration :**

Le phénomène de corrosion ou de détérioration des matériaux immergés dans un milieu aqueux est de plus en plus associé au vivant c'est-à-dire aux microorganismes et à leurs activités

métaboliques. La biocorrosion ou CMI est définie par Guézennec en 1993 [16], comme étant la corrosion induite par les micro-organismes et peut être définie comme la conséquence de la présence physique et de l'activité d'une grande variété de micro-organismes sur les surfaces, selon des mécanismes faisant appel, soit à une action directe (production de métabolites agressifs), soit à une action indirecte (intervention au niveau de réactions d'oxydo-réduction). En se plaçant au niveau électrochimique, la présence d'un biofilm sur les surfaces métalliques modifie les potentiels et le plus souvent il se produit un ennoblement. La biocorrosion serait attribuée à un effet de catalyse de la réaction cathodique ou anodique provoquée par les biofilms, notamment par des enzymes, modifiant la cinétique des réactions électrochimiques à l'interface biofilm-métal [117]. Ce phénomène peut avoir lieu en milieu anaérobie ou en présence d'oxygène .

Le problème de la biocorrosion ou CMI ayant pour origine la présence des microorganismes touche des secteurs d'activités divers, et les installations industrielles susceptibles d'être détériorées sont nombreuses: l'industrie pétrolière (puits d'extraction, oléoducs, pipeline), l'industrie navale, la pêche, la géothermie, l'aérospatial (réservoirs de kérosène), l'industrie nucléaire (échangeurs, circuits de refroidissement, circuits d'incendie, stockage des déchets, que ce soit en surface ou en site profond), l'industrie agroalimentaire, ...et, de façon générale toutes les installations qui sont dans un milieu aqueux non stérile.

Cet aspect de la biocorrosion a été largement traité, en milieu naturel (eau marine, eau douce) dans la littérature, mais souvent les auteurs parlent de biofilms bactériens, les microalgues ne sont citées qu'accessoirement. Or, il n'existe pas de biofilm strictement bactérien dans un milieu ouvert et chaque espèce qui vit dans cette communauté a un rôle bien défini. Dans les biofilms aquatiques, on pourrait penser que les algues servent uniquement à restaurer le déficit en oxygène du aux microorganismes aérobies par le biais de la photosynthèse. Mais elles peuvent aussi avoir un rôle direct sur les substrats métalliques car elles possèdent un potentiel enzymatique qui leur permet de solubiliser les métaux dans le processus de biolixiviation [11,12]. Nous verrons plus loin toutes les possibilités qui pourraient induire le phénomène de biocorrosion des matériaux par les microalgues.

Dans les cultures industrielles, les problèmes liés à la biocorrosion ont été largement rapportés lorsqu'il s'agit de cultures bactériennes, surtout dans les fermenteurs afin de lutter contre la détérioration des matériaux due aux produits de fermentation [95, 118]. Un grand nombre de travaux ont démontré que dans les procédés agroalimentaires, les équipements peuvent être une source de contamination des produits alimentaires obtenus [5].

Mais comme on l'a dit précédemment, il existe des espèces bactériennes qui peuvent protéger les matériaux et peuvent être un allié dans la lutte contre la biocorrosion. Un autre phénomène non moins important qui a été décrit dans la littérature est l'effet électroactif des cellules microbiennes sur les matériaux qui a permis la valorisation des biofilms. Ainsi des micro-organismes assemblés en biofilms présentent plusieurs propriétés dont découle l'électroactivité, c'est-à-dire, la capacité de catalyser le transfert d'électrons entre les cellules et leur support [119].

## **II.6. Action des biofilms et impact électrochimique des microalgues sur les matériaux**

### **II. 6.1. Action corrosive et ennoblement du potentiel de corrosion**

L'action corrosive des microalgues comme pour les bactéries pourrait être due à la présence de métabolites, d'oxygène, d'enzymes (ex : hydrogénase). C'est une action directe, ou indirecte, les microalgues pouvant favoriser la croissance des bactéries de la biocorrosion.

Ainsi  $H_2O_2$ , est un puissant oxydant, qui a une grande part dans l'ennoblement des aciers inoxydables immergés dans les eaux marines et douces. Or dans les biofilms marins, les niveaux de concentration de peroxyde d'hydrogène produit sont très élevés. Cette concentration élevée en  $H_2O_2$  ne peut pas provenir de la seule réduction de l'oxygène dissous dans l'eau de mer. Il a été mentionné que des organismes marins tels que des phytoplanctons, ou des bactéries, sont capables de produire de telles espèces par réduction d' $O_2$ : la présence de microalgues sur les surfaces recouvertes de biofilm conforte cette hypothèse. La quantité de peroxyde d'hydrogène détectée dans les biofilms est suffisante pour provoquer des transformations des oxydes de surface, responsables alors de l'augmentation du potentiel d'abandon et de l'accélération de la cinétique de réduction d' $O_2$  [6].

Terry et al. [121] et Edyvean et Moss [122] ont abordé le sujet de la présence des microalgues dans un biofilm marin, sur des substrats métalliques où ils ont constaté le phénomène de biocorrosion ou un ennoblement du potentiel de corrosion, ces microalgues sont des diatomées et beaucoup d'auteurs après eux y font référence [6,14, 15, 17,123 ,125].

Marconnet en 2007 [125] a rapporté aussi la présence de ces microalgues au niveau des biofilms d'eau douce générant un ennoblement des aciers pouvant aboutir au phénomène de biocorrosion.

Malgor et al.en 1998 [20] ont étudié le comportement du fer et du cuivre dans une culture de *Spirulina platensis*. La culture de cette souche requiert une température de croissance optimale supérieure à 30°, obtenue à l'aide recipients thermostatés composés de cuivre ou de fer. En vue de choisir le matériau adéquat qui minimiserait les risques de biofouling et de biocorrosion, ces auteurs ont testé le pouvoir d'adhésion des cellules microalgales sur des supports en cuivre et en fer, ainsi que leur capacité d'induire le phénomène de biocorrosion. Ils ont trouvé que le fer est un matériau qui favorise l'adhésion des cellules microalgales. De plus, du point de vue électrochimique, ces dernières ont provoqué une polarisation au niveau des électrodes de mesure. A l'inverse le cuivre est un bon matériau lorsqu'on veut minimiser les risques de biofouling et de biocorrosion lors de la culture de *Spirulina p.*

Mara en 1972 [126] a mis en évidence l'aptitude de certaines microalgues (*Chlorella*) et bactéries photosynthétiques possédant une hydrogénase, à utiliser l'hydrogène cathodique et partant de là à amorcer une biocorrosion. Dans le même esprit, Iverson en 1987 [13], en testant des souches microalgales appartenant au genre *Cyanophyta* et possédant une hydrogénase, conclut que ces souches sont capables d'utiliser l'hydrogène cathodique. En d'autres termes, tous les microorganismes qui possèdent une hydrogénase et ont la capacité de produire des sulfides à partir des composés sulfurés peuvent provoquer la biocorrosion [6].

## II. 6. 2. Action algale inhibitrice de la corrosion

L'action anticorrosive des microalgues pourrait se manifester par la présence de métabolites qui favoriseraient la protection du métal, par exemple les pigments. Ceux-ci ont une action antioxydative, et provoqueraient probablement une passivation du métal. Selon Iverson [13] la

présence de microalgues peut aussi se traduire par un changement du point de vue qualitatif ou quantitatif dans le milieu (nature et concentration des ions) par le biais du pH, généralement basique, qui tend à réduire le taux de corrosion.

Mert et al. en 2011[127], en étudiant l'action de spiruline sur la corrosion de l'acier carbone immergé dans une solution saline, observe que cette microalgue protège cet acier contre la corrosion. Hefny et al. en 2004 [22] et ensuite en 2009 [23] en testant l'action d'une autre microalgue, *Dunaliella salina*, sur la corrosion du titane, et de l'acier 304 dans une solution saline ont conclu que cette souche a un pouvoir anti corrosif dû à la synthèse du  $\beta$  – carotène. Kamal et Sutherland en 2012 [128] ont mis en évidence l'action de *Spirulina sp* sur l'acier carbone et ont montré le rôle des microalgues dans l'inhibition de la biocorrosion de cet acier par la présence d'antioxydants dus au  $\beta$  carotène ou d'autres métabolites.

## II.7. Conclusion

Le terme biofilm est utilisé généralement pour tous les microorganismes fixés (bactéries, champignons et algues) que ce soit en recherche fondamentale pour des notions absolues ou en recherche appliquée dans les bioprocédés. C'est le terme qui a été retenu également pour notre étude. Le mécanisme de formation des biofilms d'algues, au sens strict, jusqu'à présent, n'est pas très clair comme il l'est, relativement, pour les bactéries qui présentent un modèle de base autour duquel se posent des variantes, selon les espèces qui viennent s'agglomérer sur le support. L'impact des biofilms sur les matériaux présente généralement deux aspects : un aspect positif et un aspect négatif. Mais quel que soit l'effet des biofilms sur les matériaux, il y a un phénomène de double impact : c'est à dire que l'organisme vivant agit sur le matériau et réciproquement. Le plus souvent cette interaction est d'origine électrochimique et apparait sous forme d'ennoblissement, d'électroactivité, de biocorrosion ou d'anticorrosion.

## CHAPITRE III: PHOTOBIOREACTEURS ET MATERIAUX

### III.1. Les différents types d'installation permettant la culture des microalgues

La valorisation des microalgues dans un but commercial ou industriel passe impérativement par leur mise en culture dans de bonnes conditions en tenant compte de leur spécificité métabolique qui est la photosynthèse, directement liée à la présence d'une source lumineuse. Quel que soit le type de procédé utilisé, il doit tenir compte de ce facteur majeur sans toutefois négliger les autres paramètres, pour exploiter au mieux les potentialités algales et aboutir à une meilleure productivité.

Il existe deux types de réacteurs biologiques permettant la culture des algues, dont l'objectif est la production de biomasse et / ou de métabolites :

- **Les réacteurs ouverts** qui sont construits à l'extérieur et sont exposés à l'air libre. Ils se présentent sous la forme de bassins peu profonds (lagunes ou canaux en serpentin). Ils sont implantés généralement sur une grande surface (1000 à 5000 m<sup>2</sup>) [129].  
Ces réacteurs sont peu coûteux dans la mesure où ils sont alimentés par une source lumineuse d'origine solaire, mais ils sont plus difficiles à contrôler. Ils sont plus exposés aux contaminations par toutes sortes de microorganismes, bactéries, protozoaires, et des espèces algales opportunistes autres que celles qui y sont cultivées.
- **Les photo bioréacteurs ou «PBR »**, environnements où a lieu la culture des microalgues, sont essentiellement des systèmes de culture clos qui ont été conçus à partir d'une approche physiologique des microalgues [130] afin de mieux contrôler les facteurs de croissance (lumière, température, PH, etc.). La production de produit microalgal de haute valeur est restreint aux systèmes fermés en raison de la possibilité de reproduire les conditions de production et d'être un « GPM » (en anglais Good Pratical Manufacturation) approprié c'est-à-dire être dans des conditions de «bonnes pratiques de fabrication» [131]. Qualité, quantité, productivité et surtout faible coût sont des objectifs appliqués à la valorisation de la culture commerciale des algues.

Les photobioréacteurs ou systèmes de culture clos étant les plus exposés au phénomène de biofouling ; ce problème étant l'axe de notre travail, nous nous focaliserons essentiellement sur ce type de dispositifs.

### III.2 Les photobioréacteurs

Les PBRs sont des systèmes sophistiqués, sûrs et contrôlables qui sont utilisés pour la culture des algues **phototrophes**. Les espèces de microalgues d'intérêt commercial qui croissent dans des conditions **d'hétérotrophies** fonctionnent efficacement dans des bioréacteurs conventionnels de manière similaire aux bactéries ou aux levures [132]. Ces espèces ne nécessitant pas de source lumineuse car elles utilisent le carbone organique comme source d'énergie, sont cultivées dans des **fermenteurs**.

#### III.2.1 Les types de photobioréacteurs

On peut dénombrer deux types de photobioréacteurs variables selon leur géométrie et leurs caractéristiques : **les réacteurs tubulaires et les réacteurs plans** [129]. Tel qu'il est indiqué, sur la figure 1 (annexe 2), Il existe au sein de ces différents types de photobioréacteur plusieurs variétés classées suivant les matériaux de construction (verre, plastique, rigide, etc.), la disposition des sous-unités (en parallèle ou en série), le système de circulation de la culture (air-lifts, pompe, etc.), les systèmes d'aération et de carbonatation (injection de CO<sub>2</sub> et désorption d'O<sub>2</sub> interne ou externe) mais aussi la position (verticale, horizontale, inclinée et en serpentin) [133]. La présence de réfrigération (système à double couche) peut être parfois nécessaire lorsque la lumière est émise de façon continue provoquant une augmentation de la température, ceci ayant un impact néfaste sur la culture et le dispositif.

Le déroulement de la croissance algale au sein de ces PBRs peut s'organiser en plusieurs modes :

- **Culture en batch:** Dans ce type de culture, les nutriments permettant la croissance ne sont pas renouvelés. Ainsi, les algues les utilisent jusqu'à épuisement; la courbe de croissance obtenue inscrira toutes les phases.
- **Culture en continu:** les nutriments sont renouvelés avec un taux de dilution modélisé de façon à maintenir la culture en phase exponentielle, les paramètres physico-chimiques sont régulés en adéquation avec le taux croissance optimal. Il existe deux types de systèmes répondant à cette description : le Chémostat qui est contrôlé par la concentration d'un facteur

limitant, en majorité un substrat qui peut être le CO<sub>2</sub> (modèle de Monod) et le Turbidostat régulé par la concentration cellulaire ou biomasse.

- **Culture en semi continu** : ce type de croissance est caractérisé par la présence d'un ou plusieurs paramètres contrôlés, alors que les autres facteurs ne sont pas régulés. Ce type de culture s'applique spécialement aux organismes photosynthétiques, qui reçoivent une quantité de lumière stabilisée ainsi qu'une fourniture constante de CO<sub>2</sub>; Ce système est appelé « Fed-batch »
- Les cellules algales peuvent être cultivées librement, **en suspension** dans le milieu de culture ou sous **forme fixée ou immobilisée** dans des photobioréacteurs à biofilms (PBRB).

### III.2.2. Les matériaux de construction d'un photobioréacteur

Un PBR est le résultat d'assemblages d'objets : une charpente ou ossature, des parois, et des accessoires (agitateurs, sondes, tuyaux etc.). Divers matériaux peuvent se retrouver dans un PBR. Ainsi, les plastiques voisinent avec les silicones, le caoutchouc avec les matériaux métalliques. Les matériaux qui composent un photobioréacteur sont élaborés ou formulés au fur et à mesure des besoins de l'industrie. Généralement, la simulation et l'étude du comportement de ces matériaux dans lequel ils doivent être immergés, est effectué au préalable. Ces matériaux sont soumis à des conditions stressantes et peuvent subir non seulement l'impact des algues cultivées mais aussi les contraintes de culture comme la lumière, les gaz, conditions hydrodynamiques et les cisaillements.

### III.2.3. Les critères de sélection des matériaux

Beaucoup de paramètres sont à considérer lorsqu'on veut sélectionner un matériau qui servira à la fabrication d'un PBR parmi lesquels on peut citer :

- L'effet de l'organisme sur le matériau et vice versa (l'espèce et ses spécificités métaboliques) ;

- L'effet des conditions physico-chimiques qui ont lieu dans l'environnement, en particulier, la lumière, la température, et les gaz (oxygène, gaz carbonique, hydrogène);
- Les propriétés du matériau ;
- Les produits que l'on veut obtenir ;
- Les retombées économiques.

Comme tous les microorganismes, les algues ne sont pas insensibles aux matériaux qui composent l'enceinte dans laquelle elles sont cultivées c'est-à-dire le photobioréacteur , Ceux- ci doivent être choisis de façon à ne pas intervenir sur leur métabolisme.

L'interaction microorganisme / matériau est un paramètre qui doit être pris en considération. Le matériau doit être biocompatible, permettre un échange de chaleur et être transparent pour les faces optiques. Polycarbonate ou verre sont employés pour les systèmes de taille modeste. Pour les installations plus grandes, le polyéthylène et le plexiglas sont adaptés. Pour tous les polymères, l'exposition aux UV du soleil réduit leur durée de vie (dégradation photochimique, génération de chlore) et augmente leur fragilité. Si le système doit être stérilisé, les matériaux (y compris les joints) devront supporter soit la vapeur, soit le stérilisant chimique [65].

Ces matériaux sont choisis dans le but essentiel d'améliorer le design des photobioréacteurs pour un meilleur rendement en tenant compte des conditions de croissance des organismes photosynthétiques, en premier lieu, la demande en lumière, qui est un facteur important dépendant de la transparence des parois qui peut être diminuée par l'agrégation des cellules à leur niveau . Le biofouling peut influencer sur la qualité et la quantité de la lumière pénétrant à travers des matériaux transparents des PBR qui fonctionnent à la lumière naturelle [134,135]. Le matériau choisi pour la construction d'un PBR doit minimiser au maximum la formation de biofilm.

Jae Jun Yoo et al en 2013[136] voulant optimiser un PBR ont testé différentes formes d'agitateurs (hexaédrique, cylindrique et sphérique ) réalisés en divers matériaux( verre, plastique, acier inoxydable et caoutchouc). Le verre, le plastique, le caoutchouc ont provoqué l'adhésion des cellules algales alors que l'agitateur en acier inoxydable est resté

propre pendant 24 h, minimisant la perte de biomasse qui était de 3,2 inférieure à celle de l'agitateur en plastique.

L'état de surface de ces matériaux en raison de leur utilisation répétée, ou sous l'effet de la lumière et de l'oxygène photosynthétique à long terme peut subir des modifications pouvant favoriser ou non l'adhésion des cellules. La stérilisation par autoclavage peut aussi modifier les propriétés des surfaces des matériaux [5]. On peut penser que la stérilisation à long terme modifie la texture ou la trame du matériau en question, ce qui pourrait influencer aussi le pouvoir d'adhésion des cellules. La géométrie des PBR peut influencer, aussi, sur la formation du biofouling sur les parois. Certaines espèces de microalgues restent très difficiles à cultiver dans les photobioréacteurs plats car elles peuvent générer un biofilm sur les parois [137].

#### III.2.4. Les matériaux en contact avec les microalgues

Le photobioréacteur est né il y a environ une soixantaine d'années en s'inspirant du bio réacteur conçu pour la culture des bactéries hétérotrophes. La conception des **systèmes clos** est, donc, relativement **récente** et est actuellement en phase d'optimisation. Les photobioréacteurs les plus performants en terme de productivité sont plats ou tubulaires, le choix ultime du système à utiliser dépend de la particularité de l'algue, Il reste cependant dépendant du critère économique et du volume de culture recherché [138].

Les PBR sont usinés à partir de divers matériaux, au départ le choix s'est porté sur le verre Mais celui-ci étant fragile, lors des managements, on s'oriente de plus en plus vers l'utilisation du plastique comme matériau de base, ainsi celui ci peut se décliner en :

- PEBD ( Polyethylene basse densité);
- PEHD (Polyethylene haute densité);
- PMMA (poly méthyl méthacrylate);
- PVC (Polychlorure de vinyle) ;
- PET (polyéthylène téréphtalate.

Ces variantes de plastique sont dotées de propriétés spécifiques, par conséquent, leur comportement est différent dans les PBR. Il a été constaté que seulement le PMMA et le téflon conservent leur transparence pendant des mois lorsqu'ils sont exposés à des conditions climatiques naturelles [139].

**Tableau 2: Matériaux de construction de Photobioréacteurs adapté de [140]**

matériau	Avantages	Inconvénients
verre	Transparence élevée, stabilité chimique, durabilité	Fragile, cout élevé d'installation
Polyméthyl acrylate de méthyle (PMMA)	Bonne résistance aux chocs que le PC et le PS, transmission élevée, une excellente stabilité environnementale,	Non autoclavable, se raye facilement, mauvaise résistance à beaucoup de solvants.
Polycarbonate (PC)	Autoclavable, bonne résistance aux chocs et bonne propriétés optiques, absorption d'UV	Diffuse les gazes à cause de sa faible masse moléculaire, affecté par les solvants, l'ammoniac, le NaOH et les acides concentrés.
Polyéthylène (PE)	Inerte chimiquement, résistance élevée aux acides, les alcalis et les solvants	Perte de traction et résistance aux déchirures lorsqu'il est exposé à la lumière et l'oxygène.
Polypropylène (PP)	Autoclavable, résistance à la fatigue, résistance à la corrosion	Jaunissement et perte de transparence une fois exposé à l'environnement.
Polychlorure de vinyle (PVC)	Excellente résistance aux acides et alcalis, faibles perméabilité des gazes, résistance à la traction élevée et résistance à l'UV	Faible résistance aux aldéhydes, les esters, les aromatiques et les halogènes, hydrocarbures et les cétones. faible transmission
Polystyrène (PS)	thermoplastique	
Polyéthylène téréphtalate (PET)	Résistant aux chocs Faible perméabilité aux gaz	hygroscopique
Polyuréthane (transparent)	Transmission optique élevée. Excellente résistance à l'UV (pas de jaunissement)	Cout élevé

Chitralkha Nag Dasgupta et al. en 2010 [140] ont fait une comparaison les propriétés des différents types de matériaux (Tableau 2) et ont constaté que le PMMA et le PET ont plus d'avantages pour la construction du bioréacteur que le PVC qui reste une alternative lorsque la résistance chimique est plus recherché que la transparence.

Skjanes et al. en 2008 [141] ont rapporté que les matériaux comme le caoutchouc naturel, le caoutchouc de silicium et le polypropylène présentent des effets toxiques sur les cellules d'algues en privation de soufre. Nous pensons qu'il faut en tenir si l'on doit cultiver les microalgues en présence du soufre comme facteur limitant par défaut.

### III.3. Les aciers dans le photobioréacteurs

On trouve dans les PBR, des matériaux accessoires tels que les alliages métalliques. Aussi, comme on l'a dit précédemment, les cultures industrielles de microalgues utilisent des procédés faisant appel à la présence de pièces de nature métallique telle que **l'acier** (sondes, agitateurs,) [142]. Cet alliage peut aussi entrer dans la composition des matériels (panneaux) dans les PBRB et qui sont utilisés dans les étapes d'extractions des métabolites. Lorsqu'il s'agit d'espèces croissant en modèle hétérotrophe, le réacteur (**Fermenteur**), est construit entièrement en acier.

#### III.3.1. Caractéristiques des aciers inoxydables

Les aciers inoxydables sont des alliages Fe-Cr et Fe-Ni-Cr contenant éventuellement des éléments d'alliage comme le carbone, l'azote, ou bien métallique tels que le molybdène, le titane. Le qualificatif "inoxydable" est habituellement attribué lorsque l'alliage présente une concentration minimale d'environ 11 à 12% de chrome. Selon la norme EN 10088-1 un acier inoxydable est un alliage fer-carbone-chrome contenant au moins 12% de chrome et pas plus que 2% de carbone, l'indice " L" signifie "Low carbon" (basse teneur en carbone). Le bas carbone permet d'éviter la formation de carbures (notamment carbures de chrome qui est un composé très stable mais qui n'empêche pas l'oxydation du fer).

Des phases secondaires de nature inclusionnaire, formées lors de l'élaboration du métal, tels des sulfures peuvent se retrouver dans les aciers inoxydables. Le 316L et le 304L sont rangés dans cette catégorie. La différence la plus notable entre ces deux aciers réside en l'absence de molybdène dans l'acier inox 304L.

#### III.3.2. Comportement des aciers inoxydables en milieu biologique

Les aciers inoxydables austénitiques sont largement utilisés en raison de leur haute résistance, maniabilité mécanique et excellente conductivité électrique et thermique. La formation d'une couche passive stable rend leur résistance à la corrosion forte. Parmi eux, l'inox 316L (SS) est

d'un grand intérêt pratique car il résiste bien à la corrosion par les chlorures grâce à sa forte concentration en Mo [143].

De ce fait l'acier inoxydable 316L (SS316) est le plus couramment utilisé dans les procédés agro-alimentaires. Soit des procédés permettant la transformation des aliments ou des procédés de fermentation mettant en jeu des microorganismes tels que des bactéries ou des applications impliquant un contact avec des composés / solutions biologiques. Ils sont utilisés dans l'industrie alimentaire [144,145], dans les procédés biotechnologiques, en pharmacie, dans la fabrication d'endoprothèses vasculaires, des fils de guidage, ou autre implants orthopédiques dans le domaine médical [146, 147]. Malgré son statut de matériau hygiénique et sa bonne résistance à la corrosion, il existe malheureusement deux réserves :

- La première réserve est d'ordre physique, le 316L favorise la formation de biofouling due à sa haute énergie de surface et sa nature hydrophile. Ainsi, l'encrassement est amplifié dans les échangeurs thermiques en raison du chauffage des parois et la précipitation des minéraux localisée qui en résulte [148- 150]. Sekar et al. en 2004 [110] ont testé la capacité de certains matériaux (plexiglas, verre cuivre aluminium titane acier inoxydable de type 316-L) à induire l'adhésion des microalgues à leur surface, ont obtenu le taux d'adhésion le plus élevé pour le titane et l'acier inoxydable.
- La deuxième réserve est d'ordre électrochimique car malgré leur caractère d'inoxidabilité, ces alliages ne sont pas totalement immunisés contre la corrosion : des dégradations par piqûres ou par cavernes sont fréquemment observées. De nature électrochimique, ces formes de corrosion sont régies par l'oxygène : sa réduction sur la surface des aciers inoxydables constitue en effet le "moteur" déterminant de leur corrosion [6]. Les microalgues étant des êtres photosynthétiques oxygéniques, il est fort possible que ce matériau immergé dans les cultures algales soit exposé à la corrosion à long terme. On doit ajouter que la particularité de la photosynthèse, qui est le siège de transferts d'électron dus à l'activation des pigments chlorophylliens par la lumière, puisse décupler les phénomènes électrochimiques induits. On peut penser qu'un transfert d'électrons ait lieu entre le biofilm photosynthétique et la surface du métal. Mais beaucoup de microalgues sont mixotrophes, le métabolisme hétérotrophique étant à la base de la majorité des phénomènes de biocorrosion des substrats métalliques, comme il a été démontré chez les bactéries ; il n'est pas exclu qu'à l'obscurité, les microalgues se comportent de façon similaire en induisant une corrosion.

### **III.4. Conclusion**

Les PBR doivent permettre la croissance des espèces algales dans des conditions optimales contrôlées, il doit satisfaire tous les besoins nutritifs en particulier la demande en lumière le choix du matériau utilisé pour la construction d'un PBR est déterminé par rapport à son coût, sa durée de vie, sa maniabilité, le matériau doit être stable pour une longue durée il ne doit pas permettre la migration de substances chimiques à l'intérieur de la culture il doit subir la stérilisation sans dommages, la propriété antifouling est un critère important. Il ne doit subir aucune biodétérioration ou corrosion chimique ou biologique s'il s'agit d'un matériau de nature métallique. A ce stade de la réflexion on ne sait pas comment se comporte un acier inoxydable au contact d'un organisme phototrophe.

# ***P*ARTIE *E*XPERIMENTALE**



## CHAPITRE IV: METHODOLOGIE

### IV.1.Introduction

Le suivi de la formation des biofilms, leur caractérisation et leur quantification ; l'étude de leur impact ainsi que l'effet du milieu de culture sur l'état de surface des substrats métalliques immergés sont les objectifs essentiels de notre travail .Ces objectifs s'appuient sur la mise en évidence des phénomènes électrochimiques qui ont lieu à l'interface liquide /substrat et biofilms/substrat, ainsi que par la visualisation des changements de l'état de surface des supports. En parallèle le suivi de la croissance algale, qu'il s'agisse d'une monoespece ou d'un consortium de microalgues, est indispensable pour relier les événements métaboliques qui ont lieu dans la culture aux phénomènes qui se passent sur la surface du matériau. L'atteinte de cet objectif passe par un choix de méthodes. Ce chapitre donne un aperçu des méthodes utilisées sous forme de généralités, en mettant en relief l'approche méthodologique avec discussion du choix des méthodes.

### IV.2. Approche méthodologique

#### IV.2.1.Suivi de la formation des biofilms et leur caractérisation

Les techniques d'études des biofilms sont très variées .Il existe des techniques d'analyse classiques telles que la microscopie optique, électronique et moléculaire et d'autres plus recherchées.

La variation de l'application de ces techniques suit les objectifs que l'on veut atteindre ainsi que le type du biofilm que l'on veut caractériser, l'environnement dans lequel il évolue .Il existe une diversité d'environnements dans lesquels les biofilms peuvent se former : pipelines, cathéters, dents, peau, racines des plantes, poumons (par exemple en cas de mucoviscidose, etc...). Cependant, même si les biofilms sont extrêmement diversifiés, il est utile de mettre en place des méthodes d'étude reproductibles d'un laboratoire à un autre, afin de pouvoir comparer les données et mieux les interpréter correctement [151].

En plus du facteur de reproductibilité, la recherche de méthode d'étude des biofilms suit deux objectifs fondamentaux. :

- Sauvegarde de l'intégrité du biofilm ;

- Facilité et clarté de la description des constituants des biofilms.

Les méthodes les plus utilisées pour décrire les biofilms sont généralement des méthodes microscopiques qui sont assez diversifiées, mais l'objectif est le même, trouver des techniques non destructives « non invasives » qui puissent respecter la réalité visuelle. Les méthodes non destructives pour l'examen des biofilms photosynthétiques comprennent diverses formes de microscopie : microscopie optique simple, confocal laser scanning microscopy (CLSM) et modulation d'impulsions en amplitude (PAM) ainsi que l'utilisation des microélectrodes, méthodes moléculaires (y compris fluorescentes en hybridation in situ ou FISH) et des techniques de modélisation [97].

Pour la caractérisation des biofilms, nous avons opté pour deux techniques : L'une classique c'est la microscopie électronique à balayage (MEB) dont l'application pour l'étude des biofilms est très répandue. La deuxième technique est assez récente, du moins son application aux biofilms, c'est la spectroscopie d'impédance électrochimique «SIE ». Ces deux techniques sont complémentaires.

#### **IV .2.1.1. Microscopie électronique à balayage MEB**

La microscopie électronique à balayage (MEB) occupe une place privilégiée dans le domaine de la caractérisation microstructurale des matériaux. Elle permet de donner des renseignements sur l'échantillon relatifs à la morphologie et à la répartition des constituants mais aussi des informations cristallographiques et compositionnelles [152]. Son principe est fort connu, mais ce qui reste discutable c'est son application au monde vivant.

Si, au départ, elle a été d'abord utilisée pour la caractérisation des matériaux inertes et modélisée par différents traitements en vue d'une meilleure clarté, la microscopie électronique s'avère être une technique puissante pour révéler la structure fine des systèmes vivants et a été appliquée aux biofilms [153 -157]. Mais ce sont les traitements effectués lors de la préparation qui peuvent diverger selon le but recherché. Ainsi, beaucoup d'auteurs ont discuté les avantages et les désavantages de l'application de La MEB.

Goldstein et al. en 1982 [158] ont discuté et mis en lumière un facteur qui n'a pas été évalué dans le passé : c'est la perte du biofilm au cours de la préparation de l'échantillon. La

préparation d'un échantillon pour une analyse au MEB peut induire une variété de dommages et des artefacts en particulier pour les échantillons de biofilm, qui sont hautement hydratés. Dans ce cas une seule option existe. C'est la congélation qui a été suggérée pour minimiser la destruction relative au sein d'un échantillon de biofilm. [157].

Dans le même esprit, Chang et Rittmann en 1984 [159] dans leur étude ont comparé la perte de biofilm au cours des étapes de préparation conventionnelle qui utilise simplement un flacon, ils ont proposé une alternative en utilisant une technique de filtre à membrane qui minimise les pertes de biofilm au cours de la préparation.

Wimpenny et al en 2000 [97] ont trouvé cette méthode forte utile pour recueillir des informations sur la structure de la surface d'un biofilm. Ainsi, après fixation et ombrage de l'échantillon, il est presque impossible de voir la surface au « naturel » c'est-à-dire avec les présences des EPS qui forment une couche ; ceci est fortement désiré si l'on veut voir le contour des cellules et leur disposition. Le traitement a permis d'enlever les EPS qui formaient des filaments qui pourraient en séchant, après utilisation du glutaraldehyde, masquer la structure du biofilm. En d'autres termes, ces chercheurs ont préféré sacrifier les EPS, qui après un traitement déshydratant sont dénaturés au bénéfice de la visibilité des cellules.

Conscients de ces problèmes, nous avons appliqué la MEB pour observer nos échantillons en choisissant le traitement final adéquat pour un objectif donné, selon l'expérimentation ce qui sera discuté dans les résultats obtenus.

#### **IV.2.1.2. Mesure d'impédance**

La spectroscopie d'impédance électrochimique «SIE » est une excellente technique pour étudier les propriétés électriques interfaciales de n'importe quel matériau solide ou liquide connecté à un transducteur électrochimique [160]. Elle a d'abord été appliquée aux phénomènes de corrosion pour la caractérisation des matériaux corrodés et de leurs interfaces. Ensuite cela s'est étendu à la caractérisation des biofilms bactériens [161-163].

Cette technique donne des informations sur le comportement de l'interface métal/solution en fonction du temps d'immersion. Elle met en évidence tous les événements électrochimiques qui ont lieu à la surface des matériaux. Beaucoup d'auteurs la décrivent comme étant une méthode sensible qui ne touche pas à l'intégralité du biofilm et sa structure, donc elle est non destructive comparée à d'autres méthodes [127,165,166]. Il n'existe pas à notre connaissance

des travaux rapportant son application aux biofilms microalgaux, à l'exception des études concernant les biofilms marins responsables de biocorrosion où la présence des algues est évidente surtout les diatomées. En outre Mert et al. [127] ont utilisé cette technique pour étudier l'effet inhibiteur de la microalgue *Spirulina* sur la corrosion de l'acier 304L.

La spectrométrie d'impédance électrochimique est une technologie d'analyse qui permet d'obtenir des informations sur les réactions de corrosion, le transport de masse et les caractéristiques de transferts électrique. La modélisation des spectres EIS permet d'extraire ces informations. Il est donc important de bien comprendre le principe de la spectrométrie d'impédance électrochimique.

L'impédance, dénommée  $Z$  est l'expression de la résistance qu'un composé électrique ou circuit ou système offre à un courant alternatif (AC) ou à un courant direct. Le plus souvent le courant AC est utilisé.

Une tension sinusoïdale est appliquée à la **fréquence**  $\omega$  entre le système d'électrodes.

$$E = E_0 \sin(\omega t) \quad (2)$$

Il en résulte un courant  $I = I_0 \sin(\omega t + \alpha)$  (3)

L'angle  $\alpha$  de déphasage est dû au retard de la réponse du système. On peut donc obtenir l'impédance du système électrochimique  $Z(\omega)$  à partir de :

$$E = Z \cdot I \quad (4)$$

$$Z = Z_{Re} + j \cdot Z_{Im} \quad (5)$$

L'impédance comprend une partie réelle  $Z_{Re}$  et une partie imaginaire  $Z_{Im}$  telles que avec  $j^2 = -1$ .

Traditionnellement les spectres d'impédance sont représentés par le diagramme de Nyquist tel qu'il est représenté en figure 7 ( $Z_{Re}$  pour  $x$ ,  $Z_{Im}$  pour  $y$ , en fonction de  $\omega$ ) ou par le diagramme de Bode ( $|Z|$  et  $\alpha$  en fonction de  $\omega$ ).  $Z$  est une fonction de multiples variables : résistance, capacitance ou inductance, dépendant des réactions électrochimiques du système à étudier [167]. L'impédance est ensuite représentée par un équivalent circuit électrique (Figure 8).

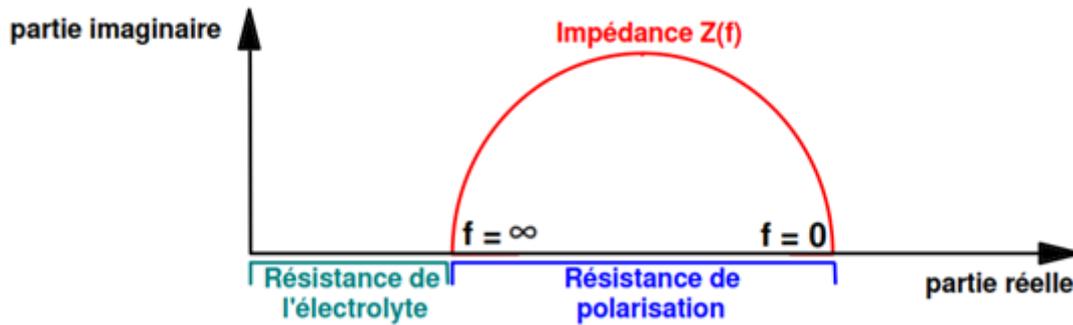


Figure7 : Représentation du diagramme de Nyquist (Web2)

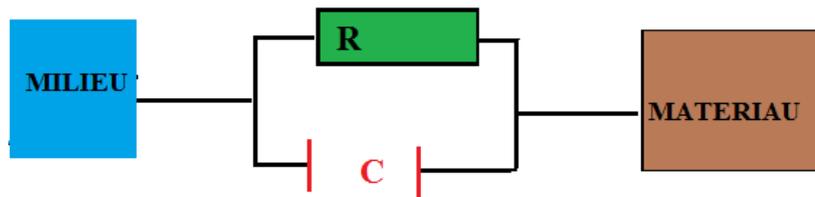


Figure 8 : Schématisation d'un équivalent circuit électrique classique (Web2)

### IV.3.Suivi de la croissance et quantification des cellules adhérentes

#### IV.3.1.Milieus de culture

Deux milieux de culture ont été utilisés : le milieu Hémerick [168] qui a servi à cultiver *Porphyridium* ( voir composition tableau annexe 3 ), et l'eau de mer stérile qui a été utilisée pour la croissance des microalgues ou consortium , isolées de la mer ( tableau annexe ). Ces deux milieux servant à cultiver des microalgues marines ont une similitude qui réside en la concentration de NaCl 29g/l pour le milieu Hémerick et 35g/l pour l'eau de mer stérile (annexe4). De plus la présence des autres nutriments assure une bonne croissance des espèces cultivées.

#### IV.3.2. Estimation de la croissance algale

Les méthodes utilisées pour suivre la croissance de la souche algale axénique et consortium d'algue pour les trois expérimentations sont de deux types :

- une méthode directe qui permet de dénombrer les cellules périodiquement par microscopie optique en utilisant une cellule spéciale (cellule de Malassez ). Cette cellule de numération est une lame spéciale que l'on place sous le microscope optique pour le comptage des cellules. Un gravage très précis trace un quadrillage dont les dimensions sont connues, et une lamelle délimite une hauteur elle aussi connue. Le volume de comptage de la cellule est donc connu avec précision. (Figure annexe)
- une méthode turbidimétrique, permettant de mesurer l'absorbance à une longueur d'onde précise en utilisant un spectrophotomètre.

Les deux méthodes ont été souvent corrélées entre elles, surtout lors de la mise au point des techniques d'analyses, mais le dénombrement des cellules algales directement sur cellule de Malassez reste le meilleur moyen de comptage ; la taille des cellules algales étant supérieure à 2µm, il est plus aisé de les voir au microscope optique.

#### **IV.3.3.Caractéristiques de l'espèce choisie comme modèle d'étude: *Porphyridium purpureum***

Cette souche a été choisie comme modèle d'étude pour le suivi de formation des biofilms dans l'expérience monoalgale. C'est une microalgue marine qui est très exploitée en biotechnologie [37, 105,142, 170, 171, 174,176, annexe] en raison de ses capacités métaboliques de production de polysaccharides extracellulaires (EPS) de pigments et d'antioxydants. Cette espèce a été décrite par Ross en 1965 [169] en Atlantique Nord-Est puis en Méditerranée. Les espèces de *Porphyridium* ont été isolées à partir d'une variété d'habitats allant de l'eau douce, saumâtre et marine ainsi que les couches humide des sols et les murs se trouvant à proximité des milieux marins (région bretonne).

##### **IV.3.3.1. Classification de *Porphyridium purpureum***

Les espèces appartenant au genre *Porphyridium* sont des algues rouges. Elles font partie de la classe des *Bangiophycideae* et appartiennent à l'ordre des *Porphyridiales*. *Porphyridium purpureum* correspond à l'espèce type du genre, initialement nommée *Porphyridium cruentum*. C'est une microalgue unicellulaire autotrophe appartenant à la classe de Rhodophycées, famille Porphyridiaceae, genre *Porphyridium* [170].

*Porphyridium. purpureum* fait partie de la classe des *Rhodophyceae* et possède à ce titre des pigments surnuméraires nommés phycobilines: l'allophycocyanine, la phycocyanine et la phycoérythrine qui lui donne la couleur rouge, variable selon l'âge et les conditions de culture. Les cellules de cette microalgue sont enrobées dans une gaine mucilagineuse de nature polysaccharidique.

#### IV.3.3.2. Caractéristiques de la cellule :

La cellule de porphyridium (Figure 9) est de forme arrondie, sa taille ne dépasse pas 10 $\mu$ m, elle ne possède pas de paroi cellulaire [171,172] Elle se trouve généralement dans le milieu de façon solitaire ou sous la forme d'agrégats formant des colonies irrégulières scellées par du mucilage amorphe souvent secrété par la cellule. Cette couche formée la protège des agressions extérieures et la rend particulièrement résistante au stress hydrodynamique. Elle possède aussi un appareil pigmentaire complexe et efficace lui permettant d'absorber des photons pour une très large gamme de longueurs d'onde. Ceci s'explique par les conditions naturelles en eaux profondes où elle se développe, sous les populations d'algues vertes. Nous trouvons dans sa composition de la chlorophylle *a* et *d* et des phycobiliprotéines (phycoérythrine et phycocyanine) [40].



**Figure 9:** Photographie des cellules de *Porphyridium purpureum* prise au cours de la croissance (X 40)

#### IV. 3 3.3. Croissance en batch ou en milieu discontinu :

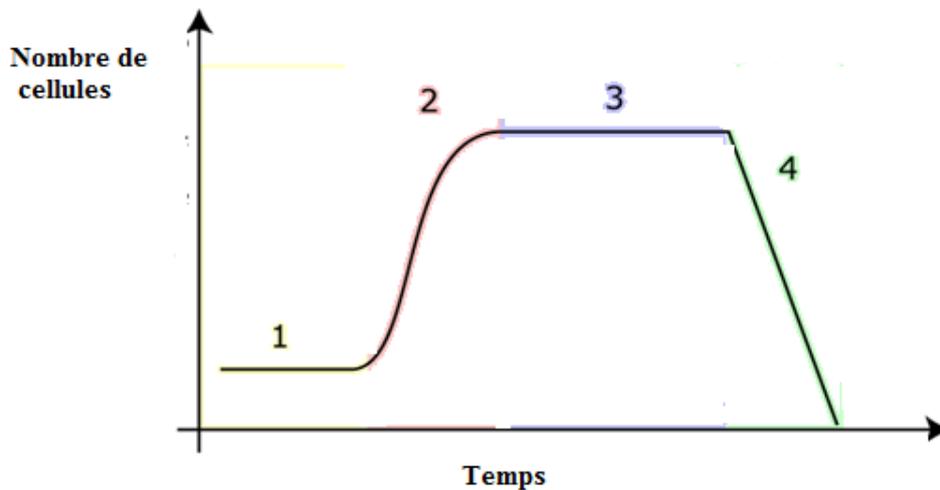


Figure 10 : Courbe de croissance théorique de *Porphyridium* en batch.

La croissance de *Porphyridium* est définie par la fonction suivante :

$$\text{Log } N = \mu \log(2) + \text{Log } N_0 \quad (6)$$

$\mu$  représente le taux de croissance ou vitesse de croissance

$N$  correspond à la quantité de biomasse (exprimé soit en nombre de cellule ou en absorbance) ;

$N_0$  correspond à la quantité initiale de biomasse, c'est l'inoculum.

La croissance des microalgues en mode batch est comparable à celle de tous les microorganismes .Elle suit une courbe bien définie caractérisée par 4 phases qui sont le reflet des changements dans la biomasse et dans son environnement [173].

C'est une croissance qui se fait en milieu discontinu. Dans ce type de culture, le milieu n'est pas renouvelé ; des concentrations déterminées de nutriments et de biomasse initiale sont introduites, les microalgues vont effectuer une croissance jusqu'à épuisement du milieu nutritif, ce qui entraîne l'arrêt de la croissance et, progressivement, la mort des cellules.

Ces phases de croissance (voir figure 10) peuvent être décrites ainsi :

- **Phase de latence (1):** Elle correspond à la phase d'adaptation des cellules à leur milieu. Durant cette phase, les enzymes sont synthétisées, la valeur de  $\mu$  est proche de

zéro. Il y a seulement quelques cellules qui entament la division mais l'augmentation de la biomasse est imperceptible, ceci est dû certainement au taux de dilution cellulaire élevé dans le milieu neuf qu'on appelle le stress de dilution.

- **Phase exponentielle (2)** : Durant cette phase, les cellules passent par 3 états progressivement : Un premier état de multiplication accélérée où  $\mu$  augmente ainsi que la valeur de  $N$  ; un deuxième état dans lequel  $\mu$  est maximal et constant et  $N$  continue à augmenter. Les cellules sont « jeunes » et se multiplient au maximum de leur capacité en utilisant les nutriments présents dans le milieu, qui est favorable par ses conditions. Enfin un troisième état qui coïncide avec une décélération où  $\mu$  commence à diminuer et  $N$  reste constant.
- **Phase stationnaire ou « plateau » (3)**: Durant cette phase métabolique il se produit des changements physicochimiques tel que l'augmentation du pH et une diminution de la concentration de certains éléments en particulier l'azote et le soufre. Le milieu devient carencé, il y a apparition de facteurs limitants. La lumière n'arrive pas à toutes les cellules surtout celles situées en profondeur, la croissance est ralentie,  $\mu$  s'annule  $N$  est constant. C'est la phase de prédilection pour l'excrétion des exopolysaccharides .
- **Phase de décroissance ou de déclin(4)**: Le milieu s'appauvrit en nutriments,  $N$  continue à diminuer,  $\mu$  prend une valeur négative est remplacé par un taux de mortalité. Il se produit une mort cellulaire.

#### IV.3.3. 4 .Conditions de culture

- Température

*Porphyridium purpureum* a une croissance optimale à des températures préférées comprises entre 20 et 25°C. Selon, Baquerisse [174] et Nouals [175], cette microalgue peut tolérer un large éventail de températures, allant de 5 à 35 C °.

- Nature, intensité et régime de la lumière

Comme pour tous les organismes phototrophes la présence de la lumière est indispensable

pour la croissance de *Porphyridium purpureum*. La lumière agit par son intensité et comme tout facteur abiotique il existe des valeurs d'intensité lumineuse où la croissance est optimale, valeurs « préférendum ». Il apparaît que la valeur optimale de l'intensité lumineuse varie avec la température [174]. Elle augmente avec la température jusqu'à 25 °C pour diminuer ensuite. Le régime de lumière ou photopériode influence la croissance de cette microalgue et son métabolisme. Des études ont montré qu'il existe une parfaite synchronisation des cultures conduites avec une photopériode 8/16 (8 heures d'éclairement et 16 heures d'obscurité). On assiste ainsi à une augmentation du volume des cellules pendant la phase d'éclairement et une division des cellules pendant la phase d'obscurité. L'augmentation de la photophase conduit à la disparition de cette synchronisation des divisions et à l'augmentation de la concentration cellulaire quelle que soit la phase [176].

- Salinité

*Porphyridium* étant une microalgue marine, c'est-à-dire halophile, son métabolisme est dépendant de la concentration saline du milieu. Elle doit trouver dans son milieu de culture la concentration adéquate pour sa croissance. L'optimum de salinité est situé entre 14,5 et 24,5 ‰ [174]. Mais cette microalgue peut tolérer des concentrations de NaCl dans un milieu contenant la moitié à deux fois la concentration en chlorure de sodium de l'eau de mer (17 et 60 g/l) [170].

- pH

La zone de pH tolérée est également assez large, variant de 5,2 à 8,3 pour une valeur optimale de pH de 7,5 [175].

- Sources carbonées et azotées

La microalgue *Porphyridium purpureum* utilise principalement du dioxyde de carbone comme source carbonée. Cependant, il lui serait possible également d'utiliser du carbonate. Par conséquent, une teneur suffisante en dioxyde de carbone dans le milieu est nécessaire sans pour autant dépasser les 5%. Par ailleurs, la microalgue utilise indifféremment des nitrates ou de l'ammonium comme sources d'azote. Cependant, seule la carence totale en azote serait vraiment perceptible sur la vitesse de croissance [174].

#### IV.3.3 .5. Particularités métaboliques de *Porphyridium*

La première particularité métabolique de cette microalgue, c'est sa capacité à produire une quantité notable de polysaccharides et pour laquelle elle est industriellement très exploitée. Cette molécule est un polysaccharide sulfoné soluble dans l'eau qui est à l'origine d'une viscosité élevée spécialement sous conditions de limitation ou de stress [171, 172, 177]. Cette microalgue est également, une source importante d'acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont essentiels pour les humains et utilisés également dans la nutrition animale.

#### **IV.4. Suivi du potentiel de corrosion ouvert ou Ecorr ou potentiel d'abandon**

La mesure du potentiel d'abandon est l'une des techniques électrochimiques les plus simples permettant de suivre l'évolution du potentiel d'un matériau immergé dans un milieu. Elle consiste à mesurer la différence de potentiel entre le matériau lui-même et une électrode de référence. La valeur et le signe du potentiel dépendent de la composition du matériau, de la température et de l'hydrodynamique de l'électrolyte [178].

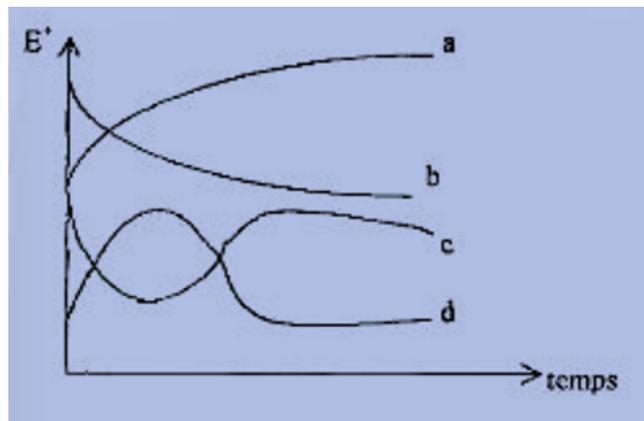
Le **potentiel** est par définition la différence électrique de tension entre deux électrodes typiquement une électrode de référence et le métal. Le **potentiel de corrosion, appelé aussi potentiel libre ou potentiel à l'abandon ou potentiel en circuit ouvert**: est le potentiel d'équilibre que prend un métal ou un alliage métallique donné par rapport un électrolyte donné. Il est dépendant des conditions expérimentales et peut être mesuré par rapport à une électrode de référence et en absence de polarisation.

Les **électrodes de références** sont des électrodes impolarisables. L'électrode de référence dont la tension est choisie égale à zéro à toute température est l'électrode à hydrogène mais cette électrode est longue à préparer et d'un emploi délicat. Celle qui est le plus utilisée est l'électrode au calomel saturé (E.C.S ou S.C.E en version anglo-saxonne) [Web3].

Toute mesure ou simulation électrochimique qui pour objet de suivre le comportement d'un matériau métallique dans un milieu donné doit passer, impérativement, par la mesure du potentiel de corrosion. Le suivi de l'évolution de Ecorr en fonction du temps apporte indéniablement beaucoup d'information sur ce qui se passe à la surface d'un matériau. Cette donnée sert à :

- Avoir une première idée sur le comportement de la surface au contact du milieu corrosif ;
- Déterminer le temps nécessaire à l'obtention d'un régime stationnaire, indispensable pour les tracés potentiodynamiques et pour les mesures d'impédances;
- Fournir des indications sur la réactivité ou passivité de l'acier.

Lorsqu'on mesure le potentiel de corrosion d'un métal, on observe qu'il n'atteint pas immédiatement une valeur stationnaire. En effet, au moment où le métal est plongé dans la solution, celle-ci ne contient pas d'ions du métal si bien qu'un potentiel stationnaire est long à atteindre. D'autres parts, l'interface métal/solution peut être modifiée par formation d'un produit de corrosion insoluble ou d'un gaz comme l'hydrogène. Les courbes potentiel-temps peuvent présenter différents aspects [118 ,179].



*Figure 11: Principales formes des courbes potentiel-temps [118,179]*

- **Courbe a** : le potentiel devient de plus en plus noble. Il y a passivation du métal par formation à sa surface d'un produit de corrosion insoluble protecteur.
- **Courbe b** : le potentiel devient de moins en moins noble ou plus négatif. Il y a attaque continue du métal.
- **Courbe c** : le potentiel devient d'abord plus négatif, puis tend vers des valeurs plus positives. Il y a attaque suivie de passivation.

La passivation ou passivité représente un état des métaux dans lequel leur vitesse de corrosion est notablement ralentie par la présence d'un film passif naturel ou artificiel, par rapport à ce qu'elle serait en l'absence de ce film. Dans la plupart des cas, ce dernier apparaît spontanément par oxydation, parce que l'oxyde formé sur la surface est insoluble et constitue un obstacle qui ralentit les processus ultérieurs.

- **Courbe d** : le potentiel devient plus noble puis se déplace vers des valeurs plus négatives. C'est le cas lorsqu'au moment de son immersion, le métal est recouvert d'une couche protectrice. Celle-ci se développe pendant un temps plus ou moins long puis est détruite. Le métal est alors mis à nu.

#### IV.5 Matériaux utilisés pour les trois expériences

Nous avons choisis de tester deux aciers doux de type 304L, (pour l'expérience II) et 316L (pour l'expérience I et III) dont la composition chimique est portée sur le tableau 3. Les aciers inoxydables sont couramment désignés par leurs noms commerciaux ou selon le système américain AISI (American Iron and Steel Institute) ou encore selon la norme UNS (Unified Numbering System).

**Tableau 3 : Composition chimique des aciers inoxydables (304L et 316L) en pourcentage massique**

Nom usuel	UNS	C	Cr	Mo	Ni	Mn	N
<b>304L</b>	<b>S30403</b>	0,018	18	<b>0</b>	8,1	<b>0</b>	1,5
<b>316L</b>	<b>31603</b>	0,019	17,3	<b>2,04</b>	11,3	<b>1,04</b>	0,041

## Chapitre V: Comportement électrochimique de l'acier 316l dans une culture de *Porphyridium*, en batch, sous photopériode et étude de l'adhésion de ces cellules

### V.1.Objectif

Le but de cette expérimentation est de suivre le comportement électrochimique de l'acier 316 dans une culture de microalgue marine :*Porphyridium purpureum* sous une photopériode d'alternance obscurité /lumière 12/12 heures, en batch . Cette partie expérimentale s'articule sur trois aspects :

- Evolution du potentiel de corrosion libre en fonction du temps, ( Ecorr ou OCP);
- Estimation des cellules algales adhérentes après décrochement par ultrasons;
- Suivi de la croissance de *Porphyridium* et l'évolution de certains pigments (Caroténoïdes totaux, chlorophylle a et phycoérythrine);
- Essai témoin sans algues en vue de voir l'effet métabolique des souches algales.

### V.2. Matériel et méthodes

#### V.2.1. Préparation des échantillons ou électrodes de mesure

Les essais ont porté sur 12 échantillons d'acier qui se présentent sous forme de coupons rectangulaires d'une surface de 300 mm<sup>2</sup> (30x10 mm), chaque échantillon a subi les étapes suivantes :

- Connexion du métal à un fil électrique dénudé de sa gaine, de chaque coté;
- Cataphorèse : le processus de cataphorèse consiste à couvrir le métal à l'aide d'un antioxydant pendant 2 mn;
- Chauffage au four à 180 ° C pendant une heure;
- Enrobage des échantillons à l'aide d'un mélange résine/ durcisseur. La résine a été utilisée pour s'assurer une surface d'étude précise. L'échantillon a été moulé dans une résine sur une seule face, la seconde étant nue et servira d'électrode de mesure;
- Le polissage: c'est l'étape finale, qui permet d'enlever l'accident sur une seule face, l'autre étant protégé par la résine. Nous avons choisi, deux types de rugosités pour nos échantillon, 500 et 1000, en vue de voir l'effet de la rugosité sur l'évolution du potentiel de corrosion libre et l'adhésion des cellules .Les échantillons sont polis progressivement,

à l'aide de disques émeri de différents calibres, puis dégraissés et rincés à l'eau distillée et enfin séchés pendant quelques secondes avec de l'air comprimé .

### **V.2.2. Matériel biologique**

La souche de *Porphyridium purpureum* utilisée est immatriculée Ro108. Elle provient de la collection Sammlung von Algenkulturen Pflanzenphysiologischer Institut der Universität Göttingen (Allemagne ), où elle est référencée 1380A.

### **V.2. 3. Mise en culture de *Porphyridium purpureum***

#### **V.2 .3.1 .Milieu de culture**

Pour la croissance de la souche algale, nous avons préparé un milieu strictement minéral préconisé par Hémerick [168] contenant une concentration de NaCl de 29g /l (voir composition tableau annexe). Les différentes solutions sont préparées séparément, et ne sont mélangées que lors de la mise en culture de l'algue, avec les proportions déterminées. Le milieu ainsi préparé, dont le pH est ajusté à 7,5, est autoclavé à 120 °C pendant 20 minutes pour permettre sa stérilisation.

#### **V.2.3.2. Préculture et culture**

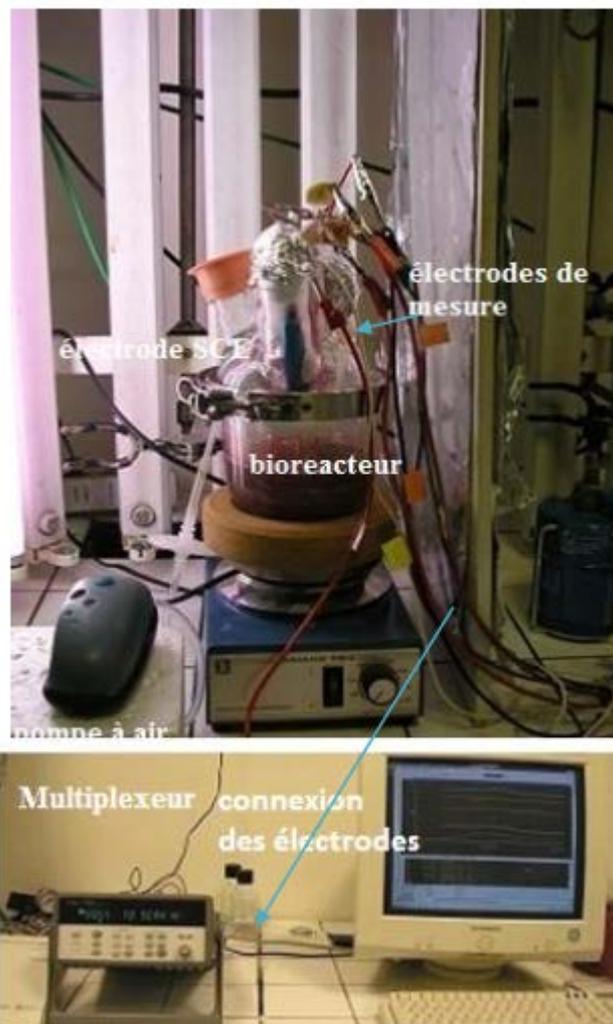
A partir d'une culture de *Porphyridium purpureum* dont l'absorbance est approximativement de 1,3, nous avons effectué une préculture sur Erlenmeyer, A partir de cette préculture dont l'absorbance est de 1,2, nous avons préparé 400 ml de culture nouvelle diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans un réacteur de 500 ml. Il faut noter que toutes les manipulations relatives à la mise en culture algale ont été effectuées dans des conditions stériles .Les conditions de culture sont : une température non contrôlée, un éclairage sous régime lumière/ obscurité 12h :12h, une intensité lumineuse incidente de 30,36 Einstein. m<sup>-2</sup> .s<sup>-1</sup>, deux néons ont été utilisés : lumière blanche et lumière fluorescente, le % CO<sub>2</sub> d'origine atmosphérique est estimé à 0 ,03%; un pH de démarrage de culture d'environ 7,3.

### **V.2 .4. Culture dans le réacteur**

#### **V.2.4.1 Dispositif expérimental**

Le dispositif expérimental définitif correspond à un réacteur électrochimique en verre

(Figure 12 a) permettant à la fois la croissance et le suivi électrochimique. Le photobioréacteur comporte plusieurs entrées, une entrée pour les échantillons, une entrée pour les tuyaux en silicone servant au bullage (entrée et sortie de l'air filtre), une entrée permettant le prélèvement, l'ajout d'eau distillée et ajustement du pH. Les ouvertures du bioréacteur sont bouchées à l'aide de coton cardé enveloppé dans de la gaze. Ce système est agité de façon magnétique. Une entrée est destinée pour l'électrode de référence. On doit préciser que l'expérimentation a été effectuée en présence et en absence d'algues.



**Figure12a: Photographie du dispositif expérimental utilisé pour suivre la croissance et le potentiel de corrosion dans la culture de Porphyridium**

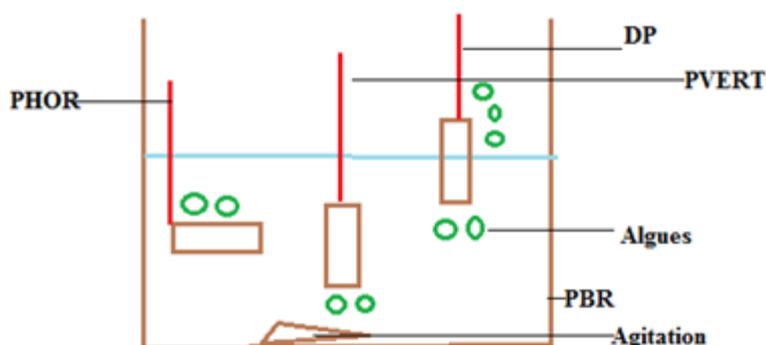
### **Disposition des échantillons, modes d'immersion et nomenclature**

A l'intérieur de ce réacteur nous avons placé un support ou châssis en téflon, qui permet le maintien des échantillons. Chaque échantillon est défini par sa position par rapport au fond du

réacteur ainsi que par rapport à sa rugosité. La position des échantillons au sein du réacteur se fait de trois façons pour chaque type de rugosité tel que le montre la figure 12 b:

- Deux échantillons placés verticalement et complètement immergés : PVERT500, PVERT 1000 ;
- Deux échantillons placés verticalement, dont la moitié seulement est immergée dans le milieu de culture et que nous avons préalablement marquée ; DP500, DP1000 ;
- Deux échantillons placés horizontalement et complètement immergés : PHOR500, PHOR1000 ;

Les abréviations MA et MS indiquent le milieu dans lequel a été immergé l'échantillon, respectivement, milieu avec algues et milieu stérile.



*Figure12b : Simulation et mode d'immersion des échantillons*

### **Mesure électrochimique**

Le suivi de la variation du potentiel de corrosion libre est assuré à l'aide d'un multiplexeur HP AGILENT34970A (Figure 12 a) qui correspond à une centrale d'acquisition régie par un logiciel BENCHLINCK. Ce multiplexeur est relié aux six électrodes de mesure et une électrode de référence au calomel saturé à l'aide du KCl. Les résultats sont exprimés en volts par rapport à l'électrode de référence.

#### **V.2.4 .2 . Stérilisation du matériel**

Les deux réacteurs (Essai et témoin) contenant les échantillons et le milieu de culture sont autoclavés séparément à 120° C pendant 20mn. L'électrode de référence est stérilisée préalablement à l'aide d'un mélange eau distillée / alcool 70%, pendant 15 minutes. Elle est ensuite introduite stérilement sous hotte, ainsi que la culture algale dans le réacteur.

### **V.3 .Déroulement des manipulations**

Durant toute l'expérimentation, pour la période de 40 jours, différentes mesures ont été suivies :

#### **V.3.1. Mesure de l'absorbance**

Dans le but d'étudier l'influence des différentes phases de croissance de *Porphyridium* sur l'évolution du potentiel de corrosion de notre souche et celle de la production des pigments, nous avons mesuré l'absorbance à différentes longueurs d'onde : à 760 nm pour estimer la biomasse, à 683 nm la chlorophylle a, à 565 nm la phycoérythrine et à 450 nm les caroténoïdes totaux. A cet effet, nous avons utilisé un spectrophotomètre de type BECKMAN DU-64.

#### **V.3.2 .Mesure du potentiel de corrosion**

Le potentiel est mesuré de façon cyclique, à des intervalles croissants successifs allant de 10s, 1mn, puis 20mn. Les mesures sont suivies en ligne sans interruption.

#### **V.3.3. Mesure des facteurs abiotiques et réajustement de divers paramètres**

Nous avons prélevé, sous conditions aseptiques, tous les deux jours, environ 1ml de culture en vue de suivre l'absorbance à différentes longueurs d'onde, aussi le milieu de culture a été réajusté au niveau initial à l'aide d'eau distillée stérile, en vue de pallier à la perte d'eau par évaporation. Le pH a été mesuré quotidiennement ainsi que la température, Le pH a été remis à une valeur adéquate à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique dilué, la valeur de pH a été réajustée de façon à ne pas dépasser la valeur extrême de 8.

La mesure de l'intensité lumineuse incidente et sortante a été effectuée. La quantité de lumière a été ajustée, au fur et à mesure, en fonction de la quantité de lumière absorbée celle ci étant proportionnelle à la quantité de biomasse algale. Après 10 jours de culture nous avons ajouté une troisième lampe : lumière incidente 45 $\mu$  moles m<sup>2</sup>.

#### **V.4. Arrêt de l'expérience et retrait des échantillons**

Au bout de 40 jours d'expérimentations, les échantillons sont retirés, rincés à l'eau salée et pesés comme avant l'expérience, le poids d'algues fixées sur l'échantillon, a pu être apprécié (voir figure annexe 5 ).

##### **V.4.1. Estimation des cellules algales adhérentes au support métallique après décrochage aux ultrasons**

Les cellules étant adhérentes au substrat, nous devons d'abord les détacher du support pour ensuite les dénombrer, nous avons utilisé des ultrasons, car la sonication est plus efficace que le raclage et brossage pour détacher les cellules [180]. Pour cela les échantillons sont mis dans un bécher contenant 25 ml d'eau salée (solution de NaCl 20g/l) et passés aux ultrasons pendant 10 minutes (20 minutes pour les échantillons à moitié immergés). Un prélèvement est alors fait sur la solution contenue dans le bécher pour un dénombrement au microscope optique. Trois séries de comptage ont été effectuées pour chaque échantillon et c'est la moyenne qui a été considérée. Le comptage a été fait en utilisant la cellule de Mallassez. Le nombre de cellules fixées = moyenne du nombre obtenu  $\times 10^5 \times 25 \text{ml}$ .

##### **V.4.2 Etude microscopique**

Les échantillons sont ensuite observés au microscope optique métallurgique, comme nous l'avons fait avant l'expérience, en vue d'apprécier l'état de surface de chaque échantillon et noter les variations subies par chaque coupon métallique, de façon préliminaire.

L'observation au microscope électronique à balayage étant plus précise, et pouvant nous donner des informations plus complètes sur l'état de surface de nos échantillons ainsi que sur la présence ou non de biofilms. A cet effet les échantillons ont été méticuleusement observés, après métallisation et déshydratation sous différents angles et différents grossissements.

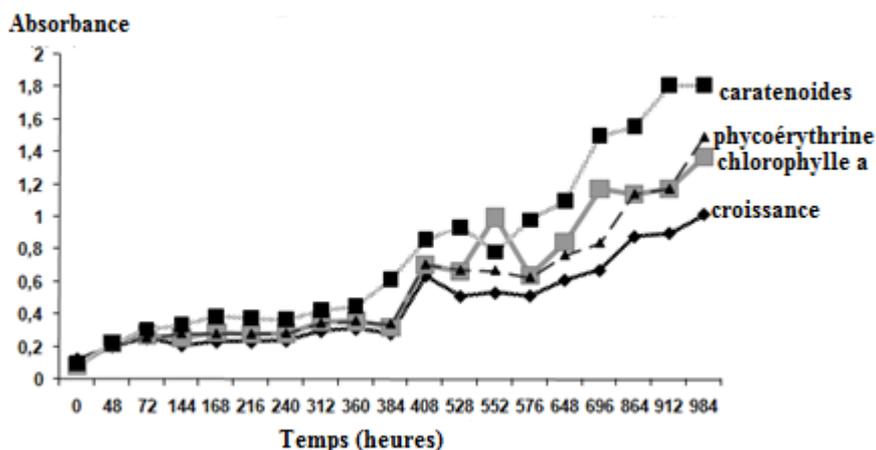
#### **V.5. Résultats**

##### **V.5.1. Croissance et production des pigments**

Lorsqu'on examine la courbe de croissance (Figure 13) de la souche algale en fonction du temps, on remarque deux phases : une phase de latence longue qui dure environ 384 h, et une phase de croissance exponentielle qui n'est pas arrivée au stade plateau, on arrive à une valeur

maximale d'absorbance voisine de 1. Cette croissance lente est due vraisemblablement à la valeur d'absorbance initiale très faible de 0,1 et aux conditions de croissance qui ne sont pas optimales. Nous avons choisi de démarrer notre culture sur une valeur d'absorbance initiale faible, en vue de cerner les différentes phases de croissance de notre souche, c'est-à-dire, la phase de latence, la phase exponentielle et la phase stationnaire, ceci afin d'établir une corrélation entre l'évolution du potentiel de corrosion, les phases métaboliques de la souche et la formation des biofilms car il est maintenant clairement établi que les propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes dépendent de leur phase de croissance [181] ce qui influe sur leur pouvoir d'adhésion.

L'allure des courbes de production des différents pigments, phycoérythrine (683nm), caroténoïdes totaux (450nm) et chlorophylle a (565nm) est similaire à celle de la courbe de croissance (760nm). On remarque une nette augmentation de la concentration des différents pigments durant la phase de croissance exponentielle en particulier les caroténoïdes totaux.



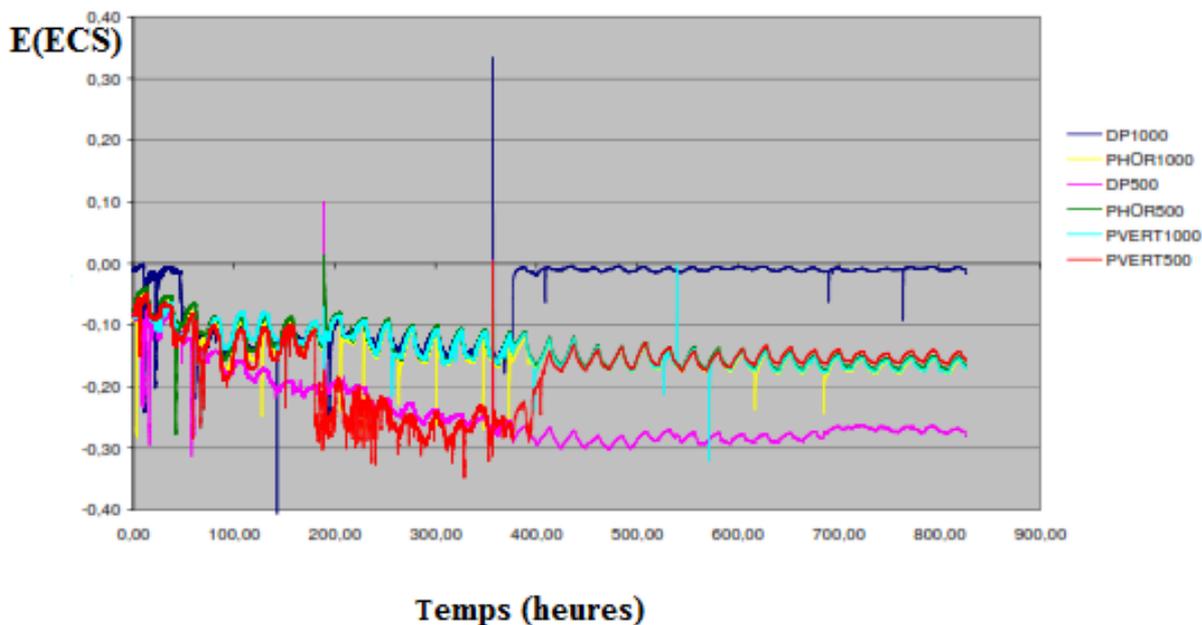
*Figure13 : Evolution de la croissance de Porphyridium en fonction du temps  
Corrélation avec la production des pigments*

## V.5. 2. Evolution du potentiel de corrosion libre

### V.5.2.1. Milieu avec algues

- Globalement, le potentiel de corrosion libre en présence d'algues varie entre - 0,307 V et - 0,005 V environ, comme le montre la figure 13. Si on compare les échantillons toutes positions confondues, on remarque deux extrêmes, l'échantillon en position à demi plongé, poli à 1000 (DP1000) dont le potentiel s'éloigne des autres et montre un

potentiel proche de 0 et l'échantillon poli à 500 (DP500), se trouvant à la même position qui, lui, enregistre le potentiel le plus faible, approchant de ( $-0,3$  V).



*Figure 14 : Evolution du potentiel de corrosion libre en fonction du temps pour l'ensemble des échantillons en présence d'algues*

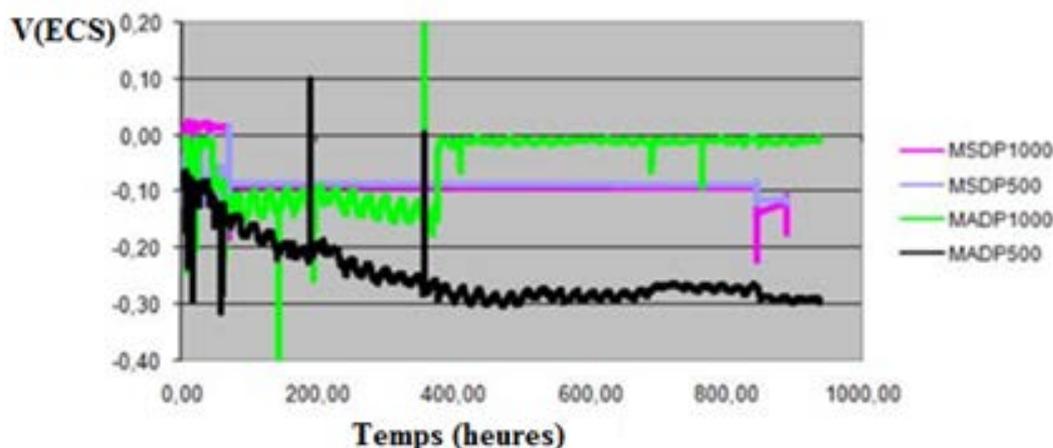
L'évolution du potentiel de corrosion des échantillons à demi-plongés est beaucoup plus difficile à interpréter que celle pour les échantillons complètement immergés, les échantillons étant ici en contact avec deux phases distinctes, l'air et le milieu. Par ailleurs, la variation constante du niveau de liquide, et donc, du rapport surface immergée / surface émergente qui est en permanente évolution.

L'observation détaillée des deux courbes peut toutefois nous donner des renseignements intéressants : la courbe de potentiel de l'échantillon de rugosité 1000 est pratiquement confondue avec celles des échantillons complètement immergés, jusqu'à environ 400 h. Au-delà, elle s'en sépare et s'approche du potentiel nul. La courbe de potentiel de l'échantillon de rugosité 500 présente au départ une allure plus proche de celles enregistrées pour les échantillons complètement immergés.

Pour plus de clarté, nous avons comparé les résultats obtenus pour deux échantillons différents pour une même position et des rugosités différentes, en tenant compte du milieu d'immersion, milieu sans algues et milieu avec algues. Les observations constatées sont les suivantes :

- **Echantillons à demi plongés**

En ce qui concerne, les coupons à moitié immergés, l'échantillon poli à 1000 enregistre un potentiel qui varie entre - 0,152 et - 0,005 V environ, ce qui est plus élevé comparé à l'échantillon poli à 500 qui enregistre un potentiel allant de - 0,281 à - 0,074 V comme le montre la figure (Figure 14 ). Lorsqu'on examine l'allure des deux courbes, on remarque deux étapes chronologiques successives, qui sont les suivantes : 0 – 400 heures et 400 - 820 heures. Si les étapes sont communes aux deux coupons, il n'en est pas de même pour le comportement de ces derniers durant ces phases. Pour l'échantillon poli à 1000, le potentiel commence par des valeurs proches de zéro. Ensuite, il y a une diminution, puis le potentiel augmente pour se stabiliser jusqu'à la fin de l'expérience à une valeur légèrement négative. L'échantillon poli à 500 part d'un potentiel plus faible que celui du coupon poli à 1000. Ensuite, ce potentiel diminue progressivement, pour se stabiliser entre - 0,25 et - 0,30 V à la fin de l'expérience.



**Figure 15: Evolution du potentiel de corrosion libre en fonction du temps en présence (MA) et en absence (MS) d'algues (échantillons à demi – plongés)**

- **Echantillons immergés en position verticale** (Figure 15), le potentiel varie, en ce qui concerne l'échantillon poli à 1000, entre - 0,173 et - 0,057 V alors que pour l'échantillon poli à 500 le potentiel passe de -0,347 à - 0,057 V. Pour ce dernier, nous avons noté une diminution entre le temps  $t = 200$  et  $t = 400$ , absente dans le premier cas. En dehors de cette phase, les deux courbes se superposent.

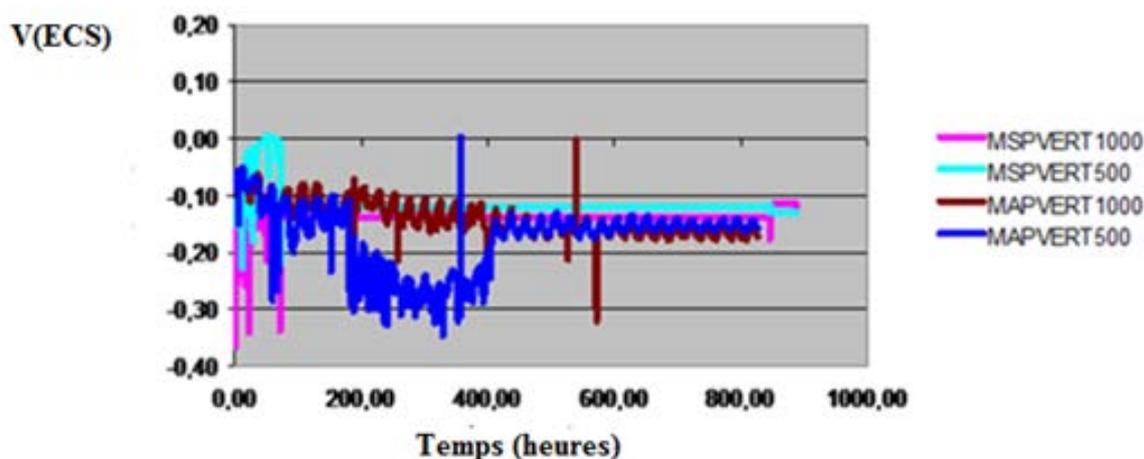


Figure16 : Evolution du potentiel de corrosion libre en présence(MA) et en absence(MS) d'algues (échantillons plongés verticalement)

- **Echantillons, immergés en position horizontale**, le potentiel varie entre (- 0,167 V) et (- 0,055 V) environ pour les deux échantillons. Les deux courbes se superposent. Il n'y a pas de différences notables en ce qui concerne les deux types de rugosité, comme le montre la figure 16.

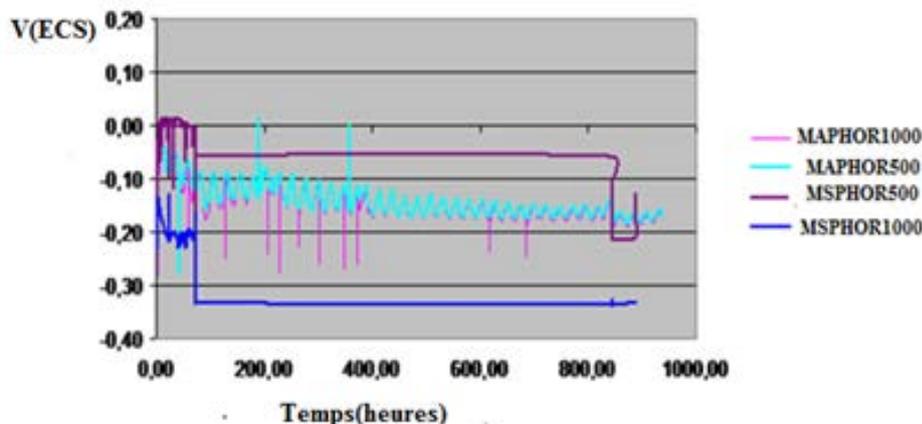


Figure17 : Evolution du potentiel de corrosion libre en fonction du temps en présence(MA) et en absence (MS) d'algues (échantillons plongés horizontalement)

En conclusion, le paramètre rugosité ne semble pas influencer sur l'évolution du potentiel, sauf dans le cas des échantillons à moitié immergés où paradoxalement l'échantillon poli à un degré plus élevé (1000) montre un potentiel nettement plus élevé, que l'échantillon poli à un

degré moindre (500). La stabilisation du potentiel de corrosion libre a lieu pendant la phase exponentielle c'est-à-dire à partir de 400 heures de culture, qui coïncide avec la production de pigments. Les oscillations sont plus homogènes durant cette phase.

#### **V.5.2.2. Milieu sans algues (témoin)**

Pour ce qui concerne l'échantillon immergé à demi en milieu sans algues, le potentiel décroît légèrement et se stabilise à une valeur constante d'environ  $-0,10$  V (Figure 14). Dans le cas des échantillons immergés verticalement le potentiel se stabilise à  $-0,15$  V pour les deux échantillons. (Figure 15) L'analyse de l'allure de la courbe de potentiel des échantillons immergés horizontalement, (Figure 16) montre que le potentiel de l'échantillon poli à 1000 se stabilise à  $-0,06$  V environ, alors que pour celui poli à 500, il se stabilise en dessous de ( $-0,3$  V). Ce dernier résultat semble dû à un problème électrique, et ne doit donc pas être pris en compte. Les résultats obtenus lors de l'étude sur milieu sans algues, montrent que le milieu Hémerick qui a une composition voisine de celle de l'eau de mer synthétique, est pourtant peu corrosif le potentiel varie peu.

#### **V.2.2.3. Evolution de Ecorr en fonction du milieu d'immersion et en fonction de la phase de croissance**

La différence fondamentale que nous avons notée, lors de l'analyse de l'évolution temporelle de Ecorr en fonction du milieu d'immersion, est la présence d'oscillation périodiques, dans la culture d'algue et absente dans le témoin, c'est-à-dire milieu sans algue et cela quelque soit le type d'échantillon en question (figures 14,15,16). Il faut rappeler que l'expérience témoin a été effectuée dans les mêmes conditions que l'essai et en présence de lumière. Le même régime lumière a été appliqué. L'analyse de ces oscillations périodiques en fonction des phases de croissance, montre qu'il existe une différence nette entre l'allure des oscillations enregistrées durant la phase de latence, comprise entre 0 et 384 heures (figure 18) et celles notées durant la phase exponentielle (Figure 19). Dans cette phase, les oscillations du potentiel se distinguent par une régularité et une stabilisation relative pour tous les échantillons à l'exception du DP1000. L'étude détaillée de ces oscillations a permis d'estimer leur fréquence, qui est d'environ 24 heures. Durant ces oscillations, Ecorr augmente en présence de lumière et diminue à l'obscurité (Figure 19).

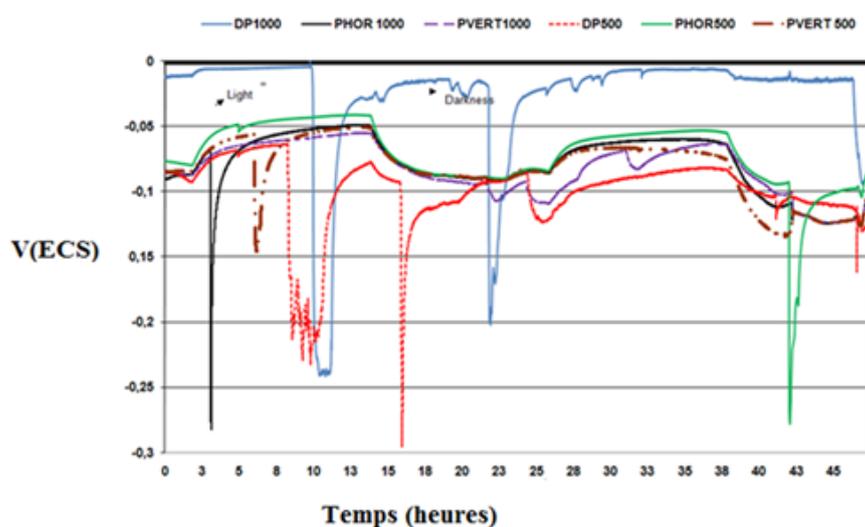


Figure 18 : Oscillations du potentiel de corrosion libre, enregistrées en phase de latence

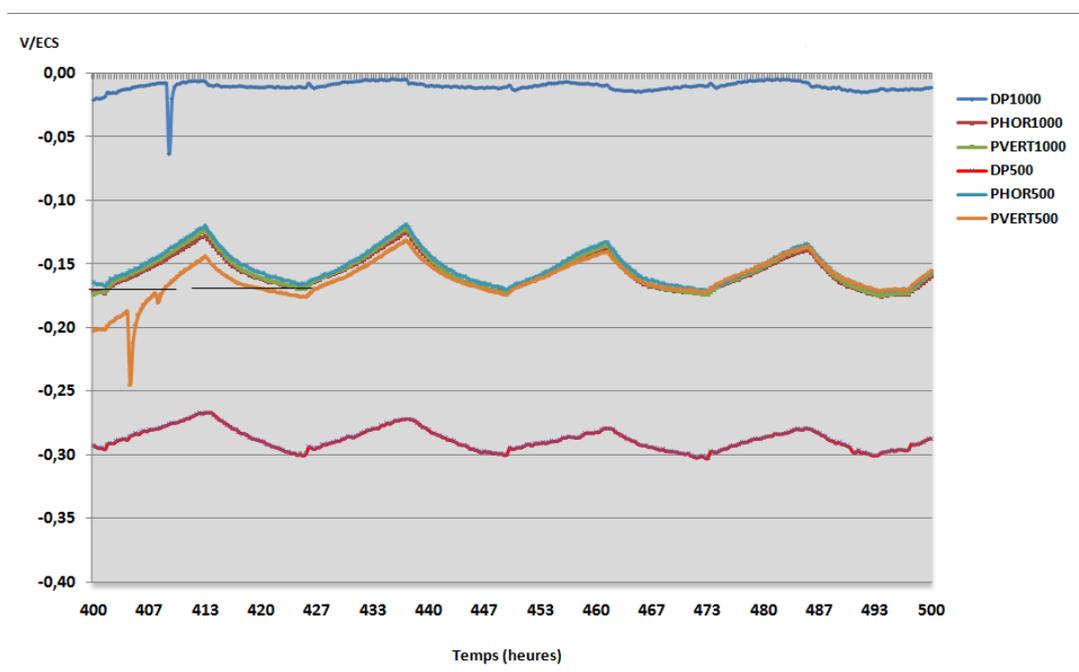


Figure 19 : Oscillations du potentiel de corrosion libre, enregistrées en phase exponentielle

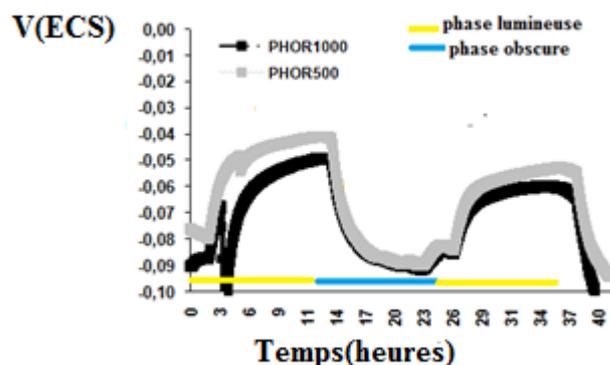


Figure20 : Effet de la photopériode sur le potentiel de corrosion libre et durée de l'oscillation (24heures)

---

### V.5.3. Nombre de cellules adhérentes et microscopie

#### V.5.3.1. Nombre de cellules adhérentes

Le nombre de cellules algales adhérentes, obtenu après décrochement, pour chaque échantillon, est représenté dans l'histogramme (figure 21). Globalement, les échantillons polis à 500, enregistrent des valeurs inférieures à celles obtenues pour les échantillons polis à 1000, la différence étant moins nette pour les échantillons placés en position verticale. Il faut rappeler que le temps de décrochement par ultrasons est de 10 min, pour tous les échantillons immergés complètement. On note que pour ce temps, le nombre de cellules décrochées sur les échantillons verticaux immergés est nettement inférieur, pour les deux rugosités, à celui observé pour les échantillons horizontaux immergés. Pour les échantillons à moitié immergés, le nombre de cellules adhérentes est très proche de celui noté pour les échantillons placés en position horizontale, et nettement supérieur à celui observé pour les échantillons en position verticale. Mais ces cellules semblent plus résistantes au décrochement car le temps qu'il a fallu utiliser pour la sonication est de 20 min au lieu de 10 min dans les autres cas. En outre, la comparaison quantitative entre le nombre de cellules immobilisées dans les trois positions a montré que le nombre de cellules immobilisées sur la surface non immergée des échantillons DP était probablement beaucoup plus élevé que ceux acquis dans les autres positions dans la mesure où les cellules qui sont fortement fixées ne sont pas comptabilisées.

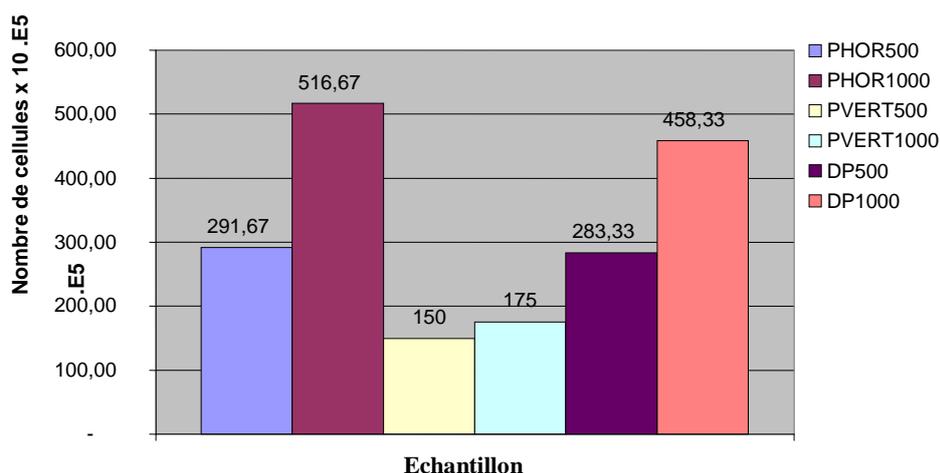


Figure 21: Nombre de cellules adhérentes en fonction des échantillons

### V.5.3.2. Analyse microscopique

Pour les échantillons à moitié immergés, nous avons choisi deux champs d'étude en fonction des parties observées, partie aérienne et partie immergée (Figure 22). L'examen au microscope électronique à balayage de l'échantillon DP1000 montre que la partie aérienne présente des structures qui pourraient être assimilées à des formations biologiques ou organiques ou biofilms associés ou non à des cristaux de sels ; la partie immergée présente quelques cristaux de sels. Les objets observés ont la forme et la taille des microalgues *Porphyridium purpureum*. Cela veut sans doute dire que toutes les algues immobilisées dans cette partie aérienne n'ont pas été décrochées, même en doublant le temps de décrochage. La partie immergée, quant à elle, ne présente à la surface que des rayures.

Les autres échantillons y compris, l'échantillon DP500, présentent des surfaces rayées mais sans présence de formes biologiques ou biofilms fortement fixés (Figures 23 - 26.).

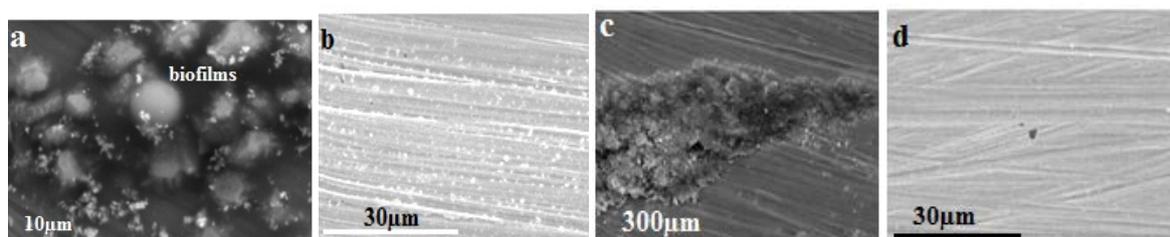


Figure 22: Micrographies des échantillons à moitié immergés obtenues par microscope électronique : DP1000 (a, b) et DP500 (c,d) : (a) partie aérienne qui présente des biofilms, (b) partie immergée, absence de biofilms, (c) partie aérienne des débris d'algues mortes, (d) partie immergée nette.

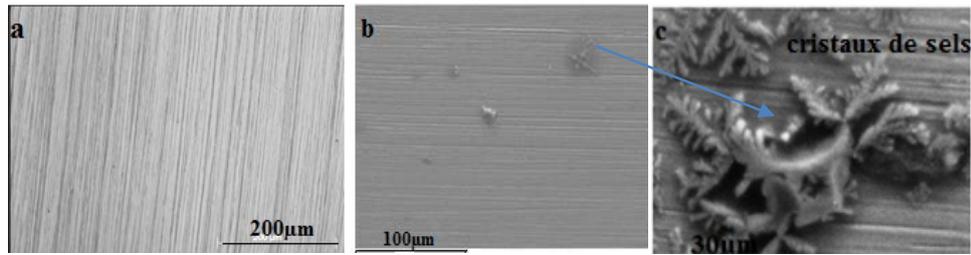


Figure 23: Observation de la surface de l'échantillon plongé horizontalement et poli à 1000 (a) avant immersion, (b) (c) après immersion.

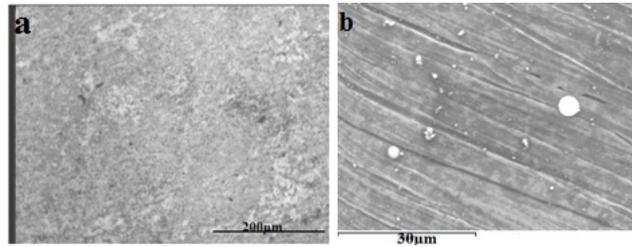


Figure 24 : Observation de la surface de l'échantillon plongé horizontalement poli à 500, (a) avant immersion (métallurgique), (b) après immersion (MEB)

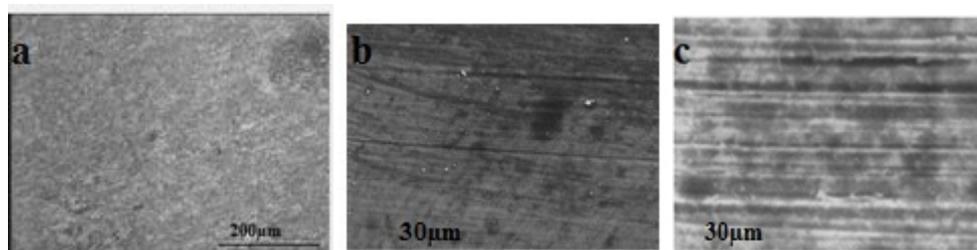


Figure 25 : Observation de la surface de l'échantillon plongé verticalement, poli à 1000, (a) représente l'échantillon avant immersion, (b) et (c) représentent le même échantillon prélevé à la fin de l'expérience mais après exploration au MEB, sur deux champs différents, on constate que la surface est nette sans biofilms

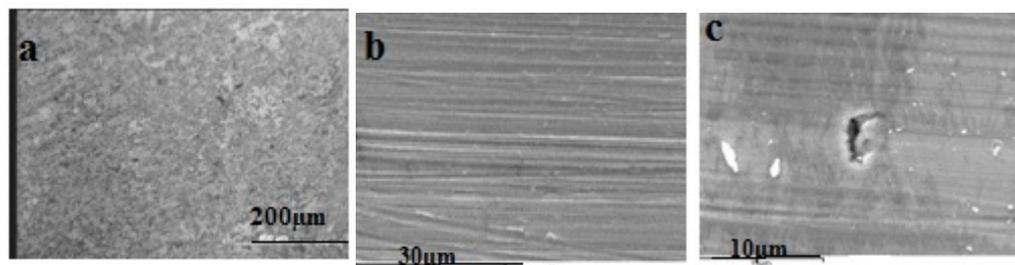


Figure 26 : Observation de la surface de l'échantillon plongé verticalement, poli à 500, (a) représente l'état de surface avant l'expérience mais (b) et (c) après immersion ; exploration au MEB, sur deux champs différents

## V.6. Discussion

Les paramètres prépondérants dans notre étude qui pourraient expliquer l'évolution du potentiel de corrosion libre de l'acier 306L en relation avec la formation du biofilm dans la culture de *Porphyridium purpureum* sont :

- Les facteurs abiotiques : la lumière, le pH, le milieu par sa composition chimique ;
- Le matériau par sa composition chimique, ainsi que sa structure c'est-à-dire l'état de surface au moment de son immersion ;
- L'espèce par ses capacités métaboliques, en premier lieu, les phases de croissance ensuite la photosynthèse et l'adhérence des cellules ;
- La position des électrodes de mesure et leur contact avec le milieu.

### **V. 6.1. Effet de l'éclairement**

Il a été montré que les paramètres environnementaux comme l'intensité lumineuse peuvent influencer la chimie des surfaces métalliques et déterminer les réactions électrochimiques. [15]. Dans les cultures algales, la lumière agit par son intensité, par sa nature, et par sa périodicité. Le régime de lumière continue est souvent utilisé pour optimiser la croissance, mais dans des cas particuliers, lorsqu'on veut optimiser une production d'un métabolite donné, il peut être préférable de recourir à la photopériode. En effet, l'alternance lumière/obscurité agit directement sur le métabolisme et sur la division des cellules en les synchronisant [182].

L'action de la lumière sur l'évolution du potentiel de corrosion par rapport aux biofilms n'est pas très claire. Les avis des auteurs divergent, certains affirment que l'augmentation du potentiel de corrosion libre a lieu en présence de lumière, d'autres trouvent que l'obscurité favorise cette élévation, enfin quelques auteurs ne trouvent aucune influence de l'éclairement sur l'évolution du potentiel de corrosion libre [6].

Dowling et al. en 1992 [183] en étudiant l'effet des biofilms photosynthétiques (cas d'une cyanophyceae *Anabena sp*) sur le potentiel de corrosion libre d'un acier ont montré que les variations du potentiel de corrosion libre, reliées à l'oxydation du 316L, sont bien dues aux biofilms photosynthétiques qui produisent de l'oxygène dissous sous l'effet de la lumière.

Nous pensons que la divergence de ces auteurs sur l'effet de la lumière sur le potentiel de corrosion libre est due à la diversité des espèces dans ces biofilms aquatiques étudiés, à leur métabolisme et aux conditions expérimentales mises en jeu.

Récemment, quelques auteurs tels que Hultberg et al. en 2014 [184] se sont intéressés à l'effet de la qualité de la lumière sur la formation des biofilm. Il semblerait que certaines microalgues, par exemple *Chlorella*, ont tendance à former un biofilm plus dense lorsqu'elles sont cultivées en présence de lumière bleue.

Maruthumatu et al. en 1993[185] ont noté que le potentiel est plus élevé le jour que la nuit, en mesurant le potentiel de corrosion libre d'échantillons d'acier immergés en eau marine dans des conditions de photopériode 12 h/12h. Ils ont déduit que cette différence de potentiel notée en absence et en présence de lumière est due à la présence d'algues dans le biofilm, qui par le phénomène de photosynthèse produisent de l'oxygène qui peut influencer la réaction cathodique par les fortes pressions partielles créées à proximité de l'électrode.

Le même phénomène est constaté par Marconnet et al, en 2008, [125] en suivant l'évolution du potentiel de corrosion libre en fonction du temps, sur des échantillons en acier immergés en eau douce pendant 18 jours au printemps. Ils ont enregistré des courbes présentant des oscillations semblables à celles que l'on a obtenues. Ils ont imputé ces oscillations, c'est-à-dire l'augmentation et la diminution du potentiel de corrosion libre, aux fluctuations de la température, basse la nuit et plus élevée le jour, celle-ci directement liée à la lumière par le phénomène de photopériode et la production de l'oxygène.

En comparant leurs résultats à ceux obtenus dans le cadre de ce travail, on peut penser qu'effectivement, c'est la lumière, se traduisant par une production d'oxygène, qui est le facteur déterminant de ces oscillations quel que soit le milieu d'immersion. (eau douce ou eau marine).

Ces oscillations particulières sont directement liées à la présence d'oxygène. L'oxygène faisant partie des éléments oxydants les plus abondants, de la planète, les algues étant la source principale d'oxygène par la photosynthèse, elles pourraient jouer un rôle fondamental dans les biofilms de la corrosion ou générer un phénomène électrochimique.

Dans notre étude, ces oscillations sont absentes en milieu sans algues et leur fréquence est d'environ 24 heures, ce qui confirmerait l'hypothèse de Maruthumatu, Dowling et Marconnet. Mais, il faut signaler que ces oscillations ne sont relativement homogènes ou régulières que dans le cas des échantillons plongés horizontalement qui présentent les amplitudes les plus régulières, alors que pour les autres échantillons, ces oscillations sont plus variables. Cette différence notable ne peut être imputée qu'à la seule position des échantillons puisque les courbes des deux échantillons PHOR se superposent.

De plus, il semblerait qu'il y ait une différence entre l'allure des oscillations enregistrées durant la phase de latence comprise entre 0 et 384 heures et celles notées durant la phase exponentielle. Dans cette dernière phase, les oscillations du potentiel se distinguent par une régularité et une stabilisation relative pour tous les échantillons. Probablement, que les cellules en phase de latence ont une faible efficacité photosynthétique comparées aux cellules qui sont en phases exponentielle. La synchronisation de la division cellulaire n'ayant lieu que lorsque les cellules se divisent activement, c'est-à-dire en phase exponentielle, donc la production d'oxygène est irrégulière.

Motoda et al. en 1990 [14] ont décrit un ennoblement de l'acier, c'est-à-dire une augmentation du potentiel de corrosion libre, dû à des algues, en particulier des diatomées appartenant à l'espèce *Phaedactylum tricorutum*. Ce potentiel atteint + 400mV /ECS, sans la présence des bactéries. Nous n'avons pas constaté d'ennoblement du potentiel, dans notre étude les valeurs maximales obtenues sont inférieures ou égales à (-0,005 V), sauf dans le cas où il y a présence de biofilms fortement adhérents. On doit préciser que les résultats obtenus par tous ces auteurs ne sont une référence que pour les échantillons plongés verticalement, position classique pour toute étude électrochimique.

### **V.6.2. Effet du milieu d'immersion**

Les résultats obtenus lors de l'étude sur milieu sans algue, montrent que le milieu Hémerick, qui a une composition proche de celle de l'eau de mer synthétique, est peu corrosif : le potentiel varie peu. Ceci est conforme aux résultats trouvés par Féron et al. en 1997 [186] qui ont testé l'effet corrosif de l'eau de mer stérile et ont conclu que les eaux de mer ne sont pas suffisamment agressives pour engendrer la corrosion des aciers inoxydables. Il faudrait la présence de microorganismes ou d'enzymes pour provoquer la corrosion.

Beaucoup de travaux ont été faits quand à l'évolution du potentiel de corrosion libre en milieu marin stérile. Beaucoup d'auteurs s'accordent sur l'idée que le potentiel de corrosion libre, dans ce cas, évolue très peu et les valeurs enregistrées varient entre -100 et +100mv. Des valeurs de potentiel d'abandon comprises entre 0,2 et 0,45 V/ECS sont ainsi généralement mesurées en milieu naturel, alors qu'elles ne dépassent pas 0,1 V/ECS en eau de mer dépourvue de microorganismes [6].

Les valeurs obtenues dans notre expérience varient entre - 0 ,40 et + 0 ,01 V/ECS. Le pH, qui se situe aux alentours de la neutralité, influe très peu sur le potentiel de corrosion libre.

A l'inverse, comme on l'a dit précédemment, le milieu de culture peut agir sur la formation des biofilms et la nature de l'adhésion des microalgues. Ainsi, l'effet du pH sur l'adhésion des microalgues a été rapporté par Sekar et al. en 2004 [110] lors d'une étude sur l'adhésion de *N. amphibia*. Ces auteurs ont montré qu'un pH alcalin favorise l'attachement des cellules de *Navicula amphibia* sur les substrats en acier car les microalgues en majorité montrent une bonne croissance à des pH compris entre 6 et 9. Un autre facteur du milieu qui pourrait agir fortement sur l'adhésion des cellules microalgales est sa composition chimique, ainsi la concentration en fer lorsqu'elle est limitante favorise l'adhésion des cellules de *Chlorella* [112].

### **V.6.3. Effet de la température**

La température joue, bien entendu, un rôle primordial dans le développement du biofilm, puisque, pour des températures éloignées de l'optimum, la vitesse de multiplication des cellules est ralentie. Gallardo-Moreno et ses collaborateurs en 2004 [187] ont rappelé que la température d'expérimentation doit être proche de la température optimale de croissance, sans quoi l'adhésion théoriquement attendue ne sera pas observée.

### **V.6.4 Effet de la souche et de ses capacités métaboliques**

Les résultats des mesures de potentiel sont difficiles à interpréter car beaucoup de paramètres entrent en jeu, l'espèce à laquelle appartient l'algue testée est un paramètre important. Nous n'avons rencontré aucune étude ayant trait au rôle de *Porphyridium purpureum* dans la biocorrosion, mais quelques études ont rapporté le rôle anticorrosif des EPS [188]. Cette espèce, qui en produit beaucoup dans des conditions de culture optimisées (cas des cultures industrielles), aurait peut-être un rôle anticorrosif, d'autant plus qu'on attribue aux EPS un rôle antioxydatif [189]. Cela pourrait expliquer les valeurs de potentiel bas obtenues. Ces auteurs ont testé le pouvoir anticorrosif des EPS, issus de souches bactériennes. Il semblerait

que certains EPS auraient un rôle protecteur de la surface des aciers. *Porphyridium purpureum* possède aussi un système enzymatique antioxydatif, tel que les catalases et peroxydases qui dégradent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [190], ce qui pourrait expliquer le potentiel négatif obtenu.

Les EPS sont également impliqués dans la corrosion microbienne influencée (CMI), en particulier, leur interaction avec le fer et autres métaux peut augmenter la cinétique de la corrosion des métaux, comme cela a été démontré chez les bactéries sulfato- réductrices [191].

Little et al. en 1996 [192] ont examiné le rôle des polysaccharides dans le phénomène de la corrosion marine du cuivre. Ils ont constaté qu'une bactérie marine appartenant à l'espèce *Oceanospirillum* cultivée sur une surface cuivrée, produit une grande quantité de polysaccharides exocellulaires (EPS) sur lesquels se lient des molécules de cuivre. Cela peut être un mécanisme de protection contre la toxicité du cuivre. En principe, la contribution des EPS dans les mécanismes de la biocorrosion est basée sur leur fixation d'ions métalliques, soit par réaction chimique, chélation ou autre liaison ionique et la dissolution subséquente du métal. Dans les systèmes utilisant les espèces autres que les bactéries réductrices des sulfates, le rôle des EPS dans la corrosion est peu étudié, bien qu'ils soient suspectés d'être impliqués dans le mécanisme de corrosion.

#### **V. 6.5. Effet du matériau**

Un autre paramètre important est la nature de l'acier choisi, le 316L étant un acier résistant à la corrosion, souvent, même sous l'action des bactéries. Du fait de sa composition chimique, les valeurs de potentiel basses enregistrées ne sont pas étonnantes. Mais ce matériau est aussi défini par sa composition chimique, son état de surface, sa topographie, sa rugosité et son hydrophobicité. Fattom et Shilo en 1984 [193] en étudiant les capacités d'adhésion des microalgues de type cyanobactéria montrent que l'hydrophobicité d'une surface favorise l'adhésion de ces micro algues de façon similaire aux bactéries. Les surfaces rugueuses des aciers inoxydables passivés sont plus exposées à la corrosion localisée par piqûre et crevasse que les surfaces lisses [194]. Deux paramètres liés au matériau mis en jeu lors de notre expérimentation sont sa composition chimique et sa rugosité.

- Influence de la rugosité sur l'adhésion des cellules et sur le potentiel de corrosion libre

La rugosité d'un matériau est un paramètre qui influe en principe sur le taux d'adhésion cellulaire qui par son degré influence la nature des phénomènes électrochimiques qui ont lieu à sa surface et par la même sur le potentiel de corrosion libre. Dans notre étude la rugosité influe surtout sur le phénomène d'adhésion, le nombre de cellules adhérentes noté pour les échantillons polis à 500, est inférieur à celui enregistré pour les échantillons polis à 1000 et cela quelle que soit la position de l'échantillon. Il n'existe aucune étude rapportant l'adhésion de *Porphyridium* sur des aciers qui pourraient nous aider à comprendre pour quoi l'adhésion est plus importante sur les échantillons lisses par rapport aux échantillons rugueux. Boulangé-Petermann et al. 1997 [94] rapportent que la rugosité pourrait permettre de réduire la surface de contact entre le microorganisme et le support, favorisant ainsi son détachement mais que la présence de « microcrevasses » peut favoriser l'adhésion en protégeant les microorganismes des phénomènes de cisaillement hydrodynamique. La première hypothèse avancée par ces auteurs pourrait expliquer les résultats obtenus pour *Porphyridium*. A l'inverse Sekar et al. en 2004 [110] ont remarqué lors de leur étude que pour certaines micro algues (diatomées et chlorelles) l'adhésion des cellules est plus forte sur les surfaces rugueuses que les surfaces lisses aussi bien pour le titanium que les aciers inoxydables.

#### **V.6. 6. Effet de la position des échantillons**

Dans les études classiques de simulation des phénomènes de corrosion, l'échantillon est plongé verticalement et complètement immergé. Dans notre cas, les résultats obtenus en fonction de la position des échantillons sont différents surtout dans le cas des échantillons DP1000 et DP500, qui correspondent à un contact simultané air/solide et liquide/solide.

Cette position de demi-immersion de l'électrode de mesure, est une particularité, comme l'explique Scully en 1995 [195], pour qui les phénomènes électrochimiques obtenus lors de la demi-immersion des échantillons sont différents de ceux obtenus dans l'immersion complète ; en effet, dans le premiers cas, la zone cathodique et la zone anodique sont séparées de façon permanente, la zone cathodique reste proche de la surface de l'eau où l'oxygène est disponible. Cela rend difficile l'interprétation des résultats car nous n'avons pas rencontré dans la littérature des études faisant référence à la position d'exposition des échantillons, à l'exception des travaux de KUS et al [196] qui ont testé un échantillon de cuivre dans la position à demi plongé dans une culture bactérienne. Electrochimiquement, cet échantillon se comporte différemment des autres. Il présente un comportement similaire à celui que nous avons obtenu avec l'échantillon DP1000. Ces auteurs ont conclu qu'il est tout à fait possible

d'obtenir des résultats différents pour un même système métal/solution /bactérie, mais exposé différemment. A notre avis, la position des échantillons met en jeu les forces d'adhésion différentes surtout pour les échantillons à moitié immergés, où il existe un gradient d'humidité sur la surface du matériau entre la partie immergée et la partie aérienne. Nous pensons que la présence des cellules adhérentes modifie le potentiel de corrosion libre d'un métal. Cela est confirmé par le comportement de DP500 qui se trouve dans la même position mais qui ne présente pas à sa surface des cellules adhérentes. Son potentiel évolue de façon normale comme les quatre autres échantillons.

Motoda et al. en 1990, [14] ont constaté, après observation au microscope d'un échantillon métallique immergé dans une eau marine et présentant un ennoblement du potentiel de corrosion libre, qu'il existait une fine couche de nature organique, entre le biofilm constitué de diatomées et la surface de l'acier, qui serait responsable de l'augmentation du potentiel. Dans notre cas seul l'échantillon DP1000, présente à sa surface des formes qu'on pourrait assimiler à un biofilm et c'est justement celui- là qui enregistre le potentiel relativement le plus élevé .Son comportement est différent comparé au comportement des autres échantillons toutes positions confondues.

En outre, la comparaison qualitative entre le nombre de cellules immobilisées dans les trois positions a montré plus haut qu'il semble que le nombre de cellules immobilisées sur la surface non immergée des échantillons DP était probablement beaucoup plus élevé que ceux acquis dans les autres positions. Les algues microscopiques présentes sur la surface de bulles de gaz sont jetées en l'air lorsque les bulles explosent à la surface du liquide. Elles tombent sur les parties non immergées des échantillons. Ces cellules ne peuvent pas vivre longtemps sans eau. Ainsi, elles sécrètent probablement des EPS pour s'en tenir à la surface de l'échantillon et, par la construction d'un biofilm fortement fixé, progressivement, attraper les gouttelettes d'eau issues l'explosion. Dans le même contexte, Sekar et al. [110] ont expliqué que l'adhésion forte observée lors de leur étude sur la formation des microalgues sur des surfaces de titanium et d'acier inoxydable peut être due à un problème d'hydratation.

## **V.7. Conclusion**

Dans les conditions opératoires énoncées, il semblerait que la microalgue *Porphyridium purpureum* cultivée en batch sous photopériode sur milieu Hémerick n'a pas d'effet corrosif sur le 316L, le potentiel de corrosion libre est compris entre - 0,307 V et - 0,005 V. La photopériode agit sur l'évolution du potentiel de corrosion libre par la présence d'oscillations d'environ 24 heures dues probablement à la production d'oxygène par les microalgues dans la phase lumineuse. L'adhésion des cellules semble plus forte sur l'interface air/métal de l'échantillon à demi plongé de rugosité 1000. On peut dire que le gradient d'humidité est un facteur important pour la fixation forte des cellules de *Porphyridium*, ce qui explique la raison pour laquelle on retrouve cette espèce sous forme de biofilms sur les murs des bâtiments. Enfin, l'échantillon DP100 s'est comporté différemment des autres en montrant une augmentation de potentiel qu'on pourrait assimiler à un ennoblement. Par contre, les échantillons plongés horizontalement ont eu un effet stabilisant sur le potentiel de corrosion libre.

## **Chapitre VI. Caractérisation de biofilms de *Porphyridium purpureum* sur support en acier inoxydable de type 304L, par spectroscopie d'impédance électrochimique**

### **VI.1. Objectif**

Le but de cette partie est de suivre la constitution d'un biofilm sur l'acier 304L s'appuyant sur une souche algale seule en tenant compte des paramètres de cultures proches de ceux qu'on pourrait rencontrer dans une culture industrielle. Pour cela nous avons simulé une culture industrielle en batch en semi-continu en conditions de pH, de lumière, d'oxygène et de gaz contrôlées mais en milieu non renouvelé. Pour la caractérisation des biofilms nous avons corrélé les mesures d'impédance à une analyse par microscopie électronique à balayage.

### **VI.2. Matériel et méthodes**

#### **VI.2.1. Matériau utilisé et préparation des échantillons**

Le métal choisi pour la réalisation de ce travail est l'acier inoxydable 304L sous forme de disques de 18 mm de diamètre et de 1 mm d'épaisseur. Ces coupons sont percés d'un trou de 1.1 mm de diamètre et maintenus par un fil en acier 316L. La composition chimique de l'acier 304L est donnée dans le tableau 3. Les échantillons ont été préalablement polis (polissage 1200). Ils sont ensuite rincés à l'eau distillée, puis séchés à l'air comprimé et autoclavés avant d'être immergés dans la culture comme le montre la figure 28.

#### **VI.2.2. Essai témoin**

La mise en route de l'essai témoin sans algues sur petit réacteur (500 ml) a été effectuée parallèlement à la culture en photo bioréacteur. Ce réacteur témoin tel qu'il est présenté en figure 27, contient le milieu Hémerick stérile (250ml) sans algue dans lequel sont immergés six échantillons. La partie supérieure du réacteur est fixée sur le corps du réacteur à l'aide de la graisse et du para film, les entrées sont bouchées à l'aide de coton cardé recouvert de la gaze. Les échantillons sont introduits dans le réacteur par une ou plusieurs entrées.

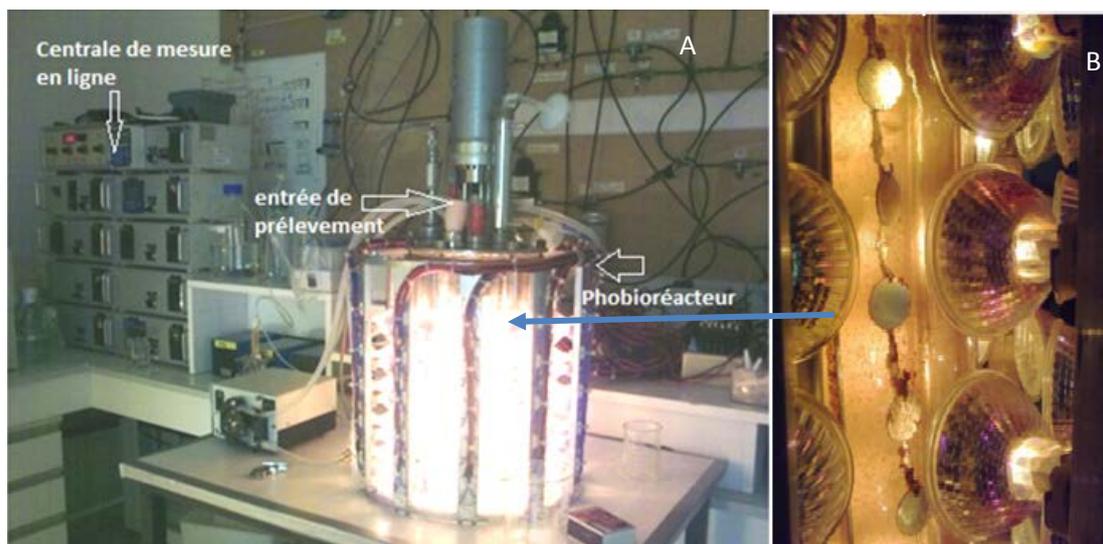


**Figure 27 : Photographie du dispositif ayant servi au suivi de l'expérience témoin**

### **VI.2.3 .Mise en culture de *Porphyridium purpureum* et suivi de la croissance**

*Porphyridium* a été cultivée sur milieu Hemerick[ 168] modifié par ajout  $\text{NaHCO}_3$  avec une concentration finale de 20 millimoles/L. Le photobioréacteur (figure 28) qui a servi à la culture est de forme cylindrique, son volume est de 5 litres.

Les conditions opératoires mises en place sont :une température de  $25^\circ\text{C}$  ; une tension en  $\text{CO}_2$  de 2% ; un débit du mélange gazeux de 2,5 V /VH ; un éclairage continu est assuré par éclairage radial externe (L'éclairage est constitué de 55 lampes halogènes (Sylvania professional 25, BAB  $38^\circ$ , 12 V, 20 W). L'irradiance est réglée via un générateur de tension variable; un pH stabilisé à 7,5 par ajout de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .La croissance a duré 16 jours. Son suivi s'est effectué par comptage des cellules par microscopie optique sur cellule de Malassez tous les deux jours.



**Figure 28 : Dispositif expérimental de culture (A) de *Porphyridium purpureum* (lumière continue) et mode d'immersion des échantillons (B)**

#### **VI .2.4. Mesure de l'impédance**

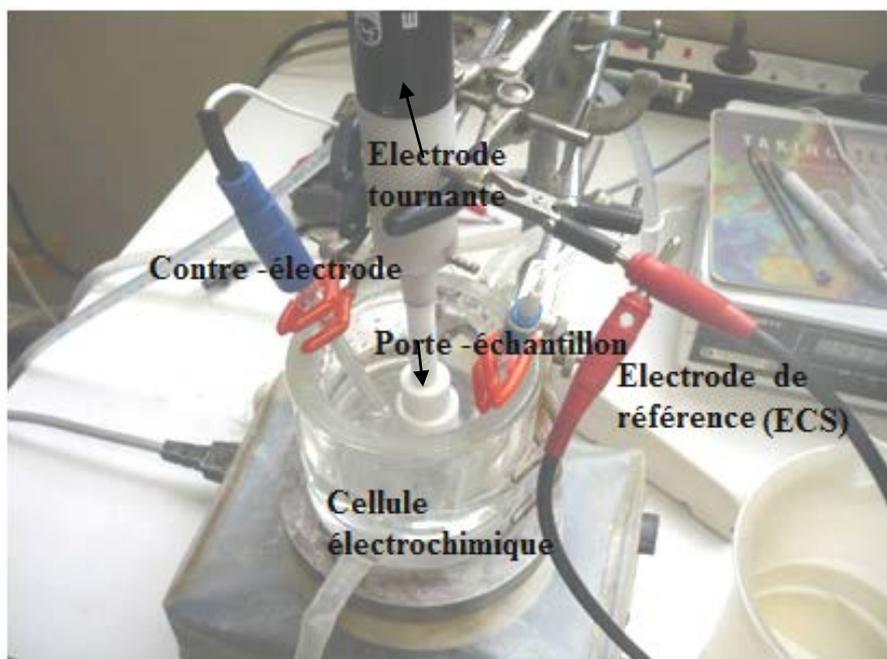
Le dispositif utilisé pour les mesures électrochimiques est un système de type Analyseur de fréquence SI 1250 SOLARTRON, relié à un générateur SI 1287 SOLARTRON.

La solution ou électrolyte d'immersion des échantillons est une solution de  $\text{NaNO}_3$  choisie pour sa neutralité, et pour sa concentration en Na. Ainsi, on évite l'éclatement des cellules algales habituées à un milieu salé. Cette solution est renouvelée pour chaque échantillon. Une opération de dégazage est effectuée, pour cela on fait barboter l'azote dans la solution pendant 20 mn jusqu'à saturation.

L'électrolyte d'immersion est disposé dans une cellule à double couche (Figure 29). Les différentes électrodes, électrode de référence (électrode au calomel ou KCl saturé), électrode auxiliaire ou contre -électrode, (électrode de platine) sont connectées au générateur, d'un coté, et ensuite elles sont placées dans la solution de  $\text{NaNO}_3$ . L'électrode de travail est placée dans un porte -échantillon qui est au bout d'une électrode adéquate elle représente l'électrode tournante, le tout est plongé dans la solution d'immersion.

Un contrôleur permet d'ajuster l'électrode tournante à une vitesse de 500 tours / mn, ce qui assure une uniformité ionique. Les mesures sont faites en condition standard de température :  $25^\circ\text{C}$ . Le dispositif de mesure est relié à un ordinateur qui permet l'acquisition des données qui seront traitées à l'aide d'un logiciel d'exploitation Zplot. La valeur du potentiel d'abandon a servi de potentiel initial obtenu au bout d'une heure de stabilisation.

L'amplitude de la tension sinusoïdale appliquée au potentiel d'abandon est de 30 mV à des fréquences comprises entre 65535Hz et 0,01Hz avec 5 points par décade.



*Figure 29 : Photographie de la cellule électrochimique et disposition des électrodes.*

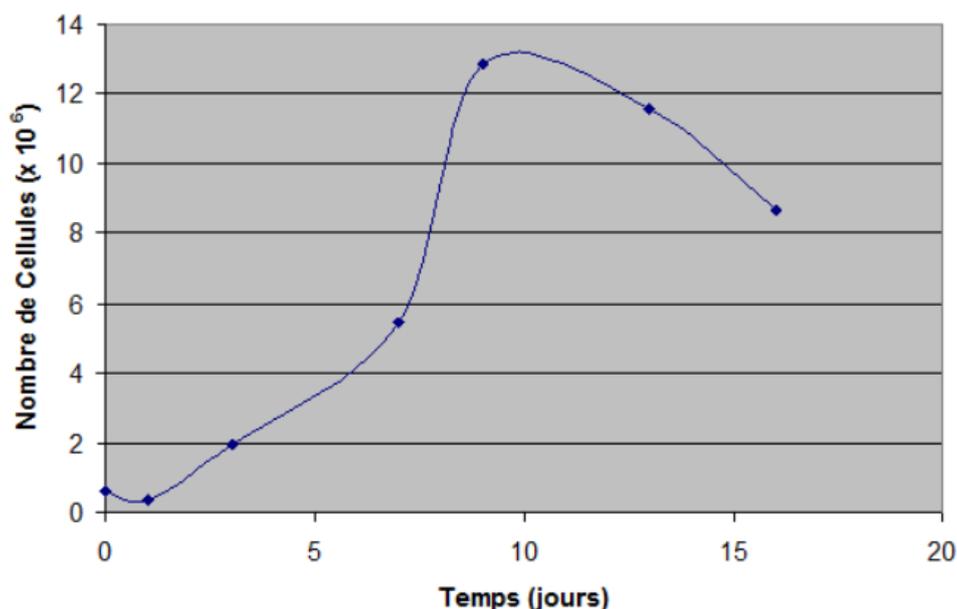
## **VI .2.5. Analyse par microscopie électronique à balayage**

Après l'étude électrochimique, les échantillons sont récupérés et séchés à l'air. Ils sont ensuite métallisés par une fine couche d'or sans d'autres traitements. L'observation est réalisée sur un microscope électronique à balayage Jeol SM 820.

## **VI.3. Résultats**

### **VI.3.1. Evolution de la croissance**

La figure 30 montre l'évolution de la croissance en fonction du temps. On observe une phase de latence qui dure 24 heures et une phase de croissance exponentielle qui démarre au bout de deux jours et qui s'étend jusqu'au dixième jour, suivie par une phase de ralentissement. La biomasse évolue entre une valeur minimale de  $5,8 \cdot 10^5$  et une valeur maximale de  $128,65 \cdot 10^5$  cellules /ml.

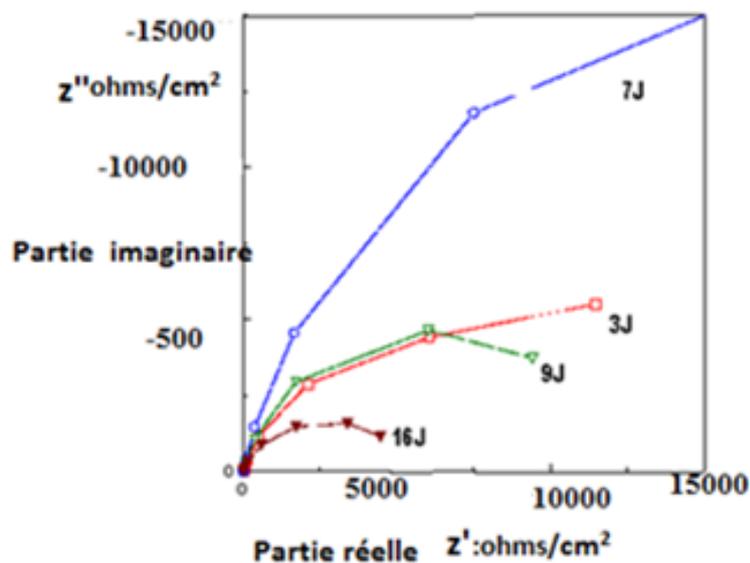


*Figure 30 : Courbe de croissance de Porphyridium (lumière continue): nombre de cellules en fonction du temps*

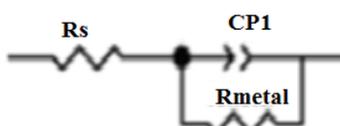
### **VI.3 .2. Mesure d'impédance et modélisation par le logiciel Zplot**

L'ensemble des résultats électrochimiques obtenus est représenté par les courbes d'impédance en fonction du temps (figure 31). Le schéma de l'équivalent circuit obtenu après modélisation à l'aide du logiciel ZPLOT est donné en figure 32.

En pratique, les données de l'étude de SIE sont souvent interprétées dans des circuits électriques équivalents qui peuvent être utilisés pour décrire les caractéristiques électriques des interfaces électrochimiques [197]. Le modèle de l'équivalent circuit résume tout le parcours du courant de l'électrolyte jusqu'à la surface du matériau, si le courant rencontre un obstacle celui-ci sera transcrit sous forme de couche. Le schéma de l'équivalent circuit obtenu montre l'existence de seulement deux couches, celle de l'électrolyte représentée par RS et celle du métal ( $R_{\text{métal}}$ ) et ne met pas en évidence la couche de biofilm. Le schéma de l'équivalent circuit est le même pour tous les prélèvements, c'est-à-dire formé de deux couches, et plusieurs couches étant donné que le biofilm est formé de plusieurs strates superposées, comme on pourrait le supposer, alors que les courbes d'impédance en figure 31 montrent que l'échantillon prélevé le seizième jour a une forme plus proche du demi cercle, comparé aux autres.



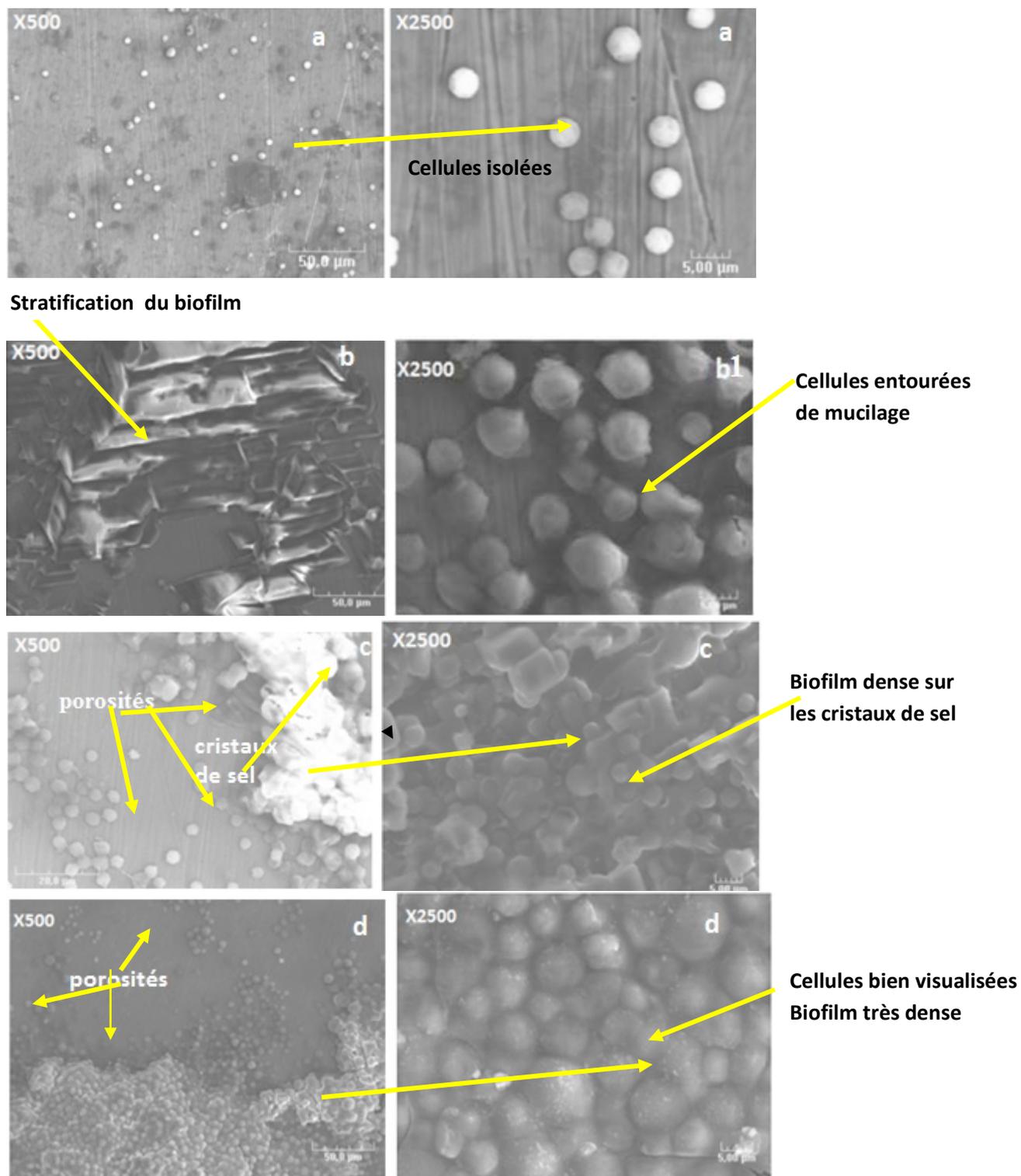
*Figure 31: Evolution de l'impédance en fonction du temps (diagramme de Nyquist )*



*Figure 32 : Schéma de l'équivalent circuit électrique obtenu après modélisation*

### **VI.3 .3 .Analyse par microscopie électronique à balayage**

Les résultats obtenus, après observation au microscope électronique, sont portés sur la figure 36 qui illustre la cinétique de formation du biofilm. **Après trois jours de culture**, le biofilm n'est pas encore formé (présence de cellules planctoniques, isolées) cela est normal car la culture est en phase de latence, la biomasse est peu importante. **Après sept jours de culture**, les cellules commencent à s'entourer de mucilage (b1) on remarque que le biofilm est stratifié (b), on doit noter que b et b1 représentent deux champs d'étude différents.



*Figure 33: Micrographies obtenues par microscopie électronique à balayage illustrant la cinétique de formation du biofilm sur l'acier 304L. (a) après 3j ; (b) après 7j ; (c) après 9j ; (d) après 16j.*

**Après 9 jours de culture**, le tapis algal évolue et devient plus dense sur une partie de la surface préférentiellement sur la partie où se trouvent les cristaux de sel. **Au bout de 16 jours** de culture, le tapis microalgal est plus dense sur une partie du substrat, mais le biofilm ne couvre pas la totalité de la surface. On note la présence de vides ou porosités qui peuvent provenir soit d'un défaut de colonisation du à une faible croissance du biofilm, soit d'une perte de biomasse due au décrochage des cellules faiblement adhérentes, lors du rinçage.

#### **VI.4. Discussion**

Les résultats obtenus montrent qu'en matière de croissance la souche a bien poussé malgré les fluctuations du pH qui se sont produites lors de l'expérience. *Porphyridium* est une microalgue très robuste, elle résiste aux variations de pH, mais cette bonne croissance n'a pas eu le résultat escompté sur la formation du tapis algal, qui n'était pas uniforme. Les cellules se sont agglomérées sur les cristaux de sel formant des îlots d'agrégats, produisant ainsi une hétérogénéité sur la surface de l'acier. La position des échantillons à proximité de la source de lumière, a probablement aussi, dérangé l'adhésion des cellules. Le manque d'uniformité dans la surface du matériau, a fait que les mesures d'impédances n'ont pas mis en évidence la présence d'une couche compacte entre la surface de l'acier et l'électrolyte, conformément à ce qu'ont rapporté Bayouhd et al. [198].

#### **VI.5. Conclusion :**

Les résultats obtenus ont montré que l'épaisseur du tapis algal et son uniformité sont des conditions essentielles pour l'application de SIE. Toutefois, lors des mesures nous avons remarqué que l'intégrité du biofilm n'a pas été touchée, et l'électrolyte ( $\text{NaNO}_3$ ) est bien adapté pour les microalgues halophiles, comme solution d'immersion.

## **Chapitre VII : Comportement de l'acier 316L dans une culture plurialgale et étude de la formation du biofilm**

### **VII .1.Objectif**

L'objectif de cette expérimentation est d'étudier le comportement de l'acier 316 L immergé dans une culture mixte composée de plusieurs espèces microalgales en prenant comme milieu de culture de l'eau de mer exempte de bactéries. Comme pour les expériences précédentes, nous avons mené cette expérience en utilisant la microscopie électronique à balayage combinée l'analyse électrochimique et en parallèle un suivi de la croissance à été effectué.

### **VII.2.Matériel et méthodes**

#### **VII.2.1. Prélèvement, matériau testé et origine du matériel biologique**

L'eau de mer a été prélevée au port de Sidi Fredj. L'échantillonnage a été fait à l'ouest du port, loin de la côte et de toutes formes de pollution, à une profondeur d'environ 1.5 m .Le matériau utilisé est de l'acier de type 316L. Les coupons sont sous forme de parallélépipède et sont reliés à un fil électrique. Au total, trois coupons ont été testés. La surface active a été estimée à 1,2 cm<sup>2</sup>. Les algues servant à l'inoculation du milieu sont isolées de l'eau de mer après une première filtration grossière à l'aide de papier filtre, puis une deuxième avec un filtre de porosité de 1µm.

#### **VII.2.2.Dispositif expérimental, conditions de culture et axénisation**

La culture a été effectuée dans un réacteur assimilé à une cellule électrochimique en verre, de forme sphérique, ayant une capacité de 1000 ml. Cette cellule est munie de 5 orifices qui ont permis l'emplacement des différentes électrodes (de mesure, de référence au calomel saturé (ECS) et (la contre- électrode), un orifice pour l'injection d'air et un orifice pour le prélèvement de la solution. Les microalgues issues de la double filtration sont cultivées dans un litre d'eau de mer stérile à température ambiante (21°C - 24°C).

La cellule est mise sous un éclairage de tubes fluorescents : deux tubes de 20 watts et un tube de 16 watts, placés horizontalement. L'intensité lumineuse est de 3800 lux et l'énergie lumineuse est fournie 12 heures sur 24. Les tubes utilisés sont de type "blanc industrie".

L'air est injecté à l'aide d'une pompe à air. Un filtre en coton cardé est disposé en amont du circuit pour limiter la contamination bactérienne. L'air permet l'agitation du milieu pour le maintien des algues en suspension et apporte l'oxygène et le gaz carbonique, considéré comme source de carbone pour les algues. La culture est axénisée par adjonction d'une solution d'antibiotiques, sous la forme d'un mélange de Pénicilline G (10 mg/l) et de Streptomycine-sulfate (20 mg/l), soit une concentration finale dans le milieu de culture de 0,003 %. [199 ,200].

Le matériel nécessaire pour réaliser les expériences électrochimiques tel que le présente la figure 34, se compose de la cellule contenant la culture, d'une chaîne de mesure électrochimique, comprenant un potentiostat-galvanostat, un analyseur de fréquence et un système d'acquisition (micro-ordinateur relié au potentiostat-galvanostat).

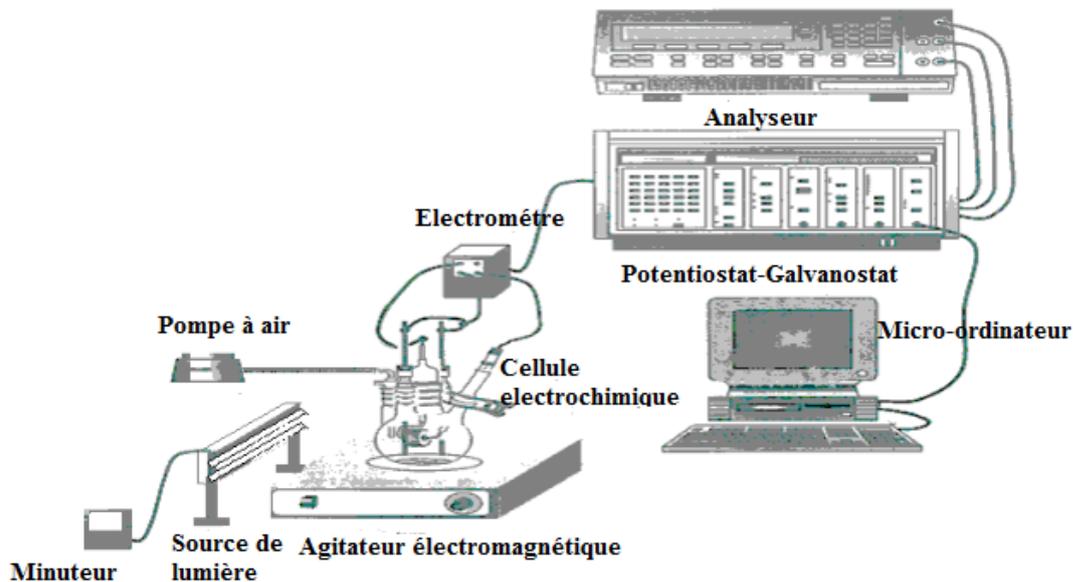


Figure 34: Schéma de l'installation expérimentale pour le suivi de la croissance microalgale et les mesures électrochimiques [201]

### VII.2.3 .Déroulement des expérimentations

Les essais ont été menés sur une période de 10 jours. Un suivi quotidien de l'évolution du pH, de la température, de l'oxygène dissous et de la conductivité, a été effectué pendant toute la durée de l'immersion des aciers.

### **VII .2.3.1. Mesures électrochimiques**

Le potentiel d'abandon en fonction du temps  $E_{corr}=f(t)$  a été suivi par la méthode potentiocinétique il permet d'avoir une première idée sur le comportement de la surface de l'acier inoxydable immergé le milieu d'étude (milieu avec algues et milieu stérile). Les mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique ont été suivies quotidiennement. L'amplitude de la tension sinusoïdale appliquée au potentiel d'abandon est de 10 mV à des fréquences comprises entre 0,001Hz – 10 KHz avec 5 points par décade.

### **VII.2 .3 2. Suivi de la croissance**

Le comptage de la culture d'algues se fait au moyen d'une cellule de Malassez. Le dénombrement est effectué sur 3 échantillons différents à partir de la solution d'immersion bien homogénéisée, la moyenne des résultats est ensuite calculée.

### **VII.2.3.3. Contrôle de la pureté de la culture**

Cette analyse a pour but la vérification de la présence d'une éventuelle contamination bactérienne qui pourrait se produire lors des manipulations. L'ensemencement se fait sur gélose nutritive. On ensemence 1 ml prélevé de la culture dans 3 boîte des pétri. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 48 heures.

### **VII .2 .4. Arrêt et retrait des échantillons**

#### **VII.2.4.1. Observation des aciers par microscopie électronique à balayage**

Après retrait, les échantillons subissent un dessalage, dans des bains successifs d'eau de mer stérilisée et d'eau distillée à salinité décroissante (100%, 75%, 50%, 25%, 0%) pendant 10 min chacun. Pour éviter la destruction des cellules. La déshydratation de l'échantillon, nécessaire avant l'analyse est réalisée en plongeant l'échantillon dans plusieurs bains successifs dont la concentration en éthanol augmente (0%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%) (6). Après séchage à l'air, les échantillons sont ensuite métallisés par une fine couche de platine.

## **VII.3 .Résultats**

### **VII.3.1. Evolution du pH et du taux d'oxygène dissous**

Le pH varie entre 8.25 et 7.39, les teneurs d'oxygène varient entre 11,79 et 7,39 mg/l. Les variations des teneurs d'oxygène dissous sont dues aux activités des microorganismes dans la

solution, la photosynthèse en présence de lumière, conduisant à une production d'O<sub>2</sub> donc une augmentation de l'O<sub>2</sub> dissous. La respiration est intense à l'obscurité, ce qui induit une diminution de l'O<sub>2</sub> dissous. L'injection de l'air a aussi une influence sur la teneur d'oxygène dissous. La solution étant saturée, les variations ne sont pas très visibles.

### VII.3.2. Evolution de la croissance multialgale

L'examen de la courbe de croissance en Figure 35 montre 4 phases distinctes : une phase de latence qui a duré 3 jours, une phase exponentielle d'environ 5 jours, suivie d'une phase stationnaire. A partir du 8ème jour, nous notons une phase de déclin. Cette culture se faisant en milieu non renouvelé, il y a épuisement de nutriments ; le nombre de cellules varie entre  $0,88 \cdot 10^5$  et  $2,9 \cdot 10^5$  cellules /ml.

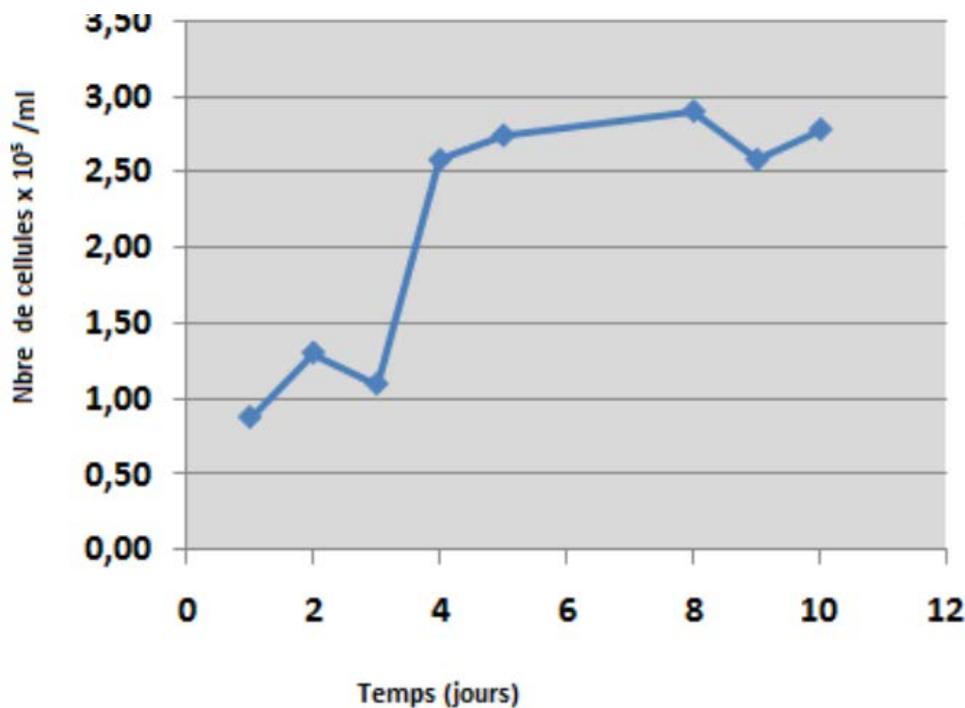


Figure 35 : Evolution de la croissance microalgale en fonction du temps

### VII.3.3. Evolution du potentiel de corrosion libre

Le suivi temporel du potentiel à l'abandon par la méthode potentiocinétique permet d'avoir une première idée sur le comportement de la surface de l'acier inoxydable vis-à-vis le milieu d'étude. La figure 36 représente l'évolution du potentiel à l'abandon en fonction du temps, de l'acier inoxydable immergé dans l'eau de mer naturelle en présence des algues et dans l'eau de mer stérilisée. L'échantillon de l'acier inoxydable immergé dans la culture micro algale,

voit son potentiel de corrosion libre augmenter au cours du temps. Dès les premiers instants de son immersion, on constate un accroissement très net de la valeur du potentiel. En effet, ce dernier varie de (-300 mV) jusqu'à atteindre une valeur de (-163 mV) après 24 heures d'immersion. La valeur la plus élevée est de (-100 mV) et atteinte après 10 jours d'immersion.

L'échantillon de l'acier inoxydable immergé dans l'eau de mer naturelle stérilisée a un potentiel qui augmente, mais à des valeurs inférieures à celles obtenues dans l'eau de mer en présence des algues. Dès son immersion, le potentiostat affiche un potentiel de (-236 mV), ce dernier augmente jusqu'à atteindre une valeur de (-180 mV) après deux jours d'immersion. Dans l'eau de mer stérilisée, l'acier inoxydable prend un potentiel libre de (-180 mV), plus faible que celui obtenu dans l'eau de mer inoculée avec des algues (-143 mV) pour la même durée d'immersion.

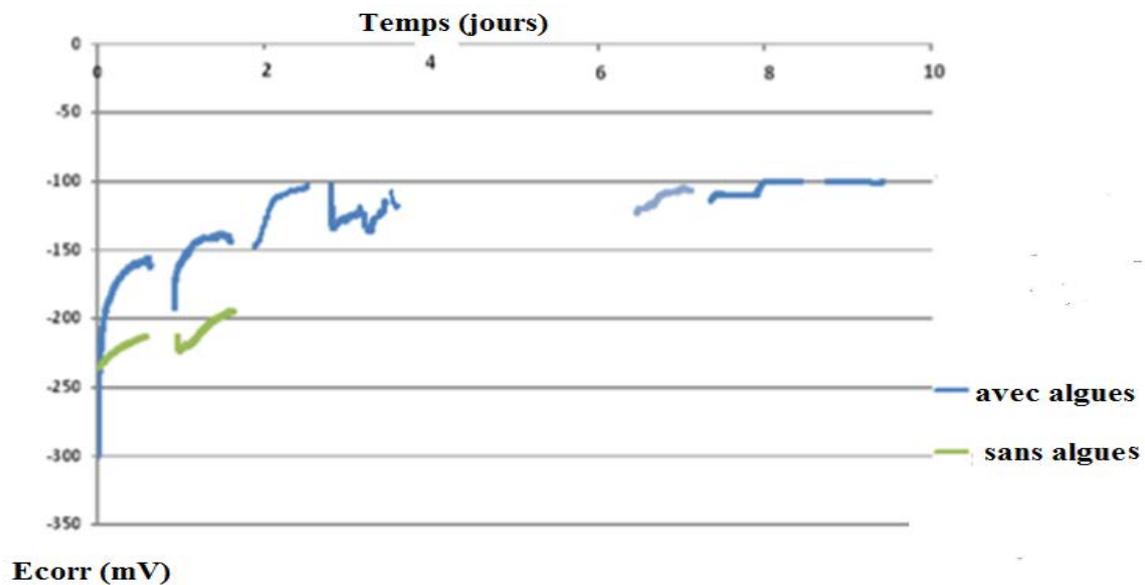


Figure 36: Evolution du potentiel de corrosion en fonction du temps, en présence et en absence d'algues

#### VII.3. 4. Mesures d'Impédance

Les résultats des mesures d'impédance en fonction du temps obtenus pour l'acier immergé dans l'eau de mer en présence du consortium d'algues ainsi que le résultat du témoin, sont représentés par le diagramme de Nyquist.

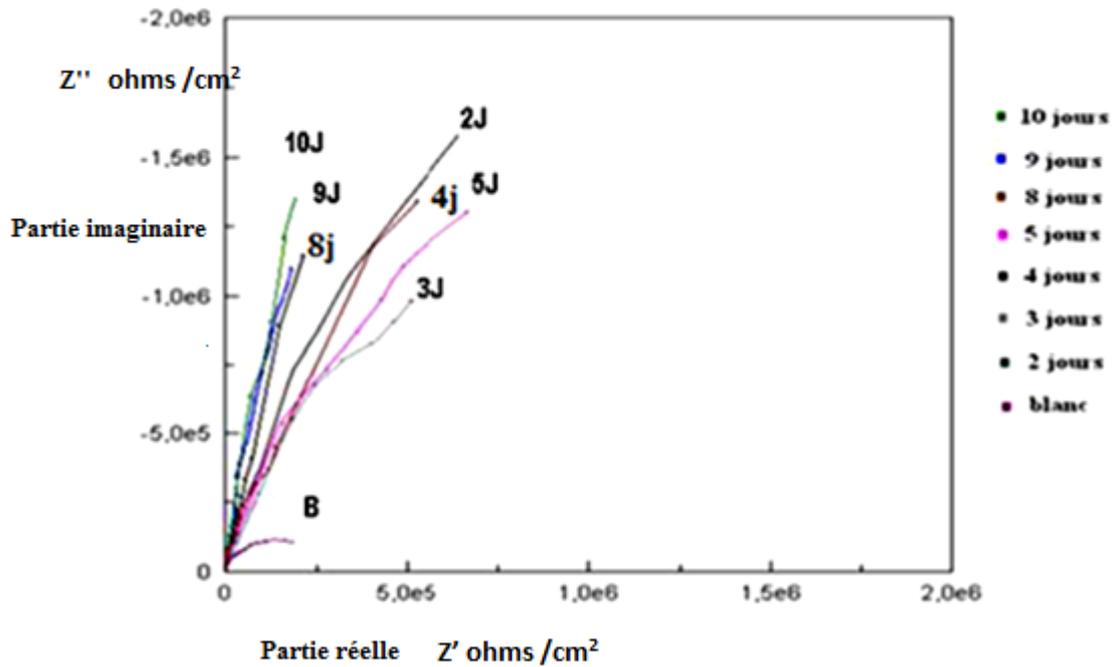


Figure 37 : Evolution de l'impédance en fonction du temps

Les courbes obtenues sont assimilées à des droites avec différentes pentes en fonction du temps. L'évolution de la résistance de polarisation ( $R_p$ ) pour l'acier inoxydable immergé dans l'eau de mer inoculée avec des algues présente des fluctuations.  $R_p$  chute et remonte au cours des quatre premiers jours d'immersion (Tableau 5).

Tableau 5: Evolution de la résistance de polarisation ( $R_p$ ) obtenue lors des mesures d'impédance.

Temps (jours)	2	3	4	5	8	9	10	Témoin
$R_p$ (KOhms)	3,538	1,325	2,354	1,666	2,216	4,770	5,207	1, 235

### VII.3. 5. Analyse microscopique

La figure 38 montre la cinétique de formation du biofilm sur l'acier inoxydable. On assiste à la formation progressive du biofilm qui au bout de 10 jours, n'est pas très dense. On note la présence de cristaux de sel en plus d'un léger film biologique qui ne couvre pas la totalité

de la surface, la forme des cellules n'est pas très nette. On remarque la formation de pores, de couches craquelées, dues à la deshydratation des EPS.

Après enlèvement du biofilm, on constate la présence de piqûres qui présument un début de corrosion (Figure 39), à la surface de l'acier inoxydable, observée par un microscope métallurgique OLYMPUS GX71, avec un grossissement (X100).

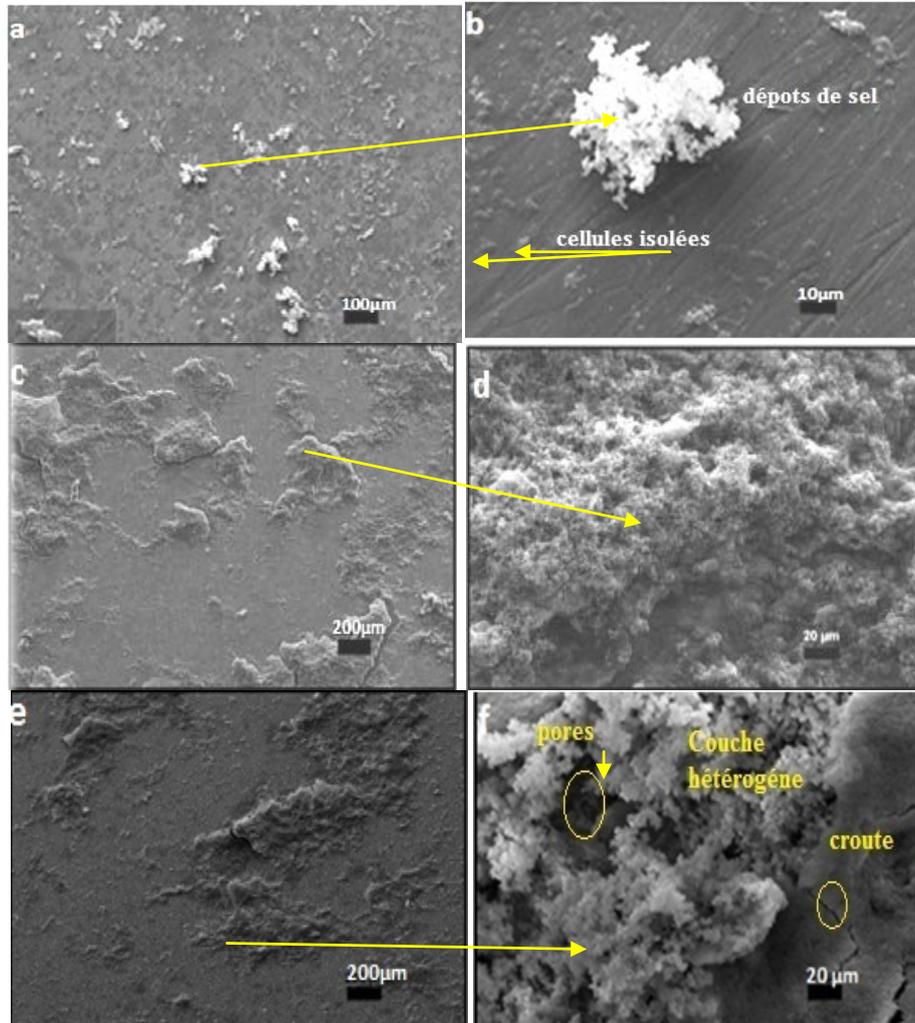
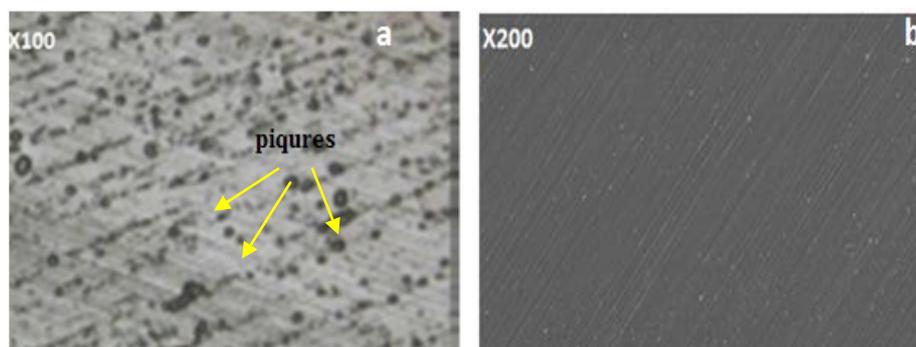


Figure 38 : Micrographies obtenues par MEB montrant la cinétique de formation du biofilm en fonction de la durée d'immersion : (a,b) 3 jours, (c,d) 6 jours, (e,f) 10 jours



**Figure 39 : Etat de surface de l'acier inoxydable observé par microscope métallographique, (a) après 10 jours d'immersion et après décrochage du biofilm, (b) avant immersion**

#### VI .4.Discussion :

Comme pour l'expérience précédente, qui met en jeu la formation du biofilm de la microalgue marine *Porphyridium* sur l'acier 304L, il est très difficile d'interpréter les résultats de mesure d'impédance. En effet, le biofilm, qu'il soit issu d'une seule espèce ou composée de plusieurs espèces, est une matrice dynamique qui évolue dans le temps. La présence de pores est retrouvée dans les deux cas, il est clair que l'hétérogénéité de la couche de biofilm algal est une caractéristique fondamentale de celui-ci, d'autant plus que la biodiversité influe et accentue l'hétérogénéité de la surface du tapis algal qui est formé de plusieurs espèces de métabolisme diversifié lié à leur type trophique (hétérotrophie, autotrophie) et de tailles différentes.

Du point de vue électrochimique les fluctuations de  $R_p$  (tableau 5) expliquent mieux que les courbes d'impédance les événements qui ont lieu sur l'interface biofilm / métal et biofilm / milieu de culture. Lorsque qu'on fait une corrélation entre les différentes phases métaboliques (Figure 35) et les mesures électrochimiques, on remarque que  $R_p$  est relativement plus faible en phase exponentielle qu'en phase de latence et phase de déclin. On peut dire que les populations de cellules se trouvant en phase de déclin et phase de latence sont différentes de celles se trouvant en phase exponentielle et par là même différent par leurs capacités électrochimiques et par leur pouvoir d'adhésion. Ces dernières étant dépendantes des propriétés de surface des cellules. Les propriétés physico-chimiques de surface des micro-organismes dépendent de leur phase de croissance [181,202]. Un autre paramètre non moins important pouvant expliquer ces fluctuations de  $R_p$  est la composition chimique du milieu de

culture qui évolue en fonction des phases de croissance, lors de l'excrétion de métabolites issus du métabolisme algal en particulier les polysaccharides extracellulaires qui sont plus abondants en phase de ralentissement ou stationnaire.

L'augmentation du potentiel de corrosion libre ou potentiel d'abandon dès les premiers jours d'immersion et sa stabilisation en fin de phase exponentielle peut être assimilée à un anoblissement de l'acier due aux changements qui ont lieu à la surface de l'acier tels que le phénomène de passivation et la formation du biofilm primaire. La présence de piqûres qui correspond à une rupture du film passif peut être aussi à la base de cette élévation du potentiel. On remarque la présence d'oscillations du potentiel liées à la photopériode.

#### **VI.5. Conclusion :**

Le comportement de l'acier 316L dans la culture comprenant un consortium de microalgues a un comportement différent de celui immergé dans une culture axénique de *Porphyridium purpureum* ; cette différence réside en la présence de piqûres sur la surface de l'acier, absente dans le deuxième cas. L'hétérogénéité de la surface du biofilm provenant d'une culture microalgale diversifiée est accentuée par rapport à celle observée dans un biofilm issu d'une culture mono spécifique.

## *C*ONCLUSION *G*ENERALE



## CONCLUSION GÉNÉRALE

Il ressort de cette étude qui se voulait pluridisciplinaire combinant la microbiologie, l'électrochimie et l'étude des matériaux et dont la principale question était de savoir si les microalgues avaient une quelconque participation dans les mécanismes de corrosion des aciers inoxydables de type 316L et si leur adhésion sur ce type de matériau pouvait induire des phénomènes électrochimiques.

On peut répondre que la souche *Porphyridium purpureum* axénique testée dans les conditions de culture décrites n'a pas d'effet corrosif sur cet acier alors que le consortium microalgal composé de plusieurs espèces marines pourrait induire sa corrosion.

L'étude de l'adhésion des cellules de *Porphyridium purpureum* sur 316L a montré que l'adhésion semble plus forte sur l'interface air/métal de l'échantillon à moitié immergé et caractérisé par une faible rugosité (1000), que le gradient d'humidité est un facteur déterminant pour l'irréversibilité de l'adhésion, le stress d'humidité provoque la sécrétion des polysaccharides. Le comportement électrochimique de cet échantillon est différent des autres, vraisemblablement par la présence de biofilms fortement adhérents à sa surface.

Un autre résultat intéressant obtenu est l'action de la lumière sur le potentiel électrochimique, due à la photopériode, qui se traduit par la présence d'oscillations, augmentation et diminution du potentiel de façon périodique d'environ 24 heures résultant probablement de la production d'oxygène par les microalgues dans la phase lumineuse et l'arrêt de la photosynthèse en phase obscure.

Enfin, la caractérisation des biofilms de microalgues sur l'acier 304L (une seule espèce) et 316L (consortium d'espèces) par mesure d'impédance, nous a révélé que l'épaisseur du tapis algal et son uniformité sont des paramètres importants qui doivent être pris en considération lors de la modélisation. Lors des mesures, l'intégrité du biofilm n'a pas été touchée, et l'électrolyte ( $\text{NaNO}_3$ ) est bien adaptée pour les microalgues halophiles, comme solution d'immersion. La présence de sel dans le milieu conditionne les mesures d'impédance par la formation de cristaux sur la surface de l'acier en provoquant l'agrégation des cellules préférentiellement sur ces cristaux. Les traitements effectués sur les échantillons en vue de la

caractérisation des biofilms au MEB doivent être pris en considération, selon l'objectif recherché : visualiser la forme des cellules ou mettre en évidence les EPS .

La difficulté majeure que nous avons rencontrée lors de ces investigations est l'interprétation des mesures d'impédance et leur modélisation sous forme de circuit électriques, le biofilm étant très hétérogène, présentant des pores et étant constitué de couches non compactes , on doit ajouter à cela la présence de cristaux de sel ce qui décuple les difficultés.

En perspective, il serait intéressant de pousser les investigations sur le pouvoir d'adhésion des cellules algales en présence ou en absence de bactéries sur différents matériaux en corrélation avec leur impact électrochimique en relation avec les effets de la photopériode et le suivi de la production d'oxygène.

De point de vue méthodologique l'utilisation de la technique de microscopie à balayage environnemental (MEBE) pour la caractérisation des biofilms de microalgue serait appropriée, car elle permettrait de visualiser les biofilms à l'état naturel sans déshydrations, surtout si elle est associée à la microscopie à force atomique (AFM).

Ce travail n'est qu'un balbutiement dans la compréhension de l'adhésion des cellules microalgales sur la matière inerte et tous les phénomènes électrochimiques qui s'en dégagent, il trouvera sans nul doute application dans la lutte antifouling, et anticorrosive, dans la conception des biocapteurs mais surtout dans la valorisation des déchets, et production d'électricité ce qui nous conduit à grands pas vers la préoccupation du moment : l'énergie renouvelable.

## **R**EFERENCES **B**IBLIOGRAPHIQUES



## References Bibliographiques

- [1] Ozkan, A., Kinney, K., Katz, L., and Berberoglu, H., 2010: Novel algae biofilm photobioreactor for reduced energy and water usage, ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, Vancouver, British Colombia, 6th- 8th November, 12-18.
- [2] Craggs, P., Mc Auley, P., and Smith, V., 1997: Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown corrugated raceway, Water Res., 31, 1701–1707.
- [3] Cui, Y., Yuan W. Q. and Cao J., 2013: Effects of surface texturing on microalgal cell attachment to solid carriers, Int. J. Agr. Biol. Eng., 6(4), 44–54.
- [4] Johnson, M.B and Wen.Z ,2010 : Development of an attached microalgal growth system for biofuel production, Appl Microbiol Biotechnol,85:525–534 DOI 10.1007/s00253-009-2133-2 .
- [5] Schmidt, R., 1999 : Comportement des Matériaux dans les milieux biologiques. Application en médecine et biotechnologie, Traité des matériaux, Presses Polytechniques et universitaires Romandes, Lausanne, Suisse.
- [6] Le Bozec, N., 2000 : Réactions de réduction de l’oxygène sur les aciers inoxydables en eau de mer naturelle. Influence du biofilm sur les processus de corrosion, Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France.
- [7] George, R.P., Muraleedharan, P., Parvathavarthini, N., Khatak, H.S. and Rao, T.S, 2000: Microbially influenced corrosion of AISI type 304 stainless steels under fresh water biofilms, Mater. Corr., 51, pp 213-218.
- [8] De Brito, L.V. R., Coutinho, R., Cavalcanti, E. S., Benchimol, M., 2007: The influence of macrofouling on the corrosion behaviour of API 5L X65 carbon steel, Biofouling, 23: 193–201.
- [9] Pisciotta, J. M., Zou, Y., Baskakov, I., 2010: Light-Dependent Electrogenic Activity of Cyanobacteria V PLoS ONE, 5 10821.
- [10] Mc Cormick, A. J., Bombelli, P., Scott, A. M. Philips, A. J., Smith, A. G, Fisher A. C. and Howe, C. J., 2011: Photosynthetic biofilms in pure culture harness solar energy in a mediator less bio-photovoltaic cell (BPV) system, Energy & Environ. Sci., 4, 4699.
- [11] Cecal, A., Humelnicu D., Popa, K., RudiC, V., Gulea A., Palmaru I., Nemtoi G., 2000: Bioleaching of UO<sub>2</sub> 2+ ions from poor uranium ores by means of cyanobacteria, J. Radioanal. Nucl. Chem., 245, 427–429.
- [12] Calmoi, R. and Cecal, A., 2007: Bioleaching of uranyl ions from uranium ores by some algae, Environ. Eng. Manage. J., January/February, 6, No. 1, 27-30.

- [13] Iverson, W.P.; 1987: Microbial corrosion of metals. Advances in Applied Microbiology, 32, 1–36.
- [14] Motoda, S., Suzuki Y., Shinohara T., Tsujikawa S. 1990: The effect of marine fouling on the ennoblement of electrode potential for stainless steels, Corrosion Science 31 515–520
- [15] Little, B., Ray, R., Wagner, P., Lewandowski, Z., Lee, W.,C.,Characklis, W.G., Mansfeld, F., 1991: Impact of biofouling on the electrochemical behaviour of 304 stainless steel in natural seawater, Biofouling 3, 45–59.
- [16] Guezennec, J., 1993: Prévention de la corrosion induite par les micro-organismes et moyen de lutte. Océanis, 19, 3.33-36.
- [17] Kolari, M., Mattila, K., Mikkola, R., Salkinoja-Salonen,M.S.,1998 :Community structure of biofilms ,on ennobled stainless steel in Baltic Sea Water. J. Indust. Microbiol. Biotechnol. 21, 261–274.
- [18] Junke, B., 2008: Corrosion in bioprocessing applications mini review. Bioprocess Biosyst., April.
- [19] Haras, D., 2005 :Biofilms et altérations des matériaux : de l’analyse du phénomène aux stratégies de prévention. Matériaux & Techniques. 93: 27-41.
- [20] Malgor, R. Heijo, G., Romero, L., Zinola, C.F., 1998: Electrochemical behaviour of iron and copper in a culture solution for *Spirulina platensis* Journal of Applied Electrochemistry 28 p1351-1357.
- [21] Liu, S., Wang,Y., Zhang, D., 2013: Electrochemical Behavior of 316L Stainless Steel in f/2 Culture Solutions Containing *Chlorella Vulgaris* Int. J. Electrochem. Sci., 8 5330 – 5342.
- [22] Hefny,M .M ., Dardir A.A. ,Abdel-Tawab, A., 2004 :The Effect of *Dunaliella Salina* on the corrosion behaviour of technical titanium in saline solutions. Egyptian Salts and Minerals Company (Emis) Volume7 preprint 12jcse.
- [23] Heakal, F. El-Taib., Hefny M.M., Abd El-Tawabb A.M., 2009: Electrochemical behavior of 304L stainless steel in high saline and sulphate solutions containing alga *Dunaliella Salina* and  $\beta$ -carotene Journal of Alloys and Compounds .
- [24] Pflug H.D., 1987 : Sur les premières traces géologiques de la vie, In: Aux origines de la vie, Fayard (ed.), Paris, . 51-103.
- [25] Berman-Frank, I., Lundgren, P., Falkowski P., 2003: Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. Research in microbiology, 154(3), 157–164.
- [26] Pérez, R., 1997 : Ces algues qui nous entourent. *In*: Arbault, S., Barbaroux, O., Phliponeau, P., Rouxel, C. (Eds.).France, Plouzané, Editions IFREMER, 272 p

- [27] Sakshaug, E., Bricaud, A., Dandonneau, Y., Falkowski, P.G., Kiefer, D.A., Legendre, L., Morel, A., Parslow, J., Takahashi, M., 1997 : Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. J.Plankton Res., 19: 1637-1670.
- [28] Linné (Linnaeus, Carolus) 1735: Systema naturae per regna tria naturae : secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, sinonimis, locis Tomus I (Regnum animale), Editio, Leyde.
- [29] Woese, C. R., Balch, W. E., Magrum, L. J., Fox G. E., Wolfe, R. S., 1977 : An ancient divergence among the bacteria , in Journal of Molecular Evolution, vol. 9, , 305–311.
- [30] Couté A., 1995 : Diversité chez les microalgues, Techniques sciences méthodes, génie urbain génie rural, 1, 20-24.
- [31] Haeckel, E., 1866: Generelle Morphologie der Organismen ,Reimer, Berlin.
- [32] Castenholz, R.W., 1992: Species useage, concept, and evolution in the cyanobacteria (blue-green algae). J Phycol 28: 737-745.
- [33] Woese C.R., Kandler, O., Wheelis. M.L., 1990: Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eukarya*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4576-4579.
- [34] De Reviers, B., 2002 : Biologie et phylogénie des algues, tome 1 : cours. *In: Belin (Eds.) , Belin Sup. Sciences*, 351. Paris, France,
- [35] Metting, Jr., 1996: Biodiversity and application of microalgae, Journal of Industrial Microbiology 17, 477-489.
- [36] Prescott, L., 1995: Microbiologie, De Boeck University, chap. 27 « Les Algues ».
- [37] Ruiz G., 2005 : Extraction,détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges Thèse de Doctorat en chimie appliquée –Chimie des Substances Naturelles Faculté des Sciences et Techniques l Université de Limoges.
- [38] Andersen, R.A., 1992: Diversity of eukaryotic algae. Biodiversity and Conservation 1(4), 267-292.
- [39] Cavalier-Smith, T., 1993: Kingdom Protozoa and its 18 phyla. Microbiol. Rev.57:953-994.
- [40]Tomaselli,L.,2004: The microalgae cell. In: Handbook of Microalgal Culture:Biotechnology and Applied Phycology, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd.,Oxford, pp. 3-1
- [41] Sialve,B.,Steyer,J-P.,2013: Les microalgues, promesses et défis, Innovations Agronomiques 26 ,25-39.
- [42] Bold, H. C., Wynne, M. J., 1985: Introduction to the algae: structure and reproduction. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall Inc.

- [43] Borowitzka, M.A., Huisman, J.M., 1993: The ecology of *Dunaliella* (chlorophyceae, volvocales): effect of environmental conditions aplanospore formation. Bot. Mar. 36.
- [44] Seckbach, J., 2007: *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Springer.
- [45] Silli, C., Torzillo, G., Vonshak, A., 2012 : *Arthrospira (Spirulina)*, pp. 677–705. Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*. Springer.
- [46] Droop, M.R., 1974: Heterotrophy of carbon. In: Algal physiology and biochemistry. Blackwell, Oxford, pp 53. Stewart WDP (ed).
- [47] Gladue, R.M., Maxey, J.E., 1994: Microalgal feeds for aquaculture. J. Appl. Phycol. 6(2):131–141.
- [48] Chojnacka, K., Marquez-Rocha, F.-J., 2004: Kinetic and stoichiometric Relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. Biotechnology 3(1):21–34
- [49] Lee, Y.K., 2001: Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. Journal of Applied Phycology 13: 307-315.
- [50] Barberousse, H., 2007 : Étude de la diversité des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade et recherche des facteurs favorisant leur implantation, Thèse de Doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle Paris.
- [51] Dangeard, P., 1921 : Sur la mobilité de certaines cellules du *Porphyridium cruentum* Naegeli. C. R. Acad. des Sc., CXV, . 819.
- [52] Porter K.G., 1988 : Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. Hydrobiol. 159: 89-97.
- [53] Cole, J.J., 1982: Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. Annu. Rev. Ecol. Syst. 13:291–314.
- [54] Tison, D.L., Lingg, A.J., 1979: Dissolved organic matter utilization and oxygen uptake in algal–bacterial microcosms. Can. J. Microbiol. 25:1315–1320.
- [55] Borde. X., Guieysse, B., Delgado, O., Munoz, R., Hatti-Kaul, R., NugierChauvin, C., Patin, H., Mattiasson, B., 2003: Synergistic relationships in algal–bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants. Bioresour. Technol. 86:293–300.
- [56] Munoz, R., Guieysse, B., 2006: Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review, Water Res. 40:2799–2815.
- [57] Guo, Zhi., Tong, Yen. Wah ., 2014 : The interactions between *Chlorella vulgaris* and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions. Journal of Applied Phycology Volume: 26 Issue: 3 : 1483-1492 .

- [58] Le Floch, E., 2002 : Etude expérimentale des limitations simultanées de l'azote et de la lumière sur la croissance de *Rhodomonas salina* (Cryptophyceae). Thèse de l'université de la Méditerranée (AixMarseilleII) – Observatoire des sciences d 318 l'univers.
- [59] Wen, Z.Y., Jiang, Y., Chen, F., 2002: High cell density culture of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: fed-batch development. *Process Biochem.* 37:1447–53.
- [60] Pulz, O., Gross, W., 2004: Valuable products from biotechnology of microalgae, Appl. Microbiol. Biotechnol. 65(6):635–648.doi:10.1007/s00253-004-1647-x
- [61] Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C., Ravishankar, G.A., 2005: Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?, Trends in Food Science & Technology, 16(9), .389-406.
- [62] Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006: Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience et Bioengineering 101: 87-96
- [63] Mulbry, W., Kondrad, S., Buyer, J., 2008 :Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates. J. Appl. Phycol. 20:1079–85.
- [64] El Gamal, A.A., 2010 : Biological importance of marine algae, Saudi Pharmaceutical Journal 18,1–25.
- [65 ] Pruvost, J., Cornet, J-F., Le borgne, F., JENCK J., 2011 : production industrielle de microalgues et cyanobactéries Techniques de l'ingénieur .
- [66] Pairin, S., 2011: Diversity of algae and water quality assessment in sediment areas at Bueng Boraphet. Master's thesis, Department of Botany, Kasetsart University.
- [67] Marcaillout-Le Baut, C., 2006: Les toxines des microalgues marines, Biofutur 272 décembre, 35.
- [68] Guiry, M., 2012: How many species of algae are there? J. Phycol. 48, 1057–1063 © Phycological Society of America DOI: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x.
- [69] Andersen, R. A.; Morton, S. C.; Sexton, J. P. 1997: Culture collection of marine phytoplankton catalogue of strains. J. Phycol. 33, Supplement.
- [70] Sharma, Naveen Kumar, Rai A.K., 2011: Biodiversity and biogeography of microalgae: Progress and pitfalls, 15, 1–15.
- [71] Wijffels, R.H., 2008: Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. Trends Biotechnol. 26(1):26.
- [72] Raja, R., Hemaiswarya, S, Kumar, N.A., Sridhar, S., Rengasamy, R., 2008: A perspective on the biotechnological potential of microalgae. Crit. Rev. Microbiol. 34(2):77.

- [73] Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J., 2008: A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. Curr.Opin.Biotechnol. 19(5):430-6. doi: 10.1016/j.copbio.2008.07.008. Epub 2008 Sep 6.
- [74] Guedes, A.C., Amaro, H.M., Malcata, F.X., 2011 :Microalgae as sources of high added-value compounds a brief review of recent work. Biotechnol. Prog., May-Jun;27(3):597-613. doi: 10.1002/btpr.575. Epub Mar. 30.
- [75] Boulêtreau, S., 2007 : Déterminisme des fonctions d'accrétion et de détachement du biofilm phototrophe en milieu naturel : études expérimentale et numérique des facteurs de contrôle de la biomasse en rivière. Thèse Doctorale Université Toulouse III - Paul Sabatier
- [76] Characklis, W.G., 1990: Biofilms : basis for an interdisciplinary approach. In : Characklis W.G. Marshall K.C. (eds). Biofilms. John Wiley and Sons – New-York January
- [77] Henrici, A.T. 1933: Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopic method. J. Bacteriol. 25, 277 -286.
- [78] Zobell C.E. et Allen E.C., 1935: The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. Journal of bacteriology. 29, 239-251.
- [79] Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, G.K., 1978: How bacteria stick? Scientific American. 238, 86-95.
- [80] Zobell CE. 1943. J.Bacteriol., 46:39-56;
- [81] Loeb G.I., Neihof, R.A., 1975: Marine conditioning films. Adv. Chem. 145:319 – 335.
- [82] Bakker, D.P., Klijnstra, J.W., Busscher, H.J., Van Der Mei, H., 2003: The effect of dissolved organic carbon on bacterial adhesion to conditioning films adsorbed on glass from natural seawater collected during different seasons. Biofouling 19:391 – 397.
- [83] Bhosle, N.B., Garg, A., Fernandes, L., Citon, P., 2005: Dynamics of amino acids in the conditioning film developed on glass panels immersed in the surface seawaters of Dona Paula Bay. Biofouling 21:99 – 107.
- [84] Jain, A., Bhosle, N. B., 2009 : Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion. Biofouling 25 (1): 13 — 19
- [85] Whiteley, M., Bacteria, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., and Greenberg, E.P., 2001: Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature 413: 860–864.
- [86] Filloux, A., Vallet, I., 2003: Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne . Medecine/sciences; 19 : 77-83.
- [87] Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P., 1998: The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 280:295–298.

- [88] Lejeune, P., 2003: Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. Trends Microbiol. 11, 179–184.
- [89] Allison, D. G., 2003: The biofilm matrix. Biofouling, 19, 139–150.
- [90] Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W., 1970: Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system. J. Bacteriol. 104, 313-322
- [91] Fuqua, W. C., Winans, S. C., Greenberg, E. P., 1994: Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. Bacteriol. Jan; 176(2): 269–275. PMID: PMC205046
- [92] Gerchakov, S.M., Marszalek, D.S., Roth, F.J., Udey, L.R., 1976: Succession of periphytic microorganisms on metal and glass surfaces in natural seawater - In : Proa. 4-th In-t. Congress on Marine Corrosion and Fouling- Eds Romanovsky - Juan-les-Pins, Antibes
- [93] Pedersen, K., 1990: Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. Water Res. 24 (2) 239-243 203-210.
- [94] Boulanger-Petermann, L., Rault, J., Bellon-Fontaine, M.N. 1997: Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. Biofouling 11:201–1
- [95] Hilbert L, R., Bagge-Ravn, D., Kold, J., Gramb, L., 2003: Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance, International Biodeterioration and Biodegradation 52 :175 – 185.
- [96] Scheuermann, T. R., Camper, A. K., Hamilton, M. A., 1998: Effects of substratum topography on bacterial adhesion. J. Colloid Interf. Sci. 208:23-33.
- [97] Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U., 2000: Heterogeneity in biofilms, FEMS Microbiology Reviews 24: 661-671b.
- [98] Jarvie, H. P.; Neal, C.; Warwick, A.; White, J.; Neal, M.; Wickham, H. D.; Hill, L. K.; Andrews, M. C., 2002: Phosphorus uptake into algal biofilms in a lowland chalk river. Science of the Total Environment 282/283: 353-373
- [99] Romani, A.M., Sabater, S., 2000: Influence of Algal Biomass on Extracellular Enzyme Activity in River Biofilms. Microbial. Ecology 41: 16-24.
- [100] Gilbert, P., McBain, A.J., Rickard, A.H., 2003: Formation of Microbial Biofilm in Hygienic Situations: A Problem of Control. International Biodeterioration and Biodegradation 51: 245-248.
- [101] Gaylarde, C., Ribas Silva, M., Warscheid, Th., 2003: Microbial impact on building materials: an overview. Materials and Structures / Matériaux et Constructions, June, Vol. 36, 342-35

- [102] Jahnke, J., Priefer, U.B., 2002: Phototrophic Biofilms of Restored Fields in the Rhenish Lignite Mining Area: Development of Soil Algal, Bacterial, and Fungal Biomasses. Soil Biology and Biochemistry 34: 1157-1165.
- [103] Paje, M.L.F, Kuhlicke, U., Winkler M., and T.R. Neu. 2002: Inhibition of lotic Biofilms by Diclofenac. Applied Microbiology and Biotechnology, 59 :488-492.
- [104] Callow, M.E., 2000 :Algal biofilms. In: Evans LV, editor. Biofilms: recent advances in their study and control. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- [105] Thepenier, C., Gudin. C.,Thomas, D., 1985: Immobilization of *Porphyridium cruentum* in Polyurethane Foams for the Production of Polysaccharide. Biomass 7:225-240.
- [106] Abdelhameed Sayed,M.; Hammouda Ebrahim, O., 2007: Biotechnological Potential uses of Immobilized Algae Review., International Journal of Agriculture and Biology Vol. 9, No.1 183–192<http://www.fspublishers.org>.
- [107] Moreno- Garrido,I., 2008 : Microalgae immobilization: Current techniques and uses. Bioresource Technology 99 3949–3964
- [108] Edyvean, R.G.J., 1986: Diatom communities on steel protected from corrosion in seawater. Algal Biofouling, p231-249, L.V. Evans and K.D Hoagland (eds)
- [109] Cooksey K.E., Wigglesworth-Cooksey, B., 1995: Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. Aquat Microb Ecol 9:87-96.
- [110] Sekar, R., Venugopalan, V. P., Satpathy, K. K., Nair, K. V. K., Rao V.N.R. , 2004:Laboratory studies on adhesion of microalgae to hard substrates Hydrobiologia 512 p109–116, P.O. Ang, Jr. (ed.), Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- [111] Mitbavkar, S., Anil, A.C, 2000: Diatom colonization on stainless steel panels in estuarine waters of Goa, west coast of India .Indian Journal of Marine Sciences Vol. 29 :273-276
- [112] Pirt, S. J., Walach, M., 1978: Biomass yields of chlorella from iron ( $Y_{x/ve}$ ) in iron-limited batch cultures. Effect of specific growth rate. Arch. Microbiol., 116:293-296
- [113] Hoagland, K. D., Rosowski, J. R. Gretz, M. R., Roemer,S. C.,1993: Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. J. Phycol. 29: 537-566.
- [114] Wetherbee, R., Lind, J. L., Burke, J. and Quatrano, R. S., 1998: The first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. J. Phycol., 34: 9-15.
- [115] Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D. Hansen, C.M.E., 2003: Contributions of microbial biofilm developing under various external factors. Eur. J. Phycol., 40:1-8.

- [116] Cao, S., Wang, J. D., Chen, H.S., 2011: Progress of marine biofouling and antifouling technologies. Chinese Sci Bull, , 56: 598–612, doi:10.1007/s11434-010-4158-4
- [117] Beech, I. B., Sunner, J., 2004: Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. Curr. Opin. Biotechnol., 15(3):181–186.
- [118] Daufin, G., Talbot J., 1971 : Etude de quelques problèmes de corrosion dans l'industrie laitière .mémoires originaux le lait juillet -août 507 : 375- 398.
- [119] Tian, M., et al. 2007: Direct growth of biofilms on an electrode surface and its application in electrochemical biosensing. J. Electroanal. Chem. 611: 133–139.
- [120] Lovley, D. R., 2008: The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. Curr. Opin. Biotechnol. 19:564–571
- [121] Terry, L.A., Edyvean, R.G.J., 1986: Recent investigations into the effects of algae on corrosion.,L.V. Evans and K.D. Hoagland (eds) Algal Biofouling Studies in Environmental Science, 28 :211-229.
- [122] Edyvean, R. G., Moss, J. B. L., 1986: Microalgal Communities on Protected Steel Substrata in Seawater Estuarine, Coastal and Shelf Science b 22:50.
- [123] Ishihara, y.,TsujiKawa, S., 1999: Effect of bacteria combined with Diatom on Ennoblement of Electrode Potential for Stainless Steel in naturel see water. Corrosion EngeneeringVol.48 No.8, 520-527.
- [124] Acuña, N ., Ortega-Morales, O. B., Valadez-Gonzalez, A., 2006 : Biofilm Colonization Dynamics and Its Influence on the Corrosion Resistance of Austenitic UNS S31603 Stainless Steel Exposed to Gulf of Mexico Seawater, Marine biotechnology Volume 8: 62–70.
- [125] Marconnet, C., Dagbert, C. Roy, M. Féron. D., 2008: Stainless steel ennoblement in freshwater: from exposure tests to mechanisms. Corros. Sci.50:2342–2352.
- [126] Mara, D. D.,Williams, D. J. A., 1972:Polarization studies of pure Fe in the presence of hydrogenase positive-II. of photosynthetic bacteria and microalgae, Corrosion Science, Vol. 12: 29-34. Pergamon Press. Printed in Great Britain.
- [127] Mert, Bas ak Dođru M.Erman Mert, Gulfeza Kardas, Birgul Yazıcı 2011: The role of *Spirulina platensis* on corrosion behavior of carbon steel Materials Chemistry and Physics 130 :697– 701
- [128] Kamal, C., Sethuraman, M.G., 2012: *Spirulina platensis* – A novel green inhibitor for acid corrosion of mild steel Arabian Journal of Chemistry, Volume 5, Issue 2, April, 155–161
- [129] Pulz, o.,Scheibenbogen,k.,1998:Photobioreators : design and performance with respect to light energy input adv ,biotech eng biotechnology vol . 59: P123 -152.
- [130] Noüe J., D. Proulx, P. Dion, and C. Gudin 1990 : Drugs and chemicals from aquaculture. in “Aquaculture Europe'89. Business Joins Sciences” (ed. by N. de Pauw and R. Billard) EAS Sp. Publ., 12, 389-418.

- [131] Pulz, O., 2001: "Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms" Appl. Microbiol. Biotechnol., **57**. 287–293
- [132] Riesenberger, D., Guthke, R., 1999: High-cell-density cultivation of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol 51(4):422–430
- [133] Acién Fernández, F.G., 1996 : Operación en continuo de fotobiorreactores tubulares externos con la microalga , *Phaeodactylum tricornutum*. Tesis Doctoral. Universidad de Almería.
- [134] Brush, M., Nixon, S., 2002: Direct measurements of light attenuation by epiphytes on eelgrass *Zostera marina*. Marine Ecology Progress Series 238: 73–79.
- [135] Wong, D., Gerstenberger, S., Baldwin, W., Austin, E., 2011: Experiment 4: field validation of lethal temperatures to kill 100% of quagga mussel in summer and winter (Sept 2010 and Jan. 2011), Semi -annual Report September 2010, Denver
- [136] Jae, Jun Yoo, Won Seok, Chang Seung Phill Choi Sang Jun Sim Jaoon Y. H., Kim 2013: Development of thin-film photo-bioreactor and its application to outdoor culture of microalgae, Bioprocess Biosyst Eng 36:729–736
- [137] Tsygankov, A. A., 2001: Laboratory Scale Photobioreactors. Applied Biochemistry and Microbiology 37 (4): 333-341.
- [138] Borowitzka, M.A., 1996: Closed algal photobioreactors: design considerations for large scale systems. J. Mar Biotechnol 4:185–191.
- [139] Tredici, M.,R., 1999: Bioreactors, photo. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation, vol. 1. New York: Wiley; 395-419.
- [140] Chitralekha Nag Dasgupta, J., Gilbert , Jose Lindblad, Peter Thorsten Heidorn, Stig A. Borgvang , Kari Skjanes , Debabrata Das 2010: Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production, International Journal of Hydrogen Energy doi:10.1016/j.ijhydene.2010.06.029.
- [141] Skjanes, K., Knutsen, G., Kallqvist, T., Lindblad, P. H., 2008: Production from marine and freshwater species of green algae during sulfur starvation and considerations for bioreactor design. Int J Hydrogen Energy;33:511-21.2
- [142] Fleck-Schneider Pascale. , Lehr Florian.; Posten Clemens. , 2007:Modelling of growth and product formation of *Porphyridium purpureum*, Journal of Biotechnology Volume 132:2 134-141.
- [143] Pardo, A., Merino, M. C., Coy, A. E., Viejo, F., Arrabal, R., and Matykina, E., 2008 : *Corros. Sci.*, 50 179 Pitting corrosion behaviour of austenitic stainless steels – combining effects of Mn and Mo additions 1796 Volume 50, Issue 6, June ,1796–1806

- [144] Jullien, C., Benezech, T., Carpentier, B., Lebreton, V., Faille, C., 2003: Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. J. Food Engineering, Vol. 56, 1, . 77-87.
- [145] Whitehead, K.A., et al., 2011: The antimicrobial properties of titanium nitride/silver nanocomposite coatings. J. Adhes. Sci. Technol. 25: 2299–2315.
- [146] Stevens, R., Holah, J., 1993: The effect of wiping and spray-wash temperature on bacterial retention on abraded domestic sink surfaces. Journal of Applied Microbiology. 75:91-94.
- [147] Sundgren J.E Sundgren J.E., 1985: Structure and properties of TiN coatings. Thin Solid Films. 128: 21-44.
- [148] De Jong, P., 1997: Impact and control of fouling in milk processing. Trends Food Sci. Technol. 8: 401–405. Earle, R.L., 1966. Unit operations in food processing. Pergamon
- [149] Bansal, B., Chen, X.D., 2006: A critical review of milk fouling in Heat exchangers. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 5, 27–33.
- [150] Baek, S.M., Seol, W.S. , Lee, H.S., Yoon, J.I., 2010: Decreasing the fouling of heat exchanger plates using air bubbles. Defect Diffus. Forum 297:1199–1204.
- [151] McLean, R.J.C., Pierson III, L.S., Fuqua C., 2004: A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists Journal of Microbiological Methods 58: 351–360.
- [152] Beranger, G., Mazille, H., 2005 : Approches scientifiques des surfaces. Caractérisation et propriétés, Techniques de l'ingénieur, M 142 : 1-10 .
- [153] Weber, W. J. Jr., Pirbazari, M., Melson, G. L., 1978: Biological growth on activated carbon: an investigation by scanning electron microscopy. Envir. Sci. Technol. 12: 817-819.
- [154] Alleman, J. E., Veil J. A. and Canaday J. T. 1982 : Scanning electron microscope evaluation of rotating biological contactor biofilm. Wat. Res. 16, 543-550.
- [155] Eighmy, T. T., Maratea, D., Bishop, P. L., 1983: Electron microscopic examination of wastewater biofilm formation and structural components. Appl. envir. Microbiol. 45:1921-1931.
- [156] Kinner, N. E., Balkwill D. L. and Bishop P. L. 1983: Light and electron microscopic studies of microorganisms growing in rotating biological contactor biofilms. Appl. envir. Microbiol. 45:1659-1669.
- [157] Richards, S. R. and Turner R. J. 1984: A comparative study of techniques for the examination of biofilms by scanning electron microscopy. Wat. Res. 18: 767-773.
- [158] Goldstein J. I., Newbury D. E., Echlin P., Joy D. C., Fiori C. and Lifshin E. 1981: Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. Plenum Press, New York

- [159] Chang, H. T., Rittmann, B. E., 1984: Biofilm loss during sample preparation for scanning electron microscopy war. res. vol. 20, no. 5, 1451-1456, 1986 0043-1354/86 printed in great Britain technical note.
- [160] Bard, AJ. and Faulkner, LR. 2001: Electrochemical methods : Fundamentals and applications.: John Miley & sons, Inc
- [161] González, J.E.G., Santana, F.J.H., Mirza-rosca ,J.C., 1998 : Effect of bacterial biofilm on 316 SS corrosion in natural seawater by eis Corrosion Science Volume 40, Issue 12, , 2141–2154
- [162] Jayaraman A, Ornek D, Duarte DA, Lee C-C, Mansfeld FB, Wood TK 1999: Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of copper and aluminum. Appl Microbiol Biotechnol 52:787–790.
- [163] Dheilly, A., Linossier, I., Darchen, A., Hadjiev, D., Corbel, C., Alonso, V., 2008: Monitoring of microbial adhesion and biofilm growth using electrochemical impedancemetry Appl Microbiol Biotechnol 79:157–164.
- [164] Taeyoung, K., Junil, K., Joon-Hee, L. and Jeyong, Y., 2011: Influence of attached bacteria and biofilm on double-layer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical impedance spectroscopy, Water Res., Vol. 45, Issue 15: 4615–4622.
- [165] Bressel, A., Schultze, J. W., Khan, W., Wolfaardt, G. M., Rohns, H. P., Irmischer R. and Schöning, M. J. 2003: High resolution gravimetric, optical and electrochemical investigations of microbial biofilm formation in aqueous systems, Electrochim.. Acta, 48: 20–22, 3363–3372.
- [166] Yuan, S. J., Choong, A. M. F. and Pehkonen, S. O., 2007: The influence of the marine aerobic *Pseudomonas* strain on the corrosion of 70/30 Cu-Ni alloy, Corros. Sci., 49: 4352 - 4385.
- [167] Liu, C. Bi. Q., Leyland, A., Matthews, A. 2003: an electrochemical impedance spectroscopy study of the corrosion behaviour of PVD coated steels in 0,5 N NaCl aqueous solution: Part I. Establishment of equivalent circuits for E.I.S. data modeling, Corrosion science 45: 1243-1256.
- [168] Hemerik, G., 1973: Culture methods and growth measurements in :Handbook of physiological methods- Ed. J. R. Stein- Cambridge University Press- Cambridge, Grande-Bretagne.
- [169] Drew, K.M. & Ross, R. **1965**:Some generic names in the Bangiophycidae. Taxon 14: 93-99.
- [170] Vonshak A., 1988 : *Porphyridium* , In: Microalgal Biotechnology, Borowitzka M. and Borowitzka J. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge, UK,
- [171] Adda M., Merchuk J.C., Arad, S., 1986: Effect of nitrate on growth and production of cell wall polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium* , Biomass, 10: 131-140.

- [172] Arad, S.M., 1988: Production of sulfated polysaccharides from unicellular red algae. In: Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y., Morvan, H., Christiaen, D. (Eds), Algal Biotechnol., Elsevier Applied Science, London, 65-87.
- [173] Lee Y-K. and H. Shen, 2004: Basic culturing techniques, In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Richmond A. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 40-56
- [174] Baquerisse D., 1999 : Utilisation de la simulation dynamique des procédés pour la conduite et le contrôle commande des bioréacteurs. Thèse Doctorale, Ecole Centrale Paris, France.
- [175] Nouals S., 2000 : Modélisation d'un photobioréacteur pour le pilotage de microalgues, Thèse Doctorale, Ecole Centrale Paris, France,
- [176] Dermoun D., 1987 : Ecophysiologie de *Porphyridium purpureum* : validation expérimentale d'un modèle de croissance – étude de la production de polysaccharide, Thèse Doctorale, Université de Technologie de Compiègne, France .
- [177] Ramus J., Kenney B.E., Shaughnessy, E.J., 1989 : Drag reducing properties of microalgal exopolymers, Biotechnology and Bioengineering, 33, 550-556.
- [178] Mehanna M., 2009 : Mécanismes de transfert direct en corrosion microbienne des aciers: Application à *Geobacter sulfurreducens* et à l'hydrogénase de *Clostridium acetobutylicum*. Thèse de doctorat Université de Toulouse.
- [179] Fuvelle, C., 1988: Introduction à la corrosion, Edition Cetim,.
- [180] Gale, W. F. 1975: Ultrasonic removal of epilithic algae in bar-clamp sampler. J. Phycol. 11: Issue 4, 472-473.
- [181] Garry, P., 1997 : Propriétés physico-chimiques de surfaces en polyuréthane et conséquences sur l'encrassement et l'adhésion de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*, Thèse de Doctorat de l'université Claude Bernard-Lyon I, Claude Bernard-Lyon I: Lyon. p. 124.
- [182] Kopéck, J., Lukavská, A., Verbovická, E. and Erhardp, F., 2004: Changes in the photosynthetic pigment patterns during the synchronous life cycle of *Porphyridium purpureum*, Algalological Studies, 114, 121-132.
- [183] Dowling, N. J. E, Guezennec, J., Bullen, J., Little, B. J. and White, D. C., 1992: Effect of photosynthetic biofilms on the open circuit potential of Stainless steel, Biofouling, 5, 315-322.
- [184] Hultberg M, Asp H, Marttila S, Bergstrand KJ, Gustafsson S. 2014: Biofilm formation by *Chlorella vulgaris* is affected by light quality Curr. Microbiol. Nov;69(5):699-702. doi: 10.1007/s00284-014-0645-1. Epub Jul
- [185] Maruthamuthu, S. Eashwar M., Balakrishnan K., 1993: Effects of microfouling and light/dark regimes on the corrosion potentials of two stainless alloys in seawater. Biofouling 7 257-265.

- [186] Feron D, Langlet J, Dagbert C, Galland J.; Thibault S.; Isambert A.; Durand G. 1997: Simulation de l'effet corrosif des eaux de mer naturelles par un modèle enzymatique. Congrès/colloque Contribution à un proceeding Forum sur la Biodétérioration des Matériaux - 97 02/10/1997 - 03/10/ Ottrott, France.
- [187] Gallardo-Moreno A.M González-Martín M.L Pérez-Giraldo C Bruque J.M Gómez-García A.C 2004: The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials Journal of Colloid and Interface Science Volume 271, Issue 2, 15 March 2004, 351–358.
- [188] Stadler R, Fuerbeth W, Harneit K, Grooters M, Woellbrink M, Sand W. 2008: First evaluation of the applicability of microbial extracellular polymeric substances for corrosion protection of metal substrates: Electrochimica Acta 54 : 91–99
- [189] Tannin-Spitz Tehila, Bergman Margalit, van-Moppes Dorit, Grossman Shlomo, Arad Shoshana (Malis) 2005: Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium sp.* Journal of Applied Phycology 17 215–22
- [190] Murphy Cormac D, Moore Robert M, White Robert L. 2000: Peroxidases from marine microalgae Journal of Applied Phycology, 12 507–513 © Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- [191] Beech, I.B., Zinkevich, V., Tapper, R.C. Gubner, R., 1998: Direct Involvement of an extracellular complex produced by a marine sulfate-reducing bacterium in deterioration of steel Geomicrob. J. 15(2):121–34.
- [192] Brenda Little, Patricia Wagner, Peter Angellb & David Whiteb 1996 : Correlation between Localized Anodic Areas and *Oceanospirillum* Biofilms on Copper International Biodeterioration & Biodegradation 159-162 Published by Elsevier Science Limited Printed in Great Britain. PII: S0964-8305(96)00014-5
- [193] Fattom, A. & M. Shilo, 1984.:Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. Appl. envir. Microbiol. 47: 135–143.
- [194]. Feron, C. Compere, I. Dupont, M. Magot, 2002 : biodétérioration des matériaux métallique ou biocorrosion, Corrosion des métaux et alliage, 385-405,.
- [195] J.C.SCULLY, 1995 : Corrosion Protection : principes fondamentaux, MASSON Paris, ISBN
- [196] Kus, E., Nealson, K. and Mansfeld, F., 2007: The effect of different exposure conditions on the biofilm Interface Corrosion Science doi:10.1016/j. Corros. Sci., 0p 019.

- [197] Cristiani, P., Perboni, G., Hilbert, L., Mollica, A. and Gubner, R. 2002: Experiences on MIC monitoring by electrochemical techniques, Proceedings of the International Specialized Conference on Biofilm Monitoring, Porto, March 17–20, 197–200.
- [198] Bayouhd, S. A., Othmane, L. Ponsonnet, H. and Ben Ouada, H., 2008: Electrical detection and characterization of bacterial adhesion using electrochemical impedance spectroscopy-based flow chamber, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 318, 291-300.
- [199] Andineau, B., 1985-86 : Production d'algues unicellulaire, Station de Palavas, Ifremer, 14.
- [200] Juget, J., Riera, P., Schmelz, R., 1994 : étude des relations trophiques entre le biotecton et les nauididae (Nais spp. Oigochaeta): importance du carbone organique (COT), Annl. Limnol., 255.
- [201] Boukais ,I , 2010 : Comportement électrochimique de deux aciers (316L, X70) en milieu marin. Mémoire d'Ingénieur, ENP.
- [202] Peng, J., Tsai, W. and Chou, C., 2001: Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. Int. J. Food Microbiol., 65, 105-111.
- [203]Lecointre,G.,LeGuyader,H.,2001:Classification phylogénétique du vivant, Belin, 543;Paris.

---

## Webgraphie

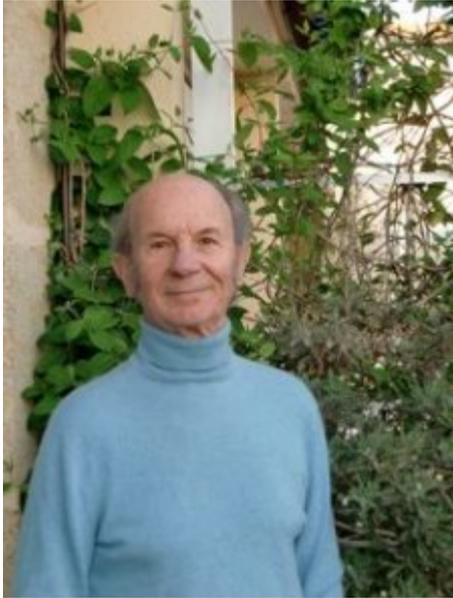
- [Web1] <http://wwz.ifremer.fr/ncal/Biodiversite-et-ressources/Microalgues/Les-microalgues>
- [Web2] <http://www.cefracor.org/doc/cours-04.pdf>
- [Web3].<http://campus.cerimes.fr/odontologie/enseignement/chap6/site/html/cours.pdf>
- [Web4] <http://place-publique.fr/article/les-micro-algues-seraient-elles->

# *A*NNEXES



## ANNEXE 1

***Les micro-algues seraient-elles l'avenir de la planète ? Interview de Claude Guadin :Propos recueillis par Thérèse Bouveret, le 4/09/2012[Web4]***



**PP :** On vous surnomme le « grand-père des algues » parce que depuis près de 40 ans vous avez étudié les micro-algues au sein de la BP (British Petroleum) et du CEA. Vous avez même constitué une collection de 500 micro-algues. Vous allez publier « une histoire naturelle des micro-algues » aux éditions Odile Jacob début 2013. (Et vous êtes fondateur de la société européenne de biotechnologies).

**C.G. :** Oui mais j'ai surtout passé une partie de mon existence, près de vingt ans, avec une micro-algue, la *Porphyridium cruentum*, qui contient de la phycoérythrine. Comme je l'ai écrit dans mon livre Une histoire naturelle de la séduction « Cette microalgue rhodophycée a été isolée dans les lieux saints, les églises, les bénitiers en Suisse et en Bretagne. Elle est la responsable des christs et des vierges sanglantes. Elle se développe grâce à la condensation de l'humidité dans les creux des mains et des plaies des statues dès que la température devient clémente et que le soleil darde à travers les vitraux de l'église. C'est une espèce très ancienne, sorte de trait d'union entre les cyanobactéries sans noyau (3,5 millions d'années) et les algues à noyau. Elle a gardé des primitives algues bleues des pigments rouges et bleus (les phycobiliprotéines). Ces molécules proviennent de la même voie de synthèse que la chlorophylle et le sang mais les quatre unités pyrroles qui les constituent (un pyrrole est un noyau à quatre atomes de carbone et un atome d'azote) sont alignés en chaîne au lieu d'être refermées sur un métal comme dans la chlorophylle (prophyrine au magnésium) ou le sang (porphyrine au fer) ».

**P.P.** : Vous avez créé une entreprise il y a une dizaine d'années, issue du CEA

**C.G.** J'ai créé Thallia Pharmaceuticals à Tarbes (entre 1992 et 1998) avec le soutien de Sofinnova Partners. C'était l'aboutissement de la filière micro-algues du CEA. J'ai conçu un système tubulaire qui permettait de cultiver cette algue dont les propriétés antioxydantes ainsi que de prévention de la DMLA (Dégénérescence Maculaire liée à l'Age) sont élevées en raison de son taux de zéastaxantine (qu'on trouve aussi dans les grains de maïs). Un taux bien plus élevé que celui du maïs dont il faut utiliser des quantités très importantes pour obtenir quelques grammes distribués sous forme de gélules. Mais nous n'avons pas réussi à commercialiser la production sous forme de gélules. La microalgue *Porphyridium cruentum* était également une source de Super Oxyde Dismutase (SOD) végétal, très recherchée depuis que la crise de la vache folle interdisait de recourir au sang de bœuf ou au sang humain. Nous avons obtenu et purifié la première source de SOD végétale. En même temps, des chercheurs de l'Inra en ont trouvé au cœur du melon, ce qui était plus économique.

**P.P.** : Pour quelles raisons votre société a-t-elle cessé son activité ?

**C.G.** Pour des questions de rentabilité. Si nous avions pu vendre les produits directement comme c'est le cas pour la spiruline, l'entreprise aurait été rentable. Cela aurait évité les processus d'extraction et de purification, qui sont les plus coûteux. Actuellement, il y a seulement trois micro-algues qui soient homologuées pour la consommation humaine dont la spiruline qui a obtenu cet agrément il y a une trentaine d'années du fait qu'elle était déjà consommée dans des cultures traditionnelles au Kenya et dans d'autres pays d'Amérique latine.

**P.P.** : Vous avez déposé à la BP et au CEA des brevets il y plus de vingt ans sur des procédés qui sont actuellement repris par des industriels.

**C.G.** : En effet, dès 1975 j'ai développé un système tubulaire flottant, celui qui a été utilisé chez Thallia Pharmaceuticals. Il a été repris ensuite par d'autres quand le brevet est retombé dans le domaine public, la durée de vie d'un brevet n'étant que de 20 ans.

**P.P.** : Quels sont les obstacles à la culture de micro-algues par voie photosynthétique ?

**C.G.** : Les micro-algues peuvent être cultivées en open pond à ciel ouverts (raceways) comme c'est le cas en Australie, en Israël ou aux Etats-Unis. Les Israéliens cultivent en plein air une microalgue survivante de la mer morte, la *Dunaliella salina*, qui est très riche en bêta-carotène. Ils l'utilisent pour produire des milliers de tonnes par an de colorant alimentaire E 160 a. C'est cette algue qu'on trouve aussi dans les étangs en Camargue et qui donne leur couleur aux flamants roses par transmission dans la chaîne alimentaire. On peut aussi cultiver d'autres espèces de micro-algues moins résistantes dans des photobioréacteurs fermés pour

éviter les problèmes de contamination. Mais on a beau retourner toutes les possibilités de ces systèmes tubulaires, flottants, à la verticale, à l'horizontale, le fait est que leur rentabilité est insuffisante. Dès qu'il s'agit d'extraction de micro-algues, les exploitations sont très coûteuses en eau, en CO<sub>2</sub>, en phosphates et en électricité. L'ennemi numéro 1 c'est l'eau qu'on manipule en trop grandes quantités.

**PP** : Il faut contrôler la température ?

**C.G.** : Oui, le gros inconvénient quand on met ces photobioréacteurs au soleil, c'est le refroidissement. Il faut d'énormes quantités d'eau pour éviter les excès de chaleur mais aussi pour filtrer les algues. (Au lieu d'utiliser des systèmes mécaniques, on utilise maintenant des systèmes Airlift qui pulsent de l'air pour faire circuler les micro-algues dans les tuyaux. On a optimisé la taille de la bulle et les systèmes fonctionnent bien).

**P.P.** : Quelle est la différence entre la culture de micro-algues par autotrophie ou par hétérotrophie ?

**C.G.** : La culture d'algue par autotrophie repose sur la photosynthèse et l'alimentation en CO<sub>2</sub> alors que l'hétérotrophie est une culture dans le noir avec des apports de sucres. Grâce aux japonais, on a découvert que des cultures de microalgues peuvent se développer en l'absence de lumière : elles vivent sur leurs réserves de sucres. De plus en plus, les entreprises se dirigent vers la mixotrophie, c'est à dire que celles qui ont des photobioréacteurs en pleine lumière ajoutent des sucres et celles qui ont des fermenteurs avec des micro-algues de la lumière. Dans les cinq ans à venir, toutes vont se tourner vers la mixotropie.

**P.P.** : Quels sont les avantages de ces deux voies ?

**C.G.** : Le développement des micro-algues dans des conditions photosynthétiques très contrôlées ne dépasse guère actuellement une concentration cellulaire de 3 g de matière sèche par litre. Si on rajoute un peu de sucre dans les PBR, la concentration va augmenter d'un facteur 10 avec une composition biochimique intermédiaire. La productivité est beaucoup plus élevée dans le cas des systèmes en hétérotrophie. Fermentalg à Libourne, par exemple, a réussi à monter à des concentrations de 100 g/l, et plus. La qualité chimique de la biomasse n'est plus la même qu'en autotrophie, sans fixation de CO<sub>2</sub> et émission d'oxygène. C'est quand même la voie d'avenir pour de nombreux métabolismes comme les lipides.

**P.P.** : Y aurait-il d'autres solutions ?

**C.G.** : Il existe une algue d'eau douce, le *Botryococcus braunii*, qui a l'avantage de produire des alcadiennes (C17-C19), c'est à dire des hydrocarbures à longue chaîne carbonée. (On retrouve aussi des hydrocarbures dans la nature chez les pétroliers, dans le gasoil ou le biodiesel). En effet, pour nager, les micro-algues ont soit un flagelle soit une bouée, ce qui est

le cas avec cette « bulle » d'hydrocarbure qui leur sert de flotteur. On peut aussi immobiliser les micro-algues sur des supports solides. J'ai fait une thèse là dessus et j'ai réussi à fixer une micro-algue dans des gels de polyuréthane. En 1983, avec le plasticien Ernest Pignon Ernest, nous avons injecté des micro-algues vivantes dans des sculptures en polyuréthane sur des arbres du Jardin des Plantes à Paris. On pourrait envisager de projeter des micro-algues dans l'environnement des villes et des bâtiments ce qui permettrait d'épuiser le CO<sub>2</sub> ambiant.

Les scientifiques russes et américains qui ont travaillé sur les programmes de vols spatiaux ont mené des recherches sur les micro-algues pour recycler le CO<sub>2</sub> de la respiration et produire des aliments dans des univers habitables clos. Ce sont d'ailleurs des chercheurs de la NASA, après l'arrêt de ces programmes, qui ont créé l'entreprise Martek aux Etats-Unis pour produire des acides gras polyinsaturés, les fameux oméga 3, dont les propriétés alimentaires sont bénéfiques pour la santé.

**P.P.** : Le CEA travaille -t-il toujours sur la question des micro-algues ?

**C.G.** : Actuellement au CEA Cadarache, il y a un projet nommé Héliobiotech dirigé par Gilles Peltier, en biologie fondamentale, en relation avec le programme Greenstars et avec le GEPEA de Nantes Saint -Nazaire. Son objectif est de produire des biocarburants pour l'aviation à partir de micro-algues. Personnellement, je ne crois pas à l'avenir des micro-algues pour produire des biocarburants, mais davantage à des applications dans le domaine de l'alimentation, de la chimie verte ou de la santé.

**P.P.** : L'INRA a aussi une unité à Narbonne qui étudie des projets utilisant des micro-algues pour la remédiation ou la dépollution. Le projet Symbiose financé par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) est bientôt terminé.

**C.G.** : Oui, en effet les micro-algues peuvent servir à dépolluer. Et elles sont très efficaces pour ça.

**P.P.** : Lafarge ou Calcia ont réalisé des démonstrateurs de récupération du CO<sub>2</sub> au pied des cimenteries. Il y a aussi un projet en cours dans le sud de l'Espagne. Pour l'instant, ces expériences ne sont pas jugées suffisamment rentables, qu'en pensez-vous ?

**C.G.** : La rentabilité n'a plus d'importance quand les micro-algues sont produites, non pour en extraire des molécules d'intérêt, mais uniquement pour capturer le CO<sub>2</sub> dans des centrales thermiques ou des cimenteries ce qui permettrait de diminuer le taux de CO<sub>2</sub> émis dans l'atmosphère.

**P.P.** : Vous prônez la création d'un Institut dédié aux micro-algues ?

**C.G.** : Oui, tout en rendant hommage au travail de Jean-Paul Cadoret qui a tenté sans succès de créer un institut des micro-algues à l'IFREMER de Nantes, je pense que l'idéal serait de

créer un organisme centralisateur totalement dédié aux micro-algues, tant les applications à venir dans le domaine de l'alimentation ou de la chimie sont importantes. Dès à présent la chimie verte pourrait remplacer la chimie du pétrole. L'IFREMER, tourné vers d'autres applications marines, ou l'INRA, vers des applications agricoles, ne suffisent plus. Il manque une véritable culture des micro-algues. Il y a très peu de spécialistes qui ont cette approche synthétique.

**P.P.** : Combien y a-t-il d'algues exploitées actuellement ? **C.G.** : Tout juste une vingtaine alors qu'il y en a des milliers possibles. On en répertorie plus de 300 000 espèces.

**P.P.** : L'expédition Tara qui a fait le tour des océans en relevant des échantillons de phytoplancton dans près de 155 bases a rapporté de sa mission 350 000 échantillons de planctons inconnus. Pour décrypter cette masse de données à l'Institut de Génomique d'Evry, notamment, il faudra environ dix ans. Pensez-vous que nous allons vers de véritables découvertes ?

**C.G.** : Oui certainement. Mais selon moi, il y a plus de différences entre une même algue selon les différents process de cultures (en batch discontinus ou en continu) qu'entre des algues différentes. J'ai travaillé dès le début de ma carrière avec le Pr Jacques Sênèze et le Pr Jacques Monod qui a inventé le procédé de la culture en continu. A l'époque, il s'agissait de produire des levures sur des normales paraffine et ça marchait. Nous nous sommes heurtés au problème de la concurrence avec le tourteau de soja.

**P.P.** : Les micro-algues seraient-elles l'avenir de la planète ?

**C. G.** : Actuellement, en dehors des micro-algues aucune autre espèce ne peut faire le travail. Les forêts ou les plantes supérieures sont confrontées un rétrécissement des surfaces. Ces micro-algues sont des cultures de l'invisible, leur temps de reproduction est plus rapide que le nôtre, de l'ordre de la journée. Il nous a fallu des millénaires pour arriver à 7 milliards d'individus sur la planète. Seules les micro-algues avec leur capacité de reproduction imbattable sont capables de nous fournir l'alimentation nécessaire en utilisant le CO<sub>2</sub> de l'atmosphère qui augmente considérablement. Mais il faut s'y mettre dès maintenant...

<b>ANNEXES2</b>				
<i>Règne</i>	<i>Groupe / Embranchement</i>		<i>Classes / Familles</i>	<i>Genres</i>
Eubacteria	Glycobacteria	<b>Cyanobacteria (= Cyanophyta)</b>	<b>Cyanophyceae</b> algues bleues	<i>Nostoc</i> <i>Chroococcus</i> <i>Oscillatoria</i>
<b>Plantae</b>	Glaucobionta	<b>Glaucophyta</b>	<b>Glaucophytes, Glaucophyceae,</b> petits flagellés d'eau douce	<i>Cyanophora</i>
<b>Plantae</b>	Rhodobionta	<b>Rhodophyta</b>	<b>Florideophyceae</b> algues rouges	<i>Gelidium</i> <i>Asparagopsis</i> <i>Nemalion</i>
<b>Plantae</b>	Chlorobionta	<b>Chlorophyta</b>	<b>Ulvophyceae Chlorophyceae</b> algues vertes	<i>Ulva,</i> <i>Cladophora</i> <i>Chlamydomonas</i> <i>Scenedesmus</i>
<b>Plantae</b>	Chlorobionta	<b>Streptophyta</b>	<b>Zygnematophyceae Charophyceae</b> algues vertes	<i>Spirogyra</i> <i>Zygnema</i> <i>Chara, Nitella</i>
<b>Position incertaine</b>	Haptobionta	<b>Haptophyta</b>	<b>Haptophytes</b> Pavlovophyceae algues unicellulaires flagellées	<i>Pavlova</i>
<b>Position incertaine</b>	Heteroconta = Straménopiles	<b>Ochrophyta</b>	<b>Diatomophyceae Phaeophyceae</b> algues brunes	<i>Navicula</i> <i>Fucus</i> <i>Cystoseira</i>
<b>Position incertaine</b>	Alveolata	<b>Dinophyta</b>	<b>Dinophyceae</b> unicellulaires biflagellés	<i>Goniolax</i>
<b>Position incertaine</b>	Discicristata	<b>Euglenozoa</b>	<b>Euglenophyceae</b> Unicellulaires biflagellés	<i>Euglena</i>
<b>Position incertaine</b>	Cryptista	<b>Cryptophyta</b>	<b>Cryptophytes</b>	<i>Cryptomonas</i>
<b>Position incertaine</b>	Sarcomastigota	<b>Cercozoa</b>	<b>Chlorarachniophyceae</b> Amiboflagellés avec chloroplastes	<i>Chlorarachnion</i>

Lignée verte

Lignée brune

**Tableau 1 : Position des algues dans le monde vivant [34,203]**

## ANNEXES3

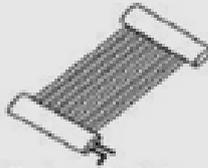
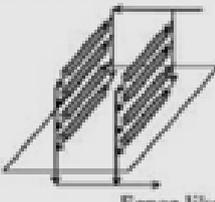
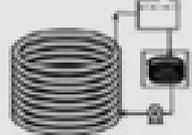
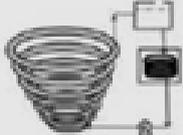
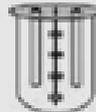
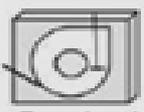
Closed system	
<b>Tubular photobioreactors</b>	  <p>Bubble column      Airlift reactor</p>
<b>Vertical tubular</b>	
<b>Horizontal tubular</b>	  <p>Horizontal tubular reactor      Fence like</p>  <p>u-shaped tubular</p>
<b>Helical tubular</b>	  <p>Helical tubular (bubble train)      Conical tubular</p>
<b>Flat plate</b>	   <p>Vertical flat plate with bubbling      Vertical flat plate with recirculation      V-shaped flat</p>    <p>Flat plate with baffles      Tilted flat plate      Flat panel rocking motion</p>
<b>Fermenter type</b>	   <p>Fermenter with internal illumination      Torus shaped      Triple jacketed reactor</p>
<b>Other types</b>	 <p>Induce diffused reactor</p>

Figure 1: Différents designs de photobioréacteurs [140]

## ANNEXE 4

**Préparation du milieu Hemerick** : Ce milieu est constitué de trois solutions, I, II, III,

**-Solution I**

Composés	Quantité/1L
NaCl	29 g
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	12,3 g
NaNO <sub>3</sub>	1,70 g
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	1,47 g
KCl	0,75 g

**-Solution II**

Composés	Quantité/1L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,0 g
MnCl <sub>2</sub>	1,8 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	117 mg
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	100 mg
CuSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	80 mg
CoSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	50 mg

**- Solution III**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,18 g
FeEDTA	0,05 g

*Tableau 2: Composition du milieu Hemerick*

Composé dissous (total)	Concentration mg kg <sup>-1</sup>	Concentration mol kg <sup>-1</sup>
Chlorure	19400	5,5 10 <sup>-1</sup>
Sodium	10800	4,7 10 <sup>-1</sup>
Sulfate	2700	2,8 10 <sup>-2</sup>
Magnésium	1300	5,3 10 <sup>-2</sup>
Calcium	410	1,0 10 <sup>-2</sup>
Potassium	400	1,0 10 <sup>-2</sup>
Bicarbonate	142	2,3 10 <sup>-3</sup>
Bromure	62	7,7 10 <sup>-4</sup>
Acide Borique	26	4,2 10 <sup>-4</sup>
Strontium	8	9,1 10 <sup>-5</sup>
Fluorure	1,3	6,8 10 <sup>-5</sup>
Lithium	0,185	2,7 10 <sup>-5</sup>
Rubidium	0,120	1,4 10 <sup>-6</sup>
Iode	0,06	2,4 10 <sup>-7</sup>
Zinc	0,01	1,5 10 <sup>-7</sup>
Cuivre	0,001	1,6 10 <sup>-8</sup>
Mercure	0,00001	4,9 10 <sup>-11</sup>

*Tableau 3 : composition chimique de l'eau de mer rapportée par (6)*

## ANNEXE 5

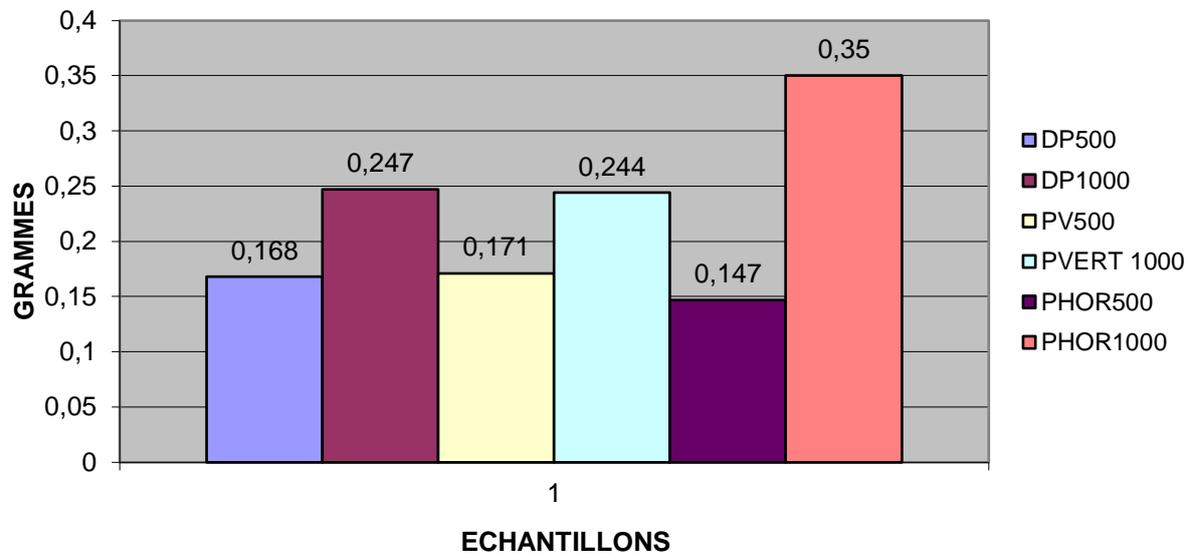


Figure 2 : Evolution du poids des échantillons avant et après immersion

## ملخص

من أجل التصدي إلي مشاكل التآكل الناجمة عن تشكل البيوفلم في زراعة الطحالب البحرية التي هي على اتصال مع الأجزاء المعدنية 304 و316L ، أجرينا هذه الدراسة، التي هدفها الرئيس يتمثل في تبين ظواهر التصاق الطحالب على الفولاذ المقاوم للصدأ، تأثيرها الكهروكيميائي بشكل عام و التآكل بصفة خاصة . لهذا الغرض غمرت هذه الفولاذ في نوعين من الزرعة : لأوله تحتوي على طحالب من نوع أحادي يسم *Porphyridium purpureum* والثانية تحتوي على عدة أنواع من الطحالب الدقيقة البحرية. طبقت نفس الشروط الضوئية في كلتا الحالتين. المنهجية لهذه الدراسة تستخدم تقنيات الكهروكيميائية (لإتباع إمكانية تآكل الحر والكهروكيميائية مقاومة الطيفي(EIS))، وتقنيات المجهر الإلكتروني(SEM) لتوصيف السطح والتقنيات الميكروبيولوجية لرصد النمو. ويبدو من هذه الدراسة أن سلالة *Porphyridium purpureum* ليس له أي تأثير على تآكل الفولاذ المقاوم للصدأ و يحدث التصاق الخلايا لا رجعة فيه على السطح الهوائي /صلب من 316 ذو خشونة منخفضة. الضوئية تؤثر على تطور إمكانية تآكل الحر دوريا .على العكس هاذ الصلب هو أكثر عرضة للتآكل عندما يكون منغمسا في زراعة مختلطة الطحالب .أخيرا، إن تطبيق (EIS)لتوصيف الأغشية الحيوية لأطحالب تعتمد على التجانس،إنالسطح يتصرف كوسيط يسهل اختراقه.

**لكلمات المفتاحية :** الطحالب، *Porphyridium*، للتآكل، التصاق، بيوفيلم، إمكانية تآكل الحر ، الفولاذ غير القابل للصدأ ، مقاومة الكهروكيميائية الطيفي (EIS)

## Resumé

En vue d'appréhender les problèmes de corrosion liés au biofouling dans les photobioréacteurs cultivant des microalgues marines qui sont en contact avec des pièces métalliques (304L , 316L) , nous avons mené cette étude , dont l'objectif principal est la mise en évidence des phénomènes d'adhésion des microalgues sur aciers inoxydables, leur impact électrochimique de façon générale et la biocorrosion en particulier. Ces aciers ont été immergés dans deux types de culture : une culture mono spécifique contenant *Porphyridium purpureum* et une culture rassemblant plusieurs espèces microalgales marines. Les conditions de photopériode ont été appliquées dans les deux cas .La méthodologie suivie pour cette étude a fait appel à des techniques électrochimiques (suivi le potentiel de corrosion libre, spectroscopie d'impédance électrochimique,(SIE)), techniques de microscopie électronique(MEB) (Caractérisation de l'état de surface) et des techniques microbiologiques pour le suivi de la croissance. Il ressort de cette étude que la souche *Porphyridium purpureum* n'a pas d'effet corrosif sur l'acier inoxydable 316L, que l'adhésion irréversible des cellules a lieu sur l'interface air /solide de l'échantillon 316L de faible rugosité .La photopériode agit sur l'évolution du potentiel de corrosion libre de façon cyclique. A l'inverse cet acier est plus vulnérable à la corrosion lorsqu'il est immergé dans une culture algale mixte. Enfin l'application (SIE) pour la caractérisation des biofilms microalgaux semble dépendante de leur hétérogénéité, l'interface se comporte comme un milieu poreux.

**Mots clés:** Microalgue, *Porphyridium purpureum*, biocorrosion, adhésion, biofilms, potentiel de corrosion libre, acier inoxydable, spectroscopie d'impédance électrochimique, (SIE)

## Abstract

In order to understand the corrosion effects associated with biofouling in photobioreactors cultivating marine microalgae that are in contact with metal parts (304L, 316L), we conducted this study, whose main objective is the investigation of microalgal adhesion which occurs on stainless steel, highlighting their electrochemical impact in general and biocorrosion in particular. These steels were immersed in two types of culture : a culture containing only one algal species which was *Porphyridium purpureum* and culture gathering several marine microalgal species. Same Photoperiod conditions were applied in both cases .The methodology for this study uses electrochemical techniques (monitor the open corrosion potential, and electrochemical impedance spectroscopy measures (EIS)), scanning electron microscopy (SEM) (the surface characterization) and microbiological techniques to monitor growth. It appears from this work that the strain *Porphyridium purpureum* has no corrosive effect on stainless steel 316L and the irreversible cell adhesion occurs on the air / solid interface of 316L with low surface roughness. The photoperiod influences the evolution of open corrosion potential cyclically. Conversely this steel is more susceptible to corrosion when immersed in a mixed algae culture. Finally, the application (EIS) for the characterization of biofilms microalgaux seems dependent on their heterogeneity, the interface behaves as a porous medium.

**Keywords:** Microalgae, *Porphyridium purpureum* microbiologically influenced corrosion, adhesion, biofilm potential free, stainless steel corrosion, electrochemical impedance spectroscopy (EIS)