THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée à Chimie ParisTech

Etude des interactions bactéries-surfaces et des effets sur la passivation des aciers inoxydables

Ecole doctorale n°388

CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE ANALYTIQUE DE PARIS CENTRE

Spécialité Chimie Physique et Chimie Analytique

COMPOSITION DU JURY :

Mme PRADIER Claire-Marie
Sorbonne Université, Présidente

Mme BASSEGUY Régine
Université de Toulouse, Rapporteur

Mme PLOUX Lydie
Université de Haute-Alsace, Rapporteur

M. REFAIT Philippe
Université de La Rochelle, Examinateur

Mme ALLION-MAURER Audrey
APERAM, Examinatrice

Mme ZANNA Sandrine
Paris Sciences et Lettres, Examinatrice

M. MARCUS Philippe
Paris Sciences et Lettres, Directeur de thèse

Soutenue par **Elise GARDIN**
le 31 août 2018

Dirigée par **Philippe MARCUS**

Chimie Paris ParisTech

PSL RESEARCH UNIVERSITY PARIS

Remerciements

Cette thèse s'est déroulée à l'Institut de Recherche de Chimie Paris (IRCP), au sein de l'équipe de Physico-Chimie des Surfaces (PCS), en collaboration avec la société Aperam, dans le cadre du dispositif Cifre.

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Marcus pour la direction de cette thèse. Je le remercie de m'avoir donné la chance de m'épanouir sur un sujet passionnant et d'avoir partagé avec moi une partie de son expertise. Ses nombreux conseils scientifiques m'ont toujours guidée dans la construction de ce travail.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury : Régine Basséguy et Lydie Ploux pour avoir accepté d'en être les rapporteurs, Philippe Refait pour avoir été examinateur et Claire-Marie Pradier pour avoir présidé le jury. Je remercie également Benoit Emo pour avoir accepté l'invitation à être membre du jury. Merci pour la lecture de ces travaux et la discussion enrichissante que nous avons eue.

Tous mes remerciements vont à Sandrine Zanna et Audrey Allion-Maurer pour avoir encadré cette thèse avec leurs visions complémentaires. Merci pour votre implication et votre disponibilité tout au long de ces trois ans, et en particulier pour votre soutien lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement Antoine Seyeux et Dimitri Mercier pour leur aide précieuse avec les techniques d'analyse des surfaces du laboratoire. Merci pour votre pédagogie et votre bienveillance. Je remercie également toutes les personnes qui m'ont aidée à Aperam, en particulier Mélanie Lecoeur pour m'avoir guidée dans mon apprentissage de la microbiologie avec son enthousiasme communicatif. Merci aux stagiaires et aux apprentis qui ont contribué à ce travail : Jérémy, Yousra, Quentin, Thomas et Emilie.

Merci à l'ensemble de l'équipe PCS pour les discussions, le soutien et la bonne humeur. Merci également à l'ensemble du Centre de Recherche d'Aperam pour l'aide que vous m'avez apportée lors de mes séjours. En particulier, je remercie Saghi Saedlou et Jean-Denis Mithieux pour nos échanges techniques. Un grand merci à Charles David pour le duo de thèses que nous avons formé. Je remercie Pascale Bécart pour son aide dans l'organisation de mes déplacements. Merci également aux co-voitureurs béthunois et lillois.

Je remercie Jean-Michel Damasse, Ismaël Guillotte et Armand Lacointe pour m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de poursuivre mon parcours chez Aperam. Merci à l'équipe Process pour m'avoir accueillie parmi eux et épaulée dans la fin de ma thèse.

Un grand merci à tous les doctorants et post-doctorants que j'ai eu la chance de côtoyer : Emna, Shadi, Zuzana, Marion, Rémi, Svetlana, Pauline, Mohammed, Anne-Ilham, Elea, Hu, Marie, Zuocheng, Luis, Alexandre. Merci pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble au laboratoire et en-dehors. J'ai apprécié l'esprit d'entraide qui s'est transmis de génération en génération et je garderai le souvenir de trois belles années en votre compagnie.

Merci à ma famille et à mes amis pour votre soutien, votre écoute et votre patience au quotidien. Merci d'avoir toujours cru en moi dans les bons moments et les moins bons. Merci à ceux qui ont pu se déplacer pour assister à ma soutenance et m'aider à son organisation ainsi qu'à ceux qui ont pensé à moi en ce jour spécial. Enfin, merci à toi Cosmin, pour avoir toujours su trouver comment m'encourager à franchir toutes les étapes de cette thèse. Merci d'avoir été là et d'avoir accepté les compromis nécessaires à la réussite de ce projet.

Sommaire

Introduction générale **1**

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique **5**

I.1. Passivation et corrosion des aciers inoxydables 5

I.1.1. Les aciers inoxydables : généralités 5

I.1.2. Passivation et corrosion des aciers inoxydables 13

I.1.3. Analyse de surface des aciers inoxydables 25

I.1.4. Cas des aciers inoxydables duplex 33

I.1.5. Résumé 35

I.2. Biocorrosion des aciers inoxydables 36

I.2.1. Le biofilm 36

I.2.2. Biofilm et biocorrosion 47

I.2.3. Cas de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 58

I.2.4. Résumé 60

I.3. Conclusions et objectifs de la thèse 61

CHAPITRE II : Techniques expérimentales **63**

II.1. Matériaux utilisés 63

II.1.1. Acier inoxydable duplex 2304 63

II.1.2. Alliages monophasés austénitique et ferritique 64

II.2. Procédures expérimentales 65

II.2.1. Préparation des surfaces 65

II.2.2. Essais d'adhésion bactérienne 67

II.3. Techniques de caractérisation 73

II.3.1. Spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) 73

II.3.2. Spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS) 81

II.3.3. Caractérisation morphologique de la surface 85

II.3.4. Caractérisation électrochimique 89

CHAPITRE III : Comparative study of the surface oxide films on lean duplex and corresponding single phase stainless steels by XPS and ToF-SIMS 93
III.1. Abstract 93
III.2. Introduction 93
III.2.1. State of the art 93
III.2.2. Objectives 97
III.3. Materials and methods 97
III.3.1. Alloys 97
III.3.2. Surface preparation 98
III.3.3. Surface characterization 99
III.4. Results 101
III.4.1. Duplex alloy 101
III.4.2. Single phase alloys 109
III.5. Discussion 114
III.6. Conclusions 119

CHAPITRE IV : XPS and ToF-SIMS characterization of the surface oxides on lean duplex stainless steel – Global and local approaches 121
IV.1. Abstract 121
IV.2. Introduction 121
IV.2.1. State of the art 121
IV.2.2. Objectives 125
IV.3. Materials and methods 125
IV.3.1. Alloy 125
IV.3.2. Surface preparation 126
IV.3.3. Surface characterization 127
IV.4. Results 129
IV.4.1. Global approach 129
IV.4.2. Local approach 138
IV.5. Discussion 145
IV.6. Conclusions 149

CHAPITRE V : Adhesion of marine bacteria on duplex stainless steel in artificial seawater – Early stage of biofilm formation 151
V.1. Abstract 151
V.2. Introduction 151
V.2.1. State of the art 151
V.2.2. Objectives 157
V.3. Materials and methods 157
V.3.1. Metallic material 157
V.3.2. Electrolytes 158
V.3.3. Bacteria 158
V.3.4. Adhesion experiments 158
V.3.5. Coupons preparation 159
V.3.6. Surface characterization 159
V.3.7. Electrochemical characterization 162
V.4. Results and discussion 163
V.4.1. Microscopic characterization 163
V.4.2. Count of viable cultivable cells 167
V.4.3. XPS characterization 169
V.4.4. ToF-SIMS characterization 184
V.4.5. Electrochemical characterization 199
V.5. Conclusions 203

CHAPITRE VI : Adhesion of marine bacteria on duplex stainless steel in artificial seawater – Later stages of biofilm formation 205
VI.1. Abstract 205
VI.2. Introduction 205
VI.2.1. State of the art 205
VI.2.2. Objectives 207
VI.3. Materials and methods 207
VI.3.1. Metallic material 207
VI.3.2. Electrolytes 208
VI.3.3. Bacteria 208
VI.3.4. Adhesion experiments 209
VI.3.5. Coupons preparation 209

VI.3.6. Surface characterization 209
VI.3.7. Electrochemical characterization 210
VI.4. Results and discussion 211
VI.4.1. Microscopic characterization 211
VI.4.2. Count of viable cultivable cells 220
VI.4.3. XPS characterization 221
VI.4.4. Electrochemical characterization 245
VI.5. Conclusions 250

Conclusion générale et perspectives 253

Références bibliographiques 259

Annexe A : Compléments bibliographiques 301
Annexe B : Conditions utilisées pour la passivation électrochimique 306
Annexe C : Composition des milieux de culture 308
Annexe D : Détail des paramètres XPS utilisés 309
Annexe E : Influence de la vitesse de balayage 310
Annexe F : Résumé des travaux présentés dans la thèse 312
Résumé du Chapitre III 312
Résumé du Chapitre IV 314
Résumé du Chapitre V 317
Résumé du Chapitre VI 320

Introduction générale

Les aciers inoxydables sont des alliages à base de fer qui ont une teneur massique en chrome minimale de 10.5 %. Ces alliages sont appréciés notamment pour leur résistance à la corrosion, qui est liée à la formation spontanée d'une couche d'oxyde à leur surface. Cette couche d'oxyde, communément appelée film passif, a une épaisseur de quelques nanomètres et se compose majoritairement d'oxydes et/ou d'hydroxydes de Fe(III) et de Cr(III). Les aciers inoxydables sont couramment utilisés, aussi bien pour des applications de la vie de tous les jours (ménager et électroménager, automobile…) que dans l'industrie (agroalimentaire, pharmaceutique, chimique, pétrochimique, traitement de l'eau…). Cependant, selon la nature du milieu auquel l'alliage est exposé (pH, présence d'ions chlorures, température, contraintes mécaniques, aération, présence de microorganismes…), la stabilité de la couche d'oxyde peut être compromise, ce qui peut déclencher des phénomènes de corrosion (localisée ou généralisée) et porter atteinte à l'intégrité des structures. Par exemple, dans les installations pétrolières « offshore », les structures en acier inoxydable seront soumises à la présence d'eau de mer, mais aussi de bactéries, ce qui peut générer des phénomènes de biocorrosion.

La biocorrosion, ou corrosion influencée par les microorganismes, est liée à l'adhésion de microorganismes, et plus particulièrement de bactéries, à la surface des matériaux, ce qui conduit à la formation d'un biofilm. Le biofilm est décrit comme une structure hétérogène et complexe, qui comprend des agrégats de bactéries, souvent englobées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (*Extracellular Polymeric Substances* – EPS), dans laquelle des particules organiques et inorganiques peuvent être piégées. Les EPS sont des biomolécules à haut poids moléculaire (polysaccharides, protéines, lipides, ADN et substances humiques) produites par les bactéries et/ou issues de la lyse cellulaire. On distingue les « *Tightly Bound* » EPS, qui sont fermement attachés à la surface des bactéries, et les « *Loosely Bound* » EPS, qui sont relâchés en-dehors des bactéries. L'établissement de conditions physico-chimiques particulières à l'interface substrat/biofilm (en termes de concentration en oxygène dissous, de concentration en ions ou de potentiel redox) peut favoriser certaines réactions physico-chimiques et ainsi conduire à l'amorçage et/ou à

l'accélération des processus de corrosion. Ainsi, l'évolution des propriétés de la couche d'oxyde au cours de la formation du biofilm est un point clé pour comprendre les mécanismes de biocorrosion des aciers inoxydables.

L'objectif de cette thèse est de caractériser les interactions bactéries-surfaces suite à l'adhésion de bactéries marines aérobies *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 en milieu marin. Plus particulièrement, le but de ces travaux est d'étudier la stabilité de la couche d'oxyde (en termes d'épaisseur et de composition chimique) au cours de la formation du biofilm. Ce manuscrit est organisé en six chapitres. Les chapitres présentant les résultats des travaux de thèse sont rédigés en anglais, dans un format de type publication. Un résumé en français de ces chapitres est donné en **Annexe F**.

Le Chapitre I est consacré à l'étude bibliographique. Dans une première partie, les processus de passivation et de corrosion des aciers inoxydables sont présentés, plus particulièrement concernant les spécificités des aciers inoxydables duplex. Dans une seconde partie, les phénomènes de formation de biofilm et de biocorrosion des aciers inoxydables sont abordés, en particulier concernant les bactéries de type *Pseudomonas*.

Le Chapitre II présente les techniques expérimentales utilisées dans ce travail de thèse. Nous présentons tout d'abord les matériaux utilisés, puis les procédures de préparation des surfaces et d'essais d'adhésion bactérienne et enfin les différentes techniques de caractérisation utilisées (XPS, ToF-SIMS, MEB, microscopie à épifluorescence, AFM et techniques électrochimiques).

Le Chapitre III propose une première approche pour caractériser la couche d'oxyde formée à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304, grâce à un couplage XPS/ToF-SIMS à l'échelle globale (c'est-à-dire que les zones analysées comprennent plusieurs régions de phases ferrite et austénite). Dans ce chapitre, les résultats obtenus pour l'alliage duplex ainsi que pour les alliages monophasés (austénitique et ferritique), correspondant à chacune des phases de l'alliage duplex, sont comparés.

Dans le Chapitre IV, nous proposons une méthodologie innovante, basée sur un couplage XPS/ToF-SIMS, afin de caractériser localement la couche d'oxyde formée sur chaque phase de l'acier inoxydable duplex 2304. Le film d'oxyde natif (formé après polissage mécanique)

et le film passif (formé après passivation électrochimique dans H_2SO_4 0.05 M) sont comparés. Une attention particulière est portée à la distribution des éléments d'alliage (Fe, Cr, Ni, Mo et N) dans la couche d'oxyde et/ou dans le métal sous-jacent au niveau de chaque phase.

Le Chapitre V et le Chapitre VI portent sur la caractérisation de la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 suite à l'adhésion de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 en milieu marin, dans le but d'étudier les interactions bactéries-surfaces. Différents stades de la formation du biofilm sont considérés : les premiers stades (Chapitre V), correspondant à une adhésion de 1 heure, et des stades plus avancés (Chapitre VI), correspondant à une adhésion de 24 heures et de 1 semaine. Des techniques microscopiques (microscopie à épifluorescence, MEB et AFM) sont utilisées pour caractériser la morphologie du biofilm (taux de recouvrement bactérien, taille des bactéries…). Des techniques d'analyse fine des surfaces (XPS et ToF-SIMS) permettent de caractériser la nature de la couche d'oxyde, afin de mettre en évidence les modifications induites par la formation du biofilm, et la nature du biofilm. Enfin, des techniques électrochimiques (suivi du potentiel à l'abandon, courbes de polarisation anodiques et cathodiques) sont utilisées afin de caractériser le comportement électrochimique et la résistance à la corrosion de l'alliage duplex en présence de bactéries.

Afin de clore ce manuscrit, nous présentons une conclusion générale des travaux de thèse et nous en évoquons les perspectives.

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

I.1. Passivation et corrosion des aciers inoxydables

I.1.1. Les aciers inoxydables : généralités

I.1.1.1. Introduction

Les aciers inoxydables, communément appelés aciers inox, sont des alliages à base de fer qui présentent une teneur massique minimale en chrome de 10.5 % et une teneur massique maximale en carbone de 1.2 % (conformément à la norme européenne EN 10088-1) auxquels d'autres éléments d'alliage sont ajoutés (principalement le nickel, le molybdène, le titane, le niobium, le manganèse, l'azote, le cuivre, le silicium, l'aluminium et le vanadium) afin de leur conférer certaines propriétés mécaniques et de résistance à la corrosion. La combinaison de propriétés mécaniques élevées et d'une bonne résistance à la corrosion permet l'utilisation des aciers inoxydables dans de nombreux domaines, comme l'industrie automobile, l'industrie agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique, les procédés industriels (chimiques, pétrochimiques, énergie, nucléaire, traitement et distribution de l'eau, traitement des fumées et boues…), le transport de marchandises, l'équipement ménager et électroménager, le bâtiment, les systèmes de chauffage, la restauration… Ce large champ d'applications souligne l'omniprésence des aciers inoxydables dans notre vie de tous les jours.

L'adjectif « inoxydable » se réfère à l'amélioration notable de la résistance à la corrosion de ces alliages en comparaison aux aciers au carbone. En effet, l'addition de chrome permet la formation spontanée au contact de l'air ou d'un milieu aqueux d'un film adhérent, couvrant et protecteur de quelques nanomètres d'épaisseur à la surface des aciers inoxydables, composé majoritairement d'oxydes et/ou d'hydroxydes de fer et de chrome, qui forme une barrière protectrice entre la matrice métallique et l'environnement (phénomène de passivation). La présence de ce film protecteur, communément appelé film « passif », permet de maintenir les aciers inoxydables dans un domaine passif, où la vitesse de dissolution du métal sous-jacent est considérablement réduite, du fait des faibles conductivités ioniques et électroniques au

sein du film passif. Le film passif présente la faculté de se reformer suite à une rupture locale (phénomène de repassivation). Ainsi, le terme « inoxydable » est paradoxal, car c'est justement le caractère fortement oxydable de ces aciers qui permet la formation du film passif et confère la résistance à la corrosion des aciers inoxydables. Ce phénomène explique la meilleure résistance à la corrosion des aciers inoxydables par rapport aux aciers au carbone, dont les produits de corrosion précipitent et forment une couche non protectrice, friable et poreuse d'oxydes et d'hydroxydes de fer (rouille). Néanmoins, dans des milieux agressifs (pH acide, température élevée, concentration élevée en ions halogénures et particulièrement chlorures, présence de dépôts ou d'un biofilm…), la stabilité du film passif peut être compromise (dépassivation), entraînant des phénomènes de corrosion généralisée ou localisée.

Bien que les origines du fer et des aciers soient très anciennes (Age du Fer), l'histoire des aciers inoxydables est beaucoup plus récente **[Cobb, 2010]**. Le développement des aciers inoxydables prend sa source dans les travaux du chimiste français Nicolas Louis Vauquelin qui fut le premier à isoler le chrome en 1797. En 1821, le minéralogiste et géologue français Pierre Berthier fit la découverte des premiers aciers inoxydables en montrant que l'alliage fer-chrome était d'autant plus résistant à certains acides que sa teneur en chrome était plus élevée. Cependant, les teneurs en carbone élevées rendaient ces alliages trop fragiles pour envisager leur développement industriel. Dans les années 1890, le chimiste allemand Hans Goldschmidt développa un procédé permettant de produire des métaux purs, ce qui permit d'envisager de réduire les teneurs en carbone des métaux et alliages. Entre 1904 et 1911, les métallurgistes français Léon Guillet, puis Albert Portevin ainsi que l'allemand Walter Giesen publièrent une série d'études sur des alliages fer-chrome et fer-chrome-nickel qui permirent de classer les aciers inoxydables selon leur structure cristallographique et de définir trois familles : martensitique, ferritique et austénitique. La première description de la passivité est attribuée à l'allemand Philipp Monnartz qui détailla en 1911 **[Monnartz, 1911]**, entre autres, la corrélation entre teneur en chrome et résistance à la corrosion. A partir de 1912, l'industrialisation des aciers inoxydables est attribuée au métallurgiste anglais Harry Brearley pour les aciers inoxydables martensitiques, aux allemands Benno Strauss et Eduard Maurer du groupe Krupp pour les aciers inoxydables austénitiques et aux américains Frederick Becket et Christian Dantsizen pour les aciers inoxydables ferritiques. Enfin, les aciers inoxydables duplex (austéno-ferritiques) furent développés dans les années 1930 en Suède et en France.

I.1.1.2. Les différentes familles d'aciers inoxydables

a. Les formes allotropiques du fer

L'élément principal des aciers inoxydables est le fer, qui peut exister sous différentes formes allotropiques (structures cristallographiques). Le diagramme de phases du fer pur à différentes pressions, montré sur la **Figure I-1**, représente les domaines de stabilité et les transitions entre les différentes formes allotropiques du fer. A pression atmosphérique et pour des températures inférieures à 912°C, le fer pur a une structure cubique centrée (fer α). Entre 912 et 1394°C, la structure du fer pur se transforme en une structure cubique à faces centrées (fer γ). Entre 1394 et 1538°C (point de fusion du fer), la structure se retransforme en une structure cubique centrée (fer δ). Pour des pressions extrêmement élevées, la structure du fer pur se transforme en une structure hexagonale compacte (fer ε) dont l'étude peut permettre de comprendre les propriétés de la croûte terrestre **[Takahashi, 1964]**, **[Ross, 1990]**. Le fer est ferromagnétique jusque 768°C (point de Curie) puis devient paramagnétique. Pour les aciers et les aciers inoxydables, la structure cubique centrée est appelée ferrite et la structure cubique à faces centrées est appelée austénite. Cette distinction permet de définir quatre principales familles d'aciers inoxydables : ferritiques, austénitiques, martensitiques et duplex (austéno-ferritiques).

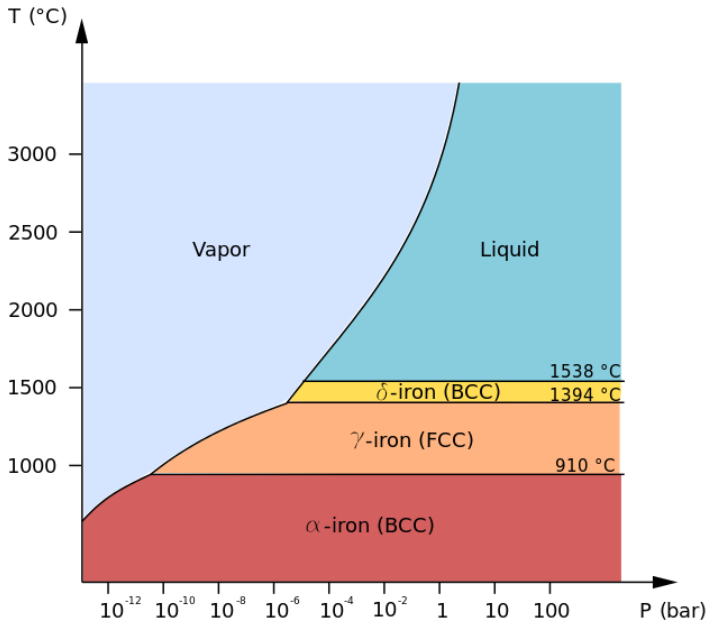


Figure I-1 Diagramme de phases du fer pur à basses pressions.

La répartition de la production mondiale de différentes nuances d'aciers inoxydables est représentée sur la **Figure I-2**. Les compositions chimiques et les propriétés mécaniques de nuances représentatives de chaque famille produites par APERAM sont présentées dans le **Tableau A-1** (**Annexe A**).

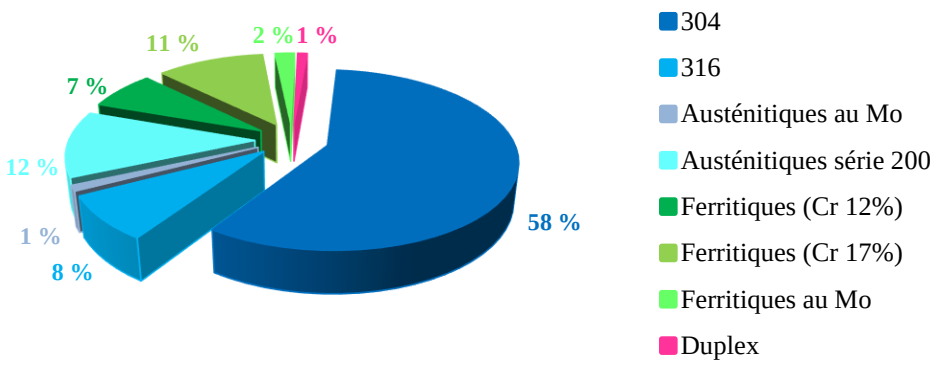


Figure I-2 Répartition de la production mondiale des différentes nuances d'aciers inoxydables en 2004 **[Charles, 2010]**.

b. Les aciers inoxydables ferritiques

Les aciers inoxydables ferritiques ont une structure cristallographique cubique centrée (α) et sont ferromagnétiques. Ils ont une teneur massique en chrome généralement comprise entre 11 et 18 %. Ils ont une limite d'élasticité généralement supérieure à celle des aciers inoxydables austénitiques mais une moindre résistance à la corrosion et sont plus fragiles à basse température. Un exemple d'acier inoxydable ferritique à basse teneur en chrome est l'AISI 409 (EN 1.4512), qui a une teneur massique en chrome d'environ 11 %. La résistance à la corrosion peut être améliorée en augmentant la teneur en chrome. Par exemple, l'AISI 445 (EN 1. 4621) a une teneur massique en chrome supérieure à 20 %, ce qui lui confère une résistance à la corrosion comparable à celle de l'AISI 304 (1.4301). Une autre possibilité pour améliorer la résistance à la corrosion des nuances ferritiques est d'ajouter du molybdène, comme dans l'AISI 444 (1.4521). Les aciers inoxydables ferritiques stabilisés sont caractérisés par l'ajout de titane et/ou de niobium, ce qui d'une part permet la formation de carbonitrures aux joints de grains à la place des carbures de chrome et réduit le risque de corrosion intergranulaire et d'autre part améliore la soudabilité. Les super ferritiques contiennent plus de 25 % de chrome et jusque 3 % de molybdène pour améliorer leur résistance à la corrosion en milieu neutre et chloruré (par exemple l'eau de mer) et jusque 4 %

de nickel pour améliorer leur ténacité. Ainsi, la famille des aciers inoxydables ferritiques est intéressante pour des applications où une résistance à la corrosion modérée est requise du fait de son moindre coût, en particulier grâce à sa faible teneur en nickel.

c. Les aciers inoxydables austénitiques

Les aciers inoxydables austénitiques ont une structure cristallographique cubique à faces centrées (γ) et sont paramagnétiques. Leur teneur massique en chrome est généralement comprise entre 16 et 18 % et leur teneur massique en nickel entre 8 et 10 %. L'ajout de nickel permet de stabiliser la structure austénitique. Cependant, le nickel peut représenter un désavantage du fait de la volatilité de son prix **[Charles, 2010]** et de son caractère allergène pour une partie de la population **[Haudrechy, 1994]**. Les aciers inoxydables austénitiques combinent une bonne résistance à la corrosion dans de nombreux milieux et de bonnes propriétés mécaniques, en particulier la ductilité. Leur haute stabilité structurale permet une utilisation à la fois à hautes températures (par exemple dans les échangeurs de chaleur) et à basses températures (par exemple pour le stockage de gaz liquéfié). Les nuances de type Fe-18Cr-8Ni, comme l'AISI 304 (1.4301) et l'AISI 304L (1.4307) représentent à elles-seules plus de 50 % de la production mondiale des aciers inoxydables (voir **Figure I-2**). Dans le cas des nuances AISI 316 (1.4401) et AISI 316L (1.4404), la teneur massique en molybdène est de 2 %, ce qui confère à ces alliages une excellente résistance à la corrosion en milieu acide et une bonne résistance à la corrosion en milieu chloruré. La teneur en carbone est plus faible dans le 304L/316L que dans le 304/316 afin de réduire le risque de corrosion intergranulaire (L se réfère à « *low carbon* »). Les super austénitiques sont des nuances fortement alliées qui présentent des teneurs massique en chrome de l'ordre de 20 %, des teneurs massiques en nickel comprises entre 18 et 25 % et des teneurs massiques en molybdène comprises entre 4 et 6 % leur conférant une excellente résistance à la corrosion dans des milieux très agressifs comme l'acide sulfurique. Afin de s'affranchir des fluctuations des coûts du nickel, les aciers austénitiques au manganèse peuvent être utilisés. Dans ces alliages, le nickel est partiellement remplacé par une combinaison de manganèse et d'azote, comme dans l'AISI 201L (1.4371).

d. Les aciers inoxydables martensitiques

La martensite (α') a une structure cristallographique métastable tétragonale centrée due à la présence d'atomes de carbone dans les sites interstitiels de la maille. La martensite résulte de

la transformation d'austénite sous l'effet d'un refroidissement rapide (trempe) au cours de laquelle les atomes de carbone ne peuvent pas diffuser (transformation displacive). La phase martensitique possède donc la même teneur en carbone que la phase austénitique dont elle provient. Les paramètres de la maille martensitique sont influencés par la teneur en carbone : plus il y a d'atomes de carbone, plus la maille est tétragonale. Les aciers inoxydables martensitiques sont ferromagnétiques et présentent une teneur massique en chrome comprise entre 12 et 18 % et une teneur massique en carbone supérieure à 0.1 %. Cette famille est caractérisée par une grande dureté, grâce à la forte teneur en carbone. Cependant, les aciers inoxydables martensitiques sont fragiles et leur résistance à la corrosion est moins bonne que celle des aciers inoxydables austénitiques du fait de leurs teneurs modérées en chrome et élevées en carbone. Les aciers inoxydables martensitiques sont utilisés pour des applications où les contraintes mécaniques sont sévères (outils coupants, instruments chirurgicaux et dentaires, vis, ressorts, roulements à billes, plaques de presse, turbines à vapeur et à gaz…).

e. Les aciers inoxydables duplex

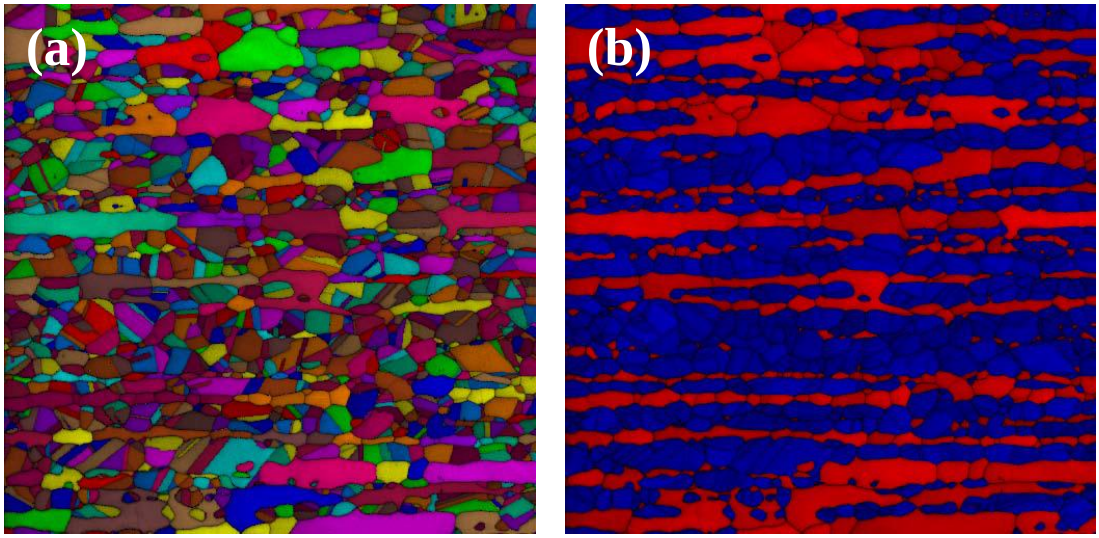


Figure I-3 Cartographies EBSD de l'acier inoxydable duplex 2205 montrant (a) l'orientation cristalline des grains et (b) l'attribution des phases (austénite en bleu et ferrite en rouge) **[Vander Voort, 2011]**.

Les aciers inoxydables duplex, ou austéno-ferritiques, ont une microstructure biphasée constituée d'austénite et de ferrite dans des proportions variant entre 40 et 60 % et en général proches de 50-50 % (**Figure I-3**). La fraction volumique de ferrite et d'austénite dépend de la composition chimique de l'alliage et des traitements thermiques réalisés **[Charles, 2010]**. Au

cours de la solidification des aciers duplex, la microstructure se compose tout d'abord exclusivement de ferrite δ puis l'austénite γ germe à partir d'environ 1350°C. Après laminage, les grains sont allongés dans le sens de laminage, ce qui peut entraîner une forte anisotropie des propriétés mécaniques (**Figure I-4**) **[Nilsson, 1992]**.

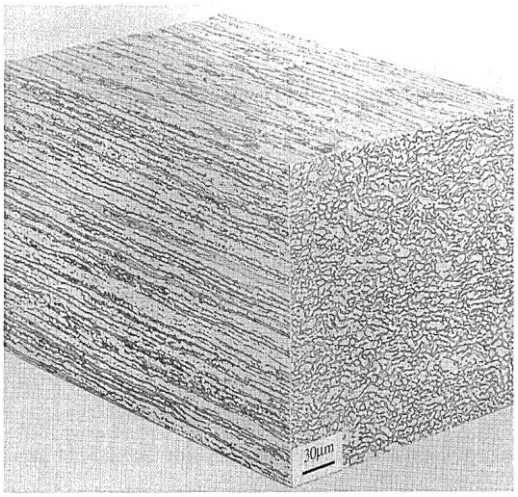


Figure I-4 Microstructure typique d'un tube sans soudure d'un SAF 2507 recuit montrant une élongation des grains dans le sens de laminage **[Nilsson, 1992]**.

Le caractère biphasé confère à cette famille des propriétés mécaniques élevées, en associant la ductilité et la ténacité de l'austénite et la résistance mécanique de la ferrite, ainsi qu'une bonne résistance à la corrosion. Cependant, du fait de l'instabilité de la ferrite, de nombreuses phases secondaires indésirables sont susceptibles de se former, comme la phase σ, les nitrures de chrome, l'austénite secondaire, la phase χ, la phase R, la phase π ou les carbures **[Nilsson, 1992]**. Une teneur massique en chrome minimale de 19-20 % est requise pour éviter la formation de martensite **[Charles, 2010]**. Par rapport aux aciers inoxydables austénitiques de la série 300, les aciers duplex nécessitent moins de nickel et de molybdène pour une résistance à la corrosion équivalente **[Charles, 2010]**. Les nuances austénitiques sont toutefois préférables pour des températures supérieures à 250°C ou inférieures à -50°C du fait du caractère fragile de la ferrite à ces températures **[Nilsson, 1992]**. Plusieurs classes d'aciers inoxydables duplex peuvent être distinguées selon leurs teneurs en éléments d'alliage. Les « *lean* » duplex, comme l'AISI 2101 (EN 1.4162), l'AISI 2202 (EN 1.4062) et l'AISI 2304 (EN 1.4362) sont caractérisés par des teneurs en nickel (entre 1 et 4 % massiques) et en molybdène (entre 0.1 et 0.4 % massiques) modérées. Leurs propriétés leur permettent de concurrencer les nuances de type AISI 304/304L et AISI 316/316L tout en diminuant l'impact

des variations des coûts du nickel et du molybdène **[Charles, 2010]**. Du fait de la diminution de la teneur en nickel, l'équilibre entre les phases est préservé en ajoutant de l'azote (jusque 0.2 % massiques) et du manganèse (jusque 5 % massiques). Les duplex « standard » comme l'AISI 2205 (EN 1.4462) présentent des teneurs en nickel (5.5 %) et en molybdène (3 %) supérieures aux « *lean* » duplex, ce qui conduit à une nette amélioration de leur résistance à la corrosion. Les « super » duplex comme l'AISI 2507 (EN 1.4410) possèdent des teneurs élevées en chrome (26 %), en nickel (7 %), en molybdène (4 %) et en azote (0.3 %) et font partie des aciers inoxydables les plus résistants à la corrosion. Ce type de nuances est une alternative économiquement intéressante aux aciers inoxydables super austénitiques, voire même dans certains cas aux alliages de nickel **[Charles, 2010]**.

I.1.1.3. Rôle des éléments d'alliage

Les éléments de petite taille comme le carbone ou l'azote occupent les sites interstitiels de la maille. En revanche, les éléments plus grands se placent en substitution. Les éléments d'alliage peuvent être qualifiés d'alphagènes (α-gènes) ou de gammagènes (γ-gènes) selon qu'ils stabilisent respectivement la ferrite ou l'austénite. Les principaux éléments alphagènes sont le chrome, le molybdène, le silicium, le titane, le niobium, le vanadium, le tungstène, l'aluminium et le tantale. Les principaux éléments gammagènes sont le carbone, le nickel, l'azote, le manganèse, le cuivre et le cobalt. Ceci explique que le nickel peut être partiellement remplacé par l'azote et/ou le manganèse dans les aciers inoxydables « *lean* » duplex et les aciers inoxydables austénitiques au manganèse tout en maintenant une microstructure austénitique **[Wang, 1999]**. Pour prévoir la structure cristallographique obtenue pour une composition chimique donnée, le « chrome équivalent » et le « nickel équivalent » sont calculés en prenant en compte l'importance relative des éléments alphagènes et gammagènes.

Dans le cas des aciers inoxydables duplex, les éléments alphagènes sont plus riches dans la phase ferritique et les éléments gammagènes dans la phase austénitique. Par conséquent, la composition des aciers inoxydables duplex n'est pas homogène et les éléments d'alliage se répartissent selon leur solubilité dans chaque phase. En particulier, la phase ferritique est plus riche en chrome et en molybdène alors que la phase austénitique est plus riche en nickel et en azote **[Potgieter, 1991]**, **[Olsson, 1995]**, **[Garfias-Mesias, 1996]**, **[Schmidt-Rider, 1999]**, **[Perren, 2001a]**, **[Femenia, 2004]**, **[Charles, 2010]**, **[Vignal, 2010]**.

I.1.2. Passivation et corrosion des aciers inoxydables

I.1.2.1. Mécanismes de passivation et de corrosion

a. Aspects thermodynamiques

A l'état naturel, la plupart des métaux, à l'exception des plus nobles comme l'or, ne sont pas stables à l'état métallique mais sont trouvés sous forme oxydée dans des minerais. Ainsi, les métaux ont naturellement tendance à s'oxyder, soit en se passivant, soit en se corrodant. Les domaines de stabilité thermodynamique de ces différentes formes peuvent être représentés sur des diagrammes potentiel-pH, ou diagrammes de Pourbaix, dont un exemple est donné sur la **Figure I-5**. Le calcul des diagrammes de Pourbaix est propre à chaque système considéré **[Marcus, 1997]**, **[Beverskog, 1999]**. Cependant, ces diagrammes sont souvent insuffisants pour la compréhension des mécanismes de passivation et de corrosion car ils ne prennent pas en compte les aspects cinétiques.

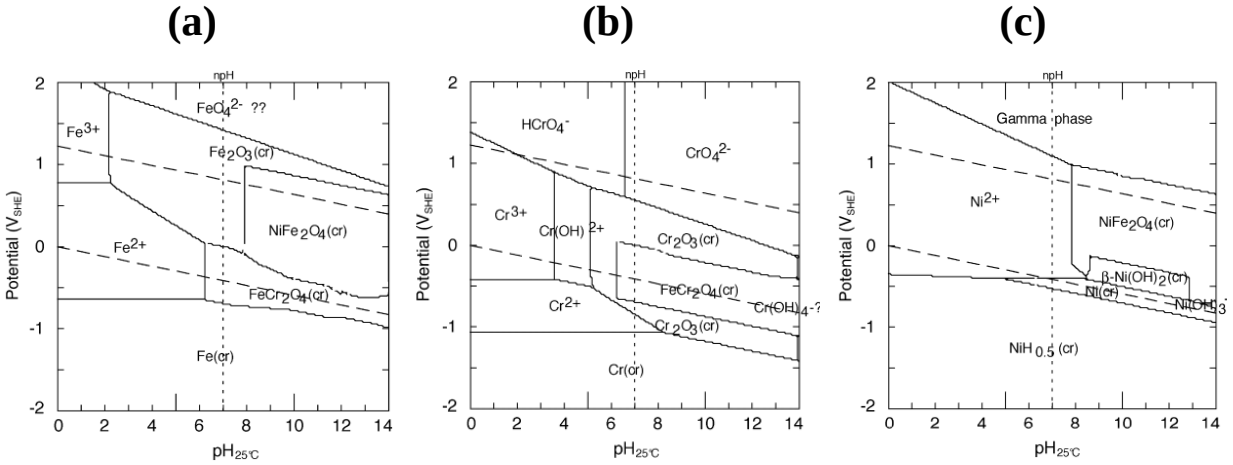


Figure I-5 Diagrammes de Pourbaix à 25°C dans le système ternaire Fe-Cr-Ni des espèces (a) fer, (b) chrome et (c) nickel **[Beverskog, 1999]**.

b. Formation du film passif

La particularité des aciers inoxydables est leur aptitude à se recouvrir spontanément d'un film passif protecteur de quelques nanomètres d'épaisseur composé majoritairement d'oxydes et/ou d'hydroxydes de fer et de chrome. Le processus qui conduit à la formation de ce film passif est appelé passivation. La présence du film passif bloque la dissolution du métal sous-

jacent, ce qui explique son caractère protecteur vis-à-vis de la corrosion. La passivation se produit en atmosphère humide ou dans des milieux aqueux, à des températures modérées. Les mécanismes d'oxydation à hautes températures (c'est-à-dire au-dessus du point de rosée de l'eau) sont différents et ne seront pas abordés ici. Le mécanisme de formation du film passif à la surface d'un acier inoxydable comprend différentes étapes représentées sur la **Figure I-6 [Okamoto, 1973]**, **[Baroux, 2014]**.

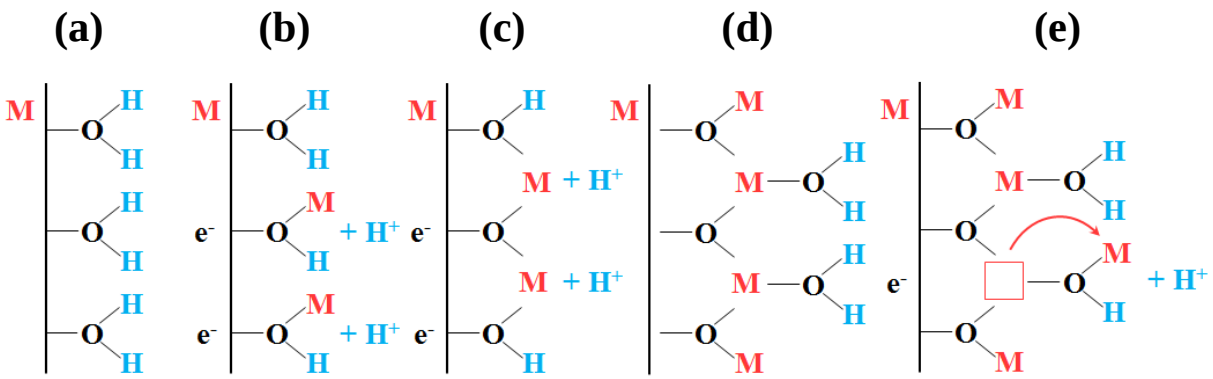


Figure I-6 Mécanisme de formation du film passif à la surface d'un acier inoxydable **[Okamoto, 1973]**, **[Baroux, 2014]**. (a) Adsorption de molécules d'eau sur la surface métallique, (b) déprotonation et migration d'un cation métallique, (c) déprotonation et pontage entre sites voisins, (d) adsorption de molécules d'eau sur la monocouche d'oxyde, (e) déprotonation et migration d'un cation métallique qui crée une lacune.

La première étape est l'adsorption de molécules d'eau à la surface, suivie d'une déprotonation et de la migration d'un cation métallique qui entraîne la formation d'hydroxydes selon une réaction du type :

$$M + H_2O \rightarrow MOH + H^+ + e^-$$ **Equation I-1**

Par la suite, la déprotonation des hydroxydes permet la formation de la première monocouche d'oxyde par un mécanisme de germination et croissance, selon une réaction du type :

$$MOH \rightarrow MO + H^+ + e^-$$ **Equation I-2**

Les molécules d'eau s'adsorbent ensuite sur la première monocouche d'oxyde et un mécanisme de « sauts de cations » permet de former une deuxième monocouche d'oxyde. Les

lacunes formées se déplacent vers le métal sous l'effet du champ électrique. La répétition du phénomène entraîne la croissance du film passif. Ainsi, le processus global de passivation peut être décrit par une réaction du type :

$$M + H_2O \rightarrow MO + 2H^+ + 2e^-$$ **Equation I-3**

Plus particulièrement, dans le cas des aciers inoxydables, l'oxydation du fer et du chrome conduisant à la formation du film passif peut être décrite par les réactions :

$$2Fe + 3H_2O \rightarrow Fe_2O_3 + 6H^+ + 6e^-$$ **Equation I-4**

$$2Cr + 3H_2O \rightarrow Cr_2O_3 + 6H^+ + 6e^-$$ **Equation I-5**

Ces réactions soulignent que la formation du film passif en milieu aqueux ou humide est une réaction d'oxydation qui implique un transfert d'électrons du réducteur (ici le métal) vers des niveaux électroniques libres de l'oxydant (par exemple l'oxygène), tandis que des protons passent en solution. La croissance de couches d'oxyde est le résultat d'un processus complexe qui combine le transport d'espèces à travers l'oxyde ainsi que des réactions à l'interface métal/oxyde et à l'interface oxyde/électrolyte. Différents modèles ont été proposés pour décrire la croissance de couches d'oxydes à la surface de métaux et d'alliages, comme le modèle Cabrera-Mott **[Cabrera, 1948]**, le modèle Fehlner-Mott **[Fehlner, 1970]**, le « *Point Defect Model* » **[Macdonald, 1992]**, **[Macdonald, 2012]**, et, plus récemment, un modèle atomistique **[Diawara, 2010]** et un modèle généralisé **[Seyeux, 2013]**, **[Leistner, 2013]**.

En cas de rupture locale du film passif, par exemple due à une rayure, le film passif a, en général, la capacité de se reformer par un processus de repassivation. Néanmoins, dans des environnements agressifs, la stabilité du film passif peut-être compromise, ce qui peut aboutir à des processus de corrosion.

c. Corrosion aqueuse

La corrosion désigne l'ensemble des interactions entre un métal et son environnement qui aboutissent à la dégradation des matériaux métalliques par une succession de réactions chimiques et/ou électrochimiques. Les enjeux de la corrosion sont considérables, à la fois d'un point de vue économique, environnemental et sanitaire **[Thompson, 2007]**. Les

mécanismes de corrosion sèche, ou corrosion à haute température, ne seront pas abordés ici. La corrosion aqueuse implique la création d'une cellule de corrosion (système redox) comprenant (1) une anode qui est le siège de l'oxydation du métal et qui conduit à la production d'électrons, (2) une cathode qui est le siège de la réduction d'un oxydant (par exemple l'oxygène) et qui conduit à la consommation des électrons produits par la réaction anodique et (3) un électrolyte qui est un conducteur ionique mais un isolant électronique dans lequel l'anode et la cathode sont immergées. La réaction anodique correspond à la dissolution du métal selon une réaction du type (ici pour un métal divalent) :

$$M \rightarrow M^{2+} + 2e^{-}$$ **Equation I-6**

Les cations métalliques peuvent ensuite se solvater ou précipiter sous la forme d'oxydes ou d'hydroxydes pour former des produits de corrosion selon des réactions du type :

$$M^{2+} + n\,H_2O \rightarrow M^{2+}(H_2O)_n$$ **Equation I-7**

$$M^{2+} + H_2O \rightarrow MO + 2H^{+}$$ **Equation I-8**

$$M^{2+} + 2H_2O \rightarrow M(OH)_2 + 2H^{+}$$ **Equation I-9**

La poursuite du processus anodique nécessite que les électrons produits soient consommés par une réaction cathodique. Tout oxydant présent en solution est susceptible de se réduire. Des exemples typiques de réactions cathodiques sont :

En milieu aéré neutre ou alcalin : $O_2 + 2H_2O + 4e^{-} \rightarrow 4OH^{-}$ **Equation I-10**

En milieu aéré acide : $O_2 + 4H^{+} + 4e^{-} \rightarrow 2H_2O$ **Equation I-11**

En milieu désaéré acide : $2H^{+} + 2e^{-} \rightarrow H_2 \uparrow$ **Equation I-12**

I.1.2.2. Les différentes formes de corrosion

On distingue la corrosion généralisée, caractérisée par une fluctuation aléatoire des sites anodiques et cathodiques sur la surface, et la corrosion localisée, caractérisée par une séparation dans l'espace des sites anodiques et cathodiques. La description de ces mécanismes de corrosion met en avant le fait que la stabilité chimique et physique du film passif est essentielle. Des précisions seront apportées dans le cas des aciers inoxydables duplex.

a. Corrosion généralisée

La corrosion généralisée se traduit par une dissolution quasi uniforme en tout point de la surface, en opposition aux autres formes de corrosion qui sont localisées. Dans ce cas, les sites anodiques et cathodiques sont très proches et répartis aléatoirement sur la surface au cours du temps. Ce phénomène se traduit à l'échelle macroscopique par une perte d'épaisseur au cours du temps qui correspond à une vitesse de corrosion. Ce type de corrosion est rencontré dans des milieux très acides où le film passif n'est pas stable (pH inférieur au pH de dépassivation).

b. Corrosion par piqûres

La corrosion par piqûres est une forme de corrosion localisée qui survient généralement dans des milieux neutres en présence d'ions halogénures (en particulier les ions chlorures) ou d'espèces soufrées. La première étape est l'amorçage des piqûres. Les inclusions comme les sulfures de manganèse sont des sites privilégiés pour l'amorçage de la piqûration. Trois types de mécanismes sont proposés : l'adsorption d'anions à la surface, l'incorporation d'anions dans le film passif, ou la rupture mécanique du film passif **[Frankel, 1998]**. Marcus *et al.* discutent les mécanismes de dépassivation locale au niveau des joints de grains séparant les nano-grains de la couche d'oxyde **[Marcus, 2008]**. Dans certains cas, le film passif peut se reformer (repassivation) et on parle de piqûres métastables. Cependant, si le milieu est suffisamment agressif, la dissolution du métal va se poursuivre, ce qui conduit à la formation de piqûres stables. Les phases secondaires, en particulier la phase sigma et dans une moindre mesure les nitrures de chrome, les inclusions et les joints de phases sont des sites privilégiés d'initiation de piqûres pour les aciers inoxydables duplex **[Garfias, 2000]**, **[Perren, 2001b]**, **[Moura, 2008]**, **[Zhang, 2009a]**, **[Zhang, 2009b]**, **[Zhang, 2012]**, **[Erazmus-Vignal, 2015]**.

c. Corrosion caverneuse

La corrosion caverneuse survient dans des zones confinées, par exemple au niveau de joints ou sous des dépôts comme le tartre. Au sein de la caverne, les échanges avec le milieu extérieur sont limités. En particulier, la teneur en oxygène dissous diminue au cours du temps, ce qui entraîne une aération différentielle entre la caverne (anode) et le milieu extérieur (cathode). Par ailleurs, la concentration en cations augmente dans la caverne, et leur hydrolyse

conduit à une acidification sévère du milieu. Si le pH devient inférieur au pH de dépassivation, un mécanisme similaire à la corrosion généralisée se déroule dans la caverne. Par ailleurs, pour respecter l'électroneutralité, des ions chlorures migrent au sein de la caverne, ce qui peut de plus générer de la corrosion par piqûres. Pour prévenir cette forme de corrosion, la conception des pièces doit être optimisée de manière à éviter les cavernes. Un rinçage régulier de l'installation est également envisageable pour permettre un renouvellement du milieu.

d. Corrosion galvanique

La corrosion galvanique intervient lorsque deux métaux de nature différente sont en contact électrique dans un électrolyte (pile électrochimique). Le métal le moins noble sera attaqué (anode) alors que le métal le plus noble sera protégé (cathode). La corrosion galvanique est aggravée si l'aire de la cathode surpasse celle de l'anode. La corrosion galvanique est parfois volontairement recherchée, par exemple pour la protection d'un métal par une anode sacrificielle. Dans le cas des aciers inoxydables duplex, il a été noté que le couplage galvanique entre les deux phases peut conduire à la dissolution préférentielle d'une phase, selon le potentiel appliqué, la composition du milieu et la composition de chaque phase **[Symniotis, 1990]**, **[Femenia, 2001]**, **[Femenia, 2003]**, **[Femenia, 2004]**, **[Tsai, 2007]**, **[Ha, 2014]**, **[Lee, 2014]**.

e. Corrosion intergranulaire

La corrosion intergranulaire des aciers inoxydables est le plus souvent liée à la précipitation de carbures de chrome de type $Cr_{23}C_6$ au niveau des joints de grains ou de phases secondaires riches en chrome et/ou en molybdène dans le cas des aciers inoxydables duplex. Ces précipités sont formés lorsque l'acier est « sensibilisé » lors d'un maintien dans une certaine gamme de température, par exemple lors du soudage **[Ravindranath, 1995]**, **[Jinglong, 2016]**. Ainsi, le chrome est mobilisé au sein des précipités, ce qui entraîne un appauvrissement local en chrome dans les zones adjacentes qui compromet la passivité et peut conduire à un déchaussement des grains. La corrosion intergranulaire peut être interprétée comme un couplage galvanique entre les précipités (cathode) et la zone appauvrie en chrome (anode). Ce type de corrosion peut également être rencontré dans des environnements très oxydants où les potentiels élevés sont propices à la dissolution des précipités. Dans ce cas, les

précipités jouent le rôle d'anode et la surface adjacente celui de cathode. Pour éviter la corrosion intergranulaire, il est possible de réduire la teneur en carbone, d'ajouter du titane ou du niobium qui forment des carbures à plus hautes températures et empêchent la formation de carbures de chrome (stabilisation) ou de réaliser un traitement thermique permettant de resolubiliser les carbures et autres phases secondaires.

f. Corrosion sous contrainte

La corrosion sous contrainte est liée à l'action conjuguée d'un environnement corrosif (température élevée, présence de chlorures ou de H_2S, milieux caustiques) et de contraintes mécaniques (appliquées ou résiduelles). Elle se caractérise par l'apparition de fissures qui se propagent perpendiculairement à la contrainte, le long des joints de grains (fissuration intergranulaire) ou à travers les grains (fissuration transgranulaire). Les aciers inoxydables austénitiques sont les plus sensibles à la corrosion sous contrainte, du fait de leur structure cubique à faces centrée qui favorise un mode de déformation planaire et peut générer des concentrations de contraintes locales.

g. Autres formes de corrosion

La corrosion-érosion est liée au mouvement d'un fluide plus ou moins corrosif qui arrache mécaniquement le film passif. La vitesse de circulation du fluide et la présence de particules sont des facteurs déterminants. La conception des pièces métalliques peut générer des turbulences et favoriser cette forme de corrosion (présence de bavures, soudures, coudes, obstacles). La corrosion-cavitation est due à l'implosion de bulles de gaz à la surface qui se forment au sein d'un fluide circulant à grande vitesse soumis à des variations de pression. Ces implosions peuvent détruire le film passif. La corrosion influencée par les microorganismes, ou biocorrosion, sera présentée en détails dans la deuxième partie de ce chapitre.

I.1.2.3. Aspects électrochimiques

D'un point de vue électrochimique, la passivation et la corrosion se traduisent par l'existence de différents domaines de potentiel sur une courbe de polarisation anodique (**Figure I-7**) **[Strehblow, 2011]**. Lorsque le potentiel est inférieur au potentiel de Nernst du couple M/M^{z+} (E_0), le métal est dans son domaine d'immunité. Le domaine actif se situe entre le potentiel de

Nernst (E_0) et le potentiel de passivation (E_p) et correspond au domaine de dissolution active du métal. La densité de courant peut atteindre plusieurs mA/cm². Ce domaine est présent en milieu acide (pH inférieur au pH de dépassivation). Le domaine passif est situé entre le potentiel de passivation (E_p) et le potentiel de transpassivation (E_{tp}) et correspond au domaine de stabilité du film passif. La densité de courant passif est très faible (moins de 1 µA/cm²) du fait de la très faible vitesse de dissolution des différentes espèces. Dans le domaine transpassif ($E > E_{tp}$), le film passif est instable et la densité de courant augmente du fait de la dissolution du chrome en Cr(VI) et du fer en Fe(III) **[Betova, 2002a]**, **[Betova, 2002b]**. L'augmentation de la densité de courant aux potentiels les plus élevés correspond à l'oxydation de l'eau. La piqûration peut se produire dans un domaine de potentiel situé entre le potentiel de piqûres (E_{pit}) et un éventuel potentiel d'inhibition (E_{inh}) lorsque des inhibiteurs de corrosion sont présents. La corrosion par piqûres se produit à une température supérieure à la Température Critique de Corrosion (*Critical Pitting Temperature* – CPT) dans des milieux en général chlorurés. Au potentiel de piqûres, la densité de courant augmente brusquement, si bien que le reste de la courbe n'est jamais atteint. Des piqûres métastables (initiation de piqûres suivie d'une repassivation) sont en général observées avant la piqûration **[Garfias-Mesias, 1999]**.

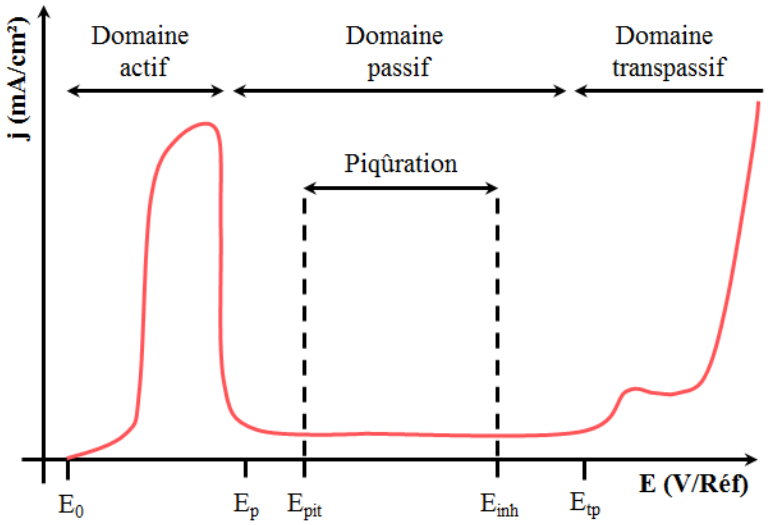


Figure I-7 Courbe de polarisation anodique typique d'un acier inoxydable dans un électrolyte acide. D'après Strehblow *et al.* **[Strehblow, 2011]**.

Ainsi, les aciers inoxydables qui ont une bonne résistance à la corrosion sont caractérisés électrochimiquement par de faibles densités de courant dans le domaine actif et dans le domaine passif, un domaine passif large (potentiel de passivation bas et potentiel de transpassivation élevé) et l'absence de piqûration.

I.1.2.4. Eléments d'alliage

a. Promoteurs de passivation et modérateurs de dissolution

Marcus **[Marcus, 1994]**, **[Marcus, 1997]** distingue deux catégories d'éléments d'alliage qui favorisent le processus de passivation et donc la résistance à la corrosion (**Figure I-8**). D'une part, les promoteurs de passivation sont caractérisés par une chaleur (enthalpie) d'adsorption de l'oxygène élevée combinée à une force de liaison métal-métal relativement faible, ce qui permet de casser facilement les liaisons métalliques au profit de la nucléation et la croissance du film passif. La contrepartie de la faible force de liaison métal-métal est une vitesse de dissolution élevée à l'état actif. Des exemples d'éléments promoteurs de passivation sont le chrome, l'aluminium et le titane. D'autre part, les modérateurs ou bloqueurs de dissolution sont caractérisés par une force de liaison métal-métal relativement élevée. Du fait de leur chaleur d'adsorption de l'oxygène élevée, ces éléments peuvent également participer à la passivation et être incorporés dans le film passif. Des exemples d'éléments modérateurs ou bloqueurs de dissolution sont le molybdène, le niobium, le tantale et le tungstène.

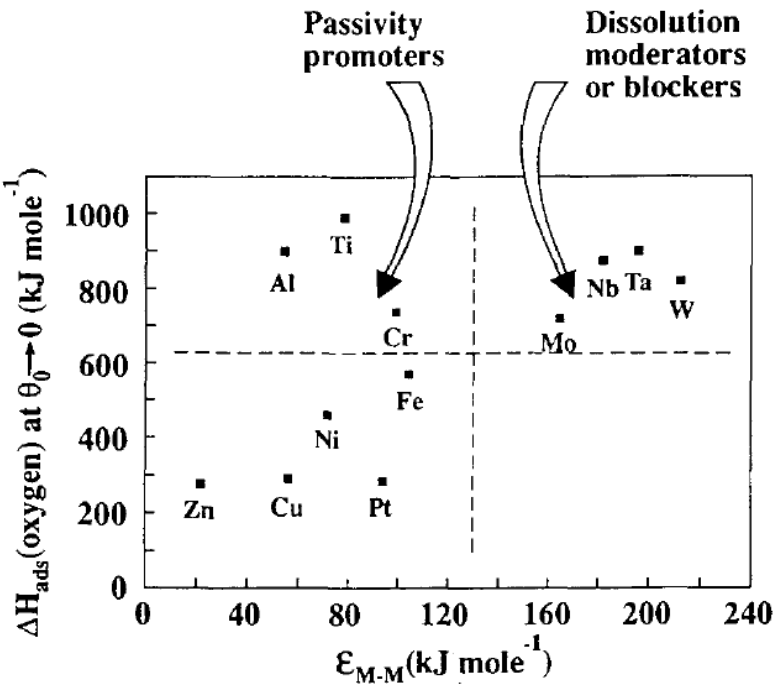


Figure I-8 Promoteurs de passivation et modérateurs de dissolution selon la synergie entre la chaleur d'adsorption de l'oxygène et la force de la liaison métal-métal **[Marcus, 1994]**, **[Marcus, 1997]**.

b. Rôle du chrome

Le chrome est le principal élément responsable de la résistance à la corrosion généralisée et localisée des aciers inoxydables **[Yang, 1994]**, **[Yang, 1994b]**. Il est présent dans le film passif sous la forme d'oxyde et/ou d'hydroxyde de Cr(III) dans des teneurs qui surpassent celles du bulk de l'alliage : on parle d'enrichissement. Plus la teneur en chrome de l'alliage est élevée, plus la densité de courant passif est faible et/ou le domaine passif s'élargit (diminution du potentiel de passivation et/ou augmentation du potentiel de piqûres) **[Hashimoto, 1979b]**, **[Kirchheim, 1989]**, **[Vignal, 2014]**.

c. Rôle du molybdène

Le molybdène a un effet très positif sur la résistance à la corrosion des aciers inoxydables, en particulier la corrosion par piqûres et la corrosion caverneuse. Les mécanismes associés ont été discutés dans de nombreuses études et peuvent être classés en deux catégories : l'atténuation de la rupture du film passif **[Sugimoto, 1977]**, **[Olefjord, 1980]**, **[Olefjord, 1982]**, **[Clayton, 1986]**, **[Castle, 1989]**, **[Macdonald, 1992]**, **[Tan, 1995]**, **[Jargelius-Pettersson, 1998b]**, **[Wegrelius, 1999]**, **[Ilevbare, 2001]**, **[Pardo, 2008a]**, **[Pardo, 2008b]** ou la favorisation de la repassivation **[Hashimoto, 1979a]**, **[Olefjord, 1980]**, **[Olefjord, 1982]**, **[Goetz, 1984]**, **[Yang, 1984]**, **[Jargelius-Pettersson, 1998b]**, **[Ilevbare, 2001]**, **[Pardo, 2008a]**, **[Pardo, 2008b]**. Sur la base du modèle bipolaire du film passif, des interactions entre l'azote et le molybdène ont également été discutées **[Clayton, 1986]**, **[Clayton, 1989]**, **[Lu, 1989]**, **[Lu, 1993]**, **[Olsson, 1995]**, **[Jargelius-Pettersson, 1999]**, **[Clayton, 2011]**. Elbiache et Marcus **[Elbiache, 1992]** ont montré que le molybdène favorise la désorption du soufre à l'état actif, ce qui neutralise l'effet négatif du soufre.

Le molybdène est incorporé dans le film passif où il représente quelques pourcentages atomiques de la composition chimique. Il est principalement présent sous la forme d'oxyde et/ou d'hydroxyde de Mo(IV) et Mo(VI) et sa distribution en profondeur peut être complexe (voir paragraphe **I.1.3.2.a**). D'un point de vue électrochimique, l'effet bénéfique de l'addition de molybdène sur la résistance à la corrosion se traduit par une baisse de la densité de courant dans le domaine actif et/ou le domaine passif **[Hashimoto, 1979a]**, **[Hashimoto, 1979b]**, **[Olefjord, 1980]**, **[Olefjord, 1982]**, **[Goetz, 1984]**, **[Marcus, 1988]**, **[Castle, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Maximovich, 1995]**, **[Jargelius-Pettersson, 1998]**, **[Hashimoto, 2007]**,

[Pardo, 2008] et dans certains cas par une baisse du potentiel de passivation **[Clayton, 1986]** ainsi qu'une hausse du potentiel de piqûres **[Olefjord, 1982]**, **[Clayton, 1986]**, **[Maximovich, 1995]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Merello, 2003]**, **[Mesquita, 2011]**, **[Mesquita, 2012]**, **[Mesquita, 2013]**.

d. Rôle de l'azote

L'azote est reconnu pour avoir un effet particulièrement bénéfique pour la résistance à la corrosion localisée des aciers inoxydables en favorisant la repassivation. Il a été proposé qu'un enrichissement en azote à l'interface métal/oxyde (éventuellement par ségrégation anodique) favorise la formation de nitrures qui diminuent la vitesse de dissolution **[Newman, 1987]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[Halada, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Jargelius-Pettersson, 1999]** ou une désorption des chlorures après l'initiation des piqûres qui aide la repassivation **[Grabke, 1996]**, **[Lothongkum, 2006]**. Un autre mécanisme proposé est une limitation de la baisse du pH à l'intérieur des piqûres par la transformation de NH_3 en NH_4^+ qui favorise la repassivation **[Grabke, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Jargelius-Pettersson, 1999]**, **[Baba, 2002]**. Enfin, d'autres auteurs décrivent un mécanisme de synergie entre l'azote et le molybdène **[Clayton, 1986]**, **[Clayton, 1989]**, **[Lu, 1989]**, **[Lu, 1993]**, **[Olsson, 1995]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Jargelius-Pettersson, 1999]**, **[Clayton, 2011]**.

Certains auteurs ont montré que la présence d'azote entraîne une baisse de la densité de courant dans le domaine actif et/ou dans le domaine passif **[Newman, 1987]**, **[Halada, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Jargelius-Pettersson, 1999]** et parfois une augmentation du potentiel de piqûres **[Newman, 1987]**, **[Jargelius-Pettersson, 1999]**, **[Lothongkum, 2006]** alors que d'autres auteurs n'ont pas constaté d'effet de l'azote sur le comportement électrochimique **[Vanini, 1994]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Baba, 2002]** voire au contraire une augmentation de la densité de courant dans le domaine actif et dans le domaine passif **[Marcus, 1992a]**.

e. Rôle des autres éléments d'alliage

Même s'il n'est pas présent dans le film passif, certains auteurs ont conclu que l'addition de nickel favorise la résistance à la corrosion, en particulier par piqûres **[Potgieter, 2008]**, **[Oh, 2015]**. L'addition de silicium limite la corrosion intergranulaire dans des milieux très oxydants comme l'acide nitrique **[Robin, 2008]**. L'addition de tungstène est reconnue

bénéfique pour la résistance à la corrosion par piqûres et caverneuse **[Haugan, 2017]**. Le carbone favorise la corrosion intergranulaire du fait de la formation de carbures de chrome aux joints de grains qui entraîne un appauvrissement local en chrome. L'ajout de titane et de niobium (stabilisation) permet de limiter la formation de carbures de chrome **[Dowling, 1999]**. Le manganèse a un effet négatif sur la résistance à la corrosion localisée du fait de la formation de sulfures de manganèse (MnS) qui sont des sites d'initiation de piqûres dans des solutions contenant des ions chlorure **[Eklund, 1974]**, **[Baker, 1993]**, **[Rossi, 2000]**, **[Ryan, 2002]**. De basses teneurs en soufre sont utilisées pour éviter ce phénomène.

f. Pitting Resistance Equivalent Number (PREN)

Pour décrire l'effet des éléments d'alliage sur la résistance à la corrosion par piqûres des aciers inoxydables, un paramètre comparatif (*Pitting Resistance Equivalent Number* – PREN) est proposé selon l'**Equation I-13** ci-dessous **[Lorenz, 1969]**, **[Garfias-Mesias, 1996]**, **[Jargelius-Pettersson, 1998a]**, **[Merello, 2003]**, **[Charles, 2010]**, **[Peguet, 2011]**, **[Ha, 2014]**, **[Mameng, 2017]** :

$$PREN = \%\,Cr + a \times (\%\,Mo) + b \times (\%\,N)$$ **Equation I-13**

De manière simplifiée, plus ce paramètre est élevé, plus la résistance à la corrosion est susceptible d'être élevée. Ainsi, Merello *et al.* **[Merello, 2003]** ont montré une relation exponentielle entre le PREN et le potentiel de piqûres pour des aciers inoxydables duplex en solution NaCl. Le PREN illustre l'effet bénéfique de l'addition de chrome, de molybdène et d'azote. En général, le facteur du molybdène est 3.3 et celui de l'azote 16. Cependant, selon le milieu et l'alliage considérés, d'autres facteurs peuvent être proposés afin de mieux représenter l'effet de chaque élément **[Jargelius-Pettersson, 1998a]**, **[Ha, 2014]**. Pour prendre en compte l'effet négatif du manganèse sur la résistance à la corrosion localisée, certains auteurs **[Jargelius-Pettersson, 1998a]**, **[Ha, 2014]** incluent le manganèse dans l'expression du PREN avec un facteur négatif. D'autres auteurs **[Haugan, 2017]** suggèrent de prendre en compte un effet bénéfique du tungstène. Cependant, le PREN ne prend pas compte la présence d'hétérogénéités ou de précipités ou encore de la synergie entre les éléments d'alliage **[Perren, 2001a]**, **[Peguet, 2011]**.

Plusieurs auteurs soulignent que dans le cas des aciers inoxydables duplex, le PREN global de la composition du bulk n'est probablement pas un bon indicateur, mais qu'une meilleure compréhension peut être atteinte en calculant le PREN de chaque phase **[Garfias-Mesias, 1996]**, **[Perren, 2001a]**, **[Peguet, 2011]**. Il a été souligné que la piqûration est déterminée par la phase la plus faible c'est-à-dire celle dont le PREN est le plus faible **[Garfias-Mesias, 1996]**, **[Perren, 2001a]**, **[Zhang, 2012]**. Par exemple, Zhang *et al.* **[Zhang, 2012]** ont montré que la résistance à la corrosion par piqûres est optimale lorsque le PREN des deux phases est égal **(Figure I-9-a)**. Lorsque le PREN de l'austénite est inférieur à celui de la ferrite, l'initiation des piqûres a lieu principalement dans l'austénite ; inversement, lorsque le PREN de la ferrite est inférieur à celui de l'austénite, l'initiation des piqûres a lieu principalement dans la ferrite ; lorsque le PREN des deux phases est égal, l'initiation des piqûres a lieu au niveau des joints de phases **(Figure I-9-b)**.

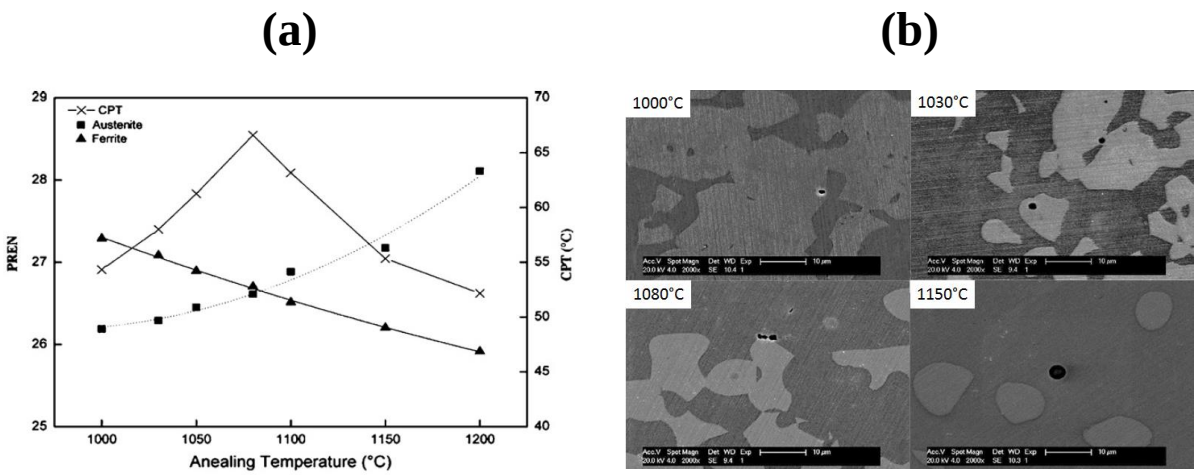


Figure I-9 (a) Evolution du PREN et de la Température Critique de Piqûration (CPT) en fonction de la température de recuit et (b) piqûres métastables formées après les tests de CPT pour différentes températures de recuit pour l'acier inoxydable duplex UNS S32304 (2304) **[Zhang, 2012]**.

I.1.3. Analyse de surface des aciers inoxydables

Une connaissance approfondie des propriétés du film passif, notamment de ses propriétés chimiques et structurales, est nécessaire afin d'optimiser la résistance à la corrosion des aciers inoxydables. La phase métallique sous le film passif, ou métal sous-jacent, joue un rôle déterminant dans le processus de passivation car sa composition détermine les vitesses de dissolution à l'interface métal/oxyde.

I.1.3.1. Aspects expérimentaux

a. Techniques d'analyse des surfaces

L'XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*), aussi appelée ESCA (*Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*) est une technique particulièrement adaptée à l'étude du film passif car l'épaisseur sondée est de l'ordre de quelques nanomètres. Des informations qualitatives et quantitatives sont obtenues aussi bien sur la composition chimique (états chimiques et proportions de chaque élément) que sur l'épaisseur du film passif. L'AES (*Auger Electron Spectroscopy*) est une technique également très utilisée pour caractériser le film passif. Cette technique possède une meilleure résolution latérale que l'XPS mais moins d'informations peuvent être obtenues sur les états chimiques des éléments. Des informations sur la distribution en profondeur des éléments au sein du film passif peuvent être obtenues par XPS et AES. Par XPS, une modification de l'angle d'analyse permet de sonder différentes profondeurs de l'échantillon. Cette technique, appelée ARXPS (*Angle-Resolved* XPS), est non destructive. Cette procédure nécessite une couche d'épaisseur uniforme couvrant une surface non-rugueuse **[Olefjord, 1996]**. Par XPS et AES, un décapage ionique peut être réalisé pour obtenir des profils en profondeur. Cette méthodologie est destructive et limitée par plusieurs facteurs (rugosité de la surface, décapage préférentiel d'un élément, qualité du vide, analyse des bords du cratère, implantation d'ions du canon de décapage, réaction ou déplacement d'atomes de la surface…).

Ces techniques d'analyse de surface sont généralement couplées à une caractérisation électrochimique afin de comprendre l'influence des propriétés chimiques du film passif sur la résistance à la corrosion des aciers inoxydables. Dans ce sens, une étude collaborative a été menée indépendamment entre différents laboratoires dans le but de standardiser les méthodes de préparation et d'analyse des films passifs par électrochimie, AES et XPS **[Marcus, 1988]**.

D'autres techniques peuvent être utilisées, comme le SIMS (*Secondary Ion Mass Spectrometry*), en particulier le ToF-SIMS (*Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*) **[Bardwell, 1991]**, **[Mischler, 1995]**, **[Rossi, 2000]**, **[Fajardo, 2010]**, **[Vignal, 2011]**, **[Fajardo, 2010]**, **[Maurice, 2015]**, **[Tardio, 2015]**, l'ISS (*Ion Scattering Spectroscopy*) **[Calinsky, 1989]**, la GDOES (*Glow Discharge Optical Emission Spectroscopy*), la QCM (*Quartz Crystal Microbalance*) éventuellement couplée à des mesures électrochimiques

[Olsson, 2000], **[Hamm, 2002a]**, **[Hamm, 2002b]** ou l'ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Source Mass Spectrometry*) pour le dosage des éléments dissous dans la solution de passivation **[Castle, 1989]**, **[Castle, 1990]**. La structure du film passif à l'échelle nanométrique peut être étudiée par STM (*Scanning Tunnelling Microscopy*) **[Maurice, 1996]**, **[Marcus, 1998]**, **[Maurice, 1998]**, **[Maurice, 2012]**, **[Massoud, 2013]**, **[Maurice, 2015]**. Enfin, les propriétés électroniques du film passif (non décrites ici) peuvent être étudiées par spectroscopie de photo-courant **[Hakiki, 1998]**, **[Montemor, 2000]**, **[Sudesh, 2006]**.

b. Préparation de la surface

Pour un même alliage, le film passif peut avoir des propriétés très différentes selon la méthodologie de préparation de surface, en particulier le polissage, la polarisation électrochimique, l'électropolissage ou le décapage chimique **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Vignal, 2014]**, **[Maurice, 2015]**. Dans la littérature, deux familles de films passifs sont distinguées. D'une part, le « film d'oxyde natif » correspond au film formé spontanément après un polissage mécanique suivi d'un certain temps d'exposition à l'air. D'autre part, le « film passif » à proprement parler correspond au film formé dans un électrolyte par passivation électrochimique, c'est-à-dire en appliquant un potentiel correspondant au domaine passif de l'alliage. De manière plus générale, le « film anodique » correspond au film formé par passivation électrochimique en appliquant un potentiel. Les paramètres utilisés pour la polarisation électrochimique (pH de l'électrolyte, potentiel appliqué, temps de polarisation, température, présence d'anions dans l'électrolyte) déterminent les propriétés du film, comme détaillé par Olsson et Landolt **[Olsson, 2003]**.

I.1.3.2. Caractérisation chimique de la surface

a. Epaisseur et composition chimique du film passif

Le film passif formé à la surface des aciers inoxydables est décrit comme une couche de quelques nanomètres d'épaisseur, généralement comprise entre 1 et 3 nm, composée majoritairement d'oxydes et/ou d'hydroxydes de fer et de chrome. Des exemples de la littérature de calculs d'épaisseur et de composition chimique pour différents alliages sont résumés dans le **Tableau A-2** (**Annexe A**). Le fer est présent sous la forme d'oxydes et/ou d'hydroxydes de Fe(II) et/ou de Fe(III). Le chrome est présent sous la forme d'oxyde et/ou

d'hydroxyde de Cr(III). La teneur en chrome dans le film passif augmente avec la teneur du chrome dans le bulk (**Figure I-10-a**) **[Frankental, 1976]**, **[Asami, 1978]**, **[Kirchheim, 1989]**, **[Hamm, 2002a]**. Le chrome est enrichi dans le film passif par rapport au bulk et sa teneur peut atteindre 80 % atomiques (**Figure I-10-b**). Cet enrichissement est le résultat de l'oxydation préférentielle du chrome par rapport aux autres éléments métalliques présents dans l'alliage, notamment le fer et le nickel **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**. Une mobilité plus élevée du chrome au sein du film passif est également proposée **[Kirchheim, 1989]**.

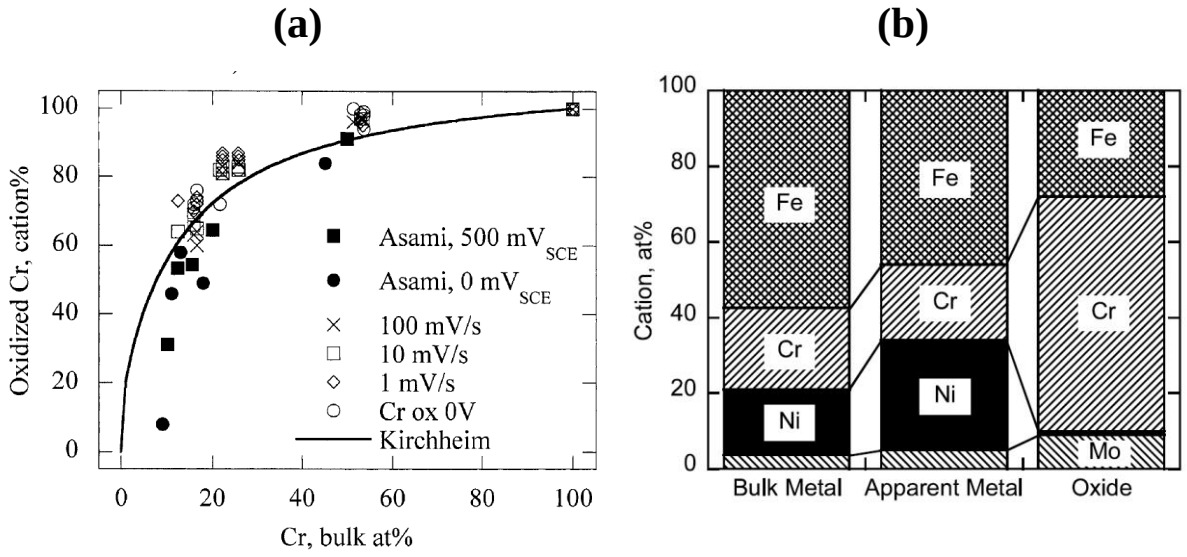


Figure I-10 (a) Teneur en chrome dans le film passif en fonction de la teneur en chrome dans le bulk **[Hamm, 2002a]** et (b) composition chimique du film passif formé sur un acier inoxydable allié au nickel et au molybdène **[Olefjord, 1982]**, **[Olsson, 2003]**.

Dans le cas des films formés par polarisation électrochimique en milieu acide, l'enrichissement en chrome est accentué par la dissolution préférentielle du fer (métallique et/ou oxydé) **[Leygraf, 1979]**, **[Calinsky, 1989]**, **[Kirchheim, 1990]**, **[Heine, 1990]**, **[Haupt, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Hamm, 2002a]**, **[Hamm, 2002b]**, **[Hermas, 2005]**, **[Maurice, 2015]**. Tardio *et al.* **[Tardio, 2015]** suggèrent une dissolution préférentielle des oxydes de fer lors de l'immersion dans de l'eau ultra pure. Selon certains auteurs **[Olefjord, 1982]**, **[Maurice, 2015]**, l'enrichissement en chrome dans le film passif entraîne un appauvrissement en chrome dans le métal sous-jacent. D'autres auteurs **[Leygraf, 1979]**, **[Halada, 1996]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]** notent au contraire un enrichissement en chrome dans le métal sous le film passif tandis que d'autres auteurs n'observent pas de différences significatives entre la teneur en chrome dans le métal sous-jacent et dans le bulk.

Les films formés en milieu basique sont plus épais et plus riches en fer dans la partie externe que ceux formés en milieux acides du fait de la stabilité accrue des espèces fer **[Calinsky, 1989]**, **[Hoppe, 1994]**, **[Schmutz, 1999]**, **[Olsson, 2003]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**. Dans le domaine passif, il est admis que l'épaisseur du film passif augmente (selon certains auteurs, linéairement) avec le potentiel appliqué, que ce soit en milieu acide **[Olefjord, 1980]**, **[Mischler, 1991]**, **[Haupt, 1995]**, **[Olsson, 1995]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Maurice, 1996]**, **[Wegrelius, 1999]**, **[Olsson, 2000]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Högström, 2013]** ou en milieu basique **[Hoppe, 1994]**. Dans le domaine transpassif, l'épaisseur du film passif décroit du fait de la dissolution des oxydes de Cr(III) en espèces Cr(VI) **[Haupt, 1995]**, **[Olsson, 2000]**.

La composition chimique du film passif est fortement affectée par le potentiel appliqué lors de la polarisation **[Olefjord, 1985]**, **[Calinksy, 1989]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Hoppe, 1994]**, **[Haupt, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Wegrelius, 1999]**, **[Olsson, 2002]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Keller, 2004]**, **[Högström, 2013]**. Olsson et Landolt **[Olsson, 2003]** soulignent que de manière générale, pour les alliages Fe-Cr, l'enrichissement en chrome du film passif se produit dans le domaine passif bas, alors que dans le domaine transpassif, la teneur en chrome diminue car la stabilité du fer dépasse celle du chrome qui s'oxyde en Cr(VI).

Plusieurs études **[Leygraf, 1979]**, **[Kirchheim, 1989]**, **[Castle, 1990]**, **[Yang, 1994a]**, **[Yang, 1994b]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Wegrelius, 1999]** concluent que l'augmentation du temps de passivation (vieillissement) entraîne une augmentation de la teneur en chrome du film passif. L'épaisseur totale du film passif ne varie pas au cours du vieillissement, mais l'épaisseur de la couche interne d'oxyde augmente et l'épaisseur de la couche externe d'hydroxyde diminue **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**.

La littérature s'accorde sur l'absence (ou la présence de traces) de nickel oxydé et/ou hydroxydé, ce qui peut être expliqué par l'oxydation préférentielle/sélective des autres éléments d'alliage alors que le nickel, plus noble, n'est pas oxydé **[Hashimoto, 2007]**. Par conséquent, le nickel métallique présente un enrichissement significatif à l'interface métal/oxyde par rapport au bulk (**Figure I-10-b**) **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Maurice, 1998]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Addari, 2008]**, **[Hamada, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Fredriksson, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**. Certains

auteurs **[Maurice, 1998]** concluent que cet enrichissement est plus prononcé pour les films formés par passivation électrochimique que pour les films formés à l'air, du fait de la dissolution préférentielle du fer lors de la passivation électrochimique. Dans d'autres études **[Olsson, 2011]**, **[Maurice, 2015]**, un enrichissement en nickel similaire a été observé sous le film d'oxyde natif et sous le film formé par passivation électrochimique.

Le molybdène est incorporé dans le film passif jusqu'à quelques pourcents atomiques. La littérature évoque principalement la présence d'oxydes et/ou d'hydroxydes de Mo(IV) et/ou de Mo(VI) **[Sugimoto, 1977]**, **[Olefjord, 1985]**, **[Clayton, 1986]**, **[Olefjord, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Macdonald, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Hakiki, 1998], [Wegrelius, 1999]**, **[Olsson, 2002]**, **[Pardo, 2008a]**, **[Pardo, 2008b]**, **[Högström, 2013]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Maurice, 2015]**, **[Tardio, 2015]**. La présence de Mo(V) a été discutée **[Kim, 1998]**. Un enrichissement en molybdène dans le film passif par rapport à la teneur du bulk est souvent constaté, plus prononcé pour les films formés par passivation électrochimique que pour les films d'oxyde natifs **[Maurice, 2015]**. Plusieurs études **[Olefjord, 1985]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Olsson, 2002]** montrent que dans le domaine passif bas, les espèces Mo(IV) sont prédominantes, alors que dans le domaine passif haut, les espèces Mo(VI) sont prédominantes. Mesquita *et al.* **[Mesquita, 2013]** concluent que la teneur en molybdène dans le film passif augmente lorsque le pH de l'électrolyte augmente. Plusieurs études **[Olefjord, 1980]**, **[Castle, 1989]**, **[Castle, 1990]**, **[Tan, 1995]**, **[Vignal, 2010]** montrent que la présence du molybdène promeut l'enrichissement en chrome dans le film passif tandis que d'autres **[Hashimoto, 1979a]**, **[Hashimoto, 1979b]**, **[Marcus, 1988]**, **[Hashimoto, 2007]** ne constatent aucun effet. Certains auteurs concluent que le molybdène métallique est enrichi sous le film passif **[Olefjord, 1982]**, **[Olefjord, 1985]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Halada, 1996]** alors que d'autres **[Maurice, 2015]** trouvent des concentrations proches de celles du bulk.

Pour les aciers inoxydables qui contiennent de l'azote, un enrichissement en azote (sous la forme de nitrures) est observé à l'interface métal/oxyde ou dans le film passif **[Willenbruch, 1990]**, **[Marcus, 1992a]**, **[Olsson, 1995]**, **[Vanini, 1994]**, **[Halada, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Femenia, 2004]**. Un mécanisme de ségrégation anodique est proposé, au cours de la passivation électrochimique ou de la dissolution qui la précède **[Marcus, 1992a]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olefjord, 1996]**. L'enrichissement en azote est également observé sous le film d'oxyde natif **[Femenia, 2004]**.

b. Stratification du film passif

Le modèle « historique » utilisé pour décrire la stratification du film passif est qualifié de « duplex » ou « bicouche » et consiste en une couche interne d'oxyde et une couche externe d'hydroxyde **[Yang, 1994a]**, **[Yang, 1994b]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Keller, 2004]**. Des techniques comme le ToF-SIMS remettent en question une stricte stratification des oxydes et des hydroxydes **[Maurice, 2015]**.

Schmidt-Rieder *et al.* **[Schmidt-Rieder, 2003]** suggèrent que le film passif formé par polarisation en milieu basique consiste en une couche interne riche en chrome et une couche externe riche en fer, alors que le film formé en milieu acide ne comprend que la couche interne riche en chrome du fait de la dissolution du fer. Högström *et al.* **[Högström, 2013]** décrivent le film passif formé dans de l'eau distillée ou en milieu acide par un modèle à trois couches : une fine couche externe composée de fer et de chrome et enrichie en fer, une couche intermédiaire épaisse composée de fer et de chrome et enrichie en chrome ainsi qu'une fine couche interne composée de fer et de molybdène et enrichie en molybdène. Le film d'oxyde natif formé à l'air peut être représenté par une couche mixte d'oxydes de Fe(III) et de Cr(III) **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**.

Maurice *et al.* **[Maurice, 2015]** proposent un modèle constitué d'une couche externe de Fe(III) et d'une couche interne de Cr(III) aussi bien pour le film d'oxyde natif que le film formé par passivation électrochimique (**Figure I-11**). Dans ce modèle, les espèces Mo(IV) et Mo(VI) sont distribuées de manière homogène, dans la couche interne pour le film d'oxyde natif et dans la couche externe pour le film obtenu par passivation électrochimique.

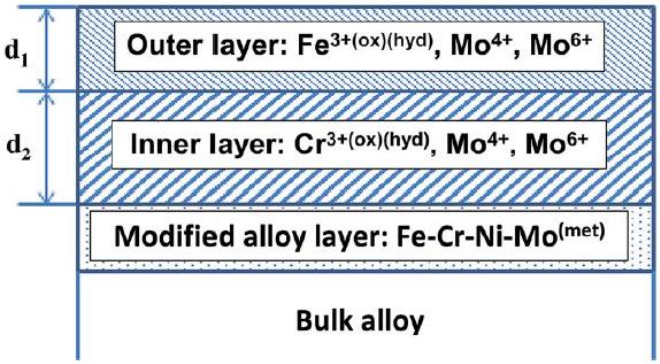


Figure I-11 Modèle utilisé pour décrire le film d'oxyde natif et le film formé par passivation électrochimique à la surface d'un monocristal Fe-17Cr-14.5Ni-2.3Mo (100) **[Maurice, 2015]**.

La distribution du molybdène au sein du film passif est susceptible d'être plus complexe. Par exemple, Olsson et Hörnström **[Olsson, 1994]** suggèrent que le Mo(VI) est concentré dans la région externe du film passif alors que les oxydes et oxy-hydroxydes de Mo(IV) sont distribués de façon plus homogène.

I.1.3.3. Caractérisation structurale de la surface

Plusieurs études **[McBee, 1972]**, **[Ryan, 1994]** concluent que le caractère amorphe du film passif est plus prononcé lorsque la teneur en chrome de l'alliage augmente. Maurice *et al.* **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]** soulignent que le vieillissement du film passif sous polarisation entraîne la coalescence de nuclei d'oxyde et la cristallisation de la couche d'oxyde Cr_2O_3 interne en épitaxie avec le substrat. Les auteurs notent que la cinétique de cristallisation est plus rapide pour les monocristaux Fe-18Cr-13Ni (100) (austénitique) que pour les monocristaux Fe-22Cr (110) (ferritique). Cette différence est attribuée à la présence d'un enrichissement en nickel dans le métal sous-jacent dans le cas des monocristaux Fe-18Cr-13 Ni (100) qui limite l'accès en Cr et ralentit la formation de Cr_2O_3 dans la partie interne du film passif, ce qui favorise une cristallisation plus complète. Maurice *et al.* **[Maurice, 2015]**, ont montré que le film passif formé sur des monocristaux de Fe-17Cr-14.5Ni-2.3Mo (100) ne présente aucune structure cristalline, du moins en surface, contrairement aux monocristaux Fe-18Cr-13Ni (100) étudiés dans les mêmes conditions **[Maurice, 1998]**. Les auteurs proposent la formation d'une couche externe de molybdate qui empêcherait l'observation par STM de la couche interne d'oxyde de chrome éventuellement cristallisée. Femenia *et al.* **[Femenia, 2001]**, **[Femenia, 2002]** ont caractérisé la dissolution des aciers inoxydables duplex aux joints de grains et de phases par STM.

Certains auteurs **[Revesz, 1978]**, **[Kruger, 1988]**, **[Maurice, 1994]** suggèrent que le caractère amorphe du film passif lui confère une flexibilité structurale permettant de mieux résister à la corrosion par piqûres. Maurice *et al.* **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]** concluent au contraire que la cristallisation du film passif n'est pas néfaste à la résistance à la corrosion. L'utilisation du STM permet également de mettre en évidence les défauts cristallins du film passif, comme les sites vacants, qui peuvent amorcer la corrosion localisée ou des différences locales d'épaisseur du film passif, dues à la structure en terrasses et en marches du film passif **[Marcus, 1998]**. Les zones où le film passif est plus fin peuvent être le siège d'une rupture de passivité **[Marcus, 1998]**.

I.1.4. Cas des aciers inoxydables duplex

Les aciers inoxydables duplex présentent une composition chimique hétérogène du fait de la différence de solubilité des éléments d'alliage dans chaque phase. En particulier, la phase ferritique est plus riche en chrome et en molybdène et la phase austénitique est plus riche en nickel et en azote. La question de la distribution des éléments d'alliage dans le film passif et dans le métal sous-jacent est essentielle pour comprendre les mécanismes de passivation et de corrosion des aciers inoxydables duplex.

Malgré un nombre conséquent de travaux portant sur la passivation des aciers inoxydables duplex à l'échelle globale **[De Cristofaro, 1997]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Addari, 2008]**, **[Bautista, 2009]**, **[Donik, 2009a]**, **[Donik, 2009b]**, **[He, 2009]**, **[Donik, 2010]**, **[Fredriksson, 2010]**, **[Mandrino, 2010]**, **[Donik, 2011]**, **[Kocijan, 2011]**, **[Luo, 2011]**, **[Mandrino, 2011]**, **[Mesquita, 2011]**, **[Luo, 2012]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Guo, 2014]**, **[Jinglong, 2015]**, **[Jinglong, 2016]**, **[Luo, 2017a]**, **[Luo, 2017b]**, peu d'auteurs ont caractérisé le film passif formé sur chaque phase à l'échelle locale **[Olsson, 1995]**, **[Schmidt-Rieder, 1999]**, **[Femenia, 2004]**, **[Kempf, 2008]**, **[Vignal, 2010]**, **[Vignal, 2011]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Vignal, 2014]**, **[Wang, 2015]**. En effet, une telle caractérisation requiert une bonne résolution en profondeur (épaisseur du film passif de quelques nanomètres) ainsi qu'une bonne résolution latérale (taille des phases de quelques dizaines de micromètres) que peu de techniques peuvent atteindre. Jusqu'à présent, la technique la plus utilisée pour obtenir ce type d'informations est l'AES. Cependant, les interprétations sont limitées par l'absence d'information sur les états chimiques et un décapage préférentiel du molybdène **[Olsson, 1995]**. L'XPS permet d'obtenir des informations sur les états chimiques et sur le molybdène mais sa résolution latérale est en général insuffisante pour analyser localement le film passif.

Une analyse locale par XPS a récemment été menée avec un diamètre de faisceau de 20 µm inférieur à la taille des phases (en moyenne 75 µm après traitement thermique) **[Vignal, 2013a]**. Plutôt que d'analyser le film passif sur chaque phase du duplex, certains auteurs ont élaboré des alliages monophasés dont la composition chimique se rapproche de celles des phases du duplex **[Olsson, 1995]**, **[Wang, 2015]**. Malgré tout, des différences de composition chimique peuvent subsister, et des précipités peuvent être présents sur les alliages monophasés **[Olsson, 1995]**. Les détails de ces travaux sont indiqués dans le **Tableau A-3**

(**Annexe A**). L'ensemble de ces travaux souligne l'existence d'un lien entre la composition chimique des phases ferritiques et austénitiques des aciers inoxydables duplex et la composition chimique du film passif et du métal sous-jacent associés à chacune de ces phases, comme illustré sur la **Figure I-12**.

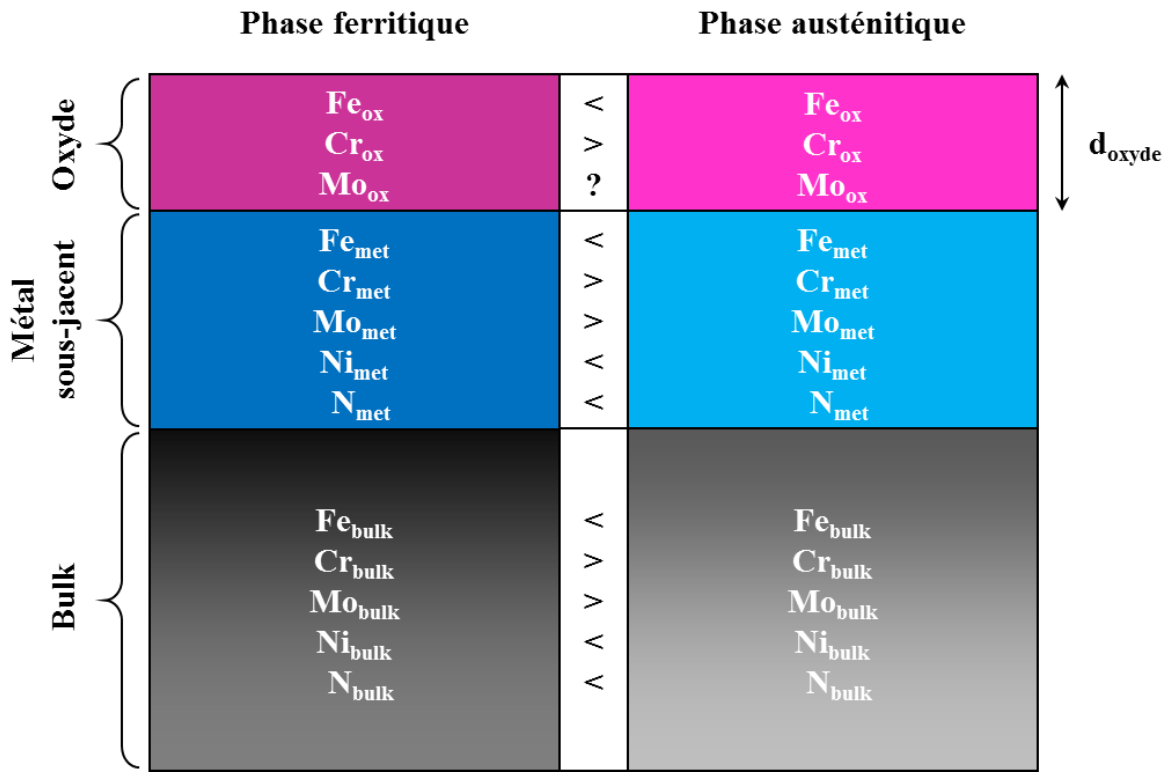


Figure I-12 Représentation schématique de la répartition des éléments d'alliage dans le bulk, le métal sous-jacent et le film passif à la surface des aciers inoxydables duplex, basée sur les données de la littérature.

En particulier, le film passif formé sur la phase ferritique est en général légèrement plus riche en chrome que celui formé sur la phase austénitique. Des différences d'épaisseur du film passif formé sur chaque phase ont parfois été notées. Dans le métal sous-jacent, le chrome et le molybdène sont plus riches sur la phase ferritique et le nickel et l'azote sont plus riches sur la phase austénitique. Par ailleurs, la répartition du molybdène au sein du film passif formé sur chaque phase n'a pas été étudiée, du fait des limitations de l'AES pour cet élément.

Même s'il est admis que ces différences chimiques sont susceptibles d'entraîner des différences de résistance à la corrosion de chaque phase, les mécanismes associés ne sont pas clairement décrits. Certains auteurs suggèrent que l'austénite a une meilleure résistance à la

corrosion du fait d'un enrichissement en nickel et/ou en azote à l'interface métal/oxyde et/ou dans le film passif plus prononcé que pour la ferrite **[Schmidt-Rieder, 1999]**, **[Femenia, 2004]**. Des mécanismes de synergie entre le nickel, le molybdène et l'azote sont discutés **[Olsson, 1995]**, **[Femenia, 2004]**. D'autres auteurs suggèrent que la ferrite est plus résistante à la corrosion du fait d'un enrichissement en chrome dans le film passif plus prononcé que pour l'austénite **[Vignal, 2011]**. Enfin, d'autres auteurs ne constatent pas de différence de résistance à la corrosion entre les deux phases **[Vignal, 2013a]**, **[Vignal, 2014]**.

I.1.5. Résumé

Les aciers inoxydables duplex sont caractérisés par une microstructure biphasée composée de volumes équivalents d'austénite et de ferrite, ce qui leur confère des propriétés mécaniques et de résistance à la corrosion élevées par rapport à des nuances austénitique ou ferritiques contenant des quantités équivalentes d'éléments d'alliage. La résistance à la corrosion des aciers inoxydables est liée à la formation spontanée d'un film passif de quelques nanomètres d'épaisseur, composé majoritairement d'oxydes et/ou d'hydroxydes de fer et de chrome, qui entraîne une baisse de la vitesse de dissolution du métal sous-jacent. Cependant, dans des environnements agressifs, la stabilité du film passif peut-être compromise, ce qui aboutit à des processus de corrosion qui peuvent survenir selon différents mécanismes.

Les principaux éléments d'alliage reconnus pour favoriser la résistance à la corrosion sont le chrome, le molybdène et l'azote. L'épaisseur et la composition chimique du film passif et du métal sous-jacent sont des paramètres clés de la passivation des aciers inoxydables. Le chrome est enrichi dans le film passif sous la forme d'oxydes et/ou d'hydroxydes de Cr(III). Le fer est présent sous la forme d'oxydes et/ou d'hydroxydes de Fe(II) et/ou de Fe(III). Le film passif est en général stratifié avec une couche externe riche en fer et une couche interne riche en chrome. Le molybdène est présent sous la forme d'oxydes et/ou d'hydroxydes de Mo(IV) et de Mo(VI) et sa distribution au sein du film passif est complexe. Le nickel n'est pas oxydé et présente un enrichissement dans le métal sous-jacent. L'azote est également enrichi dans le métal sous-jacent. Des différences marquées sont observées selon la préparation de la surface. En particulier, les « films passifs » à proprement parler, formés par passivation électrochimique, sont plus riches en chrome et en molybdène que les « films d'oxydes natifs », formés après polissage mécanique.

Du fait de la différence de solubilité des éléments d'alliage dans les deux phases, la composition chimique des aciers inoxydables duplex est hétérogène. Les éléments alphagènes, en particulier le chrome et le molybdène, sont plus riches dans la phase ferritique alors que les éléments gammagènes, en particulier le nickel et l'azote, sont plus riches dans la phase austénitique. Des différences chimiques sont notées concernant le film passif et le métal sous-jacent formé sur chaque phase, qui sont susceptibles d'entraîner une corrosion préférentiellement sur une des phases. Du fait des résolutions en profondeur et latérales requises, peu d'études ont été menées et des questions sont toujours ouvertes au sujet de la distribution des éléments d'alliage sur chaque phase et des conséquences sur la résistance à la corrosion.

I.2. Biocorrosion des aciers inoxydables

I.2.1. Le biofilm

I.2.1.1. Les bactéries : généralités

a. Classification des microorganismes

Les êtres vivants sont classés selon des critères phylogénétiques qui mettent en évidence leurs liens de parenté, comme illustré sur la **Figure I-13 [Woese, 1996]**. Trois domaines sont distingués : les bactéries, les archées et les eucaryotes. Les bactéries sont des organismes unicellulaires procaryotes, c'est-à-dire que leur matériel génétique n'est pas contenu dans un noyau. Les archées sont également des organismes unicellulaires procaryotes mais se distinguent des bactéries en plusieurs points (caractéristiques de l'ADN, voies métaboliques, paroi cellulaire). Les eucaryotes sont des organismes unicellulaires ou pluricellulaires dont le matériel génétique est contenu dans un noyau. Les microorganismes, définis comme des êtres vivants microscopiques, peuvent être aussi bien procaryotes (bactéries et archées) qu'eucaryotes (champignons et protistes). A elles seules, les bactéries représentent près de 50 % de la biomasse sèche de la planète **[Jorand, 2016]**. Dans cette étude, nous nous concentrerons sur les bactéries, reconnues principales responsables parmi les microorganismes de la formation de biofilms et de biocorrosion.

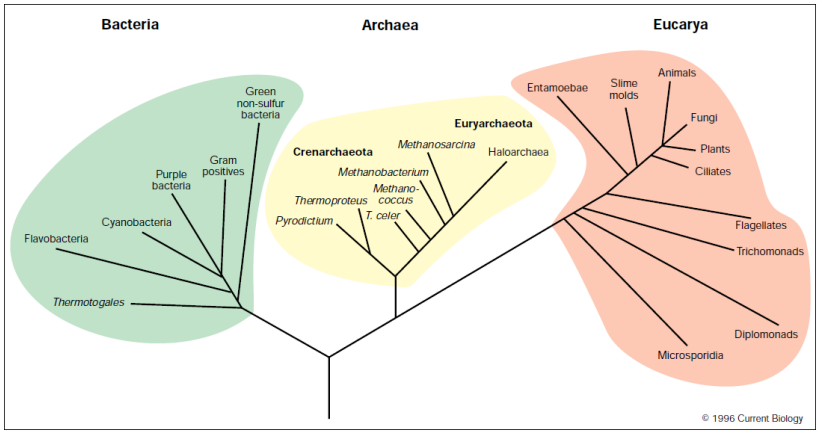


Figure I-13 Arbre du vivant selon la classification phylogénétique **[Woese, 1996]**.

b. Morphologies bactériennes

La longueur des bactéries est généralement comprise entre 0.5 et 10 µm **[Thierry, 2011]**. Les deux formes bactériennes les plus fréquemment rencontrées sont les sphères (coques) et les bâtonnets (bacilles). Des bactéries de formes intermédiaires entre les coques et les bacilles peuvent exister, dénommées coccobacilles. D'autres morphologies peuvent être rencontrées comme la forme de bacille incurvé (virgule) ou la forme spiralée. Les bactéries se divisent généralement par un mécanisme asexué de fission binaire (ou scission binaire) entraînant la formation de deux cellules filles génétiquement identiques à la cellule mère. Selon leur mode de division, les bactéries peuvent être isolées ou s'associer de manière plus ou moins complexe. La diversité morphologique des bactéries joue un rôle dans leurs mécanismes de survie **[Young, 2007]**.

c. Structures bactériennes

Le contenu des bactéries est composé du cytoplasme constitué d'un gel colloïdal (cytosol) et de protéines formant un cytosquelette qui influence la morphologie des bactéries **[Jones, 2001]**. Le cytoplasme renferme le matériel nucléaire (ADN chromosomique ou nucléoïde) et les ribosomes **[Jorand, 2016]**. Les ribosomes sont composés de protéines et d'acide ribonucléique (ARN) et permettent de décoder l'ARN messager pour la synthèse de protéines. Certaines bactéries possèdent de petites portions d'ADN appelées plasmides (ou ADN extra-chromosomique) qui ne sont pas indispensables à la croissance bactérienne mais qui apportent différents avantages, dont un échange d'informations avec des individus taxonomiquement proches, par exemple pour l'acquisition de facteurs de résistance **[Jorand, 2016]**.

La membrane cytoplasmique (ou plasmique) délimite le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire **[Jorand, 2016]**. Elle est constituée d'une double couche de phospholipides (surtout des phosphatidyléthanolamines) de 5 à 10 nm d'épaisseur dont les têtes hydrophiles séparent les queues hydrophobes du cytoplasme et du milieu extérieur. La membrane cytoplasmique contient des protéines qui sont le siège de plusieurs réactions métaboliques (en particulier la respiration et la photosynthèse) et permettent l'entrée et la sortie de molécules (nutriments ou métabolites). Elle est imperméable aux molécules chargées et aux ions mais perméable aux gaz et aux petites molécules neutres ou hydrophobes.

La membrane plasmique est recouverte par plusieurs enveloppes. Tout d'abord, la paroi est une barrière rigide qui détermine la morphologie de la cellule et la protège des variations de pression osmotique **[Jorand, 2016]**. Selon la structure de leur paroi cellulaire, les bactéries peuvent être classées en deux catégories : les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif (**Figure I-14**).

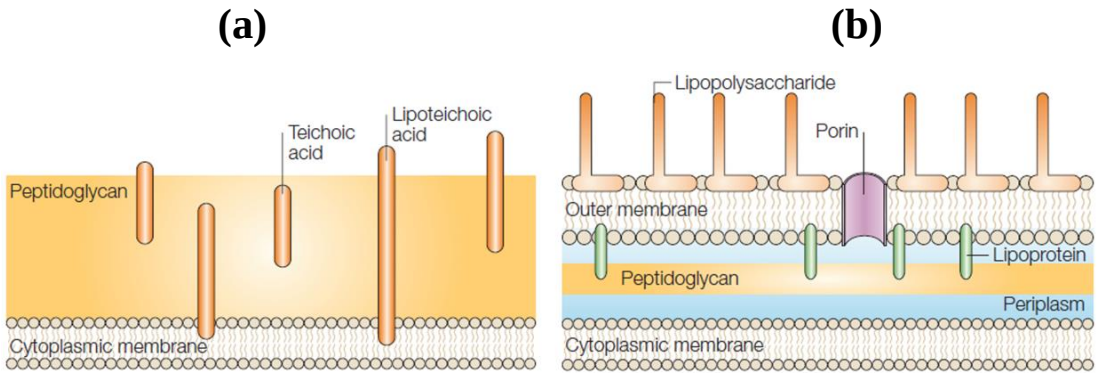


Figure I-14 Structure de la paroi cellulaire des (a) bactéries à Gram positif et des (b) bactéries à Gram négatif **[Cabeen, 2005]**.

Ces structures peuvent être mises en évidence par la méthode de coloration de Gram, mise au point en 1884 par le bactériologiste danois Hans Christian Gram **[Gram, 1884]**. La paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est constituée d'une couche de peptidoglycane (polymère polypeptidique de N-acétylglucosamine et de N-acétyl muramique branché par des ponts peptidiques courts) relativement épaisse (20-80 nm) contenant des chaînes polymériques d'acides lipotéichoïques et des acides téichoïques. La paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif, plus complexe, est constituée d'une couche de peptidoglycane beaucoup plus fine (2-3 nm) recouverte d'une membrane externe constituée de phospholipides, de lipoprotéines, de protéines (protéines de structure consolidant la

membrane externe et porine assurant le transport de petites molécules hydrophiles) et, dans beaucoup de cas, de lipopolysaccharides (LPS) qui jouent un rôle dans le caractère pathogène. Dans certains cas, la paroi bactérienne est recouverte d'une couche plus ou moins bien organisée, appelée capsule, mucoïde (« *slime* ») ou glycocalyx, qui est composée de polysaccharides et de protéines excrétés par la cellule et contribue à la pathogénicité des bactéries et favorise l'adhésion. Ces structures peuvent être regroupées sous le terme de substances polymériques extracellulaires (*Extra Polymeric Substances* – EPS).

Certaines bactéries présentent des structures protéiques externes solidement ancrées dans la membrane cytoplasmique telles que les flagelles, les *fimbria* et/ou les *pili* **[Flemming, 2010]**, **[Ploux, 2011]**, **[Jorand, 2016]**. Les flagelles sont des filaments de 15 à 20 µm de longueur dont la rotation permet aux bactéries de se déplacer à une vitesse qui peut atteindre plusieurs dizaines de µm/s afin de rejoindre des zones riches en éléments attractifs (chimiotactisme positif) ou au contraire de fuir des zones riches en éléments répulsifs (chimiotactisme négatif). Les *fimbriae* ont une longueur comprise entre 0.3 et 1 µm et favorisent l'adhésion aux cellules hôtes, par exemple grâce à la présence d'acides aminés hydrophobes qui permettent de surmonter les répulsions électrostatiques **[Jorand, 2016]**. Les *pili* peuvent atteindre 20 µm de longueur, permettent la transmission de plasmides (*pili* sexuels) et confèrent une mobilité particulière (« *twitching motility* » des *pili* de type IV).

d. Métabolisme bactérien

Le métabolisme regroupe les réactions chimiques au sein d'un organisme qui conduisent à la synthèse (assimilation) de molécules et consomment de l'énergie (anabolisme) ou à la dégradation (dissimilation) de molécules qui produisent de l'énergie (catabolisme) **[Jorand, 2016]**. Les réactions de synthèse font intervenir des précurseurs relativement simples qui sont la source des différents éléments chimiques nécessaires (nutriments) et sont catalysées par des enzymes. Les principaux besoins sont C, H, O, N, S, et P. Les bactéries ont également besoin, dans une moindre mesure, de sels minéraux (Ca, Fe, K et Mg) et des traces de métaux (Co, Cu, Mn, Mo, Ni et Zn). Les bactéries « autotrophes » sont capables d'utiliser le dioxyde de carbone (CO_2) ou les ions hydrogénocarbonates (HCO_3^-) comme unique source de carbone alors que les bactéries « hétérotrophes » ont besoin d'une ou plusieurs sources de carbone organique.

L'énergie nécessaire à la synthèse de molécules est stockée dans l'adénosine triphosphate (ATP) qui est synthétisée à partir d'une source d'énergie et d'un donneur d'électrons. Le donneur d'électrons est de nature minérale chez les bactéries « lithotrophes » et de nature organique chez les bactéries « organotrophes ». La source d'énergie est la lumière chez les bactéries « phototrophes » et une chaîne de réactions d'oxydoréduction chez les bactéries « chimiotrophes ». Les bactéries chimiotrophes peuvent suivre un processus respiratoire ou fermentatif. La respiration implique une chaîne de transferts d'électrons par des étapes de phosphorylation membranaire. Si l'accepteur final est le dioxygène (O_2), on parle de respiration aérobie. On distingue les bactéries aérobies strictes qui ne se développent qu'en présence de dioxygène, les bactéries microaérophiles qui ont besoin d'une pression partielle en dioxygène inférieure à celle de l'air, les bactéries aéro-anaérobies facultatives qui utilisent le dioxygène lorsqu'il est disponible et peuvent s'en passer lorsqu'il n'est pas disponible, les bactéries anaérobies aérotolérantes qui n'ont pas besoin de dioxygène mais l'acceptent et les bactéries anaérobies strictes incapables de se développer en présence de dioxygène. Dans le cas de la respiration anaérobie, l'accepteur final peut être minéral (NO_3^- pour les bactéries dénitrifiantes, SO_4^{2-} pour les bactéries sulfato-réductrices, Fe^{3+} pour les bactéries ferri-réductrices, CO_2 pour les bactéries méthanogènes…) ou organique (fumarate). La fermentation, dont le rendement énergétique est beaucoup plus faible que celui de la respiration, implique un transfert d'électrons qui se déroule en anaérobiose sans chaîne d'oxydation membranaire entre un donneur et un accepteur d'électrons organiques.

I.2.1.2. Le biofilm : un mode de vie avantageux

a. Propriétés émergentes des biofilms

Les bactéries peuvent adopter deux types de modes de vie. Les bactéries « planctoniques » flottent librement dans leur environnement alors que les bactéries « sessiles » sont attachées à une surface. Le mode de vie planctonique est privilégié pour la dissémination des bactéries et la colonisation de nouvelles surfaces alors que le mode de vie sessile est prédominant pour la croissance bactérienne **[Costerton, 1995]**. L'adhésion de bactéries à une surface conduit à la formation d'un biofilm (**Figure I-15**) qui est défini comme une communauté de bactéries englobées dans une matrice très hydratée de substances polymériques extracellulaires (*Extra Polymeric Substances* – EPS) adhérant entre elles et/ou aux surfaces ou aux interfaces **[Costerton, 1995]**, **[Flemming, 2010]**, **[Flemming, 2016]**.

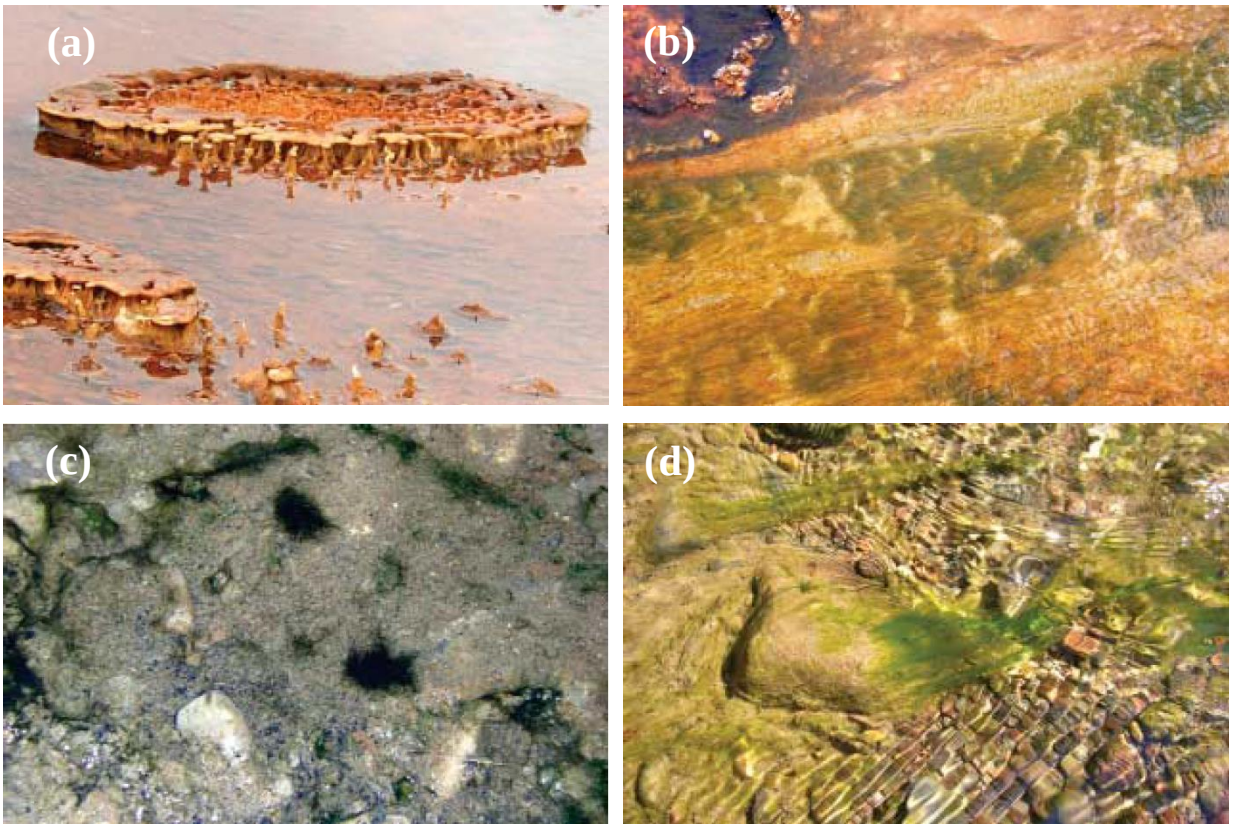


Figure I-15 Exemples de biofilms développés dans (a) et (b) des sources chaudes hydrothermales et (c) et (d) des rivières d'eau douce **[Hall-Stoodley, 2004]**.

Ce mode de vie confère de nombreux avantages aux bactéries, en particulier en milieu hostile, qui ne pourraient être prédites par l'étude des bactéries planctoniques **[Hall-Stoodley, 2004]**, **[Flemming, 2016]**. Parmi ces avantages, on trouve la stabilité mécanique, la résistance aux variations des conditions du milieu (dessiccation, température, pH, salinité, pression), la captation de nutriments (y compris le recyclage de nutriments issus de la lyse cellulaire), la rétention d'enzymes, les interactions intercellulaires (coopération, compétition ou communication), la tolérance ou la résistance aux agents antimicrobiens, la résistance contre les défenses immunitaires ou la protection contre les prédateurs **[Costerton, 1995]**, **[Costerton, 1999]**, **[Stewart, 2001]**, **[Hall-Stoodley, 2004]**, **[Flemming, 2008]**, **[Sillankorva, 2008]**, **[Flemming, 2010]**, **[Flemming, 2016]**, **[Esbelin, 2018]**.

Les biofilms sont généralement composés de plusieurs espèces de bactéries et d'autres organismes peuvent être présents, comme les micro-algues (diatomées), les protozoaires et les champignons. Les biofilms sont omniprésents, aussi bien dans la nature (eau douce et eau de mer, sol, sédiments, sous-sol…), dans les organismes vivants (flore intestinale, infections

persistantes…) que dans les installations industrielles (eaux usées, eau potable, eau de mer, circuits d'eau ultrapure, circuits de refroidissement…) où ils entraînent des problèmes sanitaires, de biofouling (bio-encrassement) et de biocorrosion **[Donlan, 2002a]**, **[Kulakov, 2002]**, **[Flemming, 2016]**, **[Levi, 2016], [Merchat, 2016]**, **[Sanchez-Vizuette, 2016]**.

b. La matrice d'EPS

Au sein des biofilms, les bactéries sont englobées dans une matrice d'EPS (substances polymériques extracellulaires) qui représente plus de 90 % de la masse sèche de la plupart des biofilms **[Flemming, 2010]**, **[Flemming, 2011]**, **[Block, 2016]**. A l'origine, le terme EPS se référait aux polysaccharides extracellulaires, mais il est aujourd'hui admis que les EPS sont un mélange complexe composé de polysaccharides, de protéines (comprenant des enzymes), d'acides nucléiques, de lipides produits par les bactéries et/ou issus de la décomposition de la matière organique (substances humiques) **[Zinkevich, 1996]**, **[Beech, 1999b]**, **[Beech, 2000b]**, **[Flemming, 2010]**, **[Flemming, 2011]**, **[Mann, 2012]**, **[Block, 2016]**, **[Sanchez-Vizuette, 2016]**.

Les flagelles *pili* et *fimbriae* peuvent interagir avec les EPS et ainsi stabiliser la matrice **[Flemming, 2010]**. Chez certaines bactéries à Gram négatif, la formation de vésicules membranaires lipidiques permet le transport d'ADN et de protéines **[Schooling, 2006]**, **[Flemming, 2010]**, **[Bonningtonn, 2014]**, **[Schwechheimer, 2015]**.

La composition chimique des EPS varie selon la souche bactérienne, les conditions de croissance des bactéries (température, composition du milieu, stade de croissance) et le degré d'attachement des EPS à la surface des bactéries (EPS fermement attachés, ou capsule, EPS faiblement attachés, ou « *slime* », EPS solubles, ou planctoniques, ou libres) **[Beech, 1999b]**, **[Beech, 2000b]**, **[Flemming, 2010]**, **[Sheng, 2010]**, **[Flemming, 2011]**, **[Torres Bautista, 2015]**.

Par exemple, Torres-Bautista *et al.* **[Torres-Bautista, 2015]** montrent que les EPS produits par *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 sont composés majoritairement de protéines dans le cas des « *Tightly Bound* » EPS et majoritairement de polysacharrides dans le cas des « *Loosely Bound* » EPS.

La nature des EPS produits influence également l'architecture du biofilm **[Branda, 2005]**, **[Ghafoor, 2011]**. Les EPS peuvent être hydrophobes ou hydrophiles et possèdent des groupes chargés négativement ou positivement qui sont à l'origine d'interactions physico-chimiques (forces électrostatiques, forces ioniques, liaisons hydrogène et forces de Van der Waals) faibles et influencent l'adhésion aux surfaces, la cohésion de la matrice et la sorption aux nutriments ou aux ions (y compris métalliques) **[Donlan, 2002a]**, **[Beech, 2005]**, **[Flemming, 2007]**, **[Flemming, 2010]**, **[Block, 2016]**. La production d'EPS par les bactéries a un coût énergétique considérable qui se justifie car les avantages du mode de vie en biofilm évoqués dans le paragraphe précédent proviennent en grande partie de la présence de la matrice d'EPS (voir **Tableau I-1**) **[Saville, 2011]**, **[Flemming, 2010]**, **[Flemming, 2011]**, **[Block, 2016]**, **[Flemming, 2016]**.

Tableau I-1 Fonctions associées aux EPS présents au sein des biofilms **[Block, 2016]**.

Fonctions / Propriétés	Constituants
Construction, cohésion, résistance mécanique	Tous les EPS, rôle sans doute particulier pour les fibres amyloïdes et l'eDNA
Sorption, piégeage, accumulation	Sites chargés (le plus souvent négativement) et domaines hydrophobes
Signalisation, information	Lectines, eDNA, nanowires (transport d'électrons)
Activités enzymatiques et redox	Exo- et ecto-enzymes
Nutrition	Tous les EPS biodégradables, piégeage de macromolécules biodégradables
Protection contre la prédation, la dessication, les substances toxiques…	Tous les EPS (surproduction d'EPS pour renforcer la protection)

c. La formation du biofilm

La formation du biofilm est un processus dynamique qui fait intervenir plusieurs étapes représentées sur la **Figure I-16 [Costerton, 1995]**, **[Stoodley, 2001]**, **[Donlan, 2002a]**, **[Sauer, 2002]**, **[Stoodley, 2002]**, **[Dagbert, 2004]**, **[Monroe, 2007]**, **[Ploux, 2011]**, **[Petrova, 2016]**, **[Sanchez-Vizuette, 2016]**. A chaque étape de la formation du biofilm, le phénotype des bactéries évolue par des mécanismes de communication intercellulaire dits de « *quorum sensing* », ce qui permet l'expression de certains gènes et conduit par exemple à la perte des flagelles ou à la synthèse d'EPS **[Costerton, 1995]**, **[Whitehead, 2001]**, **[Sauer, 2002]**, **[Stoodley, 2002]**, **[Sanchez-Vizuette, 2016]**.

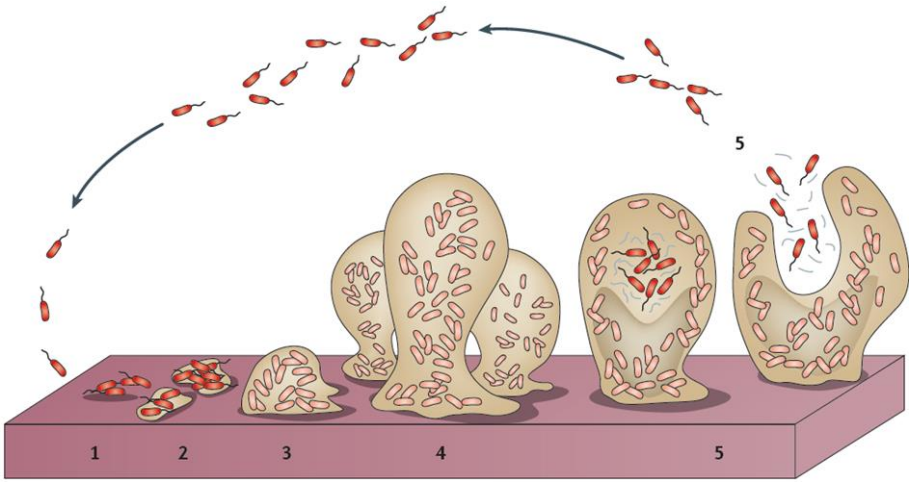


Figure I-16 Représentation schématique des différentes étapes de la formation du biofilm **[Lappin-Scott, 2014]**.

En général, la surface est initialement recouverte par un film conditionnant, formé suite à l'adsorption d'ions inorganiques et/ou de molécules organiques présents dans le milieu (dans certaines études les surfaces sont conditionnées par des EPS), qui est susceptible de modifier les conditions physico-chimiques de la surface et peut soit promouvoir soit limiter l'adhésion bactérienne **[Schneider, 1997]**, **[Beech, 2000b]**, **[Gubner, 2000]**, **[Pradier, 2000]**, **[Compère, 2001]**, **[Pradier, 2002]**, **[Poleunis, 2002a]**, **[Poleunis, 2002b]**, **[Rubio, 2002]**, **[Whitehead, 2008]**, **[Ploux, 2011]**, **[Hwang, 2012]**, **[Hwang, 2013]**, **[Torres Bautista, 2014]**, **[Yang, 2016]**. Par exemple, Compère *et al.* **[Compère, 2001]** concluent que l'immersion d'un acier inoxydable dans de l'eau de mer conduit à l'adsorption immédiate de protéines puis de carbohydrates qui forment un film non couvrant et d'épaisseur hétérogène.

Les bactéries se déplacent vers la surface soit par leur mobilité propre (grâce à la présence des flagelles) soit par le mouvement du fluide (mouvement brownien, sédimentation, écoulement) **[Dagbert, 2004]**. Dans un premier temps (étape 1), l'adhésion est réversible et résulte des interactions physico-chimiques faibles entre les bactéries et la surface (forces électrostatiques, forces de Van der Waals, interactions acide-base de Lewis). A ce stade, une désorption des bactéries est possible **[Petrova, 2016]**. Dans un second temps (étape 2), l'adhésion devient irréversible du fait des interactions fortes entre les bactéries et la surface grâce à la production d'EPS et/ou la présence de *pili* de type IV **[O'Toole, 1998]**. Les propriétés chimiques et physico-chimiques de la surface des bactéries (hydrophilie/hydrophobie, composition chimique) influencent l'adhésion **[Flemming, 1998]**, **[Boonaert, 2000]**, **[Pradier, 2005]**, **[Ramstedt, 2011]**, **[Ruhal, 2015]**, **[He, 2016]**.

Par exemple, Pradier *et al.* **[Pradier, 2005]** concluent que la présence de protéines à la surface des bactéries entraîne une augmentation du nombre de bactéries adhérentes. De même, les propriétés chimiques et physico-chimiques de la surface du matériau (hydrophilie, hydrophobie, composition chimique, fonctionnalisation, topographie, tension et charge de surface) jouent un rôle dans l'adhésion bactérienne **[Fletcher, 1979]**, **[Wieneck, 1997]**, **[Halsall, 2000]**, **[Ploux, 2007]**, **[Whitehead, 2008]**, **[Anselme, 2010]**, **[Ploux, 2011]**, **[Böhmler, 2015]**. Selon certains auteurs, ce rôle est important dans l'adhésion initiale, mais moins dans le développement du biofilm.

Pendant l'étape de maturation, les bactéries adhérentes se multiplient à la surface et forment des microcolonies (étape 3), puis la sécrétion de la matrice d'EPS permet la formation d'un biofilm tridimensionnel dont l'épaisseur peut atteindre 100 µm, stabilisé par des interactions polymériques (étape 4) **[Sauer, 2002]**, **[Tsuneda, 2003]**. Enfin, les bactéries peuvent s'échapper du biofilm et coloniser une autre surface, soit par détachement de portions de biofilms du fait des conditions hydrodynamiques, soit par une dispersion de bactéries planctoniques si les conditions environnementales deviennent défavorables (étape 5) **[Petrova, 2016]**.

I.2.1.3. Hétérogénéités au sein du biofilm

a. Architecture du biofilm

La CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*) permet de caractériser l'architecture du biofilm (**Figure I-17**), qui apparaît complexe et très variable d'un biofilm à l'autre, selon les bactéries présentes (monoculture ou culture mixte, production d'EPS) et les conditions environnementales (type de nutriments, type flux) **[Lawrence, 1991]**, **[Costerton, 1994]**, **[Bishop, 1995]**, **[Costerton, 1995]**, **[Pereira, 2002]**, **[Donlan, 2002b]**, **[Branda, 2005]**, **[Lethola, 2006]**, **[Flemming, 2008]**. La distribution de la biomasse présente une hétérogénéité à la fois latérale et en profondeur : les bactéries forment des agrégats et les bactéries peuvent être concentrées dans la région proche du substrat ou proche du liquide **[Lawrence, 1991]**, **[Costerton, 1994]**, **[Costerton, 1995]**. L'épaisseur du biofilm est hétérogène du fait de la présence de microcolonies séparées plus ou moins régulièrement par des canaux d'eau **[Lawrence, 1991]**, **[Costerton, 1994]**, **[de Beer, 1994]**, **[Costerton, 1995], [Flemming, 2008]**. Les microcolonies peuvent avoir une structure conique, ou une forme

qualifiée de champignon **[Costerton, 1995]**, **[Donlan, 2002b]**, **[Mann, 2012]**. La présence des canaux d'eau permet le transport de molécules et d'oxygène par un flux convectif **[Costerton, 1994]**, **[de Beer, 1994]**, **[Bishop, 1995]**, **[Costerton, 1995]**, **[Donlan, 2002b]**, **[Flemming, 2008]**. Des pores et des conduits peuvent également être présents au sein des microcolonies et peuvent être reliés aux canaux d'eau ou former des espaces vides. Au sein des microcolonies, le flux est purement diffusif **[Costerton, 1995]**, **[Flemming, 2008]**.

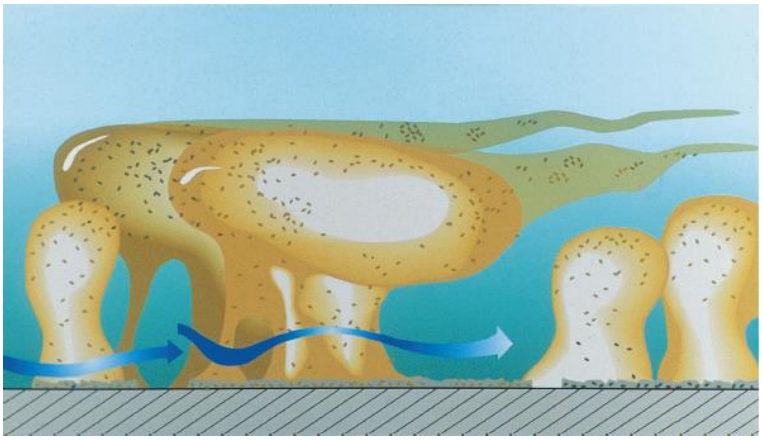


Figure I-17 Représentation schématique de l'architecture du biofilm **[Donlan, 2002b].**

b. Création de micro-niches

Les biofilms matures sont le siège de nombreux gradients chimiques qui peuvent être mesurés par des microélectrodes. La création de telles micro-niches peut s'accompagner de gradients physiologiques et phénotypiques permettant aux bactéries de s'adapter à leur environnement **[Costerton, 1994]**, **[Bishop, 1995]**, **[Costerton, 1995]**, **[Stewart, 2008]**, **[Flemming, 2008]**, **[Flemming, 2016]**. Ces gradients sont liés au caractère hétérogène de l'architecture du biofilm et sont exacerbés par l'activité métabolique des bactéries **[Costerton, 1995]**. La distribution des solutés dans le temps et l'espace est gouvernée par leurs vitesses de production, de consommation et/ou de diffusion **[Stewart, 2008]**.

Par exemple, les bactéries aérobies consomment l'oxygène plus rapidement qu'il ne diffuse au sein des microcolonies, ce qui entraîne une baisse continue de la concentration en oxygène dissous vers l'intérieur du biofilm. **[Bishop, 1995]**, **[Costerton, 1995]**, **[Flemming, 2008], [Stewart, 2008]**, **[Flemming, 2016]**. Ce phénomène peut conduire à la création de niches anaérobies qui permettent le développement de microorganismes anaérobies comme les Bactéries Sulfato-Réductrices. La consommation des nutriments dans les couches supérieures

du biofilm conduit à une privation en nutriments dans les couches inférieures, ce qui peut entraîner un ralentissement temporaire du métabolisme bactérien (état de dormance) ou une mort cellulaire **[Costerton, 1995]**, **[Lewis 2007]**, **[Stewart, 2008]**, **[Lewis, 2010]**, **[Flemming, 2016]**.

De manière générale, les réactifs du métabolisme bactérien sont plus concentrés à l'extérieur du biofilm, les produits du métabolisme bactérien sont plus concentrés à l'intérieur du biofilm et les espèces intermédiaires (intermédiaire métabolique ou produit métabolique d'une espèce consommée par une autre espèce) sont plus concentrées au centre du biofilm **[Stewart, 2008]**. Des gradients de pH ou de potentiel redox sont également rencontrés au sein des biofilms **[Flemming, 2016]**.

I.2.2. Biofilm et biocorrosion

I.2.2.1. Interactions matériau-microorganismes-environnement

La présence d'un biofilm sur une surface entraîne des problèmes de biofouling (bio-encrassement) qui peuvent se manifester par une altération des propriétés des matériaux (baisse de l'efficacité des échangeurs thermiques, colmatage des canalisations, augmentation de la résistance à la friction des coques de bateaux, perte des propriétés optiques…) voire une biodétérioration des matériaux **[Donlan, 2002a]**, **[Flemming, 2002]**, **[Beech, 2004a]**, **[Beech, 2004b]**, **[Dagbert, 2004]**, **[Thierry, 2011]**, **[Flemming, 2013]**, **[Flemming, 2016]**, **[Sanchez-Vizuette, 2016]**.

Cette biodétérioration, lorsqu'elle touche des matériaux métalliques, est qualifiée de biocorrosion, ou encore corrosion influencée par les microorganismes, mais cette notion peut être étendue à d'autres matériaux (polymères, bétons, pierres, verres…) **[Dagbert, 2004]**, **[Lors, 2016], [Roux, 2016], [Herisson, 2016], [Bousta, 2016]**. La biocorrosion est rencontrée dans de nombreux secteurs industriels et représente un enjeu économique considérable. Ainsi, le coût de la biocorrosion est estimé entre 5 et 10 % de l'ensemble des dégâts causés par la corrosion **[Dagbert, 2004]**. L'impact réel de la biocorrosion est probablement sous-estimé du fait de la difficulté à l'identifier **[Loto, 2017]**.

La biocorrosion, désigne l'ensemble des interactions entre les microorganismes, et plus particulièrement les bactéries, le matériau et l'environnement pouvant aboutir à l'initiation ou à l'accélération des processus de corrosion (**Figure I-18**). Les réactifs et les produits des réactions électrochimiques qui se déroulent à la surface du métal interagissent de manière complexe avec les réactifs et les produits des processus du métabolisme bactérien qui se déroulent dans le biofilm **[Lewandowski, 2009]**. Ces interactions dépendent des caractéristiques physico-chimiques du matériau, de l'environnement et des microorganismes. La modification d'un des paramètres de ce système est susceptible de modifier les processus de corrosion. Par exemple, Javed *et al.* **[Javed, 2014]** discutent l'effet de la concentration en nutriments dans le milieu sur l'adhésion et la biocorrosion d'un acier au carbone en présence d'*Escherichia coli*.

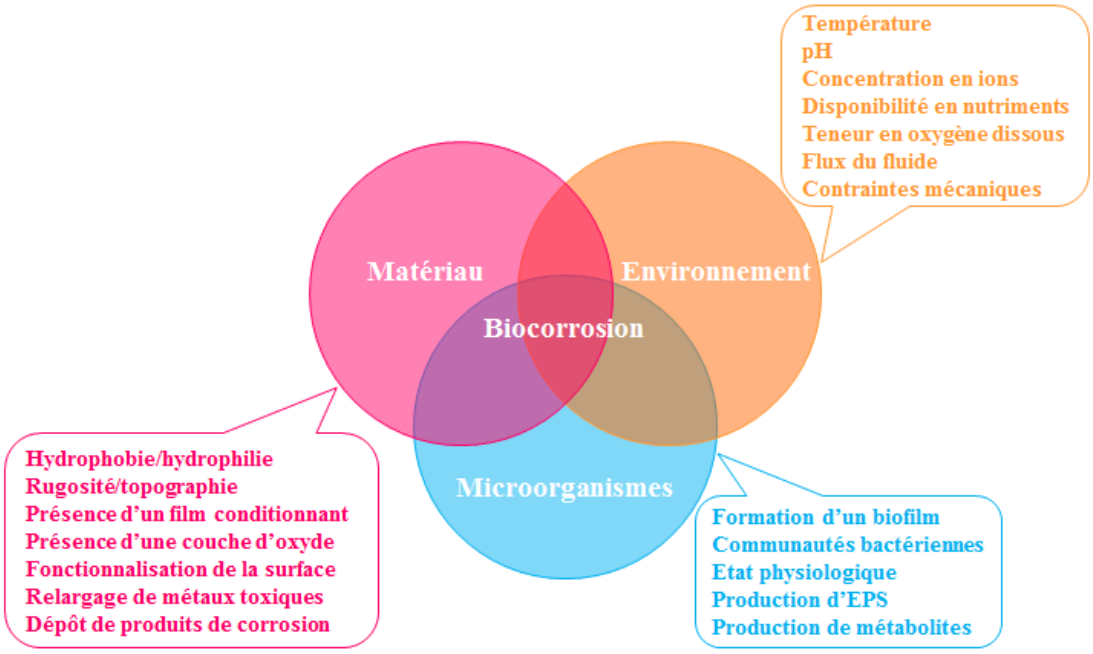


Figure I-18 Interactions entre le matériau, l'environnement et les microorganismes conduisant à la biocorrosion. D'après Dagbert *et al.* **[Dagbert, 2004]**.

La formation du biofilm bactérien sur une surface métallique entraîne une modification des propriétés de l'interface métal/solution qui crée localement des micro-niches où les conditions physico-chimiques sont radicalement différentes de celles du milieu environnement, notamment en termes de type et de concentration en ions, de pH, d'oxygène dissous et de potentiels d'oxydoréduction **[Little, 1991]**, **[Videla, 1994]**, **[Dagbert, 2004]**, **[Beech, 2005]**, **[Videla, 2005]**, **[Lewandowski, 2009]**, **[Dagbert, 2009]**, **[Sanchez-Vizuette, 2016]**. Ainsi, la présence du biofilm peut favoriser certaines réactions physico-chimiques qui n'auraient pas

lieu dans un environnement abiotique et conduire à une dégradation accélérée du métal **[Beech, 2005]**. La biocorrosion n'est donc pas une nouvelle forme de corrosion, mais elle conduit à une modification de la cinétique des réactions de corrosion (aussi bien anodiques que cathodiques) par l'action des bactéries **[Dagbert, 2009]**. Les phénomènes de biocorrosion conduisent parfois à une corrosion généralisée, mais du fait des hétérogénéités du biofilm, c'est une corrosion localisée qui est le plus souvent observée **[Dagbert, 2009]**.

De nombreux métaux et alliages sont touchés par la biocorrosion **[Féron 2016]**, comme le fer, **[Dinh, 2004]**, les aciers au carbone **[Javed, 2014]**, **[Usher, 2014]**, **[Wikieł, 2014]**, **[Rouvre, 2016]**, les aciers galvanisés **[Ilhan-Sungur, 2007]**, **[Ilhan-Sungur, 2010]**, **[Ilhan-Sungur, 2015]**, les aciers inoxydables **[Scotto, 1985]**, **[Morales, 1993]**, **[Videla, 1994]**, **[Geesey, 1996]**, **[Chen, 1997]**, **[Chen, 1998]**, **[Ismail, 1999]**, **[Johansson, 1999]**, **[Beech, 2000a]**, **[Shi, 2003]**, **[Lopes, 2006]**, **[Sheng, 2007]**, **[Yuan, 2007a]**, **[Nguyen, 2008]**, **[Starosvetsky, 2008]**, **[Yuan, 2008]**, **[Li, 2009]**, **[Yuan, 2009]**, **[Moradi, 2011]**, **[Yuan, 2013]**, **[Nan, 2015]**, **[Arkan, 2016]**, **[Hamzah, 2013]**, **[Li, 2016a]**, **[Mystkowska, 2017]** et plus particulièrement les aciers inoxydables duplex **[Antony, 2007]**, **[Antony, 2008]**, **[Antony, 2010]**, **[Moradi, 2014]**, **[Liang, 2014]**, **[Xia, 2015]**, **[Dec, 2016]**, **[Li, 2016b]**, **[Dec, 2017]**, **[Xu, 2017a]**, **[Zhou, 2018]** le cuivre et ses alliages **[Yuan, 2007b]** ou encore l'aluminium et ses alliages **[McNamara, 2005]**, **[Dai, 2016]**.

Même si les Bactéries Sulfato-Réductrices font partie des bactéries les plus souvent étudiées, une grande diversité d'autres bactéries sont impliquées dans les processus de biocorrosion, comme les Bactéries Sulfo-Oxydantes (BSO), les Bactéries Ferro-Oxydantes (BFO), les Bactéries Ferri-Réductrices (BFR), les Bactéries Mangano-Oxydantes (BMO) ainsi que les bactéries sécrétant des acides organiques et des exopolymères **[Beech, 1999a]**, **[Beech, 2004a]**. Chaque souche bactérienne appartenant à une de ces familles est susceptible d'agir sur les réactions de corrosion par plusieurs mécanismes qui peuvent se dérouler simultanément **[Little, 1991]**, **[Little, 1992]**. En général, les biofilms naturels ne sont pas constitués d'une unique souche bactérienne, mais forment des communautés synergiques qui influencent les processus électrochimiques par un métabolisme coopératif qui n'existerait pas dans le cas d'espèces individuelles **[Little, 1991]**, **[Little, 1992]**, **[Beech, 1999a]**, **[Beech, 2004a]**. A cette diversité de la nature des bactéries s'ajoute une diversité de leur distribution spatiale au sein du biofilm et de leur état physiologique (stade de croissance, métabolisme ralenti, mort cellulaire).

I.2.2.2. Mécanismes de biocorrosion

a. Approche expérimentale de la biocorrosion

L'étude des mécanismes de biocorrosion nécessite une approche pluridisciplinaire entre les biologistes et les corrosionistes dans le but d'élucider les interactions entre le matériau, les microorganismes et l'environnement **[Crolet, 1992]**. Les travaux reposent en général sur un couplage de techniques microscopiques (morphologie du biofilm, présence d'EPS, présence de produits de corrosion, état de la surface sous le biofilm…), spectroscopiques (nature des produits de corrosion, nature des dépôts microbiologiques, composition du film passif…) et électrochimiques (vitesse de corrosion…) tout en prenant en compte les contraintes particulières des systèmes biologiques dans le but d'élucider le lien entre les processus de corrosion et l'activité bactérienne **[Little, 1991]**, **[Mansfeld, 1991]**, **[Beech, 199a]**, **[Beech, 2005]**.

Au vu de la complexité et de la multitude des interactions possibles entre les bactéries, leurs réactions métaboliques, les réactions de corrosion et le métal, aucun mécanisme universel de biocorrosion ne peut être proposé **[Lewandowski, 2009]**. Les phénomènes de biocorrosion mettent en jeu plusieurs mécanismes qui peuvent se dérouler simultanément ou successivement **[Videla, 2005]**. Les conditions environnementales et les espèces bactériennes présentes peuvent dans certains cas imposer un mécanisme de biocorrosion prédominant **[Li, 2013]**. Dans le cas des communautés mixtes, un métabolisme coopératif peut affecter les processus électrochimiques **[Beech, 1999a]**. Certains mécanismes sont mieux décrits que d'autres, et de nouveaux mécanismes d'accélération ou d'inhibition de la corrosion sont continuellement proposés et étudiés **[Lewandowski, 2009]**.

D'une manière générale, tout processus biologique qui facilite ou inhibe une des réactions anodiques ou cathodiques du processus de corrosion, ou qui sépare de manière permanente les sites anodiques et cathodiques peut influencer la corrosion **[Lewandowski, 2009]**. Les mécanismes de biocorrosion impliquent en général la création de cellules de concentration.

Plusieurs travaux synthétisent les différents mécanismes de biocorrosion connus et illustrent l'évolution des connaissances dans le domaine **[Little, 1991]**, **[Little, 1992]**, **[Videla, 1992]**, **[Videla, 1994]**, **[Lewandowski, 1997]**, **[Beech, 1999a]**, **[Videla, 2000]**, **[Videla, 2001]**,

[Hamilton, 2003], **[Beech, 2004a]**, **[Mansfeld, 2007]**, **[Lewandowski, 2009]**, **[Little, 2008]**, **[Dagbert, 2009]**, **[Videla, 2009]**, **[Thierry, 2011]**, **[Li, 2013]**, **[Abdolahi, 2014]**, **[Little, 2014]**, **[Usher, 2014]**, **[Loto, 2017]**. Les paragraphes suivants détailleront plusieurs de ces mécanismes (liste non exhaustive).

b. Aération différentielle

Comme souligné dans le paragraphe **I.2.1.3.b.**, des gradients en oxygène dissous sont susceptibles de se former au cours de la formation du biofilm. En effet, au sein du biofilm, la respiration des bactéries aérobies conduit à une consommation en oxygène qui peut être plus rapide que sa vitesse de diffusion, ce qui peut créer des zones anaérobies à l'interface substrat/biofilm. En revanche, au niveau des zones non couvertes par le biofilm, le transport convectif permet un renouvellement continu en oxygène. Ainsi, les zones couvertes par le biofilm ont une concentration en oxygène dissout réduite et deviennent anodiques alors que les zones non couvertes par le biofilm ont une concentration en oxygène plus élevée et deviennent cathodiques (voir **Figure I-19**).

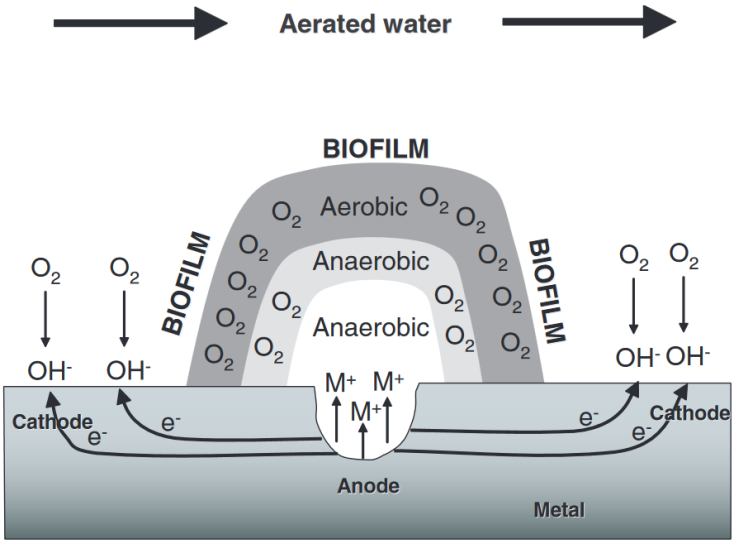


Figure I-19 Représentation schématique de l'initiation d'une piqûre sous un biofilm par un mécanisme d'aération différentielle **[Lewandowski, 2009]**.

Ce phénomène conduit à une corrosion par aération différentielle qui entraîne la corrosion du métal sous le biofilm par un mécanisme similaire à la corrosion caverneuse **[Lewandowski, 2009]**, **[Dagbert, 2009]**, **[Thierry, 2011]**, **[Hamzah, 2013]**, **[Little, 2014]**. Dans le cas de biofilms couvrant uniformément la surface, une inhibition de la corrosion peut être observée

car la consommation de l'oxygène supprime le réactif cathodique, mais cette observation est limitée aux biofilms formés au laboratoire car les biofilms formés naturellement sont généralement hétérogènes **[Little, 2002]**, **[Lewandowski, 2009]**.

La formation de dépôts par les Bactéries Métallo-Oxydantes, telles que les Bactéries Mangano-Oxydantes qui oxydent le Mn(II) en Mn(IV) et/ou les Bactéries Ferro-Oxydantes qui oxydent le Fe(II) en Fe(III), peut exacerber la corrosion par aération différentielle **[Starosvetsky, 2008]**, **[Dagbert, 2009]**. La présence d'EPS à la surface peut suffire à créer des cellules d'aération différentielle en augmentant la résistance à la diffusion de l'oxygène, même si cette hypothèse est discutable puisque la matrice d'EPS est très hydratée **[Roe, 1996]**, **[Lewandowski, 2009]**. Les Bactéries Ferri-Réductrices réduisent les espèces Fe(III) insolubles de la couche d'oxyde ou des produits de corrosion en espèces Fe(II) solubles qui, en milieu statique, permettent de réduire l'oxygène résiduel et ainsi de maintenir un environnement anaérobie où la corrosion est inhibée **[Dubiel, 2002]**, **[Lee, 2003]**.

c. Interactions EPS-cations métalliques

Les EPS produits par la bactérie ont la capacité de se lier aux cations métalliques, ce qui joue un rôle important dans les processus de biocorrosion **[Geesey, 1988]**, **[Beech, 1999a]**, **[Beech, 1999c]**, **[Johansson, 1999]**, **[Beech, 2004a]**, **[Beech, 2005]**, **[Sand, 2006]**, **[Dong, 2011]**, **[Little, 2014]**. En effet, les polysaccharides et les protéines contiennent des fonctions anioniques (par exemple les groupes carboxyle, phosphate, sulfate, glycérate, pyruvate et succinate) qui peuvent interagir avec les cations métalliques. Geesey *et al.* **[Geesey, 1988]** suggérèrent que la formation de complexes entre les ions Cu(II) et les groupes carboxyle des EPS s'accompagne d'une libération de protons. Beech *et al.* **[Beech, 2005]** proposent que la présence des cations métalliques et particulièrement de cations Fe(III) associés aux EPS entraîne des modifications des potentiels redox qui peuvent créer de nouvelles voies pour les réactions électrochimiques.

d. Production d'acide

Le métabolisme de nombreuses bactéries peut produire des acides inorganiques et/ou organiques, ce qui peut conduire à une acidification locale sévère qui accélère la corrosion (par exemple en accélérant la dissolution du métal, du film passif ou des dépôts calcaires

protecteurs) **[Little, 1988]**, **[Beech, 1999a]**, **[Dagbert, 2009]**, **[Thierry, 2011]**. C'est le cas des Bactéries Sulfo-Oxydantes (BSO) qui oxydent les formes réduites du soufre (par exemple H_2S) et produisent de l'acide sulfurique. Les bactéries fermentatives produisent des acides organiques, comme l'acide acétique, l'acide formique ou l'acide acétique **[Little, 1988]**, **[Beech, 1999a]**. Les EPS peuvent également être acides, en particulier ceux qui contiennent des fonctions acide carboxylique **[Beech, 1999a]**. Une acidification locale due aux Bactéries Sulfato-Réductrices peut également être rencontrée, suite à la formation de H_2S ou de sulfures de fer **[Crolet, 1992]**, **[Hamilton, 2003]**.

f. Production de nouveaux réactifs cathodiques ou catalyse de la réaction cathodique

Les Bactéries Mangano-Oxydantes (ou plus généralement les Microorganismes Mangano-Oxydants) sont capables d'oxyder les ions Mn^{2+} dissous (de très faibles concentrations sont suffisantes, comme 10-20 ppb) pour former des dépôts de MnOOH et de MnO_2 biominéralisés en contact électrique avec la surface métallique **[Dickinson, 1996]**, **[Olesen, 2000]**, **[Shi, 2003]**, **[Marconnet, 2006]**, **[Lewandowski, 2009]**, **[Dagbert, 2009]**, **[Little, 2014]**. Ces précipités sont de puissants réactifs cathodiques et leur réduction régénère les ions Mn^{2+} qui permettent de répéter le processus comme représenté sur la **Figure I-20**.

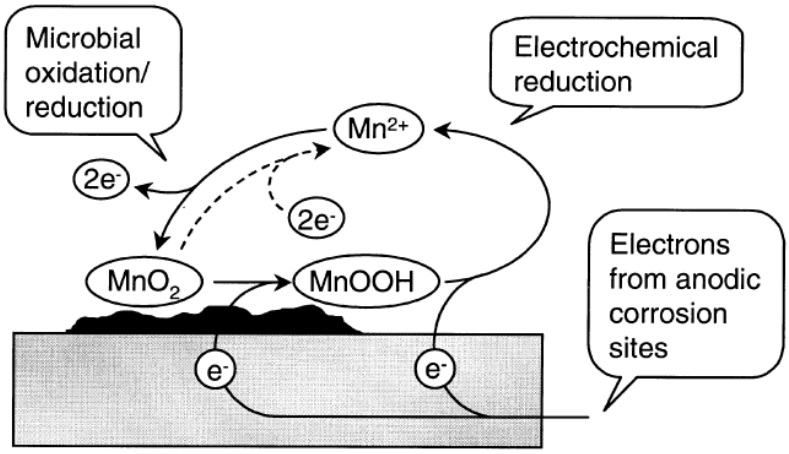


Figure I-20 Cycle du manganèse à la surface d'un acier inoxydable **[Olesen, 2000]**.

La réduction des sulfates en sulfures par les Bactéries Sulfato-Réductrices conduit à la formation de sulfure d'hydrogène (H_2S) ou de soufre élémentaire qui peuvent être des réactifs cathodiques **[Antony, 2007]**, **[Hamilton, 2003]**, **[Lewandowski, 2009]**.

Plutôt que de créer de nouveaux réactifs cathodiques, les bactéries peuvent conduire à l'accélération enzymatique des réactions cathodiques qui sont souvent l'étape limitante de la corrosion. Un mécanisme historique pour expliquer la corrosion induite par les Bactéries Sulfato-Réductrices en milieu anaérobie est la « dépolarisation cathodique », c'est-à-dire un déplacement de l'équilibre de la réaction cathodique de réduction des protons par une consommation de l'hydrogène produit catalysée par les enzymes hydrogénase, mais cette théorie historique fait débat car les réactions de corrosion ne sont pas à l'équilibre **[Bryant, 1990]**, **[Crolet, 1992]**, **[Thierry, 2011]**.

Aujourd'hui, le terme de « dépolarisation cathodique » se réfère plutôt à la catalyse de la réduction des protons en milieu anaérobie grâce aux enzymes hydrogénase, soit par un intermédiaire redox, soit par transfert électronique direct **[Da Silva, 2004]**, **[Mehanna, 2008]**, **[Rouvre, 2016]**. En milieu aérobie, la réduction de l'oxygène peut être catalysée par des enzymes comme les catalases, les peroxdydases ou les superoxydes dismutases par transfert électronique direct **[Scotto, 1985]**, **[Lai, 2002]**, **[Beech, 2004a]**, **[Iken, 2008]**, **[Cournet, 2010a]**, **[Cournet, 2010b]**. Bulasem *et al.* **[Bulasem, 2002]** soulignent que la catalyse de la réduction de l'oxygène dépend pour un alliage Cu-Zn de la composition de la couche d'oxyde.

D'un point de vue électrochimique, la production de nouveaux réactifs cathodiques et la catalyse de la réaction cathodique sont généralement associées à une augmentation de la densité de courant cathodique ainsi qu'à une augmentation du potentiel d'abandon de plusieurs centaines de millivolts (phénomène qualifié d'anoblissement par certains auteurs) **[Scotto, 1985]**, **[Little, 2008]**, **[Dagbert, 2009]**, **[Thierry, 2011]**, **[Little, 2014]**. Si le potentiel à l'abandon surpasse le potentiel de piqûres, la corrosion par piqûres peut avoir lieu. Ainsi, une augmentation du potentiel à l'abandon peut être associée à une augmentation de la probabilité de piqûration.

f. Réduction du Fe(III)

Les Bactéries Métallo-Réductrices et en particulier les Bactéries Ferri-Réductrices peuvent déstabiliser le film passif en réduisant les espèces Fe(III) insolubles de la couche d'oxyde et/ou des produits de corrosion en espèces Fe(II) solubles **[Little, 1998]**, **[Beech, 1999a]**, **[Lee, 2003]**, **[Herrera, 2009]**, **[Little, 2014]**. Dans le cas des aciers inoxydables, ce processus

conduit à une déstabilisation du film passif. Lee *et al.* **[Lee, 2003]** soulignent que les effets de la réduction du fer sur la concentration en fer du métal sont probablement liés à un processus dissimilatoire (respiration) plutôt qu'à un processus assimilatoire car les besoins nutritifs en fer sont minimes. Il s'agit en général de bactéries anaérobies facultatives dont l'accepteur final d'électrons peut passer de l'oxygène en conditions aérobies aux ions ferriques en milieu anaérobie **[Herrera, 2009]**, **[Little, 2014]**.

g. Formation de sulfures

Les Bactéries Sulfato-Réductrices suivent une respiration anaérobie qui conduit à la réduction des ions sulfates en ions sulfures (S^{2-}), en ions hydrogénosulfures (HS^-) ou en sulfure d'hydrogène (H_2S) qui peuvent réagir avec les espèces Fe(II) produites par la dissolution des alliages ferreux et former des sulfures de fer (FeS, FeS_{1-x}, FeS_{1+x} ou FeS_2) et un couplage galvanique s'établit entre les sulfures de fer (cathode) et le métal (anode). **[Beech, 1995]**, **[Lewandowski, 1997]**, **[Videla, 2000]**, **[Hamilton, 2003]**, **[Dinh, 2004]**, **[Wikieł, 2014]**.

Dans le cas des aciers au carbone, les sulfures de fer peuvent s'associer aux produits de corrosion abiotiques et conduire à la formation d'une couche de produits de corrosion hétérogène qui peuvent intensifier les couplages galvaniques **[Romaine, 2015]**, **[Robineau, 2017]**. Toutefois, si les sulfures de fer sont couvrants et adhérents, ils peuvent avoir un rôle protecteur **[Hamilton, 2003]**.

L'effet de la sulfuration du film passif par les Bactéries Sulfato-Réductrices sur la corrosion des aciers inoxydables est discuté dans de nombreuses études **[Chen, 1997]**, **[Lewandowski, 1997]**, **[González, 1998]**, **[Ismail, 1999]**, **[Chen, 1998]**, **[Antony, 2007]**, **[Sheng, 2007]**, **[Antony, 2008]**, **[Nguyen, 2008]**, **[Li, 2009]**, **[Lewandowski, 1997]**, **[Yuan, 2009]**, **[Antony, 2010]**, **[Yuan, 2013]**, **[Liang, 2014]**, **[Dec, 2016]**, **[Dec, 2017]**, **[Mystkowska, 2017]**. Dans certains cas, la sulfuration ne se limite pas au film passif, mais peut toucher le substrat métallique, comme représenté sur la **Figure I-21 [Chen, 1997]**. Dans le cas des aciers inoxydables duplex, une attaque préférentielle de la phase austénitique est notée **[Antony, 2007]**, **[Antony, 2008]**, **[Antony, 2010]**, **[Liang, 2014]**.

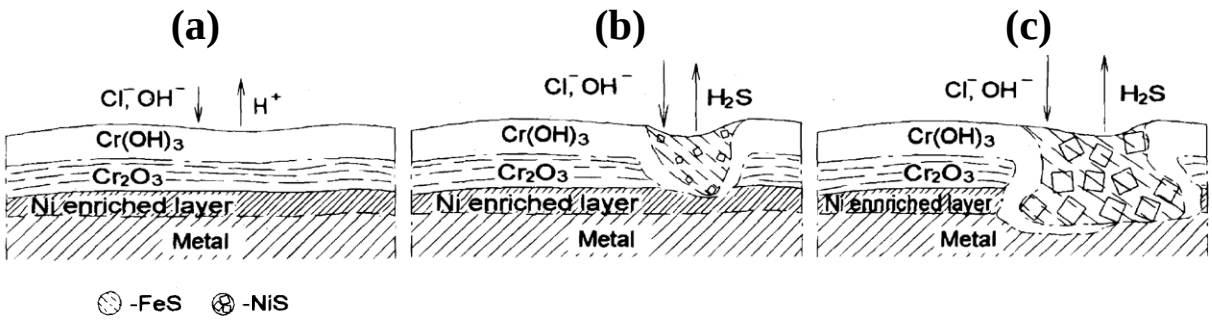


Figure I-21 Evolution du film passif formé sur un acier inoxydable 304 : (a) sans exposition aux Bactéries Sulfato-Réductrices, exposition aux Bactéries Sulfato-Réductrices menant à (b) une perte de passivité limitée et (c) une perte de passivité sévère **[Chen, 1997]**.

h. Autres formes de biocorrosion

Les autres mécanismes évoqués sont la dégradation des inhibiteurs de corrosion, la formation de phosphine (PH_3), la fragilisation par l'hydrogène par exemple par les bactéries fermentatives qui produisent de l'hydrogène ou par les SRB qui produisent du H_2S, un effet sur la fatigue-corrosion ou encore un transfert d'électrons par exemple par des nanofilaments conducteurs (« *nanowires* ») **[Little, 1991]**, **[Beech, 1999a]**, **[Mehanna, 2009a]**, **[Mehanna, 2009b]**, **[Thierry, 2011]**, **[Little, 2014]**, **[Zhang, 2015]**.

I.2.2.3. Aspects positifs du biofilm

a. Inhibition de la corrosion

Dans certains cas, la formation du biofilm peut inhiber la corrosion **[Videla, 2009]**, **[Zuo, 2007]**. Par exemple, la respiration bactérienne peut diminuer la vitesse de la réaction cathodique en réduisant la quantité d'oxygène disponible **[Pedersen, 1991]**, **[Hernandez, 1994]**, **[Zuo, 2007]**, **[Lewandowski, 2009]**, **[Videla, 2009]**. La formation de Fe(II) par les Bactéries Ferri-Réductrices peut contribuer à maintenir un environnement anaérobie où la corrosion est inhibée **[Dubiel, 2002]**, **[Lee, 2003]**. Cependant, Lewandoski *et al.* **[Lewandowski, 2009]** soulignent que ce mécanisme est probablement limité au cas des biofilms formés au laboratoire, car les biofilms formés naturellement ne sont pas uniformes et l'activité microbienne n'est pas distribuée uniformément. De plus, Videla *et al.* **[Videla, 2009]** remarquent qu'une quantité importante de nutriments est nécessaire pour augmenter l'activité métabolique des bactéries et aboutir à une inhibition de la corrosion.

Certaines espèces bactériennes génétiquement modifiées peuvent produire des substances antimicrobiennes qui permettent de ralentir la croissance d'autres espèces bactériennes agressives présentes au sein du biofilm **[Jayaraman, 1999]**, **[Zuo, 2007]**. Des inhibiteurs de corrosion peuvent également être sécrétés **[Ornek, 2002]**. Le biofilm et sa matrice peuvent également former une barrière de diffusion entre le métal et l'environnement **[Zuo, 2007]**, **[Videla, 2009]**. Dans certains cas, les Bactéries Sulfato-Réductrices peuvent conduire à la formation de couches fines et adhérentes de sulfures de fer qui peuvent s'avérer protectrices **[Gaylarde, 1987]**, **[Videla, 2009]**.

Plusieurs études concluent que les EPS peuvent avoir dans certains cas un effet inhibiteur sur la corrosion **[Stadler, 2008]**, **[Stadler, 2011]**, **[Dong, 2011]**, **[Torres Bautista, 2015]**. Stadler *et al.* **[Stadler, 2011]** attribuent cet effet à une diminution de l'adhésion bactérienne par la présence d'une couche incomplète d'EPS. Torres Bautista *et al.* **[Torres Bautista, 2015]** concluent que l'adhésion d'EPS produits par *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 à la surface d'un alliage 70Cu–30Ni en eau de mer artificielle entraîne des modifications de la couche d'oxyde (passage d'un oxyde stratifié à un oxyde mixte plus fin) et du comportement électrochimique (ralentissement de la réaction anodique). L'inhibition de la corrosion est plus marquée pour les « *Loosely Bound* » EPS que pour les « *Tightly Bound* » EPS. Par ailleurs, la teneur en Cu^+ et l'épaisseur de la couche d'oxyde sont plus faibles en présence des « *Loosely Bound* » EPS. Ces résultats sont probablement liés aux différences de composition chimique entre ces deux types d'EPS.

b. Enrichissement en chrome du film passif

Une étude récente **[Seyeux, 2015]** propose une méthodologie innovante basée sur le ToF-SIMS pour caractériser le film passif formé sur un acier inoxydable 316L après 1 h d'adhésion d'*Escherichia coli*. Pour la première fois, la présence du film passif sous les bactéries adhérentes a été démontrée. De plus, un enrichissement en chrome dans le film passif sous et à proximité des bactéries est démontré. Ainsi, le film passif pourrait être plus protecteur contre la corrosion. D'autres auteurs concluent que la formation du biofilm à la surface d'aciers inoxydables s'accompagne d'un enrichissement en chrome du film passif **[Pendyala, 1996]**, **[Beech, 2000a]**, **[Yuan, 2007a]**, **[Marconnet, 2008a]** mais l'amélioration de la résistance à la corrosion n'est pas proposée.

c. Piles à combustible microbiennes

L'implication des biofilms bactériens dans les réactions d'oxydo-réduction peut être mise à profit pour la génération de courant électrique : on parle de piles à combustible microbiennes **[Dumas, 2007]**, **[Dumas, 2008a]**, **[Dumas, 2008b]**, **[Logan, 2009]**, **[Logan, 2012]**, **[Qiao, 2017]**. Souvent, la cathode est abiotique et la réduction de l'oxygène catalysée par des particules de platine. Une catalyse de la réduction de l'oxygène par la présence d'un biofilm sur la cathode est également envisageable. La présence d'un biofilm à l'anode permet la dégradation d'un substrat organique qui entraîne la libération de protons et d'électrons. Les électrons sont transférés jusqu'à l'anode et circulent jusqu'à la cathode, ce qui crée un courant électrique. Le transfert des électrons à l'anode peut se faire *via* des médiateurs ou par transfert électronique direct.

I.2.3. Cas de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bactéries à Gram négatif, aérobies, en forme de bacilles et sont couramment rencontrées par exemple dans les eaux industrielles et l'eau de mer. Plus particulièrement, *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 est une bactérie marine connue pour produire des EPS **[Beech, 1999b]**, **[Beech, 2000b]**, **[Gubner, 2000]**, **[Torres Bautista, 2015]**, **[Brian-Jaisson, 2016]**.

Plusieurs espèces de *Pseudomonas* sont impliquées dans les processus de biocorrosion des aciers inoxydables, en particulier *Pseudomonas aeruginosa* **[Morales, 1993]**, **[Cournet, 2010]**, **[Hamzah, 2013]**, **[Abdolahi, 2014]**, **[Xia, 2015]**, **[Li, 2016a]**, **[Li, 2016b]**, **[Jia, 2017]**, **[Xu, 2017a]**, **[Zhou, 2018]**, *Pseudoalteromonas* sp. **[Moradi, 2014]**, *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 **[Beech, 2000a]**, **[Yuan, 2007a]**, **[Yuan, 2008]**, **[Yuan, 2009]**, une culture mixte de *Pseudomonas fluorescens* et d'un isolat de Bactéries Sulfato-Réductrices **[Ortiz, 1990]**, une culture mixte de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Klebsiella pneumoniae* **[Pendyala, 1996]**, une culture mixte de *Pseudomonas fragi* et *Desulfovibrio desulfuricans* **[Antony, 2010]**, une culture mixte de *Pseudomonas fragi* et *Desulfovibrio vulgaris* **[Ismail, 1999]** ou encore une culture mixte de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 et *Desulfovibrio desulfuricans* **[Yuan, 2009]**.

D'une manière générale, l'ensemble de ces études souligne que la formation d'un biofilm par des bactéries de types *Pseudomonas* à la surface d'aciers inoxydables favorise la corrosion par piqûres du fait de l'hétérogénéité du biofilm qui conduit à l'établissement de cellules de concentration, en particulier une aération différentielle. De plus, la création de micro-niches anaérobies permet le développement de Bactéries Sulfato-Réductrices (BSR) qui peuvent à leur tour favoriser la corrosion voire conduire à une synergie entre les deux types de bactéries **[Ortiz, 1990]**, **[Ismail, 1999]**, **[Antony, 2010]**. Dans le cas des études menées sur des aciers inoxydables duplex **[Moradi, 2014]**, **[Li, 2016b]**, **[Xia, 2015]**, **[Xu, 2017a], [Zhou, 2018]** l'adhésion et/ou la corrosion préférentielle d'une des phases n'est pas mentionnée.

Les paragraphes suivants portent une attention particulière aux travaux portant sur la biocorrosion d'aciers inoxydables par la formation d'un biofilm de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021.

Beech *et al.* **[Beech, 2000a]** ont étudié l'effet de la formation d'un biofilm de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 formé en eau de mer artificielle à 25°C pendant 36 jours sur un acier inoxydable 316 laminé à froid (pas de polissage, film formé fraîchement après polissage et film formé après polissage et jusque 3 semaines de stockage). Les surfaces ont été analysées par XPS pour les échantillons témoins ainsi que pour les échantillons colonisés par *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 (après avoir retiré le biofilm). Les auteurs suggèrent que des teneurs élevées en Cr et en Mo dans la partie externe du film passif inhibent le développement du biofilm. Le film passif est fortement affecté par le développement du biofilm : dans la partie externe du film passif, un appauvrissement en Fe et en Mo et un enrichissement en Cr sont détectés, et l'épaisseur du film passif est significativement réduite. Les auteurs concluent que ces modifications sont le résultat de la formation de micropiqûres observées par MEB qui pourraient être dues à la formation de métabolites comme des EPS acides ou des acides organiques.

Yuan *et al.* **[Yuan, 2007a]** ont étudié l'effet de la formation d'un biofilm de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 en eau de mer artificielle enrichie en nutriments à 25°C jusque 49 jours (avec renouvellement de 75 % tous les 7 jours) sur un acier inoxydable 304 (poli miroir). La caractérisation AFM souligne que l'épaisseur, la taille et l'hétérogénéité du biofilm augmentent au cours de la formation du biofilm. Après avoir retiré le biofilm, il apparaît que les piqûres sont initiées au bout de 14 jours d'immersion et que le nombre et la

profondeur des piqûres augmentent au cours de la formation du biofilm, alors que les piqûres sont beaucoup moins profondes après immersion dans le milieu stérile. Les auteurs suggèrent que le caractère hétérogène du biofilm crée des cellules de concentration qui conduisent à la formation de piqûres. Les analyses XPS des échantillons témoins et des échantillons colonisés par *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 (après avoir retiré le biofilm) révèlent que la formation du biofilm induit plusieurs modifications du film passif : un enrichissement en chrome et un appauvrissement en fer de la surface, une diminution de l'épaisseur du film passif, une modification du rapport Fe^{2+}/Fe^{3+}, une augmentation de la proportion de $Cr(OH)_3$ par rapport à Cr_2O_3 (qui explique pourquoi l'enrichissement en chrome n'est pas associé à une amélioration de la résistance à la corrosion) et plus généralement une augmentation de la proportion d'hydroxydes par rapport à la proportion d'oxydes ainsi qu'une modification de la nature des espèces Cr^{6+}.

Une étude ultérieure du même groupe **[Yuan, 2008]** conclut que la formation d'un biofilm de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 (dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, mais jusque 77 jours d'exposition) favorise la corrosion par piqûres d'un acier inoxydable 304. Grâce à une caractérisation électrochimique (courbes de polarisation et spectroscopie d'impédance) les auteurs montrent que la formation du biofilm induit une accélération de la réaction anodique due à la détérioration de la passivité et un ralentissement de la réaction cathodique dû à la diminution de la concentration en oxygène. Ce phénomène est plus marqué pour des expositions long terme (49, 63 et 77 jours). La comparaison de la taille des piqûres obtenues suggère que *Desulfovibrio desulfuricans* a des propriétés plus corrosives que *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021.

I.2.4. Résumé

La biocorrosion est un phénomène complexe qui résulte des interactions entre le matériau, l'environnement et les microorganismes, plus particulièrement les bactéries. Un élément clé dans les processus de biocorrosion est la formation d'un biofilm à la surface, qui est défini comme des communautés bactériennes englobées dans une matrice d'EPS. Le caractère hétérogène du biofilm est propice à la création de cellules de concentration susceptibles de favoriser la corrosion. De nombreux matériaux sont susceptibles d'être touchés par la biocorrosion, y compris les aciers inoxydables et plus particulièrement les aciers inoxydables

duplex. La biocorrsosion ne se limite pas au cas très connu des Bactéries Sulfato-Réductrices. En effet, des bactéries variées peuvent être impliquées et peuvent agir à plusieurs niveaux sur les réactions anodiques et/ou cathodiques du processus de corrosion. Les mécanismes associés sont donc très nombreux et spécifiques de chaque situation.

Les bactéries telles que *Pseudomonas* sont reconnues responsables de nombreux cas de biocorrosion des aciers inoxydables. La création de cellules d'aération différentielle du fait de la consommation d'oxygène par la respiration bactérienne favorise la corrosion par piqûres. La littérature présente quelques exemples de biocorrosion d'aciers inoxydables par la bactérie marine *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021. Néanmoins, des questions sur la relation entre la résistance à la corrosion et la composition chimique du film passif sont toujours ouvertes. Par ailleurs, les mécanismes de biocorrosion sont peu détaillés dans le cas des aciers inoxydables duplex, en termes par exemple d'adhésion et/ou de corrosion préférentielle d'une des phases.

I.3. Conclusions et objectifs de la thèse

Ce premier chapitre, structuré en deux parties, a permis de réaliser un état de l'art des connaissances autour du sujet de cette thèse. La première partie de ce chapitre porte sur les phénomènes de passivation et de corrosion des aciers inoxydables, et plus particulièrement des aciers inoxydables duplex, qui ont une microstructure biphasée composée de volumes équivalents d'austénite et de ferrite. Après avoir exposé des généralités sur les aciers inoxydables (principales propriétés, différentes familles et éléments d'alliage), les mécanismes de passivation ainsi que les différentes formes de corrosion rencontrées pour ces alliages ont été détaillés. Les aspects électrochimiques ainsi que le rôle des éléments d'alliages dans ces phénomènes ont été précisés. Une synthèse des travaux portant sur l'analyse des surfaces des aciers inoxydables a permis de présenter les principales caractéristiques du film passif (influence de la préparation de surface, épaisseur, composition chimique, stratification et propriétés structurales du film passif). Enfin, les travaux portant sur la passivation des aciers inoxydables duplex ont été présentés. Bien que peu nombreux, certains travaux ont permis d'identifier des différences chimiques de la surface au niveau de chaque phase des aciers inoxydables duplex.

La deuxième partie de ce chapitre se concentre sur les phénomènes de biocorrosion des aciers inoxydables. Des généralités concernant les bactéries ont tout d'abord été présentées (classification des microorganismes, morphologie, structure et métabolisme bactériens). Le biofilm a ensuite été décrit en détails, concernant ses propriétés émergentes et les avantages qu'il confère aux bactéries, le rôle de la matrice d'EPS, son processus de formation ainsi que son hétérogénéité (liée à son architecture et à la création de micro-niches). Nous avons ensuite décrit le phénomène de biocorrosion, qui résulte des interactions entre le matériau, les microorganismes et l'environnement. Les principaux mécanismes de biocorrosion rencontrés pour les aciers inoxydables ont été présentés : ces mécanismes sont variés et dépendent du type de bactérie considéré. Pour les bactéries aérobies telles que *Pseudomonas*, la création de cellules d'aération différentielle semble favoriser la corrosion par piqûres. Certains aspects positifs de la présence du biofilm ont été présentés, comme une inhibition de la corrosion, un enrichissement en chrome du film passif et la génération de courant électrique (piles à combustibles microbiennes). Enfin, les travaux portant sur la biocorrosion des aciers inoxydables en présence de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 ont été présentés. L'évolution du film passif semble être un point clé pour comprendre les mécanismes de biocorrosion.

Ce travail de thèse aura deux principaux objectifs. Le premier objectif sera de caractériser la couche d'oxyde (film d'oxyde natif formé après polissage mécanique et film passif formé après passivation électrochimique dans H_2SO_4 0.05 M) à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304, en termes d'épaisseur, de composition chimique et de stratification. Plus particulièrement, une méthodologie sera développée afin de caractériser la couche d'oxyde formée au-dessus de chaque phase de l'alliage duplex, afin d'étudier le lien entre la composition chimique de la phase et les propriétés de la surface. Le deuxième objectif sera de caractériser les interactions bactéries-surface au cours de l'adhésion de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 en milieu marin. Plus particulièrement, l'évolution de la couche d'oxyde au cours de la formation du biofilm sera étudiée (après 1 heure, 24 heures et 1 semaine d'adhésion), afin de comprendre les mécanismes de biocorrosion associés.

CHAPITRE II : Techniques expérimentales

Dans ce chapitre, nous présenterons les matériaux, les procédures expérimentales ainsi que les techniques de caractérisation utilisés dans ce travail de thèse.

II.1. Matériaux utilisés

Les matériaux utilisés dans cette thèse sont l'acier inoxydable duplex 2304 (Chapitre III, Chapitre IV, Chapitre V et Chapitre VI) ainsi que des alliages monophasés austénitique et ferritique correspondant à chaque phase de l'alliage duplex (Chapitre III).

II.1.1. Acier inoxydable duplex 2304

Les travaux de cette thèse ont été réalisés sur l'acier inoxydable duplex 2304 (EN 1.4362), produit par la société APERAM. Les tôles de duplex 2304 ont une épaisseur d'environ 1 mm et un fini de surface laminé à froid, recuit et décapé. L'alliage duplex présente une microstructure biphasée composée d'austénite et de ferrite. Des mesures de magnétisation spécifique de saturation, réalisées au sigmamètre (Setaram), ont révélé la présence de 46 % de régions austénitiques et 54 % de régions ferritiques.

La composition chimique de l'alliage duplex 2304 (en % atomiques) est indiquée dans le **Tableau II-1**. La composition chimique des phases austénitique et ferritique (en % atomiques) a été estimée en utilisant le logiciel ThermoCalc (composition chimique à l'équilibre à 1050°C estimée à partir de la base de données thermodynamique TCFE5). Les teneurs en fer, nickel, manganèse, cuivre, azote et carbone sont plus élevées dans la phase austénitique que dans la phase ferritique (éléments d'alliage gammagènes). Au contraire, les teneurs en chrome, silicium et molybdène sont plus élevées dans la phase ferritique que dans la phase austénitique (éléments d'alliage alphagènes). L'alliage duplex, qui contient des quantités équivalentes d'austénite et de ferrite, possède une composition chimique intermédiaire.

Tableau II-1 Compositions chimiques (en % atomiques) de l'alliage duplex 2304 et des phases austénitique et ferritique.

% at.	Fe	Cr	Ni	Mn	Si	Cu	Mo	N	C	S
Duplex 2304	bal.	24.6	4.4	1.5	0.88	0.33	0.27	0.36	0.07	< 10 ppm
Phase austénitique	bal.	21.5	5.6	1.7	0.80	0.43	0.21	0.59	0.11	< 10 ppm
Phase ferritique	bal.	28.2	3.1	1.3	0.97	0.21	0.33	0.08	0.03	< 10 ppm

II.1.2. Alliages monophasés austénitique et ferritique

Des essais complémentaires ont été réalisés sur des alliages monophasés (austénitique et ferrititique) réalisés à partir de coulées laboratoire de 50 kg. Des tôles d'une épaisseur d'environ 1 mm ont été obtenues après laminage à chaud, premier recuit, laminage à froid et recuit final. Des mesures de magnétisation spécifique de saturation, réalisées au sigmamètre (Setaram), ont révélé la présence de 1.5 % de ferrite résiduelle dans l'alliage austénitique.

Ces alliages ont été élaborés de manière à avoir la composition chimique la plus proche possible de celle des phases de l'alliage duplex (**Tableau II-2**). Une bonne corrélation a été obtenue entre la phase et l'alliage austénitiques et entre la phase et l'alliage ferritiques. Cependant, les teneurs en nickel et en silicium sont légèrement plus élevées pour l'alliage austénitique que pour la phase austénitique alors que la teneur en azote est légèrement plus élevée pour l'alliage austénitique que pour la phase austénitique et plus élevée pour la phase ferritique que pour l'alliage ferritique. De plus, les alliages monophasés présentent des teneurs en soufre plus élevées que l'alliage duplex.

Tableau II-2 Compositions chimiques (en % atomiques) des alliages monophasés austénitique et ferritique.

% at.	Fe	Cr	Ni	Mn	Si	Cu	Mo	N	C	S
Alliage austénitique	bal.	21.1	6.3	1.6	0.95	0.43	0.22	0.72	0.12	< 20 ppm
Alliage ferritique	bal.	28.5	2.9	1.2	0.97	0.17	0.34	0.006	0.04	< 20 ppm

II.2. Procédures expérimentales

II.2.1. Préparation des surfaces

Deux types de surfaces ont été étudiés : le film d'oxyde natif formé après polissage mécanique (Chapitre III, Chapitre IV, Chapitre V et Chapitre VI) et le film passif formé après passivation électrochimique dans H_2SO_4 0.05 M (Chapitre IV).

II.2.1.1. Géométrie des échantillons

Pour l'étude du film d'oxyde natif (Chapitre III et Chapitre IV), des échantillons de 10 × 12 mm² ont été découpés. Pour l'étude du film passif (Chapitre IV), des disques de 12 mm de diamètre ont été découpés. Pour les essais d'adhésion bactérienne sur le film d'oxyde natif (Chapitre V et Chapitre VI), des disques de 12 mm de diamètre ont été découpés. Enfin, pour les essais d'électrochimie (en présence de bactéries ou non) sur le film d'oxyde natif (Chapitre V et Chapitre VI), des disques de 30 mm de diamètre ont été découpés.

II.2.1.2. Préparation du film d'oxyde natif

Tout d'abord, les échantillons ont été abrasés sur une succession de papiers de carbure de silicium (SiC) du grade 80 jusqu'au grade 1200. Ensuite, des polissages successifs ont été réalisés à l'aide de spray diamanté de granulométrie 6 µm, 3 µm et 1 µm.

Pour l'étude du film d'oxyde natif (Chapitre III et Chapitre IV), les échantillons (alliage duplex 2304 et/ou alliages monophasés) ont été nettoyés aux ultrasons dans des bains successifs d'acétone et d'éthanol pendant 10 min chacun, trois fois successivement. Les échantillons ont ensuite été stockés à l'air pendant 24 heures ou 3 semaines. Avant la caractérisation XPS ou ToF-SIMS, les échantillons ont à nouveau été nettoyés aux ultrasons dans des bains successifs d'acétone et d'éthanol pendant 10 min chacun, trois fois successivement.

Pour les essais d'adhésion bactérienne et d'électrochimie en présence de bactéries sur le film d'oxyde natif (Chapitre V et Chapitre VI), les échantillons (alliage duplex 2304) ont été

nettoyés aux ultrasons dans des bains successifs d'acétone, d'éthanol et d'eau distillée pendant 10 min chacun puis séchés à l'air comprimé. Les échantillons ont ensuite été stockés à l'air entre 2 et 4 semaines. La veille des essais d'adhésion ou d'électrochimie, les échantillons ont à nouveau été nettoyés aux ultrasons dans des bains successifs d'acétone, d'éthanol et d'eau distillée pendant 10 min chacun puis séchés à l'air comprimé.

II.2.1.3. Préparation du film passif

Tout d'abord, les échantillons (alliage duplex 2304) ont été polis, comme décrit dans le paragraphe précédent. Ensuite, les échantillons ont été nettoyés aux ultrasons dans des bains successifs d'acétone et d'éthanol pendant 10 min chacun, trois fois successivement, puis dans un bain d'eau ultra-pure pendant 10 min et enfin séchés à l'air comprimé filtré. Les échantillons ont ensuite été stockés à l'air pendant 24 heures.

La passivation électrochimique a été réalisée dans une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4) 0.05 M préparée à partir d'une solution commerciale d'H_2SO_4 à 95 % diluée dans de l'eau ultra-pure. Un potentiostat Autolab PGSTAT30 a été utilisé. L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés avec le logiciel GPES (*Global Purpose Electrochemical System*). Un montage à trois électrodes a été utilisé, comprenant :

- Une électrode de travail, correspondant à l'échantillon étudié (alliage duplex 2304), maintenu dans un porte-échantillon. L'étanchéité entre l'échantillon et l'électrolyte est assurée par un joint torique. La surface de travail est de 0.50 cm².
- Une électrode de référence au sulfate mercureux saturé en sulfate de potassium (ESS, $Hg/Hg_2SO_4/K_2SO_4$ saturé, $E = +658$ mV/ENH à 25°C) qui est placée dans une allonge remplie de l'électrolyte (H_2SO_4 0.05 M). L'utilisation de cette allonge évite un contact direct entre l'électrode de référence et l'électrolyte et une contamination de l'électrode par les espèces présentes dans le milieu.
- Une contre-électrode constituée d'un fil de platine enroulé sur lui-même.

Ces électrodes sont placées dans une cellule à trois entrées contenant environ 50 mL d'électrolyte (H_2SO_4 0.05 M). Un maintien au potentiel à circuit ouvert (OCP – Open Circuit Potential) a été réalisé pendant 15 min. Ensuite, un potentiel de -100 mV/ESS, correspondant au domaine passif de l'alliage duplex 2304 dans H_2SO_4 0.05 M, a été appliqué pendant 30 min (voir **Annexe B**).

Les échantillons ont ensuite été stockés à l'air pendant 3 semaines. Avant la caractérisation XPS ou ToF-SIMS, les échantillons ont à nouveau été nettoyés aux ultrasons dans des bains successifs d'acétone et d'éthanol pendant 10 min chacun, trois fois successivement.

II.2.2. Essais d'adhésion bactérienne

Des essais d'adhésion bactérienne en milieu marin ont été réalisés (Chapitre V et Chapitre VI). La souche bactérienne utilisée est *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021. Les essais ont été réalisés sur l'acier inoxydable duplex 2304 après préparation d'un film d'oxyde natif (entre 2 et 4 semaines de vieillissement à l'air).

II.2.2.1. Préparation des milieux marins

Les essais d'adhésion bactérienne ont été réalisés en eau de mer artificielle (artificial sea water) sans (ASW) et avec (ASW+N) ajout de nutriments, composées de différents sels **[Torres Bautista, 2015]**. La composition de l'ASW et de l'ASW+N (en g/L) est indiquée dans le **Tableau II-3**. Dans l'ASW+N, des nutriments ont été ajoutés (peptone et extrait de levure) dans le but de favoriser la croissance et/ou la survie des bactéries. Après dissolution des différents composants dans de l'eau distillée, le pH a été ajusté à 8.0 $\pm$ 0.1 par ajout de soude (NaOH) 0.1 M. Enfin, l'ASW et l'ASW+N ont été stérilisées par filtration (filtres membranes avec des pores de 0.22 µm). Cette stérilisation par filtration a été préférée à une stérilisation par autoclave dans le but d'éviter une précipitation non contrôlée des espèces. Avant utilisation, l'ASW et l'ASW+N ont été stockées à 4°C afin d'éviter les risques de contamination bactérienne.

Tableau II-3 Composition de l'eau de mer artificielle sans addition de nutriments (ASW) et avec addition de nutriments (ASW+N) exprimée en g/L.

g/L	ASW	ASW+N
NaCl	24.62	
$MgCl_2(H_2O)_6$	11.06	
Na_2SO_4	4.11	
$CaCl_2(H_2O)_2$	1.54	
KCl	0.78	
$NaHCO_3$	0.20	
Peptone	-	3.0
Extrait de levure	-	1.5

II.2.2.2. *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021

La souche bactérienne utilisée dans ce travail est *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 (*National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria*, Aberdeen, UK). Il s'agit d'une bactérie marine, qui a besoin d'une certaine concentration en sels pour son développement (bactérie halophile). Elle est couramment rencontrée, par exemple dans les eaux industrielles et l'eau de mer. Cette souche bactérienne est aérobie, c'est-à-dire qu'elles a besoin d'oxygène pour sa respiration. Il s'agit de bactéries à Gram négatif (paroi cellulaire complexe constituée d'une couche fine de peptidoglycane recouverte d'une membrane externe) qui ont une forme de bâtonnets (bacilles). Ces bactéries sont connues pour produire des Substances Polymériques Extracellulaires (EPS) **[Beech, 1999b]**, **[Beech, 2000b]**, **[Gubner, 2000]**, **[Torres Bautista, 2015]**, **[Brian-Jaisson, 2016]**. Les bactéries sont conservées à −196°C dans des cryotubes avec du glycérol 50 % (v/v). Un stock de travail est conservé à −20°C également dans des cryotubes avec du glycérol 50 % (v/v).

II.2.2.3. Préparation des suspensions bactériennes et essais adhésion

La culture des bactéries comprend différentes étapes qui ont été réalisées sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Ces étapes sont représentées sur la **Figure II-1**.

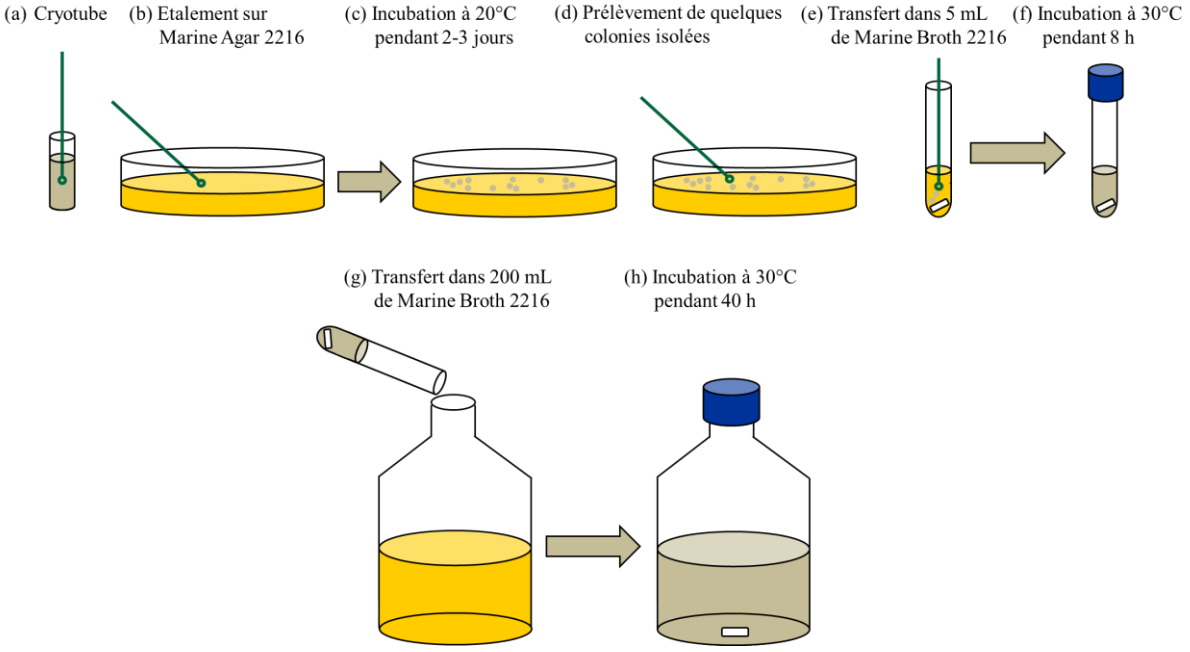


Figure II-1 Procédure de culture de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021.

Tout d'abord, la suspension bactérienne a été prélevée d'un cryotube (**Figure II-1-a**) et étalée à la surface d'une boîte de Petri contenant du milieu de culture Marine Agar 2216 (BD Difco, voir composition en **Annexe C**) (**Figure II-1-b**). Une incubation à 20°C a ensuite été réalisée entre 2 et 3 jours (**Figure II-1-c**). Des colonies isolées ont ensuite été prélevées (**Figure II-1-d**) et transférées dans un tube à essai contenant 5 mL de milieu de culture Marine Broth 2216 (BD Difco, voir composition en **Annexe C**) (**Figure II-1-e**). Une incubation à 30°C a ensuite été réalisée pendant 8 heures sous agitation **(Figure II-1-f)**. Le contenu du tube à essai a ensuite été transféré dans un erlenmeyer contenant 200 mL de milieu Marine Broth (**Figure II-1-g**). Une incubation à 30°C a ensuite été réalisée pendant 40 heures sous agitation (**Figure II-1-h**), jusqu'au début de la phase stationnaire de croissance. Cette procédure permet d'obtenir des conditions de croissances optimales et répétables.

Le contenu de l'erlenmeyer a ensuite été transféré dans des tubes de centrifugation de 50 mL. Une centrifugation a été réalisée (7 000 g, 10 min, 20°C) (**Figure II-2-a**). Un culot bactérien se forme au fond du tube. Lors du rinçage, le surnageant a été éliminé puis le culot a été remis en suspension dans de l'eau de mer artificielle (ASW) (**Figure II-2-b**). Les étapes de centrifugation et de rinçage ont été répétées trois fois afin d'éliminer les résidus de milieu de culture. Une suspension bactérienne en ASW a été préparée en ajustant la densité optique mesurée à 400 nm entre 0.8 et 0.9 (**Figure II-2-c**). Cette suspension bactérienne a été ensuite diluée au dixième dans de l'ASW (**Figure II-2-d**) et de l'ASW+N (**Figure II-2-e**), de manière à obtenir les suspensions utilisées pour les essais d'adhésion bactérienne avec une concentration de 10^7 UFC/mL pour toutes les expériences.

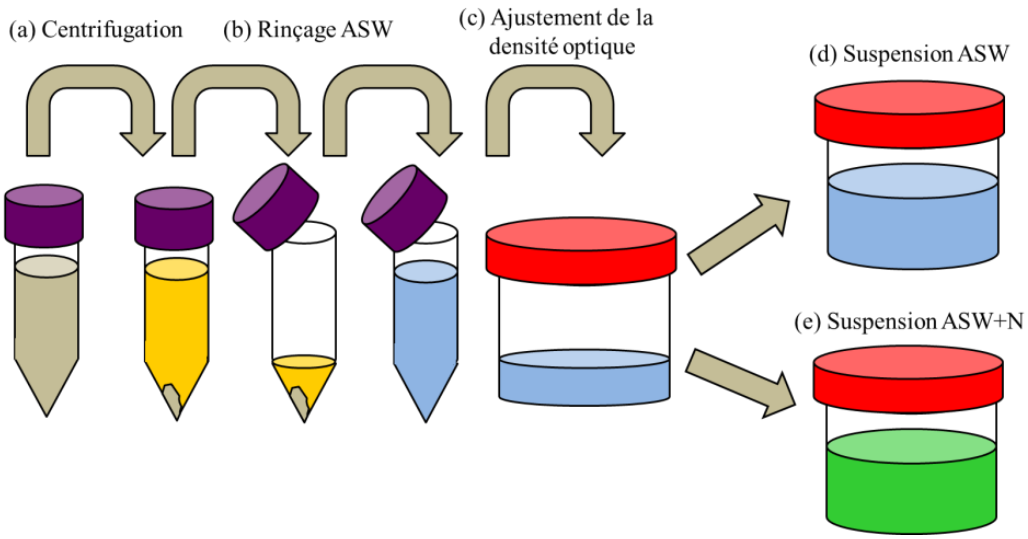


Figure II-2 Préparation des suspensions bactériennes en ASW et en ASW+N.

Les essais d'adhésion ont été réalisés en plaçant les échantillons (alliage duplex 2304) à plat dans des pots stériles et fermés contenant les suspensions de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 en ASW et en ASW+N. Des essais témoins ont été réalisés en plaçant des échantillons dans les milieux ASW et ASW+N stériles. Trois temps d'adhésion ont été considérés : 1 heure, 24 heures et 1 semaine. Tous les essais d'adhésion bactérienne ont été réalisés à partir d'une unique suspension ASW ou ASW+N afin de s'affranchir de toute variabilité. A l'issue de ces temps d'adhésion, le liquide en suspension a été éliminé et les échantillons ont été rincés en ASW stérile afin d'éliminer les bactéries non adhérentes.

II.2.2.4. Dénombrement des bactéries viables cultivables

Un dénombrement des bactéries viables cultivables (UFC pour Unité Formant Colonie, ou en anglais, CFU pour *Colony Forming Unit*) a été réalisé pour les bactéries en suspension ainsi que pour les bactéries adhérentes (voir **Figure II-3**). Après rinçage des échantillons en ASW stérile, les bactéries adhérentes ont été détachées de la surface en plaçant les échantillons dans un pot stérile contenant 10 mL de milieu ASW stérile pendant 2 min dans un bac à ultrasons puis 30 s au vortex.

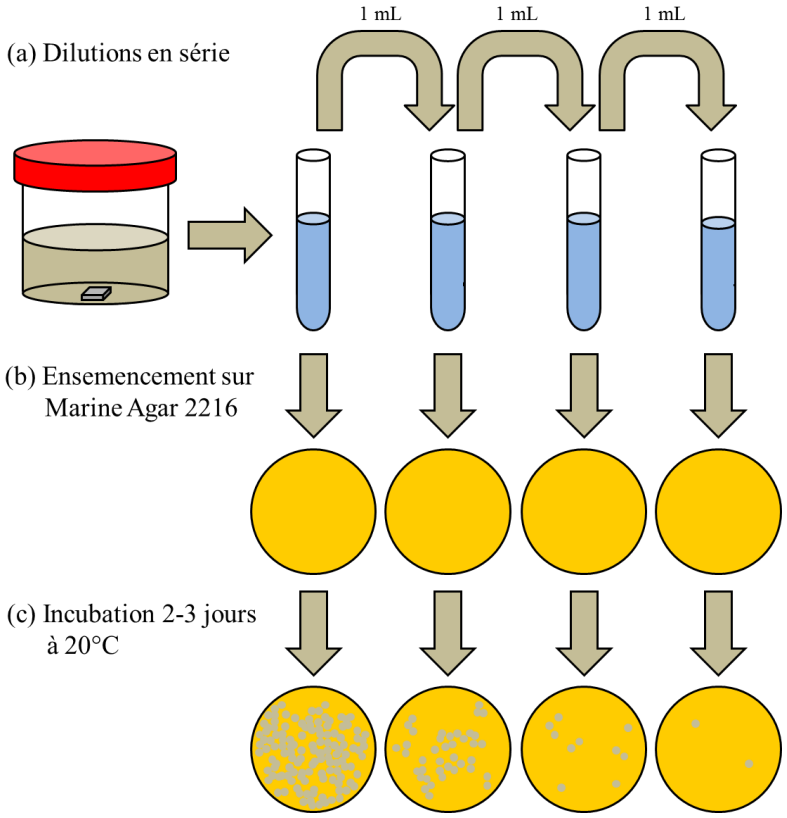


Figure II-3 Procédure de dénombrement des bactéries viables cultivables.

Des dilutions décimales en série ont été réalisées pour les bactéries en suspension et pour les bactéries adhérentes dans des tubes à essai contenant 9 mL de solution NaCl à 35 g/L (**Figure II-3-a**). Chaque dilution a été ensemencée en surface de deux boîtes de Petri contenant du Marine Agar 2216 (**Figure II-3-b**). Une incubation à 20°C a ensuite été réalisée entre 2 et 3 jours (**Figure II-3-c**). Enfin, les colonies isolées formées ont été dénombrées de manière à en déduire le nombre de bactéries viables cultivables en suspension (UFC/mL) et adhérentes (UFC/cm²). Par convention, les résultats sont jugés comptables pour un nombre de colonies isolées compris entre 30 et 300 **[Davies, 1991]**.

II.2.2.5. Traitement des échantillons après les essais d'adhésion

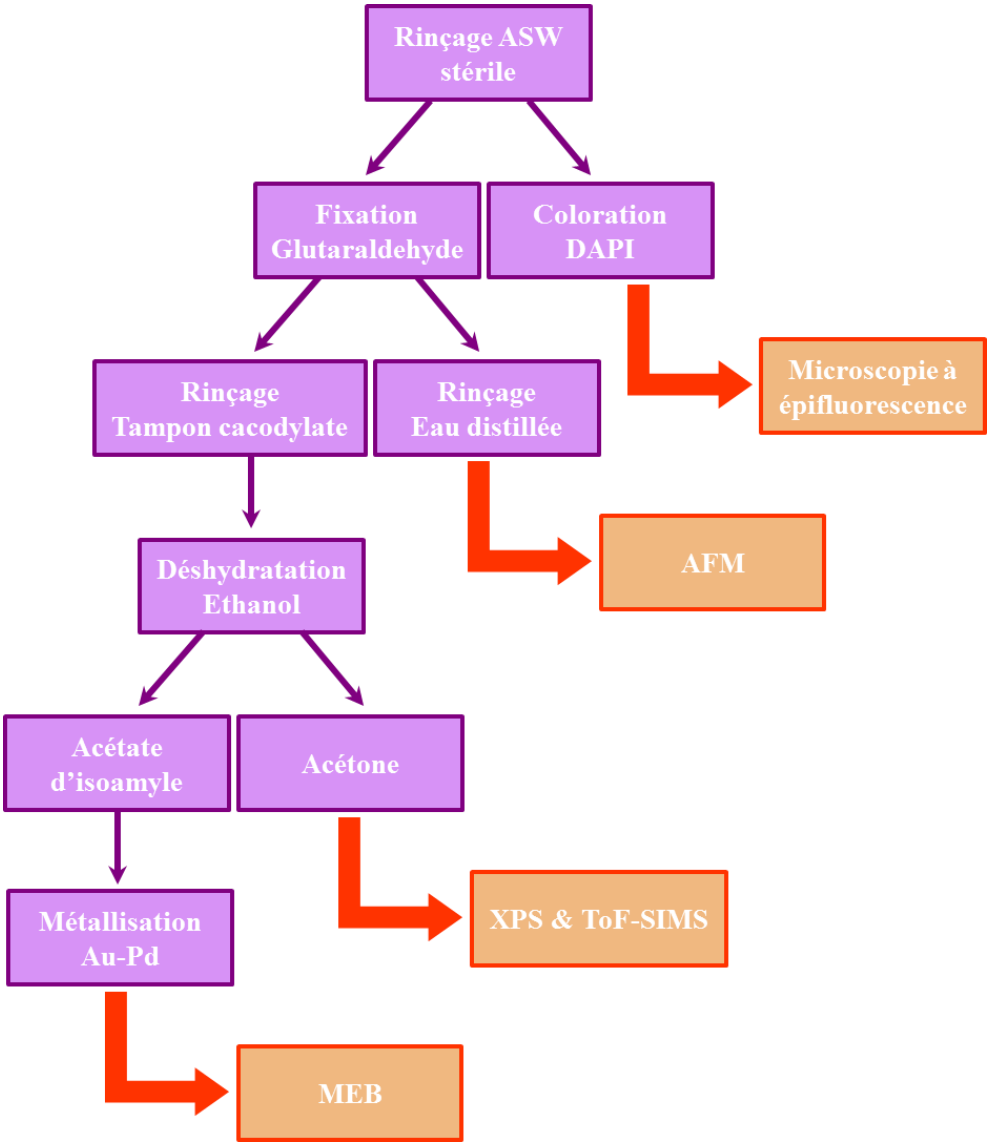


Figure II-4 Différents traitements appliqués aux échantillons selon la technique de caractérisation utilisée.

Suite aux essais d'adhésion bactérienne, différents traitements ont été appliqués aux échantillons, selon la technique de caractérisation utilisée par la suite, comme représenté sur la **Figure II-4**. Ces traitements ont été appliqués pour les échantillons immergés dans les milieux bactériens mais aussi stériles (témoins). Dans tous les cas, les échantillons ont tout d'abord été rincés dans le milieu ASW stérile de manière à éliminer les bactéries non adhérentes de la surface.

a. Traitement pour la microscopie à épifluorescence

Pour l'observation au microscope à épifluorescence, les bactéries adhérentes ont été marquées en déposant 0.1 mL de colorant DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole dihydrochloride, Molecular Probes, Invitrogen) à une concentration de 50 µg/mL à la surface des échantillons pendant 15 min à l'abri de la lumière. Le DAPI se lie aux bases adénine et thymine de l'ADN des bactéries, quelle que soit leur activité métabolique (c'est-à-dire les bactéries mortes, viables non cultivables et viables cultivables). L'absorption du DAPI est maximale pour une longueur d'onde d'environ 345 nm et l'émission est maximale pour une longueur d'onde d'environ 455 nm **[Allion, 2004]**.

b. Traitement pour les analyses AFM

Pour les analyses AFM, une fixation a été réalisée dans le but de figer la structure des bactéries. Pour cela, les échantillons ont été immergés pendant 2 h dans une solution de glutaraldéhyde ($C_5H_8O_2$) avec une concentration de 3 % dans un tampon cacodylate de sodium ($C_2H_6AsNaO_2$) 0.01 M (pH = 7.2) à 4°C. Les échantillons ont ensuite été rincés à l'eau distillée.

c. Traitement pour les analyses XPS et ToF-SIMS

Pour les analyses XPS et ToF-SIMS, les bactéries ont été fixées avec la solution de glutaraldéhyde comme décrit précédemment. Les échantillons ont ensuite été rincés par immersion dans le tampon cacodylate de sodium (deux fois 10 min). Pour permettre l'analyse sous vide, une procédure de déshydratation a été réalisée en immergeant les échantillons dans des bains d'éthanol de plus en plus concentrés (30 %, 50 %, 70 %, 90 % et 100 %, deux fois 15 min pour chaque concentration) puis dans un bain d'acétone (15 min) **[Seyeux, 2015]**.

d. Traitement pour la microscopie électronique à balayage

Pour les analyses MEB, la fixation a été réalisée comme décrit en (b) puis les échantillons ont été rincés avec le tampon cacodylate de sodium comme décrit en (c). Les échantillons ont ensuite été déshydratés par une série de bains d'éthanol comme décrit en (c) et un bain d'acétate d'isoamyle. Le remplacement du bain final d'acétone par un bain d'isoamyle a permis d'obtenir des images de meilleure qualité. Enfin, les échantillons ont été métallisés en réalisant un dépôt Au-Pd par pulvérisation cathodique pendant 2 min **[Seyeux, 2015]**.

II.3. Techniques de caractérisation

Dans cette partie, nous présenterons les différentes techniques de caractérisation utilisées dans les travaux de thèse : les techniques de caractérisation fine de surface (XPS et ToF-SIMS), les techniques de caractérisation morphologique de la surface (MEB, microscopie à épifluorescence et AFM) ainsi que la caractérisation électrochimique.

II.3.1. Spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS)

II.3.1.1. Principe de l'XPS

La spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X (XPS – *X-ray Photoelectron Spectroscopy*), aussi appelée ESCA (*Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*), est une technique d'analyse d'extrême surface qui permet une analyse chimique sur une profondeur inférieure ou égale à 10 nm. Il s'agit d'une technique non destructive. L'environnement chimique (degré d'oxydation et liaison chimique), la composition chimique de la surface ainsi que l'épaisseur de couches ≤ 10 nm peuvent être déterminées de manière quantitative. Toutefois, l'XPS ne permet pas d'obtenir d'informations moléculaires et sa limite de détection est de l'ordre de 1 % atomiques ce qui est un facteur limitant pour la détection d'éléments présents en quantités de traces. Tous les éléments peuvent être détectés, hormis l'hydrogène et l'hélium. Ces propriétés font que l'XPS est une technique particulièrement adaptée à l'étude des couches passives formées sur les aciers inoxydables.

Le principe de l'XPS repose sur l'émission de photoélectrons suite à l'interaction rayonnement-matière (**Figure II-5**). La surface de l'échantillon à caractériser est irradiée par un faisceau de rayons X monochromatiques émis par une source d'énergie $E = h\nu$, avec h la constante de Planck et ν la fréquence de la radiation. L'absorption d'un photon par l'atome de la surface entraîne l'émission d'un photoélectron. Du fait de l'énergie relativement élevée des photons incidents, des électrons appartenant à une couche intérieure de l'atome peuvent être émis (électrons de cœur).

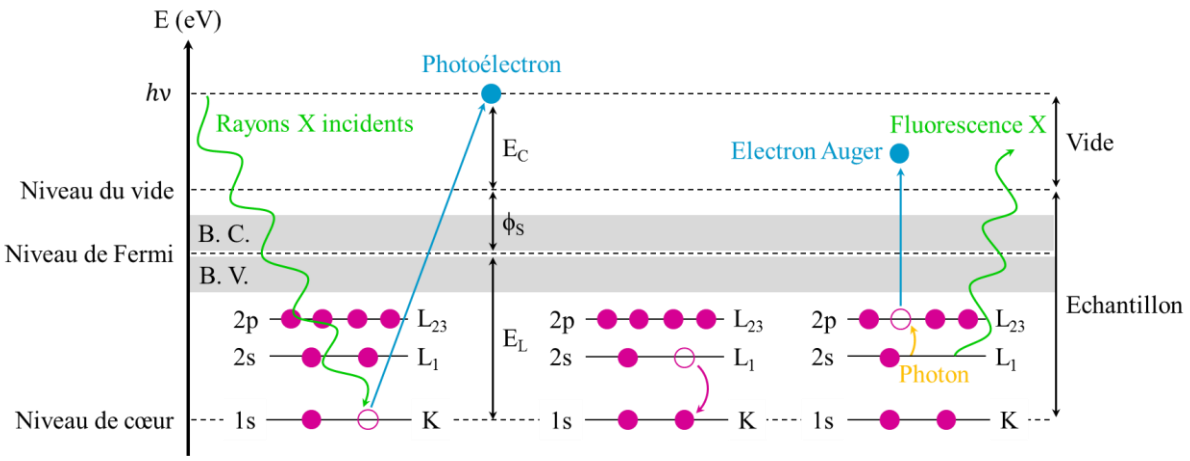


Figure II-5 Représentation schématique du principe de fonctionnement de l'XPS (B. V. = bande de valence, B. C. = bande de conduction).

La loi de conservation de l'énergie permet d'écrire le bilan énergétique suivant :

$$h\nu = E_C + E_L + \phi_S \qquad \textbf{Equation II-1}$$

avec :

$h\nu$: l'énergie du faisceau de rayons X incidents (connue) ;

E_C : l'énergie cinétique du photoélectron éjecté du matériau dans le vide (mesurée expérimentalement par un analyseur hémisphérique) ;

E_L : l'énergie de liaison de l'électron éjecté, définie par rapport au niveau de Fermi, qui est caractéristique de l'élément et de son environnement chimique (degré d'oxydation et liaison chimique) ;

ϕ_S : le travail de sortie du spectromètre (déterminé grâce à un étalon d'or Au $4f_{7/2}$).

L'émission d'un photoélectron entraîne la formation d'une lacune dans l'orbitale électronique d'origine du photoélectron qui peut être comblée par un électron venant d'un niveau plus élevé. Ce phénomène s'accompagne d'un excès d'énergie dissipé par une désexcitation, soit par l'émission de photons (fluorescence X), soit par l'émission d'un électron situé sur un niveau électronique plus élevé (électron Auger). Les électrons Auger sont caractérisés par une énergie cinétique propre indépendante du rayonnement X incident.

II.3.1.2. Analyse XPS

a. Spectres généraux et spectres spécifiques

L'analyse XPS permet d'obtenir un spectre représentant le nombre de photoélectrons détectés (en coups par seconde) en fonction de l'énergie de liaison (en eV). Deux types de spectres ont été acquis : les spectres généraux et les spectres spécifiques. Les spectres généraux (survey) ont été enregistrés sur une gamme d'énergie de liaison comprise entre 0 et 1200 eV avec une énergie de passage de 100 eV et un pas de 1 eV. Ces spectres permettent l'identification qualitative des principaux éléments présents à la surface de l'échantillon. Les spécifiques des différents niveaux de cœur considérés dans ce travail (C 1s, N 1s, O 1s, Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ et Mo 3d) ont été enregistrés avec une énergie de passage de 20 eV et un pas de 0.1 eV afin d'augmenter la résolution énergétique. Grâce à ces spectres, des informations chimiques (degré d'oxydation et environnement chimique) concernant les atomes dont les photoélectrons ont été éjectés peuvent être obtenues en étudiant les déplacements chimiques, c'est-à-dire les légères modifications de l'énergie de liaison.

b. Décomposition des spectres XPS

L'étude des déplacements chimiques par la décomposition des spectres haute résolution en une somme de contributions élémentaires (fitting), correspondant chacune à un état chimique de l'élément considéré, permet d'obtenir des informations quantitatives (environnement chimique, composition de la surface, épaisseur de la couche d'oxyde). D'une manière générale, l'énergie de liaison d'un élément augmente lorsque son degré d'oxydation augmente. Ce phénomène permet, entre autres, de décorréler les contributions provenant du substrat métallique et de la couche d'oxyde. Plusieurs règles ont été suivies pour réaliser cette décomposition spectrale.

Tout d'abord, il convient de soustraire le bruit de fond continu, qui est observable sur tout le domaine d'énergie. Deux phénomènes contribuent à ce fond continu. Premièrement, avant d'atteindre la surface de l'échantillon, un certain nombre de photoélectrons vont subir des collisions inélastiques, ce qui va entraîner une baisse de leur énergie cinétique. Deuxièmement, lorsqu'un électron passe au voisinage du noyau, il va subir une accélération qui peut causer l'émission d'un photon (radiation de Bremmstrahlung ou rayonnement de freinage). La soustraction du bruit de fond continu a été réalisée par la méthode itérative de Shirley.

Après soustraction du bruit de fond continu, la décomposition spectrale a été réalisée avec le logiciel Avantage de Thermo Electron (version 5.938). Les pics XPS ont été définis suivant leur énergie de liaison (caractéristique de l'élément et de son environnement chimique), leur Largeur à Mi-Hauteur (LMH), ou en anglais, *Full Width at Half Maximum* (FWHM), et leur forme (définie par le rapport Lorentzien/Gaussien ainsi que les paramètres d'asymétrie « *tail mix* » et « *tail exponent* »). Les écarts des énergies de liaison des différents pics au sein d'un spectre haute résolution ainsi que les largeurs à mi-hauteur de chaque pic ont été fixés. Pour les pics XPS symétriques, un rapport L/G de 30/70, un « *tail mix* » de 100 % et un « *tail exponent* » de 0 % ont été utilisés. Dans le cas des pics associés aux éléments métalliques dans les orbitales atomiques Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$ et Ni $2p_{3/2}$ et Mo 3d, une asymétrie des pics XPS a été introduite en modifiant le rapport L/G, le « tail mix » et le « tail exponent » (voir **Tableau D-1** en **Annexe D**). En effet, l'élargissement des pics XPS vers les hautes énergies de liaison est un phénomène caractéristique des métaux qui est lié à des pertes d'énergie des photoélectrons suite à la transition d'un électron de valence vers un niveau électronique partiellement occupé.

Pour la décomposition spectrale, il faut également prendre en compte le couplage spin-orbite, qui résulte de l'interaction entre le moment magnétique intrinsèque associé au spin de l'électron et du champ magnétique interne généré par le mouvement orbital du même électron. Pour une orbitale atomique caractérisée par les nombres quantiques n (nombre quantique principal) qui est un entier non nul, ℓ (nombre quantique secondaire) qui est un entier positif ou nul tel que $0 \leq \ell \leq n - 1$ (associé à une lettre : s, p, d, f…) et s (spin) qui vaut $\frac{1}{2}$ pour les électrons, le couplage spin-orbite est introduit par le nombre quantique j (moment angulaire total), tel que $|\ell - s| \leq j \leq \ell + s$. Ainsi, lorsque $\ell \geq 1$, le couplage spin-

orbite conduit à des doublets ayant des états d'énergie différents pour une même orbitale atomique (phénomène de dégénérescence). L'écart énergétique entre les doublets dépend de l'atome et de l'orbitale atomique considérés mais pas de la matrice dans laquelle l'élément se trouve. Le rapport des aires des pics XPS dans chaque doublet vérifie un ratio qui dépend de la dégénérescence de chaque état de spin (voir **Tableau II-4**).

Tableau II-4 Ratio des aires des doublets en fonction du nombre quantique ℓ (nombre quantique secondaire) et du nombre quantique j (moment angulaire total) en conséquence du couplage spin-orbite.

ℓ	Lettre	j	Ratio des aires
0	s	$\frac{1}{2}$	n. a.
1	p	$\frac{1}{2}$; $\frac{3}{2}$	1:2
2	d	$\frac{3}{2}$; $\frac{5}{2}$	2:3
3	f	$\frac{5}{2}$; $\frac{7}{2}$	3:4

Plus spécifiquement, pour l'orbitale atomique Mo 3d, un écart énergétique de 3.13 eV existe entre les doublets Mo $3d_{5/2}$ et Mo $3d_{3/2}$, si bien que les pics XPS de chacun des doublets se recouvrent partiellement (s'il y a plusieurs états chimiques). Ainsi, la décomposition spectrale du Mo 3d a été réalisée en prenant en compte les pics XPS correspondant à chacun des doublets en respectant un ratio d'aires 2:3. Pour tous les autres orbitales atomiques présentant des doublets (Fe 2p, Cr 2p et Ni 2p), l'écart énergétique est suffisant pour séparer les pics XPS de chacun des doublets, si bien qu'un seul doublet a été pris en compte pour réaliser la décomposition spectrale (Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$ et Ni $2p_{3/2}$).

Dans le cas des matériaux isolants ou semi-conducteurs, l'émission des photoélectrons s'accompagne d'une accumulation de charges positives à la surface de l'échantillon. Cet effet de charge entraîne une baisse de l'énergie cinétique des photoélectrons et donc un décalage plus ou moins important des pics XPS vers les hautes énergies de liaison et/ou une déformation des pics XPS. Dans certains cas, seulement une partie de l'échantillon est sujet à l'effet de charge, ce qui entraîne un effet de charge différentiel. L'effet de charge peut être compensé par l'utilisation du « *Flood Gun* » qui envoie des électrons de faible énergie à la surface de l'échantillon afin de compenser et neutraliser la charge de surface. Ce dispositif n'a pas été utilisé dans ces travaux.

c. Analyse quantitative

Après la décomposition spectrale, les spectres XPS peuvent être interprétés de manière quantitative. Pour cela, on considère la relation générale suivante, qui relie l'intensité des photoélectrons (proportionnelle à l'aire du pic XPS) et les paramètres du spectromètre et de l'échantillon :

$$I_X^M(z) = k \times T(E_C^X) \times \sigma_X \times \int D_X^M(z) \times exp\left(-\frac{z}{\lambda_X^M \times \sin(\theta)}\right) dz \qquad \textbf{Equation II-2}$$

avec :

z : une variable caractéristique de la profondeur analysée de l'échantillon ;
$I_X^M(z)$: l'intensité des photoélectrons émis par un élément X dans une matrice M à la profondeur z (CPS.eV) ;
k : une constante caractéristique du spectromètre qui inclut le flux de photons, l'aire analysée de l'échantillon, et le rendement du détecteur ;
$T(E_C^X)$: le facteur de transmission de l'analyseur qui dépend de l'énergie cinétique des photoélectrons émis par l'élément X et du niveau de cœur considéré ;
σ_X : la section efficace de photoionisation pour le niveau de cœur considéré de l'élément X ;
$D_X^M(z)$: la densité de l'élément X dans la matrice M à la profondeur z (mol.cm^{-3})
λ_X^M : le libre parcours moyen inélastique des photoélectrons émis par l'éléments X dans la matrice M (nm), correspondant à la distance moyenne parcourue par l'électron entre deux chocs inélastiques ;
θ : l'angle d'émergence, c'est-à-dire l'angle entre la surface de l'échantillon et la direction dans laquelle les photoélectrons sont analysés (degrés).

Le **Tableau D-2** (**Annexe D**) synthétise les valeurs des facteurs de transmission pour l'analyseur du spectromètre Escalab 250, des sections efficaces de photoionisation à 1486.6 eV, calculées par Scofield **[Scofield, 1976]**, et des libres parcours moyens, calculés par la méthode de Tanuma, Powell et Penn (TPP2M) **[Tanuma, 1991]** grâce au programme QUASES-IMFP-TPP2M.

Pour un angle d'émergence de 90°, cette relation souligne que 95 % du signal provient d'une profondeur inférieure ou égale à 3λ. Quel que soit l'élément chimique considéré, cette valeur est inférieure à 10 nm. Ainsi, les couches d'épaisseur supérieure à 10 nm seront considérées « infinies » alors que les épaisseurs des couches inférieures à 10 nm pourront être déterminées par XPS. L'intégration de l'**Equation II-2** (ici pour un angle d'émergence de 90°) peut mener à différents cas de figure selon le modèle représentant la surface étudiée. Différents exemples sont donnés ci-dessous (**Figure II-6**). A partir de ces cas de figure, d'autres systèmes d'équations associés à d'autres types de modèles plus complexes peuvent être définis.

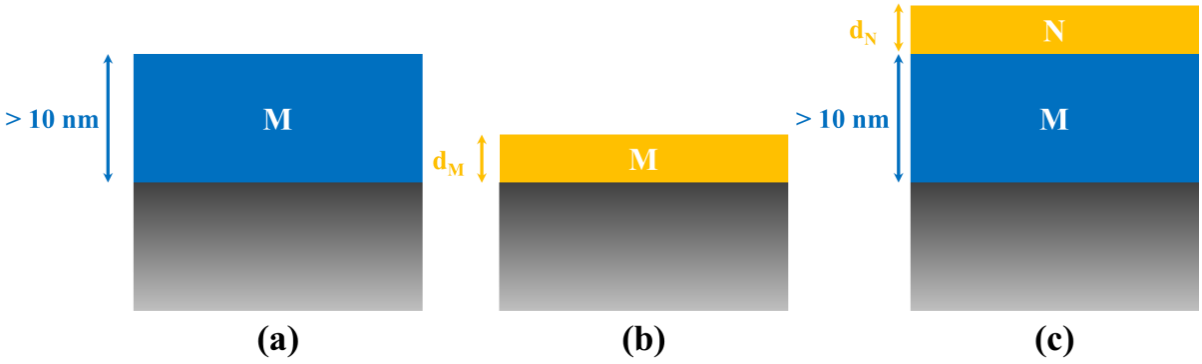


Figure II-6 Exemples de modèles représentant la surface étudiée par XPS.

Comme représenté sur la **Figure II-6-a**, pour un élément X présent dans une couche homogène et continue M d'épaisseur infinie (> 10 nm), on obtient (pour un angle d'émergence de 90°) :

$$I_X^M = k \times T(E_C^X) \times \sigma_X \times D_X^M \times \lambda_X^M \qquad \textbf{Equation II-3}$$

Comme représenté sur la **Figure II-6-b**, pour un élément X présent dans une couche homogène et continue M d'épaisseur finie (< 10 nm) notée d_M (nm), on obtient :

$$I_X^M = k \times T(E_C^X) \times \sigma_X \times D_X^M \times \lambda_X^M \times \left[1 - exp\left(-\frac{d_M}{\lambda_X^M}\right)\right] \qquad \textbf{Equation II-4}$$

Comme représenté sur la **Figure II-6-c**, pour un élément X présent dans une couche homogène et continue M d'épaisseur infinie (> 10 nm) au-dessus de laquelle se trouve une couche homogène et continue N d'épaisseur finie (< 10 nm) notée d_N (nm), on obtient :

$$I_X^M = k \times T(E_C^X) \times \sigma_X \times D_X^M \times \lambda_X^M \times exp\left(-\frac{d_N}{\lambda_X^N}\right)$$ **Equation II-5**

II.3.1.3. Instrumentation

L'appareil utilisé est un spectromètre Escalab 250 de la société Thermo Electron, représenté sur la **Figure II-7**. Il se compose de trois chambres principales : un sas d'introduction qui permet le passage rapide de la pression atmosphérique à une pression de l'ordre de 10^{-6} mbar ; une chambre de préparation qui permet de décaper ou de chauffer l'échantillon où la pression est comprise entre 10^{-8} et 10^{-9} mbar ; une chambre d'analyse où l'analyse XPS a lieu et la pression est maintenue entre 10^{-9} et 10^{-10} mbar (ultravide). Une source de rayons X d'aluminium Al Kα monochromatisée et focalisée a été utilisée, avec une énergie de 1486.6 eV. Sauf indication contraire, l'angle d'émergence (θ) utilisé était de 90° (angle entre la surface de l'échantillon et la direction dans laquelle les photoélectrons sont analysés). Les éventuels effets de charge n'ont pas été compensés.

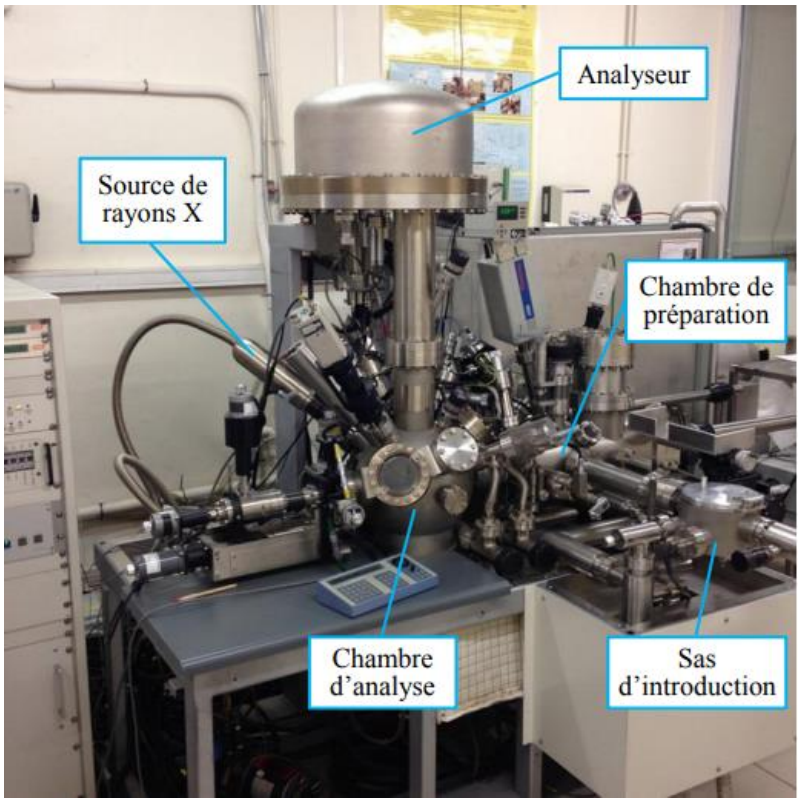


Figure II-7 Photographie du spectromètre Thermo Electron Escalab 250 utilisé pour les analyses XPS dans l'équipe PCS de l'IRCP.

II.3.2. Spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS)

II.3.2.1. Principe du ToF-SIMS

La spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS – *Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*) est une technique d'analyse de surface dotée d'une très grande sensibilité (ppm voire ppb) qui permet d'obtenir des informations élémentaires, isotopiques et moléculaires de la surface de l'échantillon avec une très grande résolution en masse et/ou latérale.

Au cours d'une analyse SIMS, la surface de l'échantillon est bombardée par un faisceau d'ions primaires avec une énergie de plusieurs keV. La dissipation de l'énergie des ions primaires résulte en une cascade de collisions sur les 2 ou 3 premières monocouches atomiques, avec rupture des liaisons chimiques et l'émission de particules secondaires (processus d'émission), comme représenté sur la **Figure II-8**. La majorité des espèces pulvérisées est neutre (atomes ou molécules) alors qu'une faible proportion sont des ions chargés positivement ou négativement, qui peuvent être analysés **[Senoner, 2012]**. Les ions secondaires ainsi émis sont accélérés dans le spectromètre grâce à l'application d'un champ électrique engendré par une tension d'accélération (V_{acc}) puis sont analysés en masse grâce à la mesure du temps nécessaire pour voyager de l'entrée de l'analyseur jusqu'au détecteur (temps de vol).

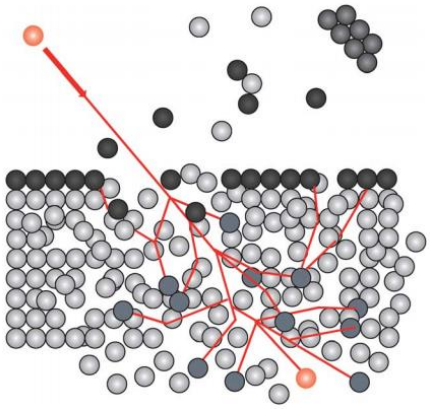


Figure II-8 Représentation schématique de la cascade de collisions suite au bombardement par un faisceau d'ions primaires (rouge) entraînant l'émission de particules secondaires (gris/noir) **[Senoner, 2012]**.

L'énergie cinétique des ions secondaires peut s'écrire :

$$E_C = q \times V_{acc}$$ **Equation II-6**

mais aussi :

$$E_C = \frac{1}{2} \times m \times v^2$$ **Equation II-7**

avec q la charge de l'ion secondaire, V_{acc} la tension d'accélération, m la masse de l'ion secondraire et v la vitesse de l'ion secondaire.

La combinaison de l'**Equation II-6** et de l'**Equation II-7** permet de définir la relation entre le temps de vol (t_{vol}), la longueur du parcours (L), la masse (m) et la charge de l'ion (q) ainsi que la tension d'accélération (V_{acc}) :

$$t_{vol} = \frac{L}{v} = L \times \sqrt{\frac{m}{2 \times q \times V_{acc}}}$$ **Equation II-8**

Ainsi, la mesure du temps de vol permet de déterminer le rapport masse/charge des ions secondaires. La résolution en masse est exprimée par le pouvoir de résolution en masse M/ΔM. Par exemple, un pouvoir de résolution de 10 000 signifie que l'on peut séparer des ions de masses 100.00 et 100.01. On obtient alors un spectre de masse qui représente l'intensité des ions secondaires analysés en fonction du rapport masse/charge, ce qui permet une analyse chimique détaillée de la surface.

Cependant, le ToF-SIMS n'est pas une technique d'analyse quantitative. En effet, le rendement de pulvérisation (quantité de particules secondaires émises) mais aussi les rendements ioniques (quantités d'ions secondaires positifs et négatifs émis) dépendent de la matrice et ne sont pas connus précisément. De plus, les ions secondaires ne représentent qu'une faible proportion des particules pulvérisées. Le ToF-SIMS est par nature une technique d'analyse destructive, car le bombardement d'ions primaires induit une perte des particules pulvérisées. Elle induit également d'autres effets tels que l'implantation ionique ou le « *mixing* » (mélange des atomes au cours de l'analyse).

II.3.2.2. Analyse ToF-SIMS

Trois modes d'analyse ToF-SIMS peuvent être utilisés, qui permettent d'obtenir des informations différentes : le mode spectroscopie, le mode profil et le mode imagerie chimique.

a. Mode spectroscopie

En mode spectroscopie, des spectres de masse sont obtenus avec résolution en masse très élevée (M/ΔM de l'ordre de 10 000). Ce mode permet une analyse isotopique ou élémentaire des espèces présentes en surface mais aucune information en profondeur n'est obtenue.

b. Mode profil

En mode profil, deux faisceaux d'ions sont utilisés (*dual beam mode*) : un faisceau d'ions primaires pour l'analyse (Bi^+) et un faisceau d'ions pour l'érosion (Cs^+). L'alternance des cycles de décapage et d'analyse au centre du cratère d'érosion préalablement réalisé permet d'obtenir des spectres de masse à différents temps de décapage (proportionnel à la profondeur du cratère) et de construire un profil de composition en profondeur qui représente l'intensité de chaque ion secondaire en fonction du temps de décapage. Dans ces travaux, l'interface métal/oxyde a été positionnée à un temps de décapage correspondant à 80 % de l'intensité maximale de l'ion Ni_2^- (caractéristique du nickel métallique). La vitesse de décapage de la couche d'oxyde a pu être estimée sur la base de précédents travaux portant sur des oxydes de fer, de nickel et de chrome **[Mazenc, 2012]**. Des ratios CrO_2^- / FeO_2^- et MoO_3^- / FeO_2^- ont été calculés en divisant les aires des pics de ces différents ions sur le spectre de masse, cumulés dans une gamme de temps de décapage correspondant à la profondeur de l'oxyde. Ces ratios ont permis de discuter comparativement les teneurs en chrome et en molybdène de la couche d'oxyde, respectivement.

c. Mode imagerie chimique

En mode imagerie chimique, une cartographie 2D des ions secondaires sur la surface de l'échantillon est obtenue. Une résolution latérale de l'ordre de 150 nm peut être obtenue en réduisant le courant du faisceau d'ions primaires. La contrepartie est ici la dégradation de la

résolution en masse du fait de l'utilisation de pulses larges **[Seyeux, 2011]**. Dans ce mode, la résolution en masse peut être améliorée en utilisant un faisceau d'ions primaires (Bi^+) séparé en 4 petits pulses qui possèdent chacun une bonne résolution en masse. De plus, des cartographies 3D peuvent être réalisées en couplant le faisceau d'ions primaire (Bi^+) séparé en 4 pulses à un faisceau d'ions de décapage (Cs^+). Cette configuration permet d'obtenir de hautes résolutions en masse et latérale, mais les temps d'analyse sont très longs. Grâce aux cartographies 3D, des profils peuvent être extraits sur des zones particulières de la surface (zones d'intérêt) et des informations locales peuvent être obtenues.

II.3.2.3. Instrumentation

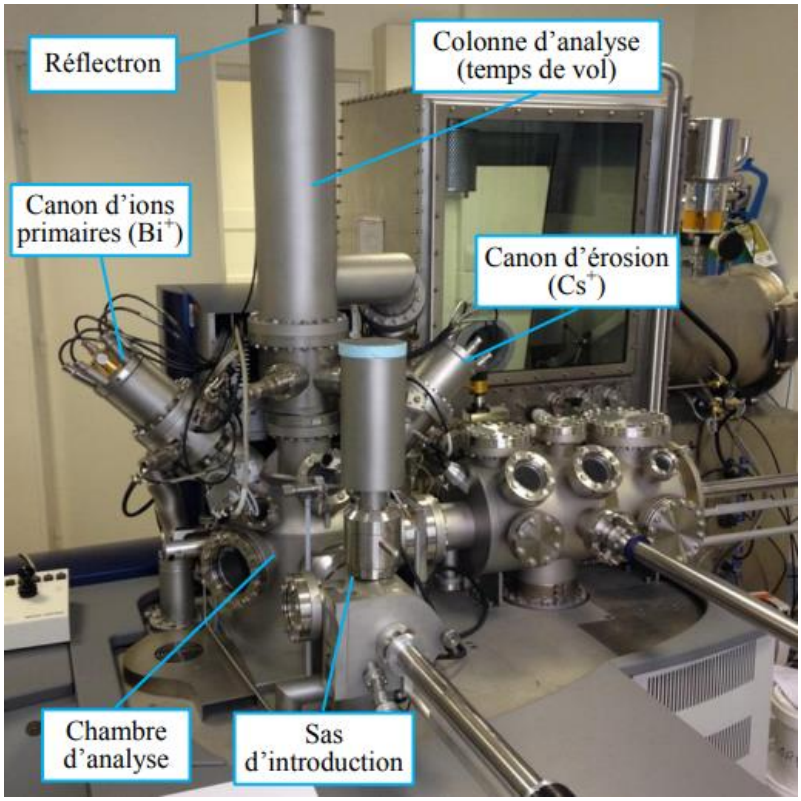


Figure II-9 Photographie du spectromètre IonToF ToF-SIMS 5 utilisé pour les analyses ToF-SIMS dans l'équipe PCS de l'IRCP.

L'appareil utilisé est un spectromètre ToF-SIMS 5 de la société IonToF, représenté sur la **Figure II-9**. Il comprend un sas d'introduction qui permet le passage rapide de la pression atmosphérique à une pression de l'ordre de 10^{-6} mbar et une chambre d'analyse où la pression est maintenue inférieure à 10^{-9} mbar. Une chambre de préparation est également disponible pour chauffer l'échantillon. Comme détaillé précédemment, l'analyseur à temps de vol permet

d'associer le temps de vol des ions secondaires à leur rapport masse/charge. Le réflectron permet une amélioration de la résolution en masse en augmentant la distance du parcours dans l'analyseur et en corrigeant la dispersion en énergie cinétique des ions secondaires de rapports masse/charge identiques. L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés avec le logiciel SurfaceLab (version 6.5).

Avant analyse, la surface a été décapée pendant quelques secondes avec un faisceau d'ions Cs^+ de manière à retirer la couche de contamination carbonée. Un canon d'ions primaires Bi^+ pulsé avec une énergie de 25 keV a été utilisé. Le flux d'ions primaires a été maintenu inférieur à 10^{12} ions/cm² de manière à utiliser le ToF-SIMS en mode statique, c'est-à-dire que la probabilité que deux ions primaires (Bi^+) arrivent sur la même zone de la surface est nulle. Un canon d'ions Cs^+ avec une énergie de 500 eV ou de 1 keV a été utilisé pour le décapage de la surface. L'énergie, le courant et l'aire des faisceaux seront précisés au cas par cas dans la suite de ce document. Les angles d'incidence entre les canons ioniques et la surface de l'échantillon sont de 45°. Les ions secondaires négatifs ont été analysés (polarité négative), car ils présentent un meilleur rendement dans les matrices oxydées que dans les matrices métalliques.

II.3.3. Caractérisation morphologique de la surface

II.3.3.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM – *Scanning Electron Microscopy*) est une technique d'imagerie qui permet d'obtenir des informations concernant la morphologie et la chimie des surfaces. La surface de l'échantillon est balayée par un faisceau d'électrons accélérés par une tension qui interagissent avec un certain volume du matériau appelé « poire d'interaction ». Les interactions électrons-matière (élastiques et inélastiques) entraînent l'émission de différentes particules et radiations, en particulier : des électrons secondaires de faible énergie (< 50 eV) qui sont émis des couches proches de la surface (< 10 nm), des électrons rétrodiffusés de forte énergie (> 50 eV) qui sont émis des couches plus profondes (plusieurs centaines de nm) et des rayons X qui permettent une analyse chimique de la surface (EDX – *Energy-Dispersive X-ray spectroscopy*). Des détecteurs spécifiques sont utilisés pour analyser les électrons secondaires, les électrons primaires et les rayons X.

Les images MEB ont été obtenues avec un microscope Jeol 7000F équipé d'un canon à effet de champ (FEG – *Field Emission Gun*). La tension d'accélération était de 10 ou 15 kV. Dans ces travaux, deux types d'images ont été obtenues : des images en électrons rétrodiffusés qui donnent un contraste chimique et topologique de la surface et des images en électrons secondaires qui donnent un contraste uniquement topologique.

II.3.3.2. Microscopie à épifluorescence

Les bactéries (marquées au DAPI) adhérant à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 ont été observées avec un microscope BX51 de la société Olympus, dont le principe de fonctionnement est représenté sur la **Figure II-10**. Il s'agit d'un microscope optique qui permet de visualiser la fluorescence émise par un échantillon. Une lampe et un filtre d'excitation permettent d'exciter les substances fluorescentes (ici le DAPI fixé à l'ADN des bactéries) par le dessus avec une radiation d'une longueur d'onde caractéristique (ici $\lambda \approx 345$ nm). Un miroir dichroïque est utilisé afin de réfléchir la radiation d'excitation vers l'échantillon et de laisser passer par transmission les radiations émises par l'échantillon. La fluorescence émise à une longueur d'onde caractéristique (ici $\lambda \approx 455$ nm) est détectée grâce à un filtre d'émission.

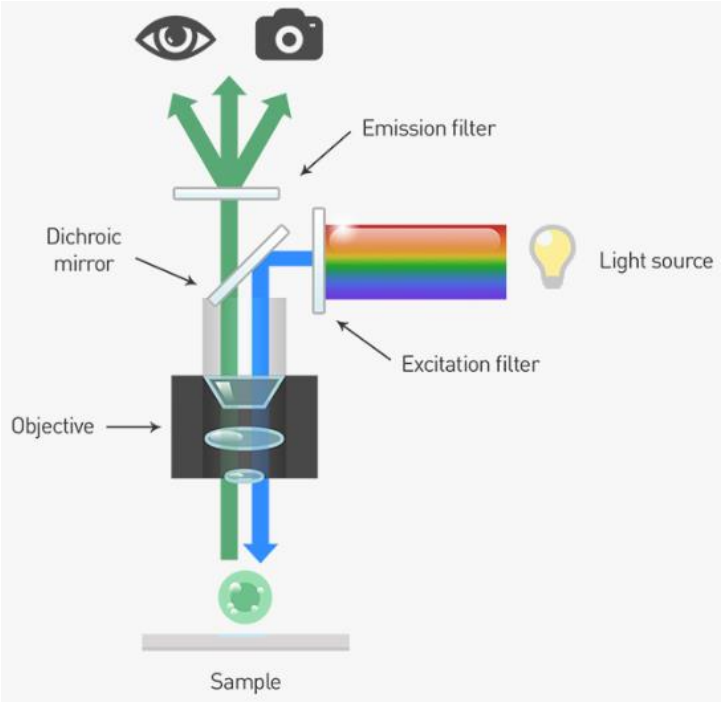


Figure II-10 Principe de fonctionnement de la microscopie à épifluorescence et représentation du trajet optique (*www.thermofisher.com*).

Dans ces travaux, les images ont été prises avec un grossissement de ×400 (objectif : ×40, oculaire : ×10). Au minimum 10 champs par échantillon et trois échantillons différents ont été observés. Afin de déterminer le taux de recouvrement bactérien et le nombre total de bactéries adhérentes, l'analyse d'image a été réalisée avec le logiciel analySIS version 3.2.

II.3.3.3. Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (AFM – *Atomic Force Microscopy*) est une technique qui permet d'obtenir une cartographie de la topologie de la surface d'un échantillon avec une résolution verticale pouvant être inférieure au nanomètre. Tous types d'échantillons peuvent être analysés, y compris les échantillons isolants. Un levier (aussi appelé cantilever) muni d'une pointe balaie la surface de l'échantillon (**Figure II-11**). Les atomes situés à l'extrémité de la pointe interagissent avec les atomes de la surface par des forces attractives et/ou répulsives, entraînant une déflexion du levier qui est mesurée grâce à un faisceau laser réfléchi sur le levier et mesuré par une photodiode.

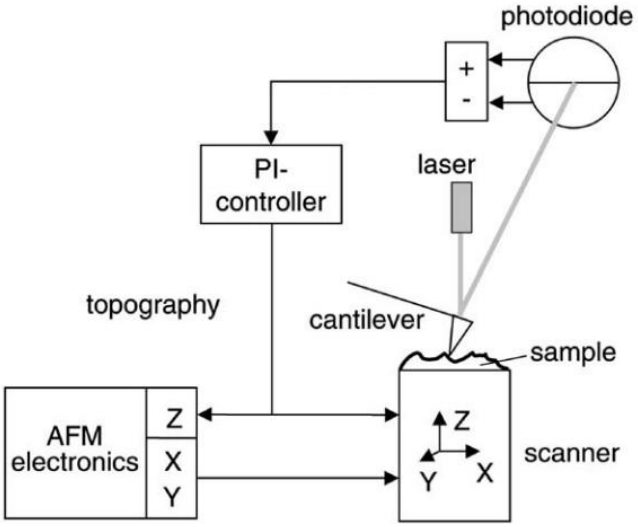


Figure II-11 Représentation schématique du fonctionnement de l'AFM **[Schitter, 2004]**.

Trois modes peuvent être utilisés en AFM, qui dépendent de la distante pointe-échantillon et des interactions mesurées (**Figure II-12**) :

- Le mode contact : Dans ce mode, la pointe et la surface de l'échantillon sont en contact et des interactions répulsives sont mesurées. Une très bonne résolution verticale est obtenue, mais le contact constant entre la pointe et l'échantillon peut entraîner une détérioration de la pointe comme de l'échantillon.

- Le mode non-contact : Dans ce mode (essentiellement utilisé sous ultravide), la pointe oscille à une fréquence proche de sa fréquence de résonance sans entrer en contact avec la surface de l'échantillon. Dans ce cas, des interactions attractives sont mesurées. La résolution verticale est moins bonne qu'en mode contact mais la pointe et l'échantillon ne sont pas endommagés au cours de la mesure.
- Le mode contact intermittent : Ce mode est le plus couramment utilisé. La pointe oscille à une fréquence proche de sa fréquence de résonance et entre ponctuellement en contact avec la surface de l'échantillon, ce qui entraîne des modifications de l'amplitude, la phase et la fréquence de résonance du levier. Il s'agit d'un mode intermédiaire entre le mode contact et le mode non-contact qui permet de réduire la détérioration de la pointe et de l'échantillon.

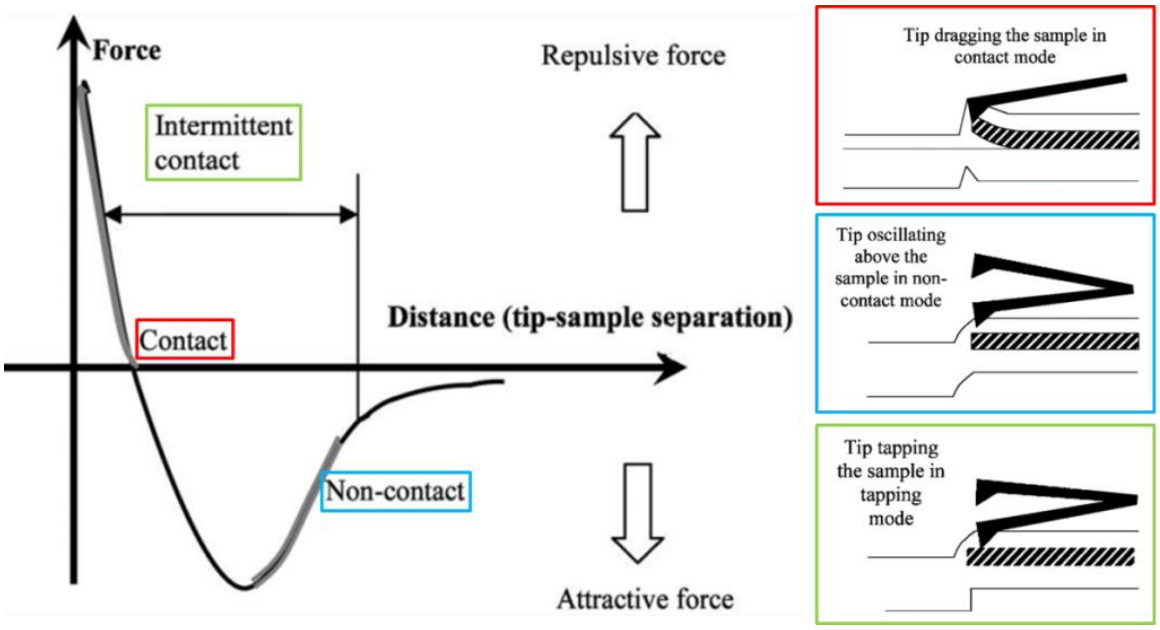


Figure II-12 Variation des forces interatomiques en fonction de la distance pointe-échantillon et modes d'analyse AFM. D'après Jalili *et al.* **[Jalili, 2004]**.

Dans ces travaux, les analyses AFM ont été réalisées avec un microscope Nano-Observer de la société CSI. Les images ont été obtenues dans le mode contact intermittent (images de hauteur, d'amplitude et de phase). Une pointe en silicium pyramidale fournie par la société AppNano a été utilisée. La hauteur de la pointe est comprise entre 14 et 16 µm, le rayon de courbure de l'extrémité de la pointe est de 6 nm, la constante de raideur est de 1.6 $N.m^{-1}$ et la fréquence de résonance nominale est de 61 kHz. Les images ont été traitées avec le logiciel Gwyddion version 2.49.

II.3.4. Caractérisation électrochimique

II.3.4.1. Cellule électrochimique

Des essais d'électrochimie ont été réalisés afin d'étudier le comportement électrochimique de l'acier duplex 2304 (après préparation d'un film d'oxyde natif) au cours de l'adhésion de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 et la formation d'un biofilm dans le milieu ASW+N. En effet, les techniques électrochimiques permettent d'étudier les différentes réactions d'oxydo-réduction faisant intervenir aussi bien le métal (par exemple les réactions de corrosion ou de passivation) que l'environnement (par exemple la réduction de l'oxygène dissous).

Un montage à trois électrodes a été utilisé, représenté sur la **Figure II-13**, comprenant :

- Une électrode de travail, correspondant à l'échantillon étudié (alliage duplex 2304), maintenu dans un porte-échantillon. L'étanchéité entre l'échantillon et l'électrolyte est assurée par un joint. La surface de travail est de 4.2 cm².
- Une électrode de référence au calomel saturée en chlorure de potassium (ECS, $Hg/Hg_2Cl_2/KCl$ saturé, $E = +248$ mV/ENH à 25°C) qui est placée dans une allonge remplie de l'électrolyte remplie d'une solution de KCl saturée et stérile. L'utilisation de cette allonge évite un contact direct entre l'électrode de référence et l'électrolyte et une contamination de l'électrode par les espèces présentes dans le milieu.
- Une contre-électrode en platine.

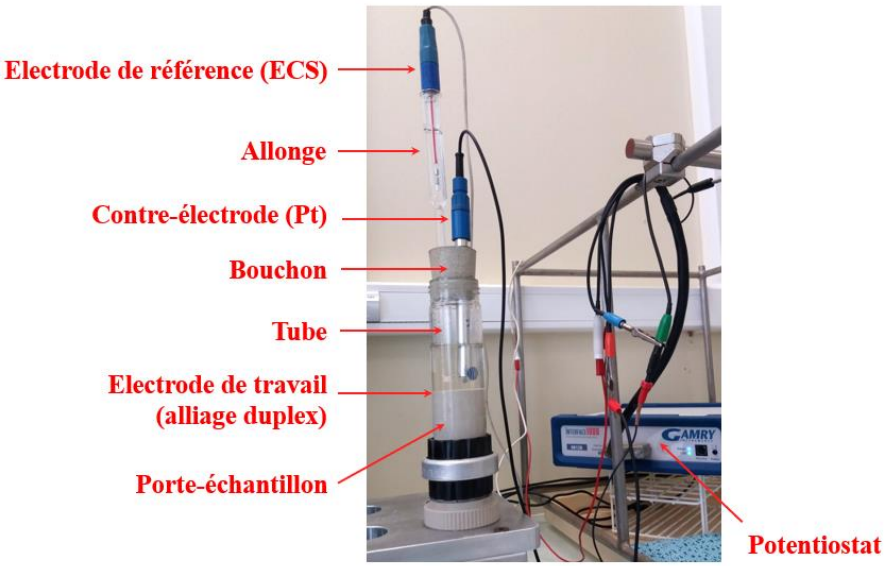


Figure II-13 Montage à trois électrodes utilisé pour la caractérisation électrochimique.

Les essais ont été réalisés avec un potentiostat Gamry Interface 1000. Une cellule électrochimique en verre de forme cylindrique a été utilisée. L'électrode de travail, maintenue dans le porte-échantillon, a été placée au fond de la cellule. L'allonge contenant l'électrode de référence et la contre-électrode, maintenues par un bouchon en caoutchouc percé, ont été placées par le haut de la cellule, de manière à assurer l'étanchéité du dispositif. Un volume d'électrolyte (non désaéré) de 50 mL a été ajouté. Les expériences ont été réalisées à 20°C en conditions statiques.

II.3.4.2. Stérilisation et décontamination

Afin d'éviter une croissance indésirable de microorganismes au cours des essais d'électrochimie (plus particulièrement pour les expériences témoins réalisées sur des temps longs), une procédure de stérilisation et de décontamination du matériel a été développée.

La stérilisation (réalisée avant utilisation) comprend :

- Une stérilisation par immersion dans de l'éthanol à 70°C pendant au moins 4 heures de la cellule, du porte-échantillon, des joints, de la contre-électrode et du bouchon, suivie par un séchage.
- Une stérilisation par autoclave pendant 20 min à 121°C de la cellule, du porte-échantillon et des joints suivie par un refroidissement.

La décontamination (réalisée après utilisation) comprend :

- Une décontamination de la contre-électrode, de l'allonge, de l'électrode de référence et du bouchon en caoutchouc avec solution désinfectante suivie par un rinçage à l'eau distillée stérile.
- Une décontamination par immersion dans de l'eau de Javel pendant environ 10 min de la cellule, du porte-échantillon et des joints.
- Une décontamination par autoclave pendant 30 min à 120°C de la cellule, du porte-échantillon et des joints suivie par un rinçage à l'eau de Javel et d'un nettoyage au lave-vaisselle.

II.3.4.3. Suivi du potentiel à l'abandon (OCP)

Le potentiel à l'abandon, aussi appelé potentiel libre ou potentiel de circuit ouvert (OCP – *Open Circuit Potential*) correspond au potentiel mesuré entre l'électrode de travail et l'électrode de référence pour un courant net nul. La valeur de l'OCP dépend du matériau (électrode de travail), de l'électrolyte, de la température et des conditions hydrodynamiques. Dans ces travaux, un suivi de l'OCP a été réalisé pendant 1 heure, 24 heures et 1 semaine dans le milieu ASW+N stérile ou bactérien (temps similaires aux essais d'adhésion bactérienne).

II.3.4.4. Courbes de polarisation

L'acquisition de courbes de polarisation consiste à faire varier la différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence en imposant une certaine vitesse de balayage (mV/s) et à mesurer la variation du courant. Selon le potentiel appliqué, l'électrode de travail peut être une anode (réactions d'oxydation) ou une cathode (réactions de réduction). Des informations concernant les processus électrochimiques anodiques et cathodiques peuvent être obtenues. Après avoir suivi l'évolution du potentiel à l'abandon pendant 1 heure, 24 heures ou 1 semaine, des courbes de polarisation anodiques et cathodiques ont été réalisées (séparément) en partant d'un potentiel de -20 ou $+20$ mV/OCP, respectivement, avec une vitesse de balayage de 0.17 mV/s.

CHAPITRE III : Comparative study of the surface oxide films on lean duplex and corresponding single phase stainless steels by XPS and ToF-SIMS

III.1. Abstract

The surface oxide films formed after mechanical polishing on Duplex Stainless Steel and corresponding single phase alloys were characterized by XPS and ToF-SIMS. The native oxide films are mixtures of oxides and hydroxides composed of Fe(III), Mo(IV) and Mo(VI) in the outer region and Cr(III) in the inner region. Nickel, molybdenum and nitrogen are enriched in the underlying metal while chromium and molybdenum are enriched in the oxide layer. The contents of alloying elements in the oxide layer and/or in the underlying metal were found to be directly related to their content in the bulk of the alloys.

III.2. Introduction

III.2.1. State of the art

Duplex Stainless Steels (DSSs) are complex alloys with a two-phase microstructure composed of austenite and ferrite. DSSs combine high strength and high corrosion resistance together with reduced alloying cost (thanks to low Ni and Mo contents) compared to austenitic counterparts. They can therefore be used in a wide range of industrial sectors such as desalination plants, oil and gas production, pulp and paper industry or reinforced concrete structures **[Moura, 2008]**, **[Addari, 2008]**, **[Kocijan, 2011]**, **[Peguet, 2011]**, **[Mesquita, 2012]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Erazmus-Vignal, 2015]**. Due to solubility differences of alloying elements in Face-Centered Cubic (austenite) and Body-Centered Cubic (ferrite) structures, the two phases of DSSs exhibit different chemical compositions: Ni and N contents are higher in the gamma phase (austenite) whereas Cr and Mo contents are higher in the alpha phase

(ferrite) **[Olsson, 1995]**, **[Schimt-Rieder, 1999]**, **[Femenia, 2004]**, **[Vignal, 2010]**, **[Peguet, 2011]**, **[Vignal, 2011]**, **[Mesquita, 2012]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Vignal, 2014]**.

Corrosion resistance of stainless steels is ensured by the spontaneous formation of a surface oxide layer, commonly referred to as the passive film, which leads to a marked decrease in the dissolution kinetics of the underlying alloy. Passivation of austenitic and ferritic stainless steels has been extensively studied in the literature for decades **[Asami, 1978]**, **[Hashimoto, 1979a]**, **[Olefjord, 1980]**, **[Goetz, 1984]**, **[Brooks, 1986]**, **[Clayton, 1986]**, **[Marcus, 1988]**, **[Calinsky, 1989]**, **[Mathieu, 1989]**, **[Kirchheim, 1990]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[Mischler, 1991]**, **[De Vito, 1992]**, **[Marcus, 1992a]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Haupt, 1995]**, **[Halada, 1996]**, **[Maurice, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Marcus, 1998]**, **[Maurice, 1998]**, **[Olsson, 2002]**, **[Olsson, 2003]**, **[Keller, 2004]**, **[Ha, 2009]**, **[Fajardo, 2010]**, **[Fredriksson, 2010]**, **[Hamada, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Fredriksson, 2012]**, **[Jung, 2012]**, **[Macdonald, 2012]**, **[Maurice, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Fajardo, 2014]**, **[Maurice, 2015]**, **[Seyeux, 2015]**, **[Tardio, 2015]**, **[Jiang, 2017]** whereas the amount of studies is more limited in the case of DSSs **[Olsson, 1995]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Schmidt-Rieder, 1999]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Abreu, 2004]**, **[Femenia, 2004]**, **[Addari, 2008]**, **[Bautista, 2009]**, **[Donik, 2009a]**, **[Donik, 2009b]**, **[He, 2009]**, **[Donik, 2010]**, **[Fredriksson, 2010]**, **[Vignal, 2010]**, **[Kocijan, 2011]**, **[Luo, 2011]**, **[Vignal 2011]**, **[Luo, 2012]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Vignal, 2014]**, **[Guo, 2014]**, **[Wang, 2015]**, **[Luo, 2017a]**. The passive film is generally described as a mixed oxi-hydroxide layer composed mainly of chromium and iron, typically 1-3 nm thick. Chromium and iron are usually found in their trivalent states, preferentially in the inner and outer parts of the passive film, respectively. For a sufficient chromium content in the alloy **[Asami, 1978]**, **[Calinsky, 1989]**, **[Haupt, 1995]**, preferential chromium oxidation and/or preferential iron dissolution in acidic media leads to a significant Cr(III) enrichment in the oxide layer, conferring to the passive film its protective nature.

The characteristics of the passive film as well as of the underlying metal strongly depend on the composition of the alloy **[Okamoto, 1973]**, **[Frankenthal, 1976]**, **[Asami, 1978]**, **[Hashimoto, 1979a]**, **[Olefjord, 1980]**, **[Goetz, 1984]**, **[Clayton, 1986]**, **[Marcus, 1988]**, **[Calinsky, 1989]**, **[Mathieu, 1989]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[Mischler, 1991]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Halada, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Olsson, 2002]**, **[Olsson, 2003]**, **[Ha, 2009]**, **[Fredriksson, 2010]**, **[Jung, 2012]**, **[Högström,**

2013], **[Mesquita, 2013]**, **[Maurice, 2015]**, the surface preparation **[Calinsky, 1989]**, **[Maurice, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Maurice, 1998]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Vignal, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Vignal 2011]**, **[Vignal, 2014]**, **[Maurice, 2015]** as well as the subsequent exposure conditions **[Olsson, 1994]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Addari, 2008]**, **[Bautista, 2009]**, **[Kocijan, 2011]**, **[Vignal 2011]**, **[Jung, 2012]**, **[Luo, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Vignal, 2013]**, **[Seyeux, 2015]**, **[Tardio, 2015]**. The Cr(III) enrichment is often reported to be more pronounced for electrochemically-formed passive films than for air-formed passive films, also referred to as native oxide films, due to preferential iron dissolution during passivation in acidic electrolyte electrolyte **[Calinsky, 1989]**, **[Haupt, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Olsson, 2011]**, **[Maurice, 2015]**. A small amount of oxidized molybdenum is detected for Mo-bearing stainless steels **[Hashimoto, 1979a]**, **[Olefjord, 1980]**, **[Goetz, 1984]**, **[Clayton, 1986]**, **[Marcus, 1988]**, **[Mathieu, 1989]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Mischler, 1991]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Halada, 1996]**, **[Olsson, 2002]**, **[Högström, 2013]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Maurice, 2015]** including DSSs **[Olsson, 1995]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Kocijan, 2011]**, **[Luo, 2011]**, **[Guo, 2014]**. Mo(VI) is reported to be enriched in the surface region, while Mo(IV) distribution through the passive film is more homogeneous **[Olefjord, 1990]**, **[Olsson, 1994]**, **[Olsson, 2003]**. The extent of chromium and molybdenum oxides enrichment during electrochemical passivation and the thickness of the oxide layer depend on the applied potential **[Okamoto, 1973]**, **[Asami, 1978]**, **[Olefjord, 1980]**, **[Goetz, 1984]**, **[Calinsky, 1989]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Mischler, 1991]**, **[Haupt, 1995]**, **[Olsson, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Olsson, 2002]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Keller, 2004]**, **[He, 2009]**, **[Luo, 2011]**, **[Guo,2014]**, the passivation time **[Calinsky, 1989]**, **[Haupt, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Maurice, 2015]**, **[Jiang, 2017]**, the pH **[Calinsky, 1989]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]** and the temperature **[Mischler, 1991]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]** of the electrolyte and the presence of chloride or sulfate ions in the electrolyte **[Brooks, 1986]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Mischler, 1991]**.

For Ni-bearing austenitic and duplex stainless steels, the selective oxidation of iron and chromium leads to a very low and often non-detectable amount of oxidized nickel in the passive film, while metallic nickel is enriched in the underlying metal **[Frankenthal, 1976]**, **[Clayton, 1986]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**,

[Maurice, 1998], **[Shimizu, 2000]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Addari, 2008]**, **[Hamada, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Fredriksson, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**, **[Tardio, 2015]**. Nitrogen can be enriched by anodic segregation during passivation **[Marcus, 1992a]**, leading to the formation of a mixed-nitride phase either at the metal/oxide interface or incorporated in the passive film **[Willenbruch, 1990]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Halada, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Ha, 2009]**.

A key question related to the passivity of DSSs is the link between the chemical heterogeneity of austenite and ferrite phases and the chemical composition of the oxide layer formed on both phases. The local investigation of the passive film formed on austenite and ferrite phases of DSSs faces major technical difficulties given the depth and lateral resolutions required, explaining the low number of studies dealing with this subject. Up to now, the most used technique for this local characterization was Auger Electron Spectroscopy (AES) or Scanning Auger Electron Spectroscopy (SAES) **[Olsson, 1995]**, **[Schmidt-Rieder, 1999]**, **[Femenia, 2004]**, **[Vignal, 2010]**, **[Vignal, 2011]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Vignal, 2014]**. Published data tend to indicate that the nickel and nitrogen enrichments in the metal under the passive film are more pronounced on the austenite phase due to higher nickel and nitrogen bulk contents. Femenia *et al.* **[Femenia, 2004]** indicated that the composition gradient across the phase boundary occurred within a few micrometers. In many cases, slightly higher chromium content was found in the passive film formed on the ferrite phase as a result of higher chromium bulk content. However, AES technique is limited by preferential sputtering effects in the case of molybdenum as well as by the lack of information on the oxidation states **[Olsson, 1995]**.

The local characterization of each phase of DSSs can be avoided thanks to single phase alloys. For example, Olsson **[Olsson, 1995]** characterized by AES and XPS the passive film formed by polarization in 1 M NaCl on 2205 duplex stainless steel and on single phase alloys. The single phase alloys were designed to have compositions as close as possible to those of the respective phases in the duplex alloy. The compositions of the passive films showed good correlation between the single phase alloys and the respective phases on the duplex stainless steel. However, the passive films formed on single phase alloys were slightly thicker than on duplex alloy. Recently, Wang *et al.* **[Wang, 2015]** characterized the single phase samples prepared by selective dissolution of the two phases of 2205 duplex stainless steel. Using this approach, the single phase alloys had almost the same composition as the corresponding

phase of the duplex alloy. However, the impact of this procedure on the composition of the surface was not mentioned. After 12 h immersion in 3.5 % NaCl solution at OCP, XPS analyses revealed higher stability of Cr(III) species in the passive film formed on austenite – which was not in agreement with the other studies cited above – as a result of higher nickel content within austenite.

III.2.2. Objectives

Questions are still open concerning the effect of constituent phases compositions on the nature of the surface oxide film, and particularly the native oxide film, formed at the surface of duplex stainless steels. The aim of this work was to characterize the native oxide film and the underlying alloy formed after mechanical polishing at the surface of 2304 lean DSS as well as on corresponding austenitic and ferritic single phase alloys. Two complementary surface-sensitive analytical techniques were used: X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS).

III.3. Materials and methods

III.3.1. Alloys

This study was carried out using 1 mm thick plates of 2304 lean Duplex Stainless Steel (DSS) from APERAM with a cold-rolled, annealed and pickled surface finish. In addition, austenitic and ferritic single phase alloys were elaborated in order to approach the chemical composition of austenite and ferrite phases of 2304 DSS. After casting of 50 kg austenitic and ferritic ingots, the alloys were hot-rolled, annealed, cold-rolled in order to obtain 1 mm thick plates and again annealed. The chemical composition of the three alloys, summarized in **Table III-1**, was determined by X-ray fluorescence for chromium, nickel, manganese, silicon, copper and molybdenum, inert gas fusion-thermal conductivity detection for nitrogen and combustion-infrared absorption for carbon and sulfur. The chemical composition of the austenite and ferrite phases of 2304 DSS was estimated using the software ThermoCalc. A good correlation was found between the austenite phase and austenitic alloy as well as between the ferrite phase and ferritic alloy. However, the nickel and silicon contents were slightly higher for the austenitic alloy than for the austenite phase while the nitrogen content

was slightly higher for the austenitic alloy than for the austenite phase and higher for the ferrite phase than for the ferritic alloy. Moreover, the single phase alloys exhibited higher sulfur contents than the duplex alloy. The contents of iron, nickel, manganese, copper, nitrogen and carbon were found to be higher in the austenite phase/alloy than in the ferrite phase/alloy (gammagene alloying elements). On the contrary, the contents of chromium, silicon and molybdenum were found to be higher in the ferrite phase/alloy than in the austenite phase/alloy (alphagene alloying elements). As expected, the duplex alloy exhibited an intermediate global chemical composition.

Table III-1 Chemical composition of 2304 DSS as well as austenitic and ferritic single phase alloys.

at. %	Fe	Cr	Ni	Mn	Si	Cu	Mo	N	C	S
2304 DSS[1]	bal. (67.6)	24.6	4.4	1.5	0.88	0.33	0.27	0.36	0.07	<10 ppm
Austenite phase of 2304 DSS[2]	bal. (69.1)	21.5	5.6	1.7	0.80	0.43	0.21	0.59	0.11	<10 ppm
Austenitic alloy[1]	bal. (68.6)	21.1	6.3	1.6	0.95	0.43	0.22	0.72	0.12	<20 ppm
Ferrite phase of 2304 DSS[2]	bal. (65.8)	28.2	3.1	1.3	0.97	0.21	0.33	0.08	0.03	<10 ppm
Ferritic alloy[1]	bal. (65.9)	28.5	2.9	1.2	0.97	0.17	0.34	0.006	0.04	<20 ppm

[1]Determined by X-ray fluorescence (chromium, nickel, manganese, silicon, copper and molybdenum), inert gas fusion-thermal conductivity detection (nitrogen) or combustion-infrared absorption (carbon and sulfur).

[2]Chemical composition at equilibrium at 1050°C estimated from ThermoCalc TCFE5 thermodynamic database.

III.3.2. Surface preparation

10 × 12 mm² coupons were cut out from the three alloys. The coupons were abraded with a series of SiC papers and polished with 6 µm, 3 µm and 1 µm diamond spray, successively. The polished coupons were then cleaned ultrasonically in acetone and then in ethanol three times for 10 min. The coupons were finally stored in air during 24 h or 3 weeks. Before XPS and ToF-SIMS characterization, the coupons were again cleaned ultrasonically in acetone and then in ethanol three times for 10 min each. As illustrated by the Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG-SEM) image obtained with a Jeol 7000F microscope (**Figure III-1**), the surface of 2304 DSS was composed of approximately equivalent areas of

austenite (light regions) and ferrite (dark regions) phases. Measurement of the specific saturation magnetization was achieved with a Setaram sigmameter. It revealed that the surface of 2304 DSS was composed of approximately 54 % ferrite regions and 46 % austenite regions while 1.5 % residual ferrite was present in the austenitic single phase alloy.

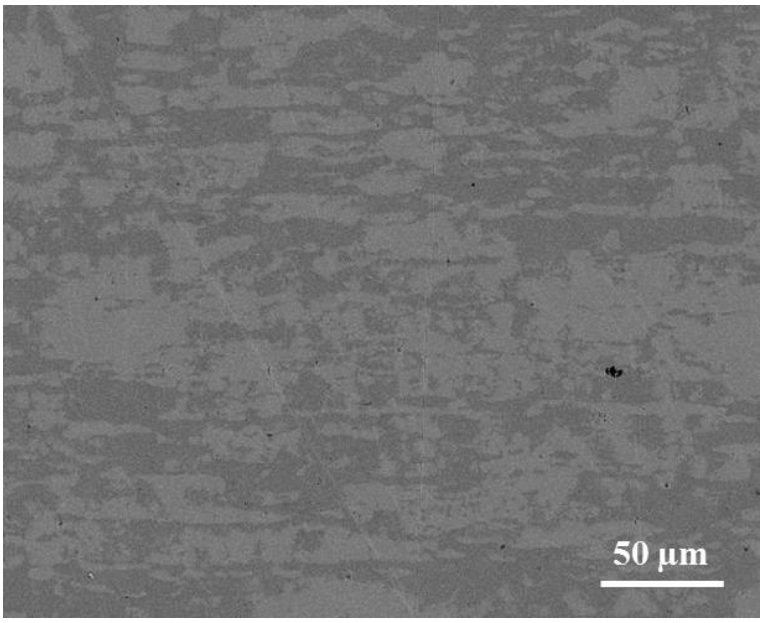


Figure III-1 SEM backscattered electrons image of the duplex stainless steel surface after mechanical polishing and 3 weeks ageing in air (Jeol 7000F microscope, accelerating voltage = 15.0 kV).

III.3.3. Surface characterization

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) analysis was performed with a Thermo Electron Escalab 250 spectrometer, using a monochromatic Al Kα X-ray source ($h\nu$ = 1486.6 eV). The base pressure in the analysis chamber was maintained at 10^{-9} mbar. The spectrometer was calibrated using Au $4f_{7/2}$ at 84.1 eV. For all analyses, the take-off angle was 90° and the analyzed area was a disk of 500 µm diameter. Survey spectra were recorded with a pass energy of 100 eV at a step size of 1 eV and high resolution spectra of the C 1s, O 1s, Fe 2p, Cr 2p, Ni 2p, Mo 3d and N 1s core level regions were recorded with a pass energy of 20 eV at a step size of 0.1 eV. All spectra were referred to the C 1s peak for the carbon involved in C–C and C–H bonds, located at 285.0 eV **[Frateur, 2007]**, **[Torres Bautista, 2015]**. Curve fitting of the high resolution spectra was performed with the Thermo Electron software Avantage version 5.938 using an iterative Shirley-type background subtraction. Symmetrical

peaks were used except for the Fe 2p, Cr 2p, Ni 2p, and Mo 3d metallic components. The values of the photoionization cross-sections at 1486.6 eV taken from Scofield **[Scofield, 1976]** and the inelastic mean free paths calculated by the TPP2M formula **[Tanuma, 1991]** used in this work are compiled in the **Table III-2**. Contents of manganese and copper in the oxide layer were found to be lower than 1 at. % and were not taken into consideration in the model used for XPS calculations.

Table III-2 Values of the photoionization cross-sections (σ_X) and inelastic mean free paths (λ_X^Y) used for XPS quantification.

Core level	Fe $2p_{3/2}$	Cr $2p_{3/2}$	Ni $2p_{3/2}$	Mo $3d_{5/2}$	N 1s
σ_X	10.82	7.69	14.61	5.62	1.80
λ_X^{oxide} (nm)	1.63	1.83	1.40	2.34	2.10
λ_X^{metal} (nm)	1.35	1.52	1.17	1.94	1.74

Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS) analysis was performed using a ToF-SIMS 5 spectrometer (IonTof – Münster Germany) operating at a pressure of 10^{-9} mbar. Data acquisition and post processing analysis were performed using the SurfaceLab software version 6.5. Prior to each measurement, the extreme surface was sputtered during approximately 5 s using a Cs^+ ion sputter gun in order to eliminate the carbonaceous pollution from the surface. The spectrometer was run in HC-BUNCHED mode for optimum mass resolution (M/ΔM of 10^4) but low lateral space resolution. Depth profiles and associated mass spectra were recorded in dual beam mode using a pulsed 25 keV Bi^+ primary ion source delivering 1.2 pA of target current over a 500 × 500 µm² area interlaced with a 500 eV Cs^+ sputter beam delivering 15 nA of target current over a 700 × 700 µm² area with a 45° incidence to the specimen surface. Bi^+ primary ion flux below 10^{12} ions/cm² was used to ensure static analysis conditions. Analysis was centered inside the sputtered crater to avoid edge effects. Negative secondary ions were analyzed, which have higher yield for oxide matrices than for metallic matrices. The secondary ions considered were O_2^-, OH^-, CN^-, Fe_2^-, Cr_2^-, Ni_2^-, FeO_2^-, CrO_2^- and MoO_3^-. For the depth profiles, the intensity of the ionized fragments, all measured quasi-simultaneously, was plotted *vs* the Cs^+ ion sputtering time. The intensity was reported using a logarithmic scale, which gave equal emphasis to signals of all intensities. The variation of the ion intensity with sputtering time reflected the variation of the in-depth concentration but was also dependent on the matrix from which the ions were emitted. The metal/oxide interface was positioned at a sputtering time corresponding to 80 %

of the maximum intensity of the Ni_2^- signal. Under these conditions of analysis, the sputtering rate of the oxide can be estimated around 0.003 nm/s **[Mazenc, 2012]**. CrO_2^- / FeO_2^- and MoO_3^- / FeO_2^- area ratios were calculated by dividing the areas of the CrO_2^- and FeO_2^- and of the MoO_3^- and FeO_2^- mass spectra peaks, respectively, cumulated in the oxide region, from a sputtering time of 10 s to a sputtering time corresponding to the metal/oxide interface.

III.4. Results

III.4.1. Duplex alloy

III.4.1.1. XPS characterization

The XPS survey spectrum recorded for the native oxide film formed on 2304 DSS after 3 weeks ageing in air (**Figure III-2**) indicates that the main elements detected at the surface are carbon, oxygen, iron, chromium and nickel. A small amount of nitrogen is detected whereas no molybdenum is observable due to a too low Mo content of 2304 DSS. Similar results were obtained for the native oxide film formed on 2304 DSS after 24 h ageing in air (not shown).

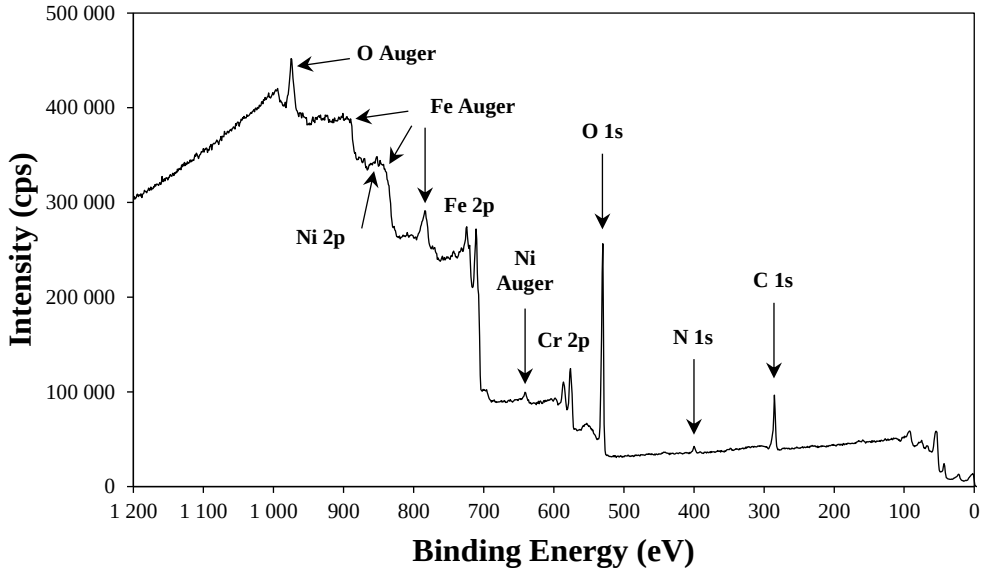


Figure III-2 XPS survey spectrum recorded for the native oxide film formed on the duplex stainless steel after 3 weeks ageing in air.

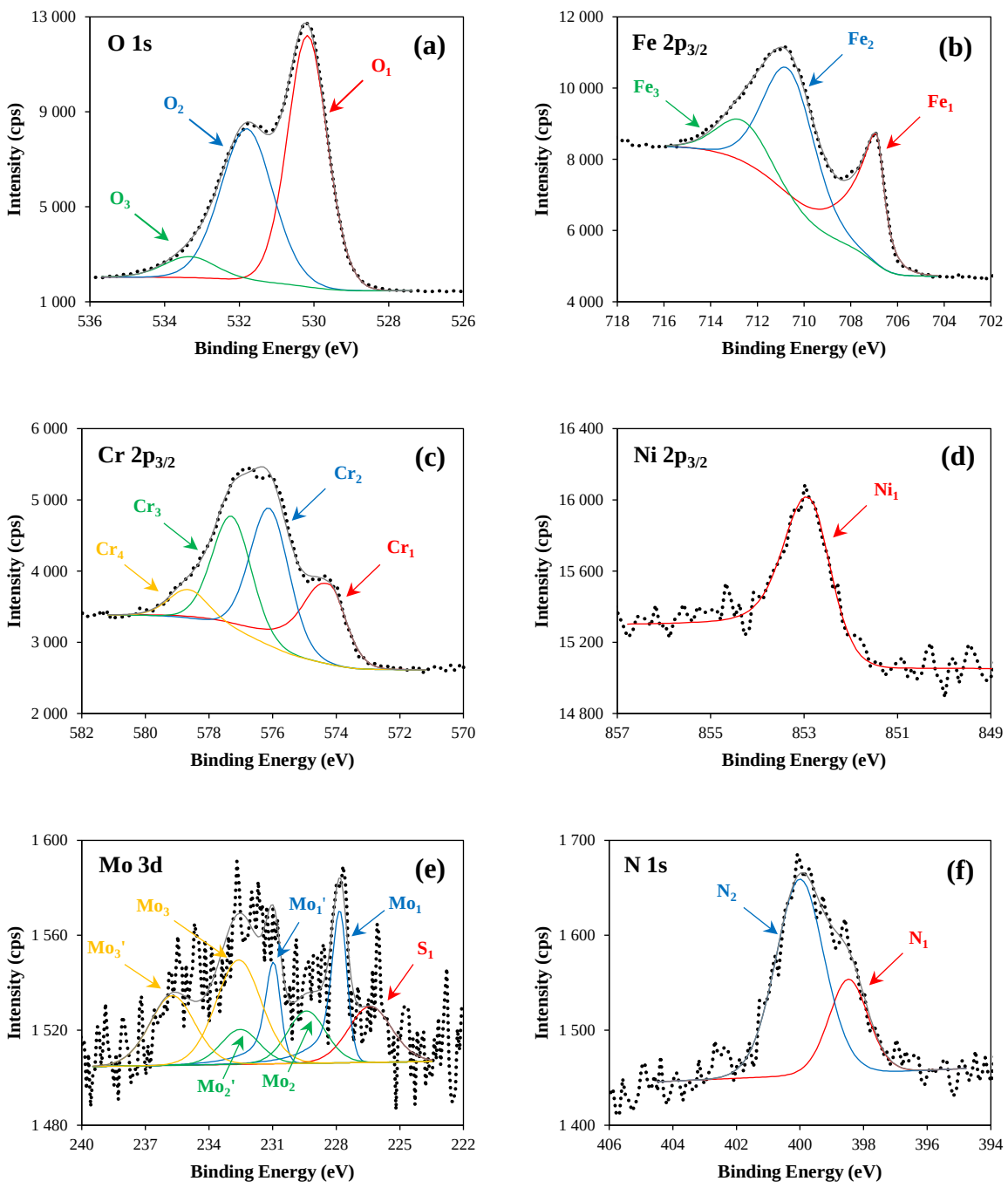


Figure III-3 XPS core level spectra recorded for the native oxide film formed on the duplex stainless steel after 3 weeks ageing in air.

Figure III-3 shows the XPS O 1s, Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$, Mo 3d and N 1s core level spectra recorded for the native oxide film formed on 2304 DSS after 3 weeks ageing in air. The O 1s core level spectrum (**Figure III-3-a**) presents three components characteristic of (O_1) metal oxides (Binding Energy = 530.2 ± 0.1 eV, Full Width at Half Maximum = 1.4 ± 0.1 eV), (O_2) metal hydroxides (BE = 531.9 ± 0.2 eV, FWHM = 1.6 ± 0.2 eV) and (O_3)

adsorbed water (BE = 533.2 ± 0.2 eV, FWHM = 1.6 ± 0.2 eV) **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1995]**, **[Keller, 2004]**, **[Frateur, 2007]**, **[Vignal, 2013]**, **[Maurice, 2015]**. The Fe $2p_{3/2}$ core level spectrum (**Figure III-3-b**) is decomposed into three components attributed to (Fe_1) metallic iron (asymmetric peak at BE = 706.7 ± 0.1 eV, FWHM = 0.79 eV) and (Fe_2), (Fe_3) Fe(III) in the form of oxide and/or hydroxide with a discrete multiplet structure attributed to multiplet splitting of the Fe(III) compounds (BE = 710.4 ± 0.1 eV and satellite peak at BE = 712.5 ± 0.1 eV, FWHM = 2.7 ± 0.1 eV) **[Mansour, 2010]**, **[Maurice, 2015]**. The Cr $2p_{3/2}$ core level spectrum (**Figure III-3-c**) exhibits four components assigned to (Cr_1) metallic chromium (asymmetric peak at BE = 574.1 ± 0.1 eV, FWHM = 1.31 eV) and (Cr_2), (Cr_3), (Cr_4) Cr(III) in the form of oxide and/or hydroxide with a discrete multiplet structure attributed to multiplet splitting of the Cr(III) compounds (BE = 576.0 ± 0.1 eV and two satellite peaks at BE = 577.1 ± 0.1 eV and 578.5 ± 0.1 eV, FWHM = 1.5 ± 0.1 eV) **[Maurice, 2000]**, **[Diaz, 2012]**, **[Maurice, 2015]**. The Ni $2p_{3/2}$ core level spectrum (**Figure III-3-d**) presents a single component characteristic of (Ni_1) metallic nickel (asymmetric peak at BE = 852.8 ± 0.1 eV, FWHM = 1.13 eV) **[Marcus, 1992b]**, **[De Vito, 1992]**, **[Torres Bautista, 2015]**, **[Maurice, 2015]**. In the Mo 3d core level spectra (**Figure III-3-e**), a first component (S_1) is assigned to sulfur species most likely as sulfides arising from the S 2s core level (BE = 226.3 ± 0.2 eV, FWHM = 2.4 ± 0.2 eV) **[Brooks, 1986]**, **[Qiu, 2010]**. Due to the low spin-orbit splitting between Mo $3d_{5/2}$ and Mo $3d_{3/2}$ core levels (3.13 eV), doublets have to be defined for each component of the Mo 3d core level spectra **[Marcus, 1988]**. Three doublets can be distinguished, attributed to (Mo_1), (Mo_1') metallic molybdenum (asymmetric peaks at BE = 227.8 ± 0.1 eV and 230.9 ± 0.1 eV for Mo $3d_{5/2}$ and Mo $3d_{3/2}$, respectively, FWHM = 0.81 eV), (Mo_2), (Mo_2') Mo(IV) in the form of oxide and/or hydroxide (BE = 229.3 ± 0.1 eV and 232.4 ± 0.1 eV for Mo $3d_{5/2}$ and Mo $3d_{3/2}$, respectively, FWHM = 2.3 ± 0.1 eV) and (Mo_3), (Mo_3') Mo(VI) in the form of oxide and/or hydroxide (BE = 232.5 ± 0.1 eV and 235.6 ± 0.1 eV for Mo $3d_{5/2}$ and Mo $3d_{3/2}$, respectively, FHWM = 2.5 ± 0.1 eV) **[Clayton, 1986]**, **[Marcus, 1988]**, **[Brox, 1988]**, **[Olefjord, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 2002]**, **[Petrova, 2011]**, **[Högström, 2013]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Maurice, 2015]**. Two components can be distinguished in the N 1s core level spectrum (**Figure III-3-f**) corresponding to (N_1) nitrogen present in the alloy either dissolved in solid solution in the metal or segregated as nitride (BE = 398.3 ± 0.2 eV, FWHM = 1.7 ± 0.2 eV) **[Marcus, 1992a]**, **[Vanini, 1994]** and (N_2) nitrogen in amine and/or amide groups arising from the surface contamination (BE = 400.1 ± 0.1 eV, FWHM = 1.9 ± 0.1 eV) **[Frateur, 2007]**,

[Torres Bautista, 2015]. The peak fitting of the XPS core level spectra was found to be similar for the native oxide film formed on 2304 DSS after 24 h ageing in air (not shown), showing similar chemical environments.

According to these results, the native oxide film formed on 2304 DSS after 24 h and 3 weeks ageing in air can be considered as a mixture of oxides and hydroxides composed mainly of Fe(III) and Cr(III) species with a small amount of Mo(IV) and Mo(VI) species. As commonly reported for stainless steels, no oxidized nickel is detected **[Frankenthal, 1976]**, **[Clayton, 1986]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Maurice, 1998]**, **[Shimizu, 2000]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Addari, 2008]**, **[Hamada, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Fredriksson, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**, **[Tardio, 2015]**. A contribution corresponding to nitrogen present in the alloy is detected. The detection of metallic components in the Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ and Mo 3d signals indicates that the thickness of the surface oxide layer is of the order of a few nanometers.

In order to calculate the oxide thickness, the oxide composition and the underlying metal composition, a model consisting in an homogeneous and continuous oxide layer composed of Fe(III), Cr(III), Mo(IV) and Mo(VI) oxides and/or hydroxides on top of the metallic 2304 DSS substrate composed of Fe, Cr, Ni, Mo and N was assumed. Based on this model, the following system of 10 equations with 10 unknowns (k, d_{oxide}, D_{Fe}^{oxide}, D_{Cr}^{oxide}, D_{Mo}^{oxide}, D_{Fe}^{metal}, D_{Cr}^{metal}, D_{Ni}^{metal}, D_{Mo}^{metal}, D_{N}^{metal}) was obtained for a take-off angle of 90°:

$$I_{Fe}^{oxide} = k\sigma_{Fe}\lambda_{Fe}^{oxide}D_{Fe}^{oxide}T_{Fe}\left[1 - exp\left(-\frac{d_{oxide}}{\lambda_{Fe}^{oxide}}\right)\right]$$ **Equation III-1**

$$I_{Cr}^{oxide} = k\sigma_{Cr}\lambda_{Cr}^{oxide}D_{Cr}^{oxide}T_{Cr}\left[1 - exp\left(-\frac{d_{oxide}}{\lambda_{Cr}^{oxide}}\right)\right]$$ **Equation III-2**

$$I_{Mo}^{oxide} = k\sigma_{Mo}\lambda_{Mo}^{oxide}D_{Mo}^{oxide}T_{Mo}\left[1 - exp\left(-\frac{d_{oxide}}{\lambda_{Mo}^{oxide}}\right)\right]$$ **Equation III-3**

$$I_{Fe}^{metal} = k\sigma_{Fe}\lambda_{Fe}^{metal}D_{Fe}^{metal}T_{Fe}exp\left(-\frac{d_{oxide}}{\lambda_{Fe}^{oxide}}\right)$$ **Equation III-4**

$$I_{Cr}^{metal} = k\sigma_{Cr}\lambda_{Cr}^{metal}D_{Cr}^{metal}T_{Cr}exp\left(-\frac{d_{oxide}}{\lambda_{Cr}^{oxide}}\right)$$ **Equation III-5**

$$I_{Ni}^{metal} = k\sigma_{Ni}\lambda_{Ni}^{metal}D_{Ni}^{metal}T_{Ni}exp\left(-\frac{d_{oxide}}{\lambda_{Ni}^{oxide}}\right)$$ **Equation III-6**

$$I_{Mo}^{metal} = k\sigma_{Mo}\lambda_{Mo}^{metal}D_{Mo}^{metal}T_{Mo}exp\left(-\frac{d_{oxide}}{\lambda_{Mo}^{oxide}}\right)$$ **Equation III-7**

$$I_{N}^{metal} = k\sigma_{N}\lambda_{N}^{metal}D_{N}^{metal}T_{N}exp\left(-\frac{d_{oxide}}{\lambda_{N}^{oxide}}\right)$$ **Equation III-8**

$$D_{Fe}^{oxide} + D_{Cr}^{oxide} + D_{Mo}^{oxide} = D^{oxide}$$ **Equation III-9**

$$D_{Fe}^{metal} + D_{Cr}^{metal} + D_{Ni}^{metal} + D_{Mo}^{metal} + D_{N}^{metal} = D^{metal}$$ **Equation III-10**

with I_X^Y the intensity of photoelectrons emitted by the considered core level X in the matrix Y (cps.eV), k a constant characteristic of the spectrometer, σ_X the photoionization cross-section of the considered core level X, λ_X^Y the inelastic mean free path of photoelectrons emitted by the considered core level X in the matrix Y (nm), T_X the transmission function of the considered core level X, d_{oxide} the thickness of the oxide layer (nm) and D_X^Y the density of the element X in the matrix Y (mol.cm^{-3}) defined by:

$$D_X^Y = \frac{\rho_Y}{M_Y} \times x_X^Y$$ **Equation III-11**

with ρ_Y the density of the matrix Y (g.cm^{-3}), M_Y the molar mass of the matrix Y (g.mol^{-1}) and x_X^Y the atomic percentage of the element X in the matrix Y.

Table III-3 compiles the quantitative XPS data (oxide thickness, oxide composition and underlying metal composition) obtained by solving the previous system of equations for the native oxide film formed on the duplex alloy as well as the austenitic and ferritic single phase alloys after 24 h and/or 3 weeks ageing in air. The reported values are the average of data obtained on four coupons prepared identically.

Table III-3 Quantitative XPS analysis of the native oxide film and the underlying metal on the duplex alloy as well as the austenitic and ferritic single phase alloys after 24 h and/or 3 weeks ageing in air. The mean values and standard deviations are presented (four coupons analyzed by XPS for each alloy).

Alloy			2304 Duplex alloy		Austenitic single phase alloy	Ferritic single phase alloy
Ageing time in air			24 h	3 weeks	3 weeks	3 weeks
Oxide film thickness (nm)			2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.4 ± 0.1
Chemical composition (at. %)	Oxide film	Fe(III)	66.6 ± 4.7	61.9 ± 1.2	69.6 ± 2.6	60.5 ± 2.8
		Cr(III)	32.4 ± 4.6	37.0 ± 1.1	28.9 ± 2.4	37.4 ± 2.6
		Mo(IV) / Mo(VI)	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.2	2.1 ± 0.4
	Underlying metal	Fe	66.8 ± 4.0	64.2 ± 2.1	60.3 ± 1.4	62.6 ± 1.0
		Cr	21.1 ± 2.5	22.7 ± 1.1	19.7 ± 0.8	27.8 ± 1.0
		Ni	8.5 ± 1.1	8.5 ± 1.5	12.1 ± 2.2	5.4 ± 1.0
		Mo	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1
		N	3.1 ± 0.7	3.8 ± 1.1	7.4 ± 2.4	3.6 ± 0.8
	Bulk alloy	Fe	bal. (67.6)		bal. (68.6)	bal. (65.9)
		Cr	24.6		21.1	28.5
		Ni	4.4		6.3	2.9
		Mo	0.27		0.22	0.34
		N	0.36		0.72	0.006

In the case of 2304 DSS, the thickness of the native oxide film is found to be 2.1 ± 0.1 nm after 24 h and 2.4 ± 0.1 nm after 3 weeks. The iron content in the oxide is found to be 66.6 ± 4.7 at. % after 24 h and 61.9 ± 1.2 at. % after 3 weeks, which remains relatively close to the iron bulk content (67.6 at. %). The chromium content in the oxide reaches 32.4 ± 4.6 at. % after 24 h and 37.0 ± 1.1 at. % after 3 weeks, revealing chromium oxide enrichment compared to the bulk (24.6 at. %). The molybdenum content in the oxide is found to be 1.1 ± 0.2 at. % both after 24 h and 3 weeks, showing that molybdenum is also enriched in the oxide compared to the bulk (0.27 at. %). As mentioned previously, no oxidized nickel is detected. The iron content in the underlying metal is found to be 66.8 ± 4.0 at. % after 24 h and 64.2 ± 2.1 at. % after 3 weeks, which remains relatively close to the iron bulk content. The chromium content in the underlying metal reaches of 21.1 ± 2.5 at. % after 24 h and 22.7 ± 1.1 at. % after 3 weeks, which is slightly lower than the chromium bulk content. The nickel content in the underlying metal reaches 8.5 ± 1.1 at. % after 24 h and 8.5 ± 1.5 at. % after 3 weeks, revealing metallic nickel enrichment under the oxide layer compared to the bulk (4.4 at. %). Molybdenum is slightly enriched in the underlying metal compared to the

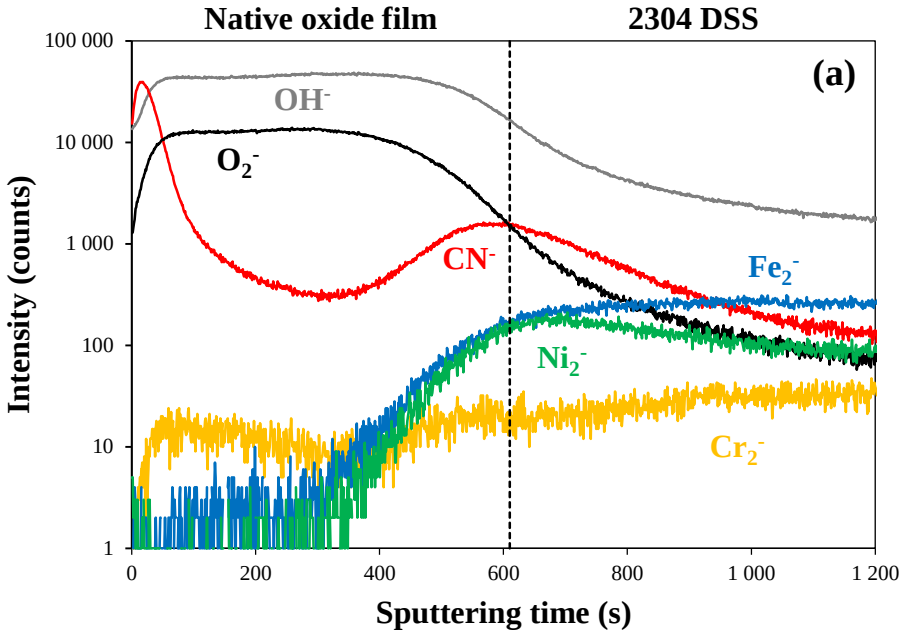
bulk, with contents of 0.5 ± 0.1 at. % after 24 h and 0.8 ± 0.2 at. % after 3 weeks. The nitrogen content in the underlying metal is found to be 3.1 ± 0.7 at. % after 24 h and 3.8 ± 1.1 at. % after 3 weeks, revealing strong nitrogen enrichment at the metal/oxide interface compared to the bulk (0.36 at. %).

It can be noted that the native oxide film formed on 2304 DSS is slightly thicker after 3 weeks than after 24 h. This result suggests that the native oxide film is continuously growing upon air exposure **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Vignal, 2013a]**. Increasing the ageing time in air from 24 h to 3 weeks does not affect significantly the mean composition of the native oxide film and the underlying metal. However, the standard deviations of iron contents in the oxide and in the underlying metal decrease from 4.7 to 1.2 and 4.0 to 2.1, respectively, whereas the ones of chromium contents in the oxide and in the underlying metal decrease from 4.6 to 1.1 and 2.5 to 1.1, respectively. These results indicate that the compositions of native oxide film and metal directly under it are more stable after 3 weeks than after 24 h ageing in air. Therefore, an ageing time in air of 3 weeks was chosen for the experiments presented later.

III.4.1.2. ToF-SIMS characterization

Figure III-4-a shows the ToF-SIMS negative ions depth profiles of O_2^-, OH^-, CN^-, Fe_2^-, Cr_2^- and Ni_2^- secondary ions recorded for the native oxide film formed on the duplex alloy after 3 weeks ageing in air. Two regions can be distinguished on these profiles, corresponding to the native oxide film (maximum O_2^- and OH^- signals) on top of the metallic substrate (maximum Fe_2^-, Cr_2^- and Ni_2^- signals), as typically observed for austenitic stainless steels **[Maurice, 2015]**, **[Seyeux, 2015]**. The metal/oxide interface (located at 80 % of the maximum intensity of the Ni_2^- signal) corresponds to 610 ± 10 s. Under these conditions of analysis, the oxide thickness can be estimated **[Mazenc, 2012]** around 1.8 ± 0.1 nm, which is slightly lower but in the same order of magnitude than the XPS data. The O_2^- and OH^- signals are characteristic of oxide and hydroxide species, respectively. The intensity of the O_2^- and OH^- signals is high throughout the native oxide film region, indicating that the oxide matrix is hydroxylated. The maximum of the CN^- signal near the metal/oxide interface reflects nitrogen enrichment in the alloy under the native oxide film. Signals characteristic of metallic iron, chromium and nickel are Fe_2^-, Cr_2^- and Ni_2^-, respectively. The Cr_2^- signal is weak, which is likely due to a low ionic emission rate in this matrix in the negative polarity. The Fe_2^- profile

reaches a plateau in the metal region whereas the Ni_2^- profile exhibits a maximum close to the metal/oxide interface and decreases slightly in the metal region, indicating metallic nickel enrichment under the native oxide film.



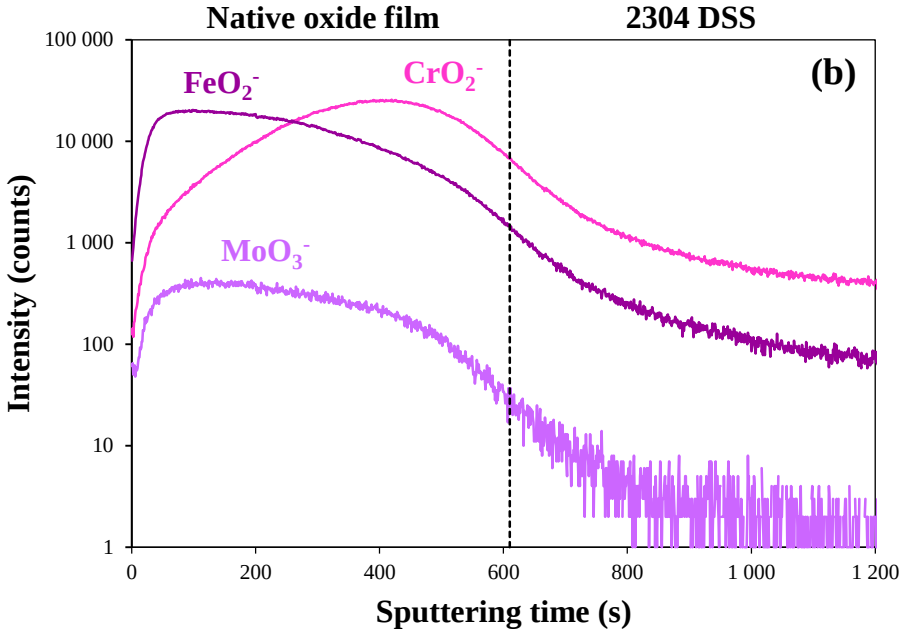


Figure III-4 ToF-SIMS negative ions depth profiles (analyzed zone: 500 × 500 µm²; sputtered zone: 700 × 700 µm²) recorded for the native oxide film formed on the duplex stainless steel after 3 weeks ageing in air. O_2^-, OH^-, CN^-, Fe_2^-, Cr_2^-, Ni_2^-, FeO_2^-, CrO_2^- and MoO_3^- ions signals are plotted.

Figure III-4-b shows the ToF-SIMS negative ions depth profiles of secondary ions characteristic of iron (FeO_2^-), chromium (CrO_2^-) and molybdenum (MoO_3^-) oxide species. Note that the MoO_3^- signal is used in order to get rid of the overlapping of the MoO_2^- (m/z = 129.8958) and $FeNiO^-$ (m/z = 129.8658) peaks. The maximum intensity of the FeO_2^- profile is reached before this for CrO_2^-, suggesting that oxidized iron is preferentially located in the outer part of the native oxide film, whereas oxidized chromium is preferentially located in the inner part, as previously described in the literature on ToF-SIMS **[Fajardo, 2010]**, **[Fajardo, 2014]**, **[Maurice, 2015]**. The MoO_3^- signal is weak throughout the native oxide film and its maximum intensity is observed in the outer part. CrO_2^- / FeO_2^- and MoO_3^- / FeO_2^- area ratios (calculated from 10 to 610 s) of 1.5 ± 0.2 and $3.2 \pm 1.0 \times 10^{-2}$ are obtained, respectively (average values and standard deviations obtained for 10 measurements).

III.4.2. Single phase alloys

III.4.2.1. XPS characterization

The XPS survey spectra recorded for the native oxide film formed on austenitic (at. %: Cr: 21.1; Ni: 6.3; Mo: 0.22; N: 0.72, Fe: balance) and ferritic (at. %: Cr: 28.5; Ni: 2.9; Mo: 0.34, N: 0.006) single phase alloys after 3 weeks ageing in air (not shown) were found to be similar to the one recorded on the duplex stainless steel. The same peak fitting of the XPS O 1s, Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$, Mo 3d and N 1s core level spectra (not shown) to the one used on 2304 DSS was used. It shows that the surface of 2304 DSS and single phase alloys exhibit similar chemical environments.

Therefore, the native oxide films formed on austenitic and ferritic single phase alloys can be considered as mixtures of oxides and hydroxides composed mainly of Fe(III) and Cr(III) species with a small amount of Mo(IV) and Mo(VI) species. Similarly to the duplex alloy, no oxidized nickel is detected while a contribution corresponding to alloyed nitrogen is present. As mentioned in the case of the 2304 DSS surface, the detection of metallic components in the Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ and Mo 3d signals indicates that the thickness of the surface oxide layers is of the order of a few nanometers.

As explained in the case of the duplex surface, the oxide thickness, the oxide composition and the underlying metal composition were determined assuming a model consisting in an homogeneous and continuous oxide layer composed of Fe(III), Cr(III), Mo(IV) and Mo(VI) oxides and/or hydroxides on top of the metallic austenitic or ferritic single phase substrate composed of Fe, Cr, Ni, Mo and N. The system of equations associated to this model was detailed previously.

The quantitative XPS data (oxide thickness, oxide composition and underlying metal composition) obtained for the native oxide films formed on austenitic and ferritic single phase alloys after 3 weeks ageing in air are compiled in the **Table III-3**. Native oxide film thicknesses of 2.8 ± 0.1 nm and 2.4 ± 0.1 nm are found for austenitic and ferritic alloys, respectively. The iron content in the oxide is found to be 69.6 ± 2.6 at. % for the austenitic alloy and 60.5 ± 2.8 at. % for the ferritic alloy, which is close to the iron bulk content for each alloy (68.6 at. % for the austenitic alloy and 65.9 at. % for the ferritic alloy). The chromium content in the oxide reaches 28.9 ± 2.4 at. % for the austenitic alloy and 37.4 ± 2.6 at. % for the ferritic alloy, revealing chromium oxide enrichment compared to the bulk of each alloy (21.1 at. % for the austenitic alloy and 28.5 at. % for the ferritic alloy). Molybdenum is also enriched in the oxide formed on the austenitic alloy (1.4 ± 0.2 at. %) and the ferritic alloy (2.1 ± 0.4 at. %) compared to the bulk (0.22 at. % for the austenitic alloy and 0.34 at. % for the ferritic alloy). As mentioned previously, no oxidized nickel is detected in the native oxide films formed on both alloys.

The iron content in the underlying metal is found to be 60.3 ± 1.4 at. % for the austenitic alloy and 62.6 ± 1.0 at. % for the ferritic alloy, which is slightly lower than the iron bulk content of each alloy. The chromium content in the underlying metal on the austenitic (19.7 ± 0.8 at. %) and ferritic (27.8 ± 1.0 at. %) alloys remains close to the chromium bulk content of each alloy. Nickel contents in the underlying metal of 12.1 ± 2.2 at. % and 5.4 ± 1.0 at. % are obtained for the austenitic and ferritic alloys, respectively, revealing metallic nickel enrichment for both alloys compared to the bulk (6.3 at. % for the austenitic alloy and 2.9 at. % for the ferritic alloy). Molybdenum content in the underlying metal is found to be 0.6 ± 0.1 at. % for the austenitic alloy and 0.7 ± 0.1 at. % for the ferritic alloy, which is higher than the molybdenum bulk content of each alloy. Strong nitrogen enrichment occurs in the underlying metal of the austenitic alloy (7.4 ± 2.4 at. %) compared to the bulk

(0.72 at. %). Nitrogen is also strongly enriched in the underlying metal of the ferritic alloy (3.6 ± 0.8 at. %) compared to the bulk, despite the low nitrogen bulk content in this alloy (0.006 at. %).

III.4.2.2. ToF-SIMS characterization

Figure III-5-a and **Figure III-6-a** show the ToF-SIMS negative ions depth profiles of O_2^-, OH^-, CN^-, Fe_2^-, Cr_2^- and Ni_2^- secondary ions recorded for the native oxide films formed on the austenitic and ferritic single phase alloys, respectively. As mentioned previously, these profiles reveal the presence of the native oxide film on top of the metallic substrate **[Maurice, 2015]**, **[Seyeux, 2015]**. The metal/oxide interface (located at 80 % of the maximum intensity of the Ni_2^- signal) corresponds to 640 ± 10 s for the austenitic alloy and 570 ± 10 s for the ferritic alloy. Under these conditions of analysis, the oxide thickness can be estimated **[Mazenc, 2012]** around 1.9 ± 0.1 nm for the austenitic alloy and 1.7 ± 0.1 nm for the ferritic alloy, which is slightly lower but in the same order of magnitude than the XPS data. As described previously, the O_2^- and OH^- profiles indicate that the native oxide films formed on single phase alloys are hydroxylated. Similarly to the profiles obtained for the duplex stainless steel, the maximum of the CN^- signal near the metal/oxide interface reflects nitrogen enrichment in the alloys under the native oxide films. Based on the intensity of the CN^- signal, the nitrogen enrichment at the metal/oxide interface appears more pronounced for the austenitic alloy than for the ferritic alloy, in agreement with XPS data. The Cr_2^- signal is weak, especially for the austenitic alloy which contains less chromium, which is likely due to a low ionic emission rate in these matrixes in the negative polarity. The Fe_2^- profile reaches a plateau in the metal region whereas the Ni_2^- profile exhibits metallic nickel enrichment near the metal/oxide interface for both single phase alloys.

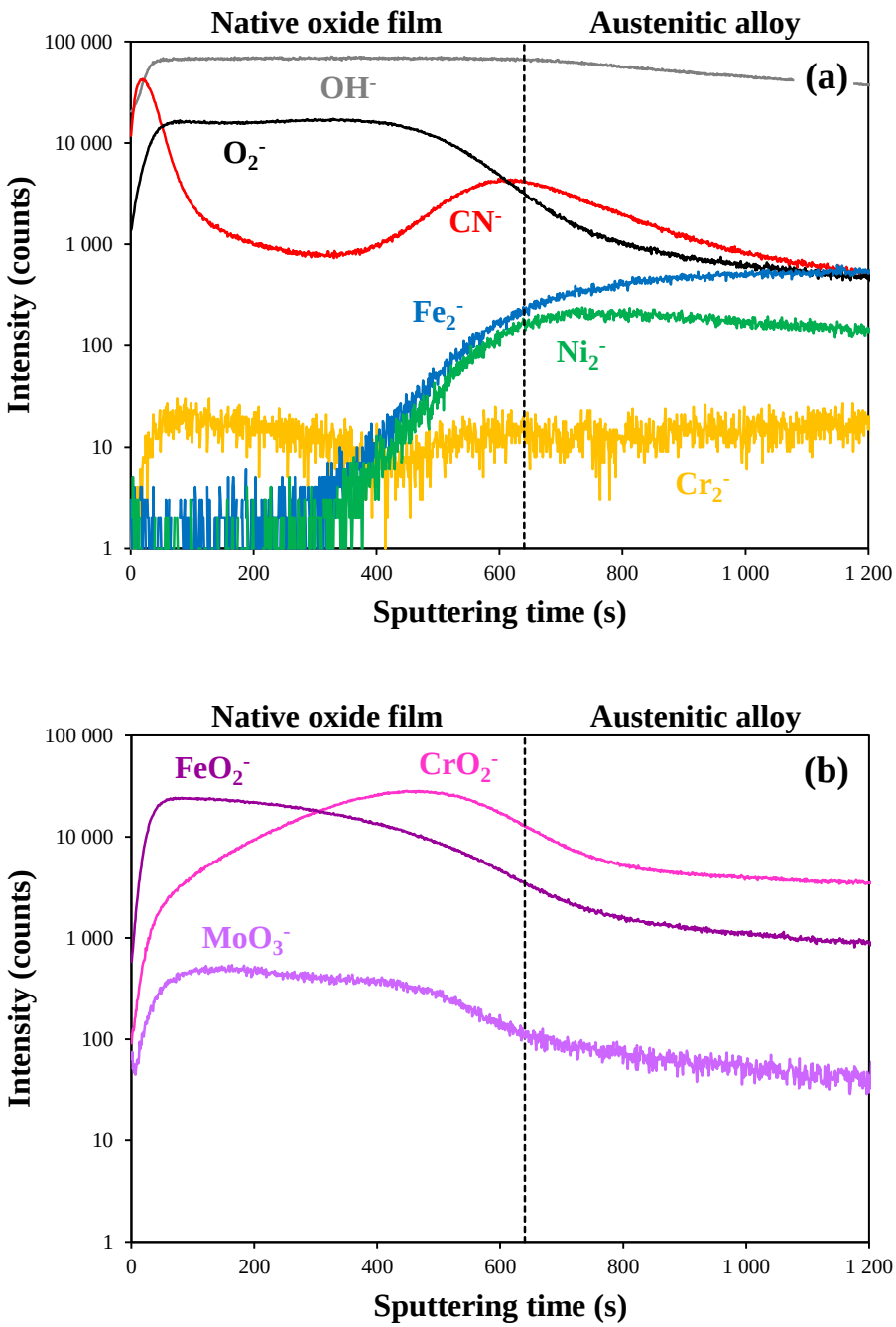


Figure III-5 ToF-SIMS negative ions depth profiles (analyzed zone: 500 × 500 µm²; sputtered zone: 700 × 700 µm²) recorded for the native oxide film formed on the austenitic single phase alloy after 3 weeks ageing in air. O_2^-, OH^-, CN^-, Fe_2^-, Cr_2^-, Ni_2^-, FeO_2^-, CrO_2^- and MoO_3^- ions signals are plotted.

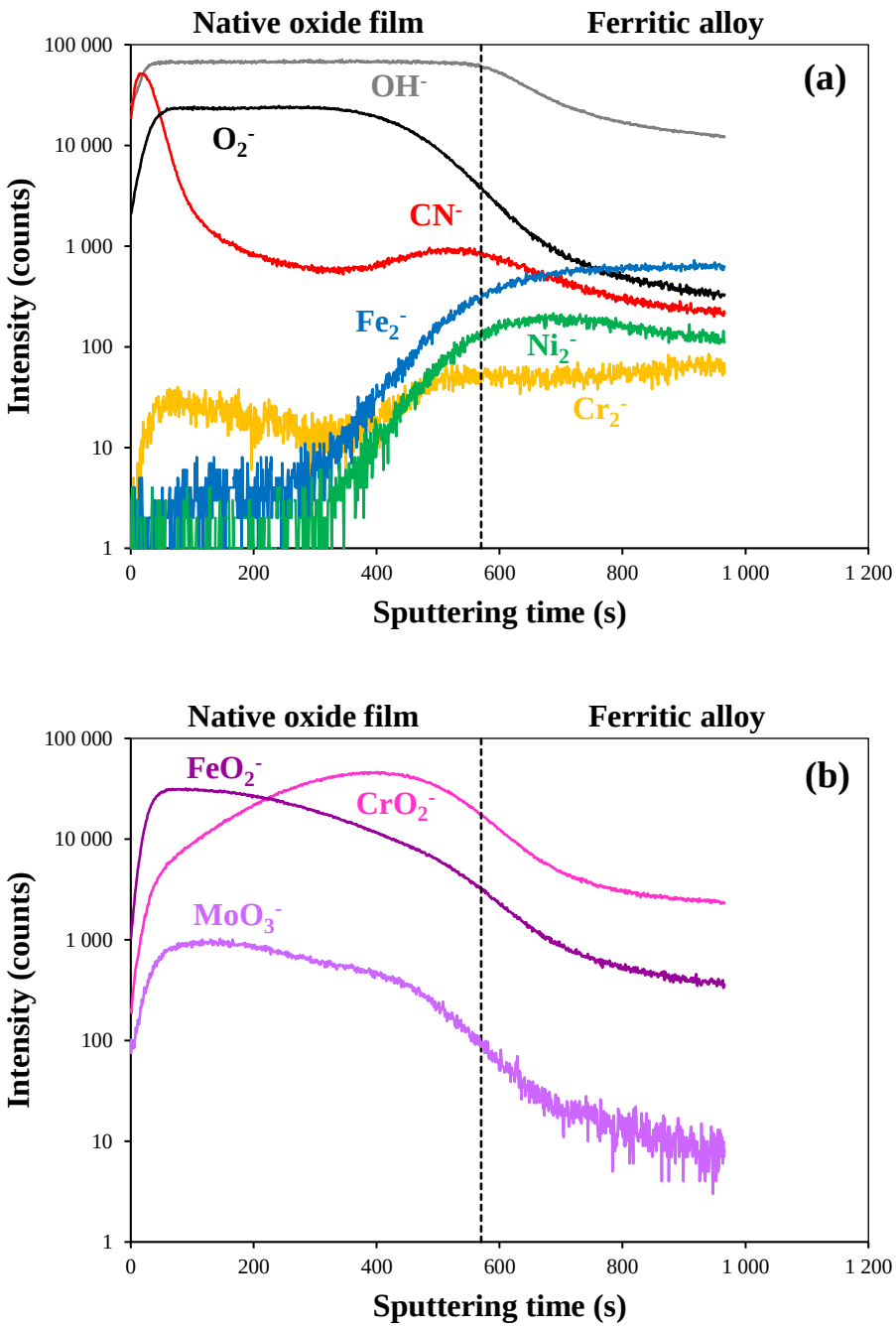


Figure III-6 ToF-SIMS negative ions depth profiles (analyzed zone: 500 × 500 µm²; sputtered zone: 700 × 700 µm²) recorded for the native oxide film formed on the ferritic single phase alloy after 3 weeks ageing in air. O_2^-, OH^-, CN^-, Fe_2^-, Cr_2^-, Ni_2^-, FeO_2^-, CrO_2^- and MoO_3^- ions signals are plotted.

Figure III-5-b and **Figure III-6-b** show the ToF-SIMS negative ions depth profiles of secondary ions characteristic of iron (FeO_2^-), chromium (CrO_2^-) and molybdenum (MoO_3^-) oxide species recorded for the austenitic and ferritic single phase alloys, respectively. Similarly to the results obtained for the duplex stainless steel, the FeO_2^- and CrO_2^- signals suggest that the native oxide films formed on the single phase alloys are stratified, with an outer part rich in iron and an inner part rich in chromium, as already described in the literature using ToF-SIMS **[Fajardo, 2010]**, **[Fajardo, 2014]**, **[Maurice, 2015]**. The MoO_3^- signal is weak throughout the native oxide film formed on both single phase alloys and its maximum intensity is observed in the outer part. For the austenitic alloy, CrO_2^- / FeO_2^- and MoO_3^- / FeO_2^- area ratios (calculated from 10 to 640 s) of 1.1 ± 0.1 and $2.4 \pm 0.8 \times 10^{-2}$ are obtained, respectively (average values and standard deviations obtained for 4 measurements). For the ferritic alloy, CrO_2^- / FeO_2^- and MoO_3^- / FeO_2^- area ratios (calculated from 10 to 570 s) of 1.5 ± 0.1 and $3.2 \pm 0.9 \times 10^{-2}$ are obtained, respectively (average values and standard deviations obtained for 4 measurements).

III.5. Discussion

XPS and ToF-SIMS characterizations have demonstrated that the native oxide films formed on 2304 DSS as well as on corresponding austenitic and ferritic single phase alloys all consisted in mixtures of oxides and hydroxides composed mainly of Fe(III) and Cr(III) species with a small amount of Mo(IV) and Mo(VI) species. ToF-SIMS depth profiles suggested that hydroxides were present throughout the whole oxide film, showing no stratification of oxide and hydroxide species. However, iron species were preferentially located in the outer part and chromium species in the inner part, demonstrating a bilayer nature of the oxide, in agreement with previous studies **[Frankenthal, 1976]**, **[Brooks, 1986]**, **[Calinsky, 1989]**, **[Mathieu, 1989]**, **[Mischler, 1991]**, **[Hakiki, 1998]**, **[Shimizu, 2000]**, **[Abreu, 2004]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Donik, 2009b]**, **[Donik, 2010]**, **[Fajardo, 2010]**, **[Fajardo, 2014]**, **[Maurice, 2015]**. As stated before **[Maurice, 2015]**, rather than an abrupt interface between the outer and inner parts, a more realistic description might consist in decreasing and increasing concentrations of iron and chromium oxides, respectively. Furthermore, ToF-SIMS depth profiles suggested that molybdenum oxide species were concentrated in the outer part of the oxide layer.

The thickness of the native oxide film determined by XPS was 2.1 ± 0.1 nm and 2.4 ± 0.1 nm for the duplex alloy (after 24 h and 3 weeks ageing in air, respectively), 2.8 ± 0.1 nm for the austenitic single phase alloy (after 3 weeks ageing in air) and 2.4 ± 0.1 nm for the ferritic single phase alloy (after 3 weeks ageing in air), in agreement with previous studies on stainless steels **[Frankenthal, 1976]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Shimizu, 2000]**, **[Olsson, 2003]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Maurice, 2015]**, **[Tardio, 2015]**. The equivalent thicknesses determined by ToF-SIMS (after 3 weeks ageing in air) were slightly lower but in the same order of magnitude than the XPS data. These results indicated that the thickness of the native oxide film formed after 3 weeks ageing in air on the duplex stainless steel and the ferritic alloy was similar while the native oxide film formed on the austenitic alloy was slightly thicker. In the case of 2304 DSS, a slight increase of the thickness was noted with ageing time in air (from 24 h to 3 weeks), reflecting the continuous growth of the oxide layer during ageing in air **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Vignal, 2013a]**.

Figure III-7-a and **Figure III-7-b** show the chemical composition of the native oxide film and the underlying metal obtained by XPS for the duplex stainless steel, the austenitic and the ferritic single phase alloys after 3 weeks ageing in air (average values and standard deviations). The chemical composition of the bulk of each alloy is specified. As mentioned previously, the ferritic alloy exhibited the highest chromium (28.5 at. %) and molybdenum (0.34 at. %) bulk contents and the lowest iron (65.9 at. %), nickel (2.9 at. %) and nitrogen (0.006 at. %) bulk contents. On the contrary, the austenitic alloy presented the highest iron (68.6 at. %), nickel (6.3 at. %) and nitrogen (0.72 at. %) bulk contents and the lowest chromium (21.1 at. %) and molybdenum (0.22 at. %) bulk contents. The mixed austenite-ferrite duplex alloy exhibited an intermediate chemical bulk composition in iron (67.6 at. %), chromium (24.6 at. %), nickel (4.4 at. %), molybdenum (0.27 at. %) and nitrogen (0.36 at. %).

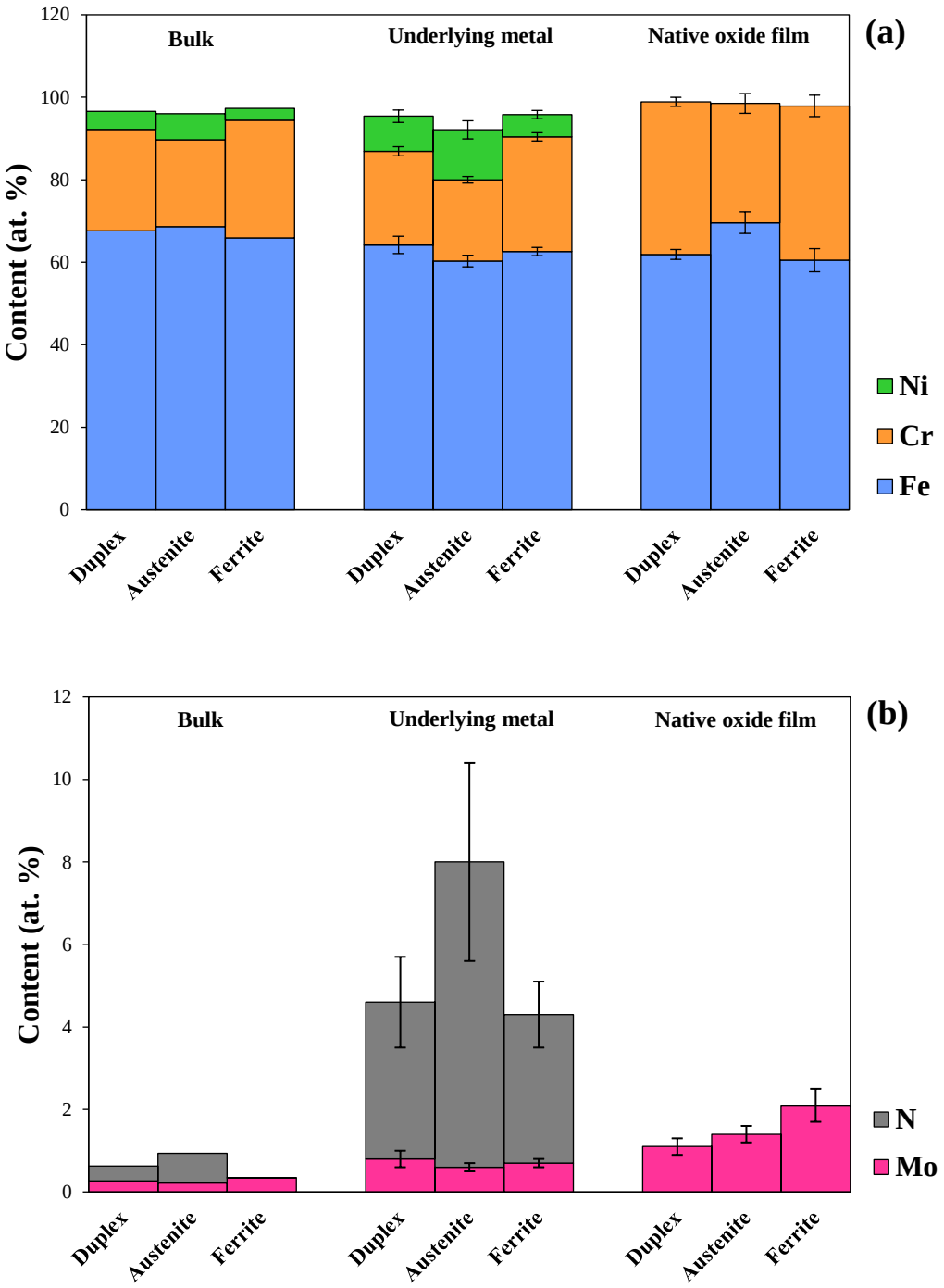


Figure III-7 Chemical composition of the bulk (obtained by chemical analysis) and mean chemical composition of the native oxide film and the underlying metal (obtained by XPS) of the duplex stainless steel, the austenitic and ferritic single phase alloys after 3 weeks ageing in air.

The iron content in the oxide layer (**Figure III-7-a**) was found to be roughly similar for the duplex (61.9 ± 1.2 at. %) and the ferritic (60.5 ± 2.8 at. %) alloys, while a higher value was found for the austenitic alloy (69.6 ± 2.6 at. %), which exhibited the highest iron bulk content. In all cases, the native oxide film was enriched in chromium compared to the bulk (**Figure III-7-a**), as a result of preferential chromium oxidation, in agreement with previous works **[Frankenthal, 1976]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Maurice, 2015]**, **[Tardio, 2015]**. The chromium content in the oxide layer was found to be roughly similar for the duplex (37.0 ± 1.1 at. %) and the ferritic (37.4 ± 2.6 at. %) alloys, while a lower value was obtained for the austenitic alloy (28.9 ± 2.4 at. %), which exhibited the lowest chromium bulk content. These results were confirmed by the CrO_2^- / FeO_2^- area ratios obtained by ToF-SIMS (duplex alloy: 1.5 ± 0.2; ferritic alloy: 1.5 ± 0.1, austenitic alloy: 1.1 ± 0.1). Molybdenum oxide enrichment was detected for each alloy (**Figure III-7-b**), in agreement with previous works **[Maurice, 2015]**. No significant difference was evidenced concerning the molybdenum content in the oxide layer for the duplex (1.1 ± 0.2 at. %) and the austenitic (1.4 ± 0.2 at. %) alloys, while a higher value was obtained for the ferritic alloy (2.1 ± 0.4 at. %), which exhibited the highest molybdenum bulk content. Given the dispersion of measurements, the MoO_3^- / FeO_2^- area ratios obtained by ToF-SIMS did not allow comparing the molybdenum content in the oxide layer formed on each alloy. No oxidized nickel was detected for any of the alloys, due to preferential oxidation of iron and chromium, in agreement with published data **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Maurice, 1998]**, **[Shimizu, 2000]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Addari, 2008]**, **[Hamada, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Fredriksson, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**.

No significant differences concerning the iron content in the underlying metal were evidenced for the duplex (64.2 ± 2.1 at. %), the austenitic (60.3 ± 1.4 at. %) and the ferritic (62.6 ± 1.0 at. %) alloys (**Figure III-7-a**). The chromium content in the underlying metal (**Figure III-7-a**) was found to increase with the chromium bulk content of the alloy (austenitic alloy: 19.7 ± 0.8 at. % < duplex alloy: 22.7 ± 1.1 at. % < ferritic alloy: 27.8 ± 1.0 at. %). Despite the chromium oxide enrichment, chromium was not (or slightly) depleted in the underlying metal compared to the bulk for each alloy. Metallic nickel enrichment at the metal/oxide interface was demonstrated by XPS (**Figure III-7-a**) and confirmed by ToF-SIMS depth profiles. This phenomenon has been commonly reported for stainless steels including DSSs to levels that

depended on the composition of the alloy and the surface preparation **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Maurice, 1998]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Addari, 2008]**, **[Hamada, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Fredriksson, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**. It can be explained by the selective oxidation of iron and chromium compared to nickel. Moreover, the content of nickel in the underlying metal increased with the nickel bulk content of the alloy (ferritic alloy: 5.4 $\pm$ 1.0 at. % < duplex alloy: 8.5 $\pm$ 1.5 at. % < austenitic alloy: 12.1 $\pm$ 2.2 at. %).

Molybdenum was found to be enriched in the underlying metal (**Figure III-7-b**). No significant differences concerning the molybdenum content in the underlying metal were evidenced for the duplex (0.8 $\pm$ 0.2 at. %), the austenitic (0.6 $\pm$ 0.1 at. %) and the ferritic (0.7 $\pm$ 0.1 at. %) alloys. A strong nitrogen enrichment was found at the metal/oxide interface by XPS (**Figure III-7-b**) and confirmed by ToF-SIMS, even for the ferritic single phase alloy which contains only traces of nitrogen (0.006 at. %). Nitrogen can be either dissolved in solid solution in the metal or segregated as nitride. In the case of electrochemically-formed passive films, nitrogen enrichment has been attributed to nitrogen anodic segregation during passivation **[Marcus, 1992a]** leading to the formation of a mixed-nitride phase either at the metal/oxide interface or incorporated in the passive film **[Willenbruch, 1990]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Halada, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Ha, 2009]**. Even if the native oxide films were formed in air, the presence of nitride cannot be excluded in this study. The nitrogen content in the underlying metal was found to be roughly similar for the duplex (3.8 $\pm$ 1.1 at. %) and the ferritic (3.6 $\pm$ 0.8 at. %) alloys, while a higher value was obtained for the austenitic alloy (7.4 $\pm$ 2.4 at. %), which exhibited the highest nitrogen bulk content.

The results obtained for the 2304 DSS and the corresponding austenitic and ferritic single phase alloys demonstrated that the contents of alloying elements (Fe, Cr, Ni, Mo and N) in the native oxide film and/or in the underlying metal were directly related to their contents in the bulk of the alloys. Nevertheless, it cannot be concluded from this work whether the chemical composition of the surface of 2304 DSS is homogeneous or heterogeneous at the scale of austenite and ferrite phases. In order to answer this question, the local characterization of the 2304 DSS austenite and ferrite phases will be the subject of the next chapter **[CHAPITRE IV]**.

III.6. Conclusions

In this work, the nature of the native oxide film and the underlying metal formed after mechanical polishing at the surface of 2304 lean DSS as well as the corresponding austenitic and ferritic single phase alloys was investigated by XPS and ToF-SIMS. The following conclusions are drawn:

- For the three alloys, the native oxide film can be described as an oxi-hydroxide layer composed mainly of Fe(III) and Cr(III) species with a small amount of Mo(IV) and Mo(VI) species. Iron and molybdenum species are concentrated in the outer part of the oxide layer while chromium species are concentrated in the inner part.

- After 3 weeks ageing in air, the thickness of the native oxide film is found to be similar for the duplex and the ferritic alloys but slightly higher for the austenitic alloy. For the 2304 DSS, the thickness of the native oxide film increases slightly when the ageing time in air increases from 24 h to 3 weeks, reflecting a continuous growth of the oxide layer.

- For the three alloys, nickel, molybdenum and nitrogen are enriched in the underlying metal compared to the bulk while chromium and molybdenum are enriched in the native oxide film compared to the bulk. This work shows that the contents of alloying elements (Fe, Cr, Ni, Mo and N) in the native oxide film and/or in the underlying metal are directly related to their contents in the bulk of the alloys.

Based on these results, chemical differences can be expected at the surface of austenite and ferrite phases within the duplex alloy. In the next chapter **[CHAPITRE IV]**, we will present an innovative methodology based on the coupling of XPS and ToF-SIMS in order to characterize locally the oxide film formed on austenite and ferrite phases within the duplex stainless steel.

CHAPITRE IV : XPS and ToF-SIMS characterization of the surface oxides on lean duplex stainless steel – Global and local approaches

---

IV.1. Abstract

This work reports an innovative methodology based on the coupling of XPS and ToF-SIMS in order to study locally the oxide layer formed on austenite and ferrite phases of duplex stainless steels (DSSs). The native oxide film obtained after mechanical polishing and the passive film obtained by electrochemical passivation in 0.05 M H_2SO_4 at the surface of 2304 DSS were investigated at a global scale and then at the local scale on each phase. The effect of electrochemical passivation on the oxide layer was discussed. Particular attention was paid to the partitioning of alloying elements (Cr, Mo, Ni and N) throughout the oxide layer and the underlying metal on both phases. Chromium and molybdenum contents were found to be higher in the oxide layer formed on ferrite phase. Nickel and nitrogen contents were found to be higher under the oxide layer formed on austenite phase.

IV.2. Introduction

IV.2.1. State of the art

Corrosion resistance of stainless steels is ensured by the spontaneous formation of a surface oxide layer, which leads to a marked decrease in the dissolution kinetics of the underlying alloy. This so-called passive film is generally described as a mixed oxi-hydroxide composed mainly of Cr(III) species in the inner layer and Fe(III) species in the outer layer, enriched in chromium, with a thickness ranging between 1 and 3 nm **[Marcus, 1988]**, **[Olefjord, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Olsson, 2003]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**. In the case of Mo-bearing stainless steels, a small amount of molybdenum

is incorporated into the passive film **[Hashimoto, 1979b]**, **[Olefjord, 1980]**, **[Goetz, 1984]**, **[Clayton, 1986]**, **[Marcus, 1988]**, **[Mathieu, 1989]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Mischler, 1991]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Halada, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Olsson, 2002]**, **[Kocijan, 2011]**, **[Luo, 2011]**, **[Högström, 2013]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Guo, 2014]**, **[Maurice, 2015]**. Mo(VI) is reported to be enriched in the surface region, while Mo(IV) distribution through the passive film is more homogeneous **[Olefjord, 1990]**, **[Olsson, 1994]**, **[Olsson, 2003]**. For Ni-bearing austenitic and duplex stainless steels, the selective oxidation of iron and chromium leads to a very low and often non-detectable amount of oxidized nickel in the passive film while metallic nickel is enriched at the metal/oxide interface **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Maurice, 1998]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Addari, 2008]**, **[Hamada, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Fredriksson, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**. Nitrogen can also be enriched by anodic segregation during passivation **[Marcus, 1992a]**, leading to the formation of a mixed-nitride phase either at the metal/oxide interface or incorporated into the passive film **[Willenbruch, 1990]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Halada, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Ha, 2009]**.

“Native” oxide film (or air-formed film) refers to the film naturally grown upon air exposure while “passive” film refers to the oxide grown upon electrochemical passivation. Even if native oxide and passive films exhibit similar natures, significant differences are generally pointed out. Indeed, the preferential iron dissolution during passivation, particularly in acidic electrolyte, induces further chromium and molybdenum enrichments in the oxide layer and further metallic nickel enrichment at the metal/oxide interface **[Calinsky, 1989]**, **[Haupt, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Olsson, 2011]**, **[Maurice, 2015]**. The extent of chromium and molybdenum oxides enrichment during electrochemical passivation and the thickness of the oxide layer depend on the applied potential **[Okamoto, 1973]**, **[Asami, 1978]**, **[Olefjord, 1980]**, **[Goetz, 1984]**, **[Calinsky, 1989]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Mischler, 1991]**, **[Haupt, 1995]**, **[Olsson, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Maurice, 1998]**, **[Olsson, 2002]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Keller, 2004]**, **[He, 2009]**, **[Luo, 2011]**, **[Guo, 2014]**, the passivation time **[Calinsky, 1989]**, **[Haupt, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Maurice, 2015]**, **[Jiang, 2017]**, the pH of the electrolyte **[Calinsky, 1989]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, the temperature of the electrolyte **[Mischler, 1991]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]** and the presence of chloride and sulfate ions in the electrolyte **[Brooks, 1986]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Mischler,**

1991]. More specific conditions have also been studied, such as immersion in artificial saliva for orthodontic clinical applications **[Kocijan, 2011]**, passivation in alkaline solutions simulating the electrolyte contained in the pores of concrete **[Luo, 2012]**, long-term ageing in air **[Vignal, 2013a]**, water exposure **[Tardio, 2015]** or immersion in a medium containing bacteria in order to study the biofilm/passive film interactions **[Seyeux, 2015]**.

Among stainless steels, duplex stainless steels (DSSs) are characterized by a complex microstructure composed of equivalent volumes of austenite and ferrite phases. The main interest of DSSs lies in the combination of high mechanical properties and high corrosion resistance together with, especially for the lean DSSs, reduced alloying cost (low Ni and Mo contents) compared to austenitic grades. As a consequence, DSSs can be used in a wide range of industrial sectors such as desalination plants, oil and gas production, pulp and paper industry or reinforced concrete structures **[Moura, 2008]**, **[Addari, 2008]**, **[Kocijan, 2011]**, **[Peguet, 2011]**, **[Mesquita, 2012]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Erazmus-Vignal, 2015]**. In DSSs, alloying elements are partitioned between the Face-Centered Cubic austenite (gamma) phase and the Body-Centered Cubic ferrite (alpha) phase. Therefore, gammagene alloying elements such as Fe, Ni and N are richer in the austenitic phase while alphagene alloying elements such as Cr and Mo are richer in the ferritic phase **[Olsson, 1995]**, **[Schimt-Rieder, 1999]**, **[Femenia, 2004]**, **[Vignal, 2010]**, **[Peguet, 2011]**, **[Vignal, 2011]**, **[Mesquita, 2012]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Vignal, 2014]**. A key question relative to the passivity of DSSs remains in the link between the chemical heterogeneity of austenite and ferrite phases and the chemical composition of the oxide formed on both phases. Despite the wide knowledge concerning the passivation of austenitic and ferritic stainless steels accumulated for decades **[Asami, 1978]**, **[Hashimoto, 1979b]**, **[Olefjord, 1980]**, **[Goetz, 1984]**, **[Brooks, 1986]**, **[Clayton, 1986]**, **[Marcus, 1988]**, **[Calinsky, 1989]**, **[Mathieu, 1989]**, **[Kirchheim, 1990]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[Mischler, 1991]**, **[De Vito, 1992]**, **[Marcus, 1992a]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Haupt, 1995]**, **[Halada, 1996]**, **[Maurice, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Marcus, 1998]**, **[Maurice, 1998]**, **[Olsson, 2002]**, **[Olsson, 2003]**, **[Keller, 2004]**, **[Ha, 2009]**, **[Fajardo, 2010]**, **[Fredriksson, 2010]**, **[Hamada, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Fredriksson, 2012]**, **[Jung, 2012]**, **[Macdonald, 2012]**, **[Maurice, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Fajardo, 2014]**, **[Maurice, 2015]**, **[Seyeux, 2015]**, **[Tardio, 2015]**, **[Jiang, 2017]**, the number of studies is more limited for the more recently marketed DSSs **[Olsson, 1995]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Schmidt-Rieder, 1999]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Abreu, 2004]**, **[Femenia, 2004]**, **[Addari, 2008]**, **[Bautista, 2009]**, **[Donik, 2009a]**, **[Donik, 2009b]**, **[He,**

2009], **[Donik, 2010]**, **[Fredriksson, 2010]**, **[Vignal, 2010]**, **[Kocijan, 2011]**, **[Luo, 2011]**, **[Vignal 2011]**, **[Luo, 2012]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Vignal, 2014]**, **[Guo, 2014]**, **[Wang, 2015]**, **[Luo, 2017a]**, and among these studies, only a few were dedicated to the local characterization of the surface on both phases **[Olsson, 1995]**, **[Schmidt-Rieder, 1999]**, **[Femenia, 2004]**, **[Vignal, 2010]**, **[Vignal, 2011]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Vignal, 2014]**, **[Wang, 2015]**. Published data tend to indicate that the contents of nickel and nitrogen under the oxide film are higher on the austenite phase due to higher bulk contents. Femenia *et al.* **[Femenia, 2004]** indicated that the composition gradient across the phase boundary occurred within a few micrometers. In many cases, slightly higher chromium content was found in the oxide film formed on the ferrite phase as a result of higher chromium bulk content.

A first strategy consists in characterizing single phase alloys designed to have compositions close to those of the austenite and ferrite phases in the considered DSS **[Olsson, 1995]**, **[Wang, 2015]**, **[CHAPITRE III]**. Limitations were pointed out because of chemical differences between single phase alloys and corresponding phases of DSSs or the presence of non-metallic inclusions in single phase alloys. Recently, Wang *et al.* **[Wang, 2015]** characterized the single phase samples prepared by selective dissolution of the two phases of 2205 duplex stainless steel. Thanks to this approach, the single phase alloys had almost the same composition as the corresponding phase of the duplex alloy. However, the impact of this procedure on the composition of the surface was not mentioned. After 12 h immersion in 3.5 % NaCl solution under OCP, XPS analyses revealed higher stability of Cr(III) species in the passive film formed on austenite – which was not in agreement with the other studies cited above – as a result of higher nickel content within austenite. A second strategy consists in characterizing locally the oxide layer formed on each phase of the considered DSS. For instance, Guo *et al.* **[Guo, 2014]** suggested that the lower conductivity of the ferrite phase compared to the austenite one measured by Current Sensing Atomic Force Microscopy (CSAFM) for 2507 DSS was due to enriched chromium and/or molybdenum oxides in the passive film formed on ferrite. The local characterization of the surface on both phases of DSSs can be achieved by Auger Electron Spectroscopy (AES) or Scanning Auger Electron Spectroscopy (SAES) **[Olsson, 1995]**, **[Schmidt-Rieder, 1999]**, **[Femenia, 2004]**, **[Vignal, 2010]**, **[Vignal, 2011]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Vignal, 2014]**. Vignal *et al.* **[Vignal, 2010]**, **[Vignal, 2011]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Vignal, 2014]** highlighted that the thickness and the Cr/Fe ratio of the passive film on each phase were affected by the surface preparation (mechanical polishing, electropolishing or etching) and the exposure conditions (long-term ageing in 0.5

M NaCl at 50°C at the OCP for 21 days or long-term ageing in air at 25°C for 1 year). However, AES and SAES were limited by preferential sputtering effects in the case of molybdenum as well as the lack of information on the oxidation states **[Olsson, 1995]**.

IV.2.2. Objectives

In the previous chapter **[CHAPITRE III]**, the native oxide film formed on 2304 DSS as well as on corresponding austenitic and ferritic single phase alloys was studied by XPS and ToF-SIMS. It was found that the contents of alloying elements (Fe, Cr, Ni, Mo and N) in the native oxide film and/or in the underlying metal were directly related to their contents in the bulk of the alloys. Based on these results, chemical differences can be expected at the surface of austenite and ferrite phases within the duplex alloy.

The aim of the present work is to investigate the native oxide film formed in air after mechanical polishing and the passive film formed by electrochemical passivation in 0.05 M H_2SO_4 at the surface of 2304 DSS by a coupling of XPS and ToF-SIMS. After a global characterization of the native and passive surfaces (analyzed areas comprising both austenitic and ferritic phase regions), an innovative methodology allowing the local characterization of the oxide formed on austenite and ferrite phases will be presented. A particular attention will be paid to the partitioning of the alloying elements (Cr, Mo, Ni and N) throughout the oxide layer and the underlying metal formed on austenite and ferrite phases in order to understand the mechanisms of formation and the properties of surface oxides on DSSs.

IV.3. Materials and methods

IV.3.1. Alloy

This study was carried out using 1 mm thick plates of 2304 lean Duplex Stainless Steel (DSS) from APERAM with a cold-rolled, annealed and pickled surface finish. **Table IV-1** summarizes the chemical compositions of 2304 DSS as well as its austenite and ferrite constituent phases. The composition of 2304 DSS was determined by X-ray fluorescence for chromium, nickel, manganese, silicon, copper and molybdenum, inert gas fusion-thermal conductivity detection for nitrogen and combustion-infrared absorption for carbon and sulfur.

The composition of austenite and ferrite phases was estimated by ThermoCalc simulation. The contents of iron, nickel, manganese, copper, nitrogen and carbon were found higher in austenite than in ferrite (gammagene alloying elements). On the contrary, the contents of chromium, silicon and molybdenum were found higher in ferrite than in austenite (alphagene alloying elements). As expected, 2304 DSS exhibited an intermediate global chemical composition.

Table IV-1 Chemical composition of 2304 DSS as well as austenite and ferrite constituent phases.

at. %	Fe	Cr	Ni	Mn	Si	Cu	Mo	N	C	S
2304 DSS[1]	bal. (67.6)	24.6	4.4	1.5	0.88	0.33	0.27	0.36	0.07	<10 ppm
Austenite phase[2]	bal. (69.1)	21.5	5.6	1.7	0.80	0.43	0.21	0.59	0.11	<10 ppm
Ferrite phase[2]	bal. (65.8)	28.2	3.1	1.3	0.97	0.21	0.33	0.08	0.03	<10 ppm

[1]Determined by X-ray fluorescence (chromium, nickel, manganese, silicon, copper and molybdenum), inert gas fusion-thermal conductivity detection (nitrogen) or combustion-infrared absorption (carbon and sulfur).

[2]Chemical composition at equilibrium at 1050°C estimated from ThermoCalc TCFE5 thermodynamic database.

IV.3.2. Surface preparation

The dimensions of the coupons were 10 × 12 mm² (native surfaces) or disks of 12 mm diameter (passive surfaces). The coupons were abraded with a series of SiC papers and polished with 6 µm, 3 µm and 1 µm diamond spray, successively. The polished samples were then cleaned ultrasonically in acetone and then in ethanol three times for 10 min. In addition, the coupons used for passivation were cleaned ultrasonically in ultrapure water for 10 min, dried with filtered compressed air and stored in air for 24 h. For electrochemical passivation, an Autolab potentiostat was used. The working electrode was the sample to be passivated, the counter electrode was a platinum wire and the reference electrode was a Mercury Sulfate Electrode (MSE). The electrolyte was an aerated 0.05 M H_2SO_4 solution prepared from a 95 % H_2SO_4 solution diluted in ultrapure water. After a 15 min rest at the Open Circuit Potential (OCP), passivation of the surface was performed by applying for 30 min a potential of −100 mV/MSE, corresponding to the middle of the passive region. After passivation, the

coupons were rinsed with ultrapure water and dried with filtered compressed air. The coupons (both native and passive surfaces) were stored in air during three weeks, following a procedure described for the native oxide film in the previous chapter **[CHAPITRE III]**. The coupons were again cleaned ultrasonically in acetone and then in ethanol three times for 10 min and finally the surfaces were analyzed by XPS and ToF-SIMS.

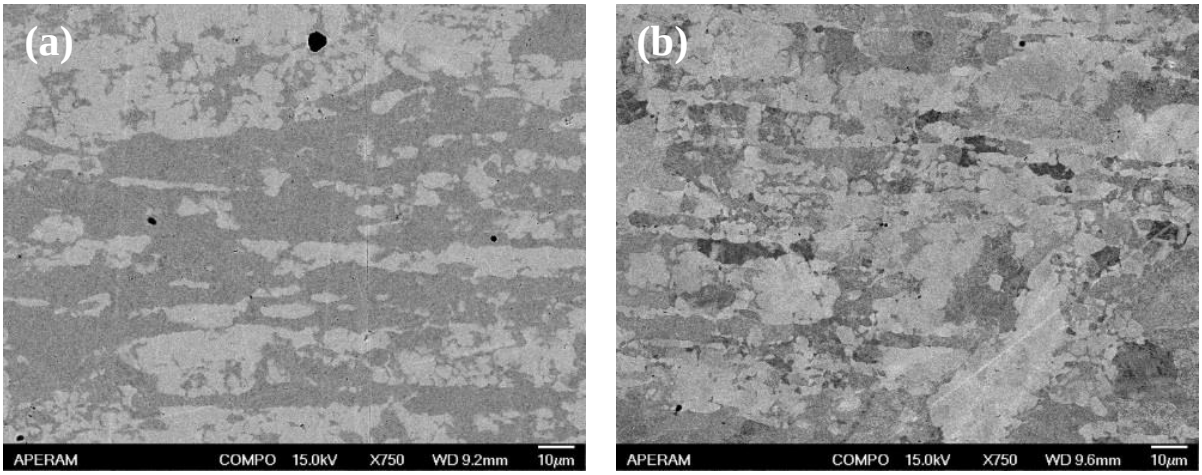


Figure IV-1 SEM backscattered electrons images of the (a) native and (b) passive duplex stainless steel surfaces (Jeol 7000F microscope, accelerating voltage = 15.0 kV).

Sigmameter analysis revealed that the surface of 2304 DSS was composed of 54 % ferrite regions and 46 % austenite regions. The Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG-SEM) image of the native 2304 DSS surface shown in the **Figure IV-1-a** illustrates the presence of approximately equivalent volumes of austenite (light regions) and ferrite (dark regions) phases. For the passive surface, shown in the **Figure IV-1-b**, grains were partially revealed, probably as a consequence of immersion in the acidic electrolyte, and phase identification was therefore less obvious.

IV.3.3. Surface characterization

IV.3.3.1. XPS analysis

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) analysis was performed with a Thermo Electron Escalab 250 spectrometer, using a monochromated Al Kα X-ray source ($h\nu$ = 1486.6 eV). The base pressure in the analytisis chamber was maintained at 10^{-9} mbar. The spectrometer was calibrated using Au $4f_{7/2}$ at 84.1 eV. The take-off angle was 90° and the analyzed area

was a 500 µm diameter disk. Complementary analyses were carried out by angle-resolved XPS (AR-XPS) with take-off angles of 40° and 90°. Survey spectra were recorded with a pass energy of 100 eV at a step size of 1 eV and high resolution spectra of the C 1s, O 1s, Fe 2p, Cr 2p, Ni 2p, Mo 3d and N 1s core level regions were recorded with a pass energy of 20 eV at a step size of 0.1 eV. All spectra were referred to the C 1s peak for carbon involved C–C and C–H bonds, located at 285.0 eV **[Frateur, 2007]**, **[Torres Bautista, 2015]**. Curve fitting of the spectra was performed with the Thermo Electron software Avantage version 5.938 using an iterative Shirley-type background subtraction. Symmetrical peaks were used except for the Fe 2p, Cr 2p, Ni 2p, and Mo 3d metallic components. Contents of manganese and copper in the oxide layer were found to be lower than 1 at. % and were not taken into consideration.

IV.3.3.2. ToF-SIMS analysis

Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS) analysis was performed using a ToF-SIMS 5 spectrometer (IonTof – Munster Germany) operating at a pressure of 10^{-9} mbar. Data acquisition and post processing analysis were performed using the SurfaceLab software version 6.5. Prior to each measurement, the extreme surface was sputtered during approximately 1 min using a Cs^+ ion sputter gun in order to eliminate the carbonaceous pollution from the surface. In a first stage (global approach), the spectrometer was run in HC-BUNCHED mode for optimum mass resolution. Depth profiles and associated mass spectra were recorded in dual beam mode using a pulsed 25 keV Bi^+ primary ion source delivering 1.2 pA of target current over a 500 × 500 µm² area interlaced with a 500 eV Cs^+ sputter beam delivering 15 nA of target current over a 700 × 700 µm² area with a 45° incidence to the specimen surface. Under these conditions of analysis (global approach), the sputtering rate of the oxide can be estimated around 0.003 nm/s **[Mazenc, 2012]**. In a second stage (local approach), the spectrometer was run in BA-IMAGE mode for optimum lateral resolution and the primary ion pulse was split into 4 short pulses in order to improve the mass resolution. Depth profiles, associated mass spectra and 3D chemical maps were recorded in dual beam mode using a pulsed 25 keV Bi^+ burst primary ion source (to get optimum lateral and mass resolutions) delivering 0.2 pA of target current over a 100 × 100 µm² area interlaced with a 500 eV Cs^+ sputter beam delivering 15 nA of target current over a 300 × 300 µm² area. Under these conditions of analysis (local approach), the sputtering rate of the oxide can be estimated around 0.017 nm/s **[Mazenc, 2012]**. Mass spectra and 3D chemical maps were reconstructed by cumulating the data obtained in defined ranges of sputtering times. In the depth profiles,

the intensity was reported using a logarithmic scale, which gave equal emphasis to signals of all intensities. The variation of the ion intensity with sputtering time reflected the variation of the in-depth concentration but was also dependent on the matrix from which the ions were emitted. The metal/oxide interface was positioned at the sputtering time corresponding to 80 % of the maximum intensity of the Ni_2^- signal. Local depth profiles, on both austenite and ferrite phases, were extracted by selecting regions of interest on the 3D chemical maps. CrO_2^- / FeO_2^- and MoO_3^- / FeO_2^- area ratios were calculated by dividing the areas of the CrO_2^- and FeO_2^- and of the MoO_3^- and FeO_2^- mass spectra peaks, respectively, cumulated in the oxide region, from a sputtering time of 10 s (global approach) or 4 s (local approach) to a sputtering time corresponding to the metal/oxide interface.

IV.4. Results

In the global approach, XPS and ToF-SIMS characterizations are performed with an analyzed area comprising both austenite and ferrite phase regions. In this part, the data obtained for the passive film are compared to those obtained previously for the native oxide film **[CHAPITRE III]**. In the local approach, ToF-SIMS characterization allows us to extract information locally in order to investigate the oxide formed on each phase, both for the native and the passive surfaces.

IV.4.1. Global approach

IV.4.1.1. XPS characterization

The survey spectrum recorded for the passive film (**Figure IV-2**) indicates that the main elements detected at the surfaces are carbon, oxygen, iron, chromium and nickel. A small amount of nitrogen is detected whereas no molybdenum is observable due to low Mo content of 2304 DSS. These results are similar to those found for the native oxide film **[CHAPITRE III]**. In the case of the passive film, traces of calcium are also detected.

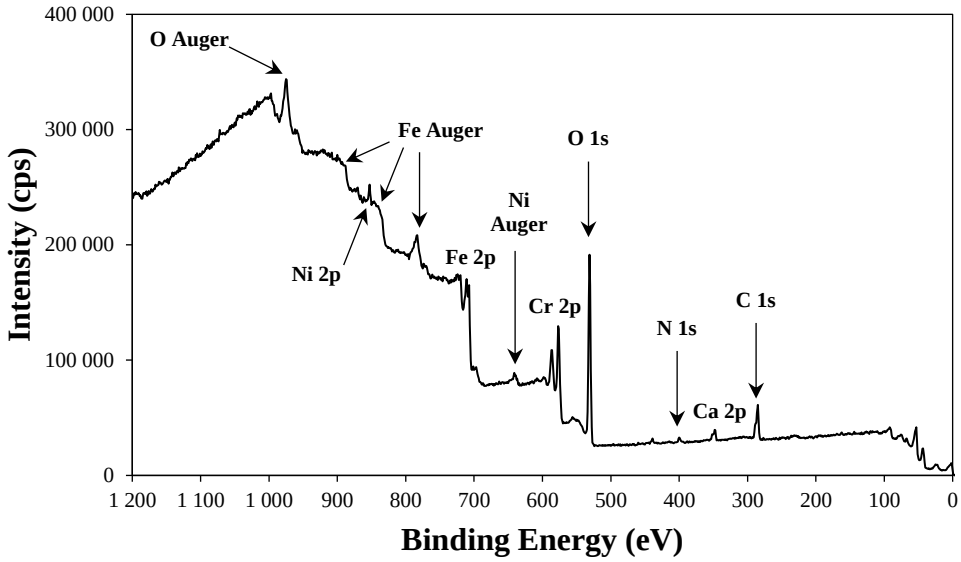


Figure IV-2 XPS survey spectrum recorded for the passive film formed on the duplex stainless steel.

Figure IV-3 shows the core level XPS spectra O 1s, Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$, Mo 3d and N 1s obtained for the passive film and the peak fitting. The XPS spectra and the peak fitting for the native oxide film have been shown in the previous chapter **[CHAPITRE III]**. Peak assignment and fitting parameters are reported in the **Table IV-2**. The decomposition of XPS spectra is similar for the native oxide film and the passive film, showing similar chemical environments. Based on these results, the native oxide film and the passive film formed on 2304 DSS are both described by a mixture of oxides and hydroxides composed mainly of Fe(III) and Cr(III) species with a small amount of Mo(IV) and Mo(VI) species. As commonly reported for stainless steels, no oxidized nickel is detected **[Frankenthal, 1976]**, **[Clayton, 1986]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Maurice, 1998]**, **[Shimizu, 2000]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Addari, 2008]**, **[Hamada, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Fredriksson, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**, **[Tardio, 2015]**. A contribution corresponding to nitrogen present in the alloy is detected. The detection of metallic components in the Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ and Mo 3d signals indicates that the thickness of the surface oxide layers is of the order of a few nanometers.

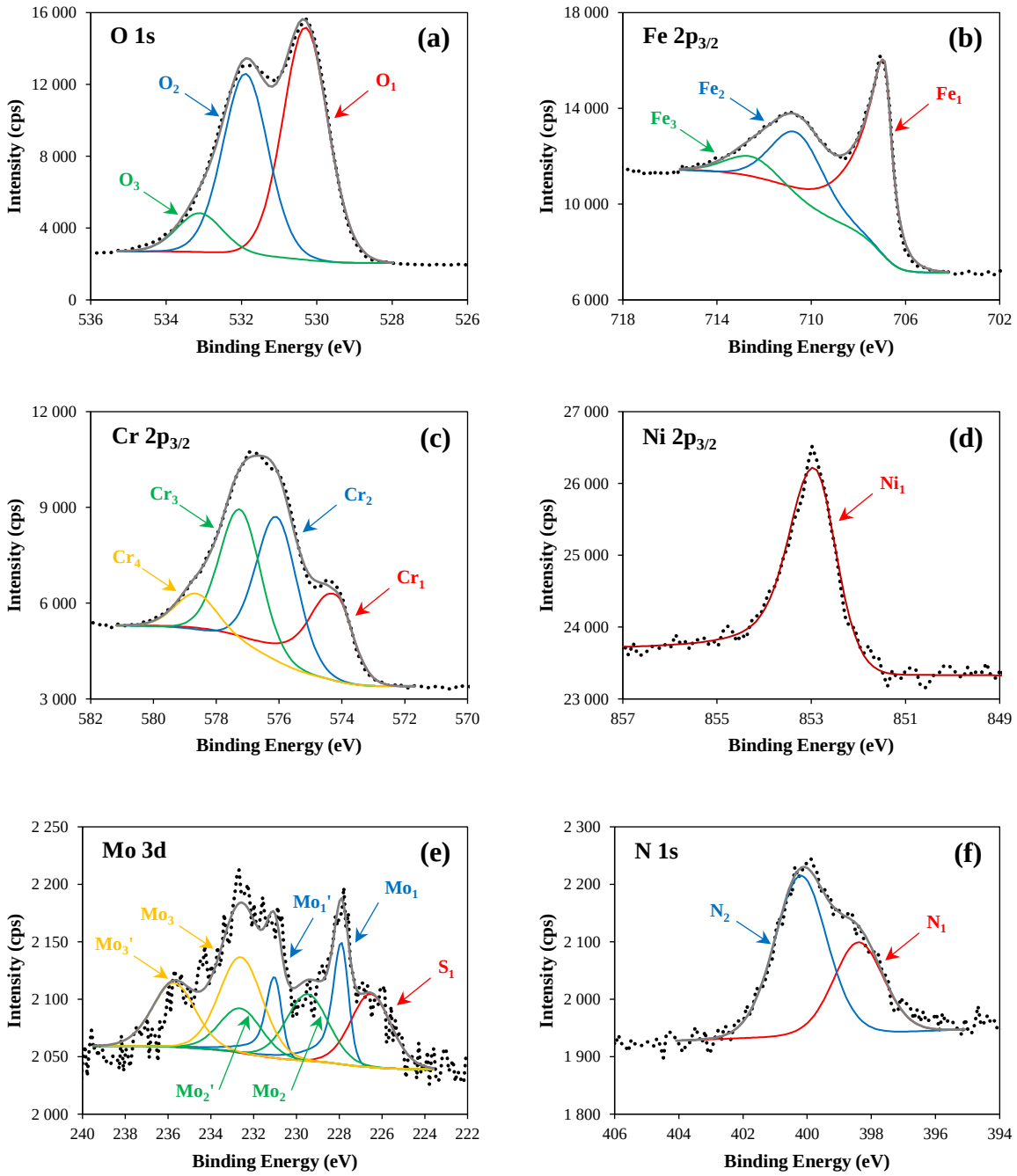


Figure IV-3 XPS core level spectra recorded for the passive film formed on the duplex stainless steel.

Table IV-2 Peak assignment and fitting parameters used for the decomposition of XPS core level spectra, both for the native oxide and the passive film on 2304 DSS surface.

Core level	Component	Assignment	BE (eV)	FWHM (eV)	Symmetric / Asymmetric	References
O 1s	O_1	Metal oxides	530.2 ± 0.1 eV	1.4 ± 0.1 eV	Symmetric	[De Vito, 1992] [Olsson, 1995] [Keller, 2004] [Frateur, 2007] [Vignal, 2013a] [Maurice, 2015]
	O_2	Metal hydroxides	531.9 ± 0.2 eV	1.6 ± 0.2 eV	Symmetric	
	O_3	Adsorbed water	533.2 ± 0.2 eV	1.6 ± 0.2 eV	Symmetric	
Fe $2p_{3/2}$	Fe_1	Metallic iron	706.7 ± 0.1 eV	0.79 eV	Asymmetric	[Mansour, 2010] [Maurice, 2015]
	Fe_2	Fe(III) oxide and/or hydroxide	710.4 ± 0.1 eV	2.7 ± 0.1 eV	Symmetric	
	Fe_3	Fe(III) oxide and/or hydroxide (satellite)	712.5 ± 0.1 eV	2.7 ± 0.1 eV	Symmetric	
Cr $2p_{3/2}$	Cr_1	Metallic chromium	574.1 ± 0.1 eV	1.31 eV	Asymmetric	[Maurice, 2000] [Diaz, 2012] [Maurice, 2015]
	Cr_2	Cr(III) oxide and/or hydroxide	576.0 ± 0.1 eV	1.5 ± 0.1 eV	Symmetric	
	Cr_3	Cr(III) oxide and/or hydroxide (satellite)	577.1 ± 0.1 eV	1.5 ± 0.1 eV	Symmetric	
	Cr_4	Cr(III) oxide and/or hydroxide (satellite)	578.5 ± 0.1 eV	1.5 ± 0.1 eV	Symmetric	
Ni $2p_{3/2}$	Ni_1	Metallic nickel	852.8 ± 0.1 eV	1.13 eV	Asymmetric	[Marcus, 1992b] [De Vito, 1992] [Torres, 2015] [Maurice 2015]
Mo 3d	S_1	S 2s core level from sulfur species	226.3 ± 0.2 eV	2.4 ± 0.2 eV	Symmetric	[Qiu, 2010] [Marcus, 1988] [Brox, 1988] [De Vito, 1992] [Olsson, 2002] [Petrova, 2011] [Högström, 2013] [Mesquita, 2013] [Maurice, 2015]
	Mo_1	Metallic molybdenum (Mo $3d_{5/2}$)	227.8 ± 0.1 eV	0.81 eV	Asymmetric	
	Mo_1’	Metallic molybdenum (Mo $3d_{3/2}$)	230.9 ± 0.1 eV	0.81 eV	Asymmetric	
	Mo_2	Mo(IV) oxide and/or hydroxide (Mo $3d_{5/2}$)	229.3 ± 0.1 eV	2.3 ± 0.1 eV	Symmetric	
	Mo_2’	Mo(IV) oxide and/or hydroxide (Mo $3d_{3/2}$)	232.4 ± 0.1 eV	2.3 ± 0.1 eV	Symmetric	
	Mo_3	Mo(VI) oxide and/or hydroxide (Mo $3d_{5/2}$)	232.5 ± 0.1 eV	2.5 ± 0.1 eV	Symmetric	
	Mo_3’	Mo(VI) oxide and/or hydroxide (Mo $3d_{3/2}$)	235.6 ± 0.1 eV	2.5 ± 0.1 eV	Symmetric	
N 1s	N_1	Alloyed nitrogen	398.3 ± 0.2 eV	1.7 ± 0.2 eV	Symmetric	[Marcus, 1992a] [Vanini, 1992] [Frateur, 2007] [Torres, 2015]
	N_2	Amine/amide groups	400.1 ± 0.1 eV	1.9 ± 0.1 eV	Symmetric	

Both for the passive and the native oxide films, a model consisting in an homogeneous and continuous oxide layer composed of Fe(III), Cr(III), Mo(IV) and Mo(VI) oxides and/or hydroxides on top of the metallic 2304 DSS substrate composed of Fe, Cr, Ni, Mo and N was assumed. The system of equations associated to this model was detailed previously **[CHAPITRE III]**.

Table IV-3 XPS quantitative results obtained for the passive film, and comparison with the data obtained for the native oxide film **[CHAPITRE III]** formed on the duplex stainless steel. The mean values and standard deviations are presented (four coupons analyzed in each case).

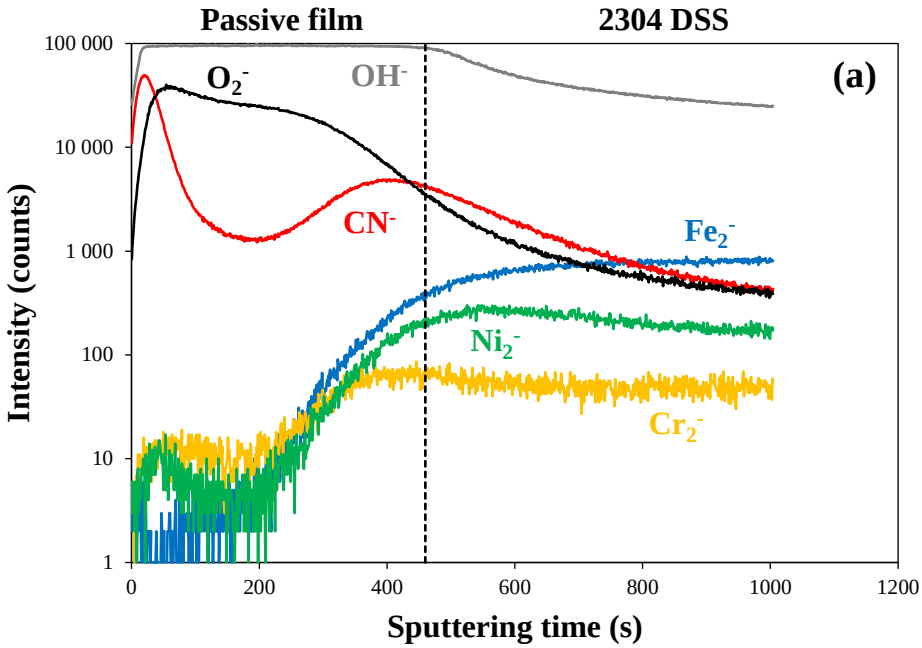
			Passive film (this work)	**Native oxide film [CHAPITRE III]**
Oxide film thickness (nm)			2.0 ± 0.2	2.4 ± 0.1
Chemical composition (at. %)	**Oxide film**	**Fe(III)**	28.0 ± 4.0	61.9 ± 1.2
		Cr(III)	69.8 ± 3.4	37.0 ± 1.1
		Mo(IV) / Mo(VI)	2.2 ± 0.8	1.1 ± 0.2
	Underlying metal	**Fe**	57.1 ± 3.0	64.2 ± 2.1
		Cr	25.0 ± 1.8	22.7 ± 1.1
		Ni	14.0 ± 2.3	8.5 ± 1.5
		Mo	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.2
		N	3.4 ± 1.2	3.8 ± 1.1
	Bulk alloy	**Fe**	balance (67.6)	
		Cr	24.6	
		Ni	4.4	
		Mo	0.27	
		N	0.36	

Table IV-3 compiles the XPS quantitative data (oxide thickness, oxide composition and underlying metal composition) obtained for the passive film formed at the surface of 2304 DSS compared to the data obtained for the native oxide film in the previous chapter **[CHAPITRE III]**. The thickness of the oxide is slightly lower for the passive film (2.0 ± 0.2 nm) than for the native oxide film (2.4 ± 0.1 nm). For the passive film, the iron content in the oxide (28.0 ± 4.0 at. %) is significantly reduced compared to the bulk (67.6 at. %), whereas for the native oxide film, the iron content in the oxide (61.9 ± 1.2 at. %) remains close to the iron bulk content. The chromium content in the oxide is significantly higher for the passive film (69.8 ± 3.4 at. %) than for the native oxide film (37.0 ± 1.1 at. %). This shows that the oxide is enriched in chromium compared to the bulk (24.6 at. %) and that this enrichment is

more pronounced after passivation. A small amount of oxidized molybdenum is detected in the passive film (2.2 ± 0.8 at. %) and in the native oxide film (1.1 ± 0.2 at. %). This shows that molybdenum is enriched in the oxide compared to the bulk (0.3 at. %) and that this enrichment is more pronounced after passivation. No oxidized nickel is detected for the passive film or the native oxide film. In the case of the passive film, the iron content in the underlying metal (57.1 ± 3.0 at. %) is reduced compared to the bulk. In the case of the native oxide film, the iron content in the underlying metal (64.2 ± 2.1 at. %) remains close to iron bulk content. The chromium content in the underlying metal is found to be 25.0 ± 1.8 at. % for the passive surface and 22.7 ± 1.1 at. % for the native surface, which remains close to the chromium bulk content. In the underlying metal, metallic nickel is enriched compared to the bulk (4.4 at. %) and this enrichment is more pronounced for the passive surface (14.0 ± 2.3 at. %) than for the native one (8.5 ± 1.5 at. %). The molybdenum content in the underlying metal is found to be 0.4 ± 0.1 at. % for the passive surface and 0.8 ± 0.2 at. % for the native one, which is slightly higher than the molybdenum content in the bulk alloy. The nitrogen content in the underlying metal is found to be 3.4 ± 1.2 at. % for the passive surface and 3.8 ± 1.1 at. % for the native one, revealing strong nitrogen enrichment at the metal/oxide interface compared to the bulk (0.4 at. %).

XPS analyses of O 1s, Fe 2p and Cr 2p core level spectra have been performed using angle-resolved XPS at take-off angles of 90° (same angle than for the previous analyses) and 40° (more surface-sensitive). In the case of the native surface, Cr(III) / Fe(III) ratios of 0.3 and 0.4 are obtained at 40° and 90°, respectively, indicating that the native oxide film is slightly richer in chromium in the inner part than in the outer part. In the case of the passive surface, Cr(III) / Fe(III) ratios of 0.4 and 2.3 are obtained at 40° and 90°, respectively, revealing a pronounced stratification of the passive film composed of an iron-rich outer layer and a chromium-rich inner layer. For the native surface, Hydroxide / Oxide ratios of 0.6 are obtained for both take-off angles, showing that the in-depth distribution of oxide and hydroxide species is homogeneous. For the passive surface, Hydroxide / Oxide ratios of 0.9 and 0.6 are obtained at 40° and 90°, respectively, showing that hydroxide species are preferentially located in the outer part of the passive film.

IV.4.1.2. ToF-SIMS characterization



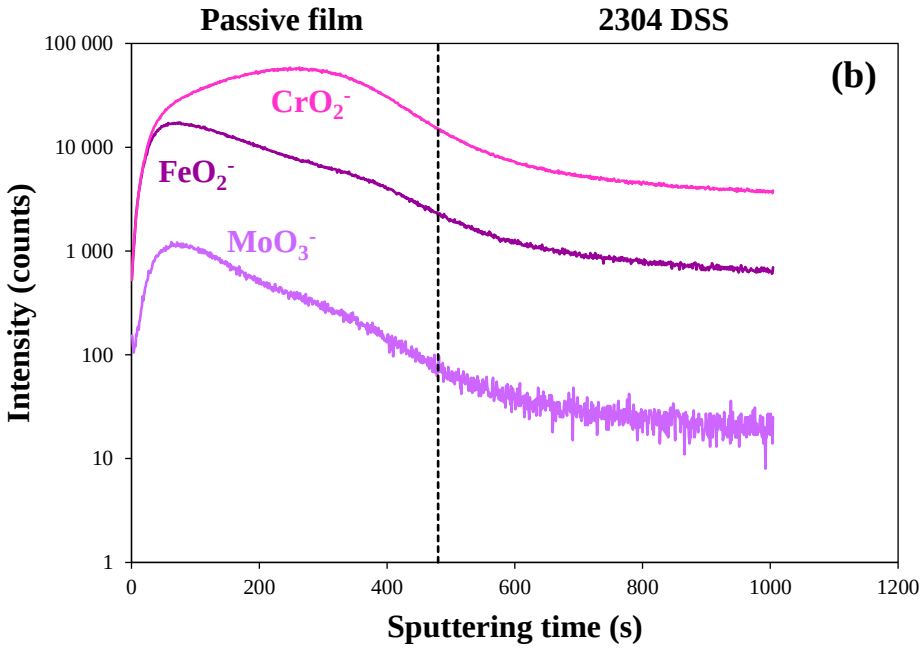


Figure IV-4 Global ToF-SIMS negative ions depth profiles recorded for the passive film formed on the duplex stainless steel (HC-BUNCHED mode; analyzed zone: 500 × 500 µm²; sputtered zone: 700 × 700 µm²). O_2^-, OH^-, CN^-, Fe_2^-, Cr_2^-, Ni_2^-, FeO_2^-, CrO_2^- and MoO_3^- ions signals are plotted.

Figure IV-4-a shows the global ToF-SIMS negative ions depth profiles of O_2^-, OH^-, CN^-, Fe_2^-, Cr_2^- and Ni_2^- secondary ions obtained for the passive alloy surface. These profiles indicate an oxide layer (maximum O_2^- and OH^- signals) on top of the alloy substrate (maximum Fe_2^-, Cr_2^- and Ni_2^- signals), as typically observed for austenitic stainless steels **[Maurice, 2015]**, **[Seyeux, 2015]**. The depth profiles obtained for the native surface **[CHAPITRE III]** show a similar structure. The metal/oxide interface (located at 80 % of the maximum intensity of the Ni_2^- signal) corresponds to 480 $\pm$ 10 s for the passive film and it was 610 $\pm$ 10 s for the native oxide film **[CHAPITRE III]**. Under these conditions of analysis, the oxide thickness can be estimated **[Mazenc, 2012]** around 1.4 $\pm$ 0.1 nm for the passive film and 1.8 $\pm$ 0.1 nm for the native oxide film, which is slightly lower but in the same order of magnitude than the XPS data. These results suggest, in good agreement with XPS data, that the passive film is slightly thinner than the native oxide film.

The O_2^- and OH^- signals are characteristic of oxide and hydroxide species, respectively. The intensity of the O_2^- and OH^- signals is high throughout the oxide region, indicating that the oxide matrix is hydroxylated, both for the passive and the native surfaces **[CHAPITRE III]**. For the passive, the OH^- profiles saturate, suggesting that it is more hydroxylated than the native oxide film. The maximum of the CN^- signal near the metal/oxide interface reflects nitrogen enrichment in the alloy under the passive film. Signals characteristic of metallic iron, chromium and nickel are Fe_2^-, Cr_2^- and Ni_2^-, respectively. The Cr_2^- signal is weak, which is likely due to a low ionic emission rate in this matrix in negative polarity. The Fe_2^- profiles reach a plateau in the metal region whereas the Ni_2^- profiles exhibit a maximum close to the metal/oxide interface, indicating metallic nickel enrichment under the oxide film.

Figure IV-4-b shows the global ToF-SIMS negative ions depth profiles for secondary ions characteristic of iron (FeO_2^-), chromium (CrO_2^-) and molybdenum (MoO_3^-) oxide species obtained for the passive film on the duplex stainless steel surface. The depth profiles obtained for the native surface have been presented in the previous chapter **[CHAPITRE III]**. Note that the MoO_3^- signal is used in order to get rid of the overlapping of the MoO_2^- (m/z = 129.8958) and $FeNiO^-$ (m/z = 129.8658) ions. Both for the passive and the native surfaces, the maximum intensities of the FeO_2^- profiles are reached before those for CrO_2^-. This suggests that, for both native and passive surfaces, oxidized iron is preferentially located in the outer part of the oxide film, whereas oxidized chromium is preferentially located in the inner part, in agreement with published ToF-SIMS data **[Fajardo, 2010]**, **[Fajardo, 2014]**,

[Maurice, 2015]. The sputtering time range between the maximum of the CrO_2^- signal and the metal/oxide interface is similar for the passivated surface (220 s) and the native surface (200 s) **[CHAPITRE III]**. This suggests that the thickness of the chromium-rich inner part of the oxide is similar for the native and passivated surfaces, while the iron-rich part is preferentially dissolved during passivation, explaining the lower total thickness of the passive film compared to the native oxide film.The MoO_3^- signals are weak throughout the oxide film and its maxima are reached in the outer oxide region. The intensity of the MoO_3^- signals is higher for the passive surface than for the native one **[CHAPITRE III]**, indicating that passivation induces molybdenum oxide enrichment, preferentially in the outer part of the oxide film.

For the passive film, CrO_2^- / FeO_2^- and MoO_3^- / FeO_2^- area ratios of 4.3 ± 0.2 and $5.8 \pm 0.7 \times 10^{-2}$ are obtained, respectively (average values obtained for 6 measurements). For the native oxide film, CrO_2^- / FeO_2^- and MoO_3^- / FeO_2^- area ratios of 1.5 ± 0.2 and $3.2 \pm 1.0 \times 10^{-2}$ were obtained, respectively (average values obtained for 10 measurements) **[CHAPITRE III]**. The increase of these ratios indicates, in agreement with XPS results, that passivation induces further chromium and molybdenum oxide enrichments compared to the native oxide.

IV.4.1.3. Coupling of XPS and ToF-SIMS data

As detailed in this section, XPS and ToF-SIMS analyses have provided consistent information concerning the chromium content of the oxide layer formed on native and passive 2304 DSS surfaces. Whereas XPS is a quantitative technique, the CrO_2^- / FeO_2^- area ratio obtained from ToF-SIMS depth profiles is a comparative parameter and cannot directly be associated to the actual Cr(III) content of the oxide. In order to investigate the correlation between the two techniques, a series of oxide layers were characterized by XPS in well-defined areas, then the coupons were transferred to the ToF-SIMS analysis chamber without contact with air and ToF-SIMS depth profiles were recorded in the same areas. Additional measurements were performed after immersion of the native duplex surface during 1 hour in seawater-based media following a procedure that will be described in the next chapter **[CHAPITRE V]**.

Figure IV-5 shows a linear relationship between the CrO_2^- / FeO_2^- area ratio obtained by ToF-SIMS and the Cr(III) content of the oxide layer measured by XPS. Thanks to this abacus, the Cr(III) content of the oxide layer can now be deduced from the CrO_2^- / FeO_2^- area ratio.

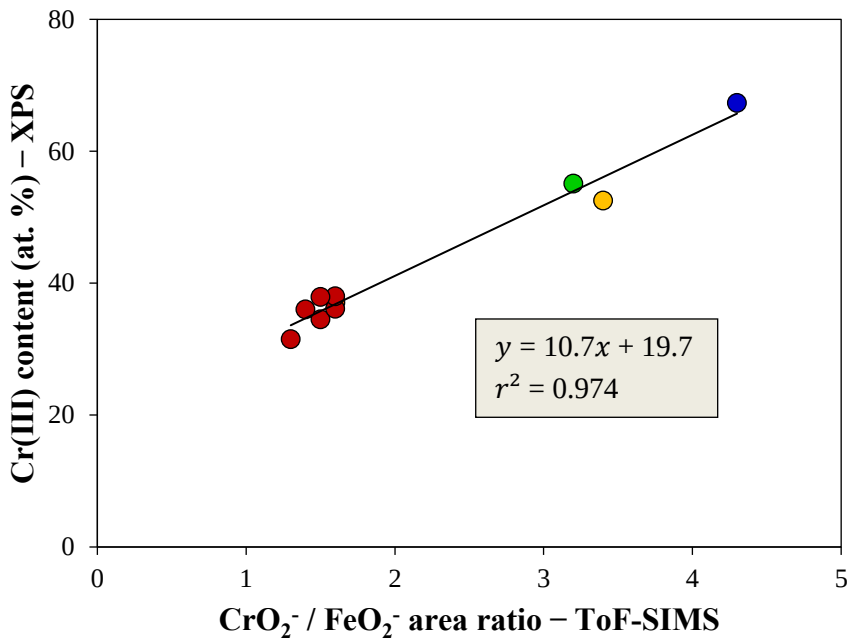


Figure IV-5 Correlation between the CrO_2^- / FeO_2^- area ratio obtained by ToF-SIMS and the Cr(III) content of the oxide layer formed on the duplex stainless steel obtained by XPS for (red) the native oxide film **[CHAPITRE III]**, (blue) the passive film (this work), (yellow) the native oxide film after 1 hour immersion in artificial seawater **[CHAPITRE V]** and (green) the native oxide film after 1 hour immersion in artificial seawater enriched with nutrients **[CHAPITRE V]**.

IV.4.2. Local approach

The ToF-SIMS 3D chemical maps of CN^-, Ni^-, O^-, OH^-, FeO_2^- and CrO_2^- secondary ions recorded for native oxide film and passive film are shown on **Figure IV-6** and **Figure IV-7**, respectively. By comparison with the FEG-SEM images recorded on the same zones for the native oxide film (**Figure IV-1-a**) and the passive film (**Figure IV-1-b**), the light areas in the CN^- and Ni^- maps (richer in nitrogen and nickel) are assigned to austenite while the dark areas (poorer in nitrogen and nickel) correspond to ferrite. This can be explained by the higher nitrogen and nickel bulk contents of austenite compared to ferrite. These results demonstrate the ability of ToF-SIMS 3D chemical maps to identify austenite and ferrite phases at the native and passive 2304 DSS surfaces.

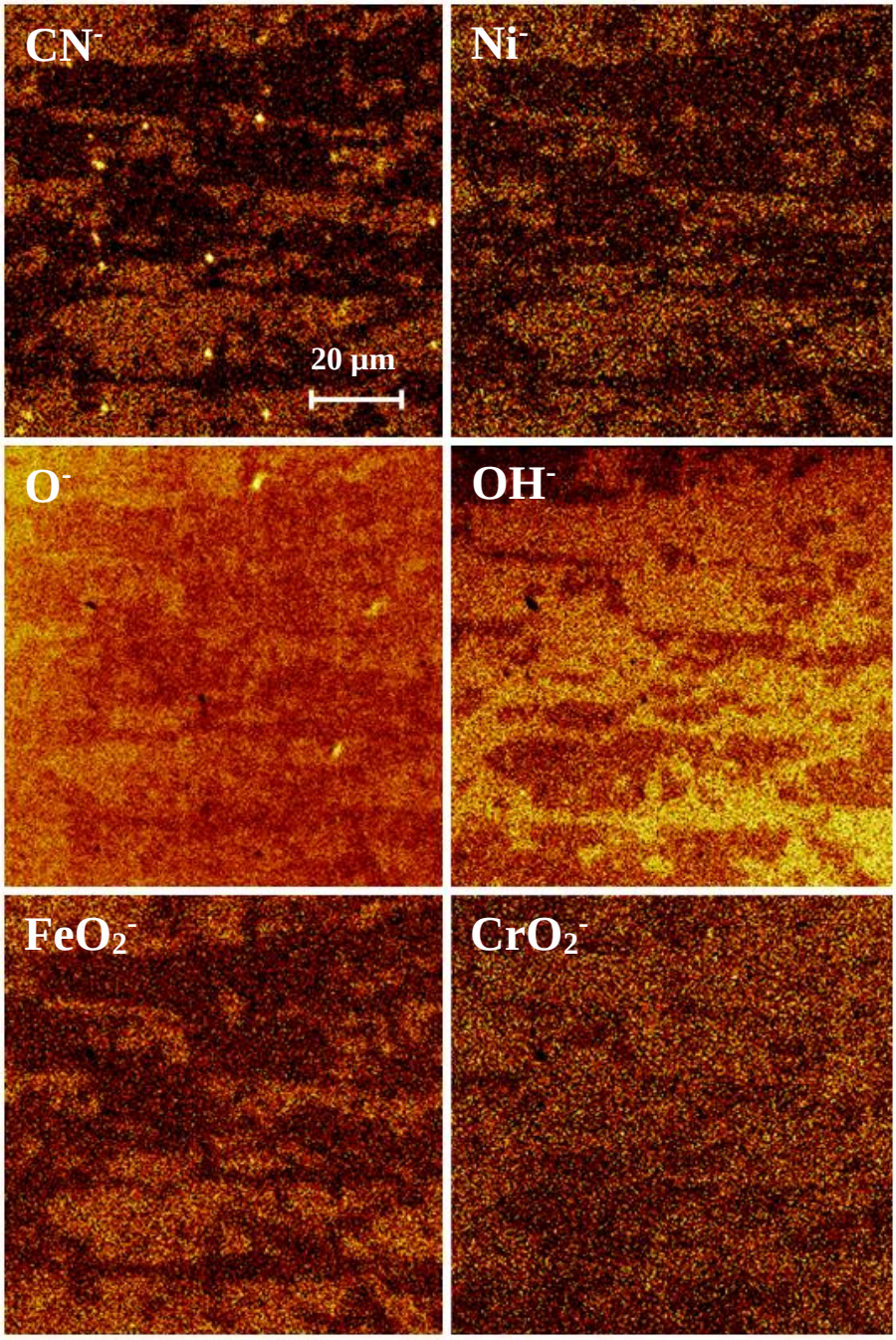


Figure IV-6 ToF-SIMS 3D negative ions chemical maps obtained for the native oxide film (BA-IMAGE mode; analyzed zone: 100 × 100 µm²; sputtered zone: 300 × 300 µm²). In order to enhance the contrasts, CN^- and Ni^- maps were reconstructed in the metallic substrate region, O^- maps in the inner oxide region, OH^- maps in the outer oxide region and FeO_2^- and CrO_2^- maps in the total oxide region (see text for experimental details).

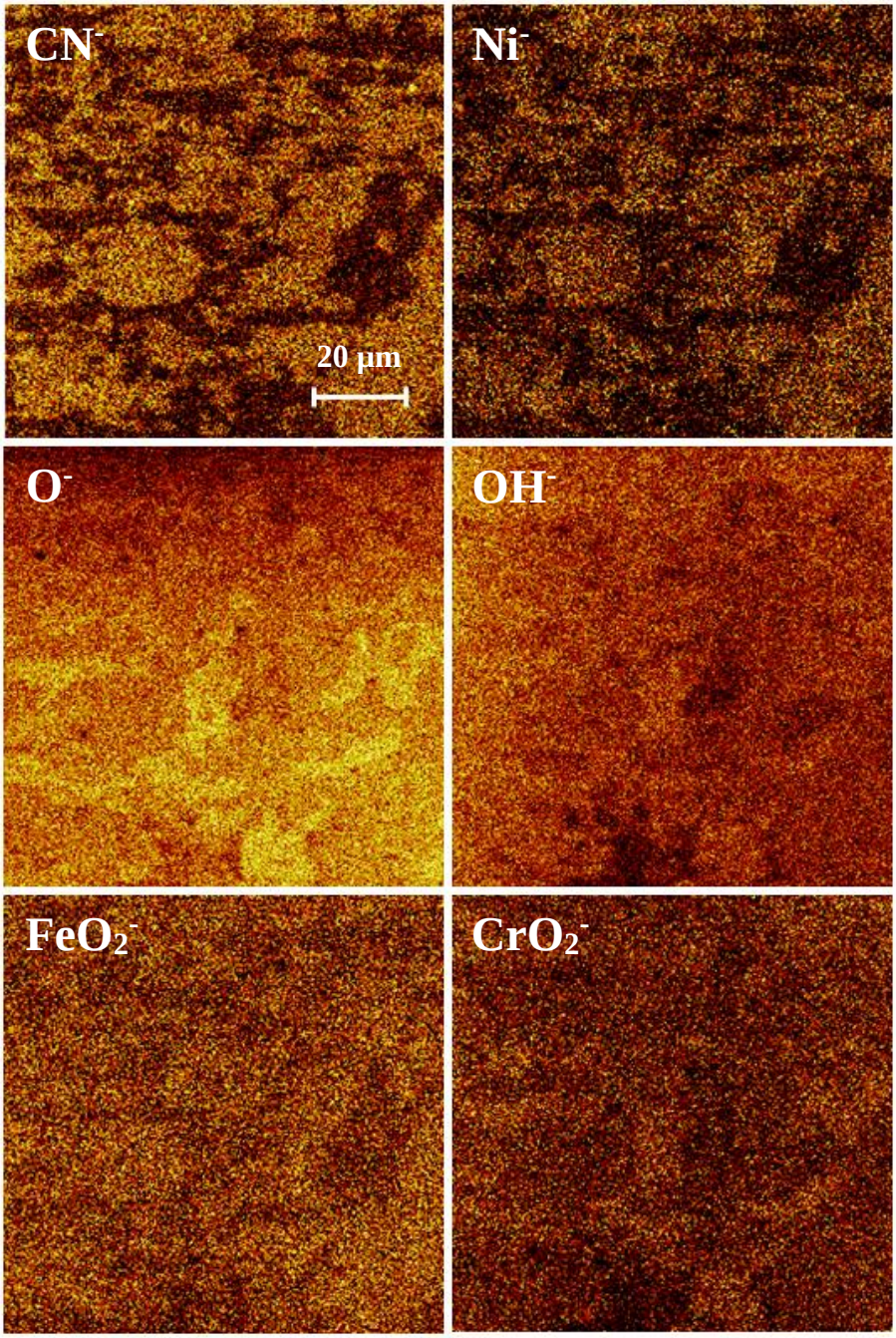


Figure IV-7 ToF-SIMS 3D negative ions chemical maps obtained for the passive film (BA-IMAGE mode; analyzed zone: 100 × 100 µm²; sputtered zone: 300 × 300 µm²). In order to enhance the contrasts, CN^- and Ni^- maps were reconstructed in the metallic substrate region, O^- maps in the inner oxide region, OH^- maps in the outer oxide region and FeO_2^- and CrO_2^- maps in the total oxide region (see text for experimental details).

The contrasts observed in the O^- and OH^- maps obtained for the native oxide film (**Figure IV-6**) show a good agreement with the phase contrast and suggest that the ferrite phase is more hydroxylated than the austenite one. This is less clear for the passive film (**Figure IV-7**). The FeO_2^- and CrO_2^- maps are also consistent with the phases and indicate qualitatively that the oxide composition is not homogeneous: the oxide is richer in iron on austenite and richer in chromium on ferrite, both for the native and the passive surfaces. A comparable methodology was used by Straub *et al.* **[Straub, 2010]** who recorded ToF-SIMS positive ions chemical maps of Cr^+, Fe^+, Ni^+, and $CrFe^+$ secondary ions in order to visualize the phases at the surface of polished duplex stainless steel. However, no information was obtained on the oxide layer.

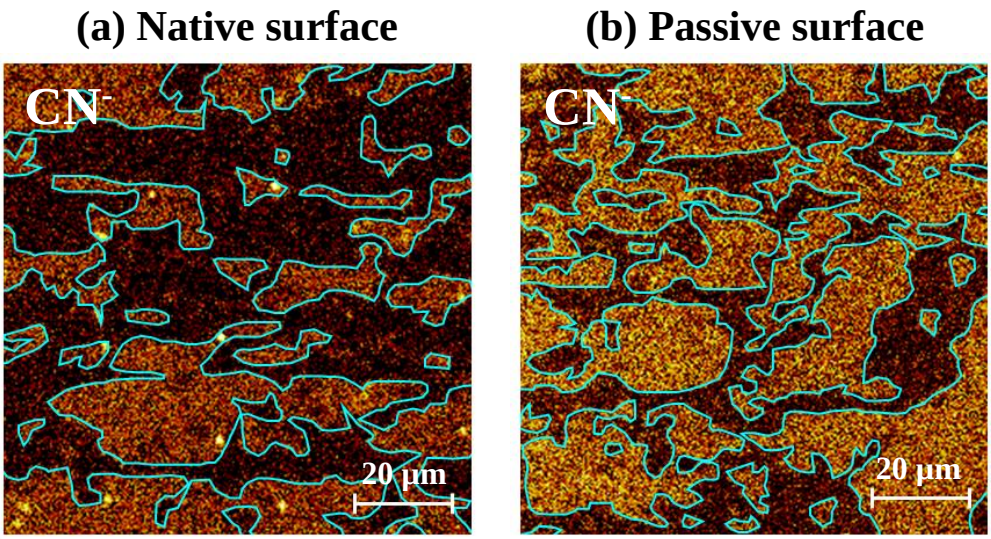


Figure IV-8 Definition of regions of interest corresponding to austenite (circled in blue) and ferrite (rest of the surface) phases on the CN^- ToF-SIMS 3D negative ions chemical maps obtained for (a) the native oxide film and (b) the passive film formed on the duplex stainless steel (BA-image mode; analyzed zone: 100 × 100 µm²; sputtered zone: 300 × 300 µm²).

Based on the ToF-SIMS 3D chemical maps presented earlier, regions of interest corresponding to austenite and ferrite phases can be defined, as shown in the **Figure IV-8**. Local ToF-SIMS negative ions depth profiles corresponding to the surface of austenite and ferrite phases can be obtained by extracting the data of each pixel located in the desired region of interest (**Figure IV-9** and **Figure IV-10**).

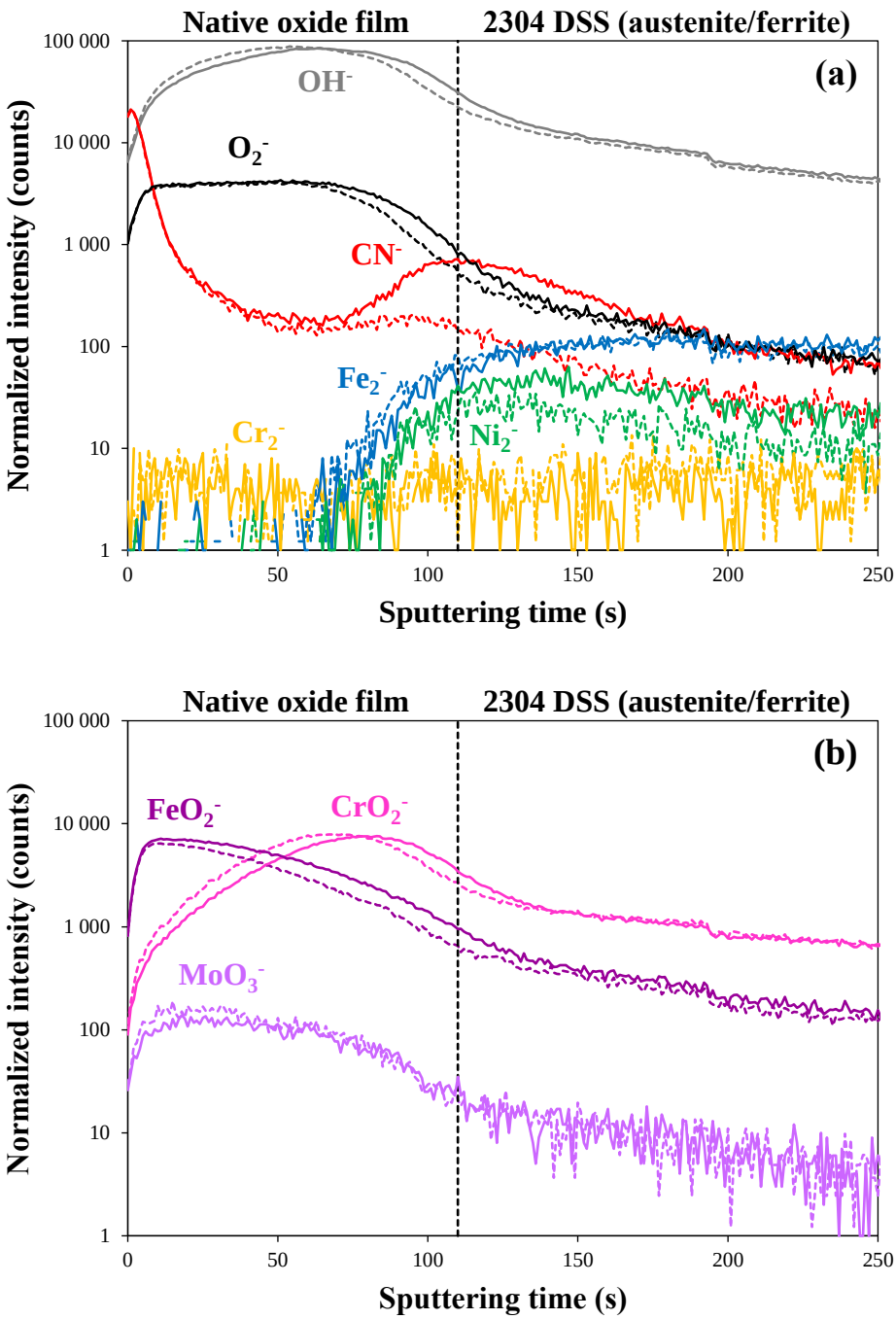


Figure IV-9 Local ToF-SIMS negative ions depth profiles recorded for the native oxide film formed on the duplex stainless steel, extracted from the austenite (solid lines) and the ferrite (dotted lines) phase regions (BA-IMAGE mode; analyzed zone: 100 × 100 µm²; sputtered zone: 300 × 300 µm²). O_2^-, OH^-, CN^-, Fe_2^-, Cr_2^-, Ni_2^-, FeO_2^-, CrO_2^- and MoO_3^- ions signals are plotted.

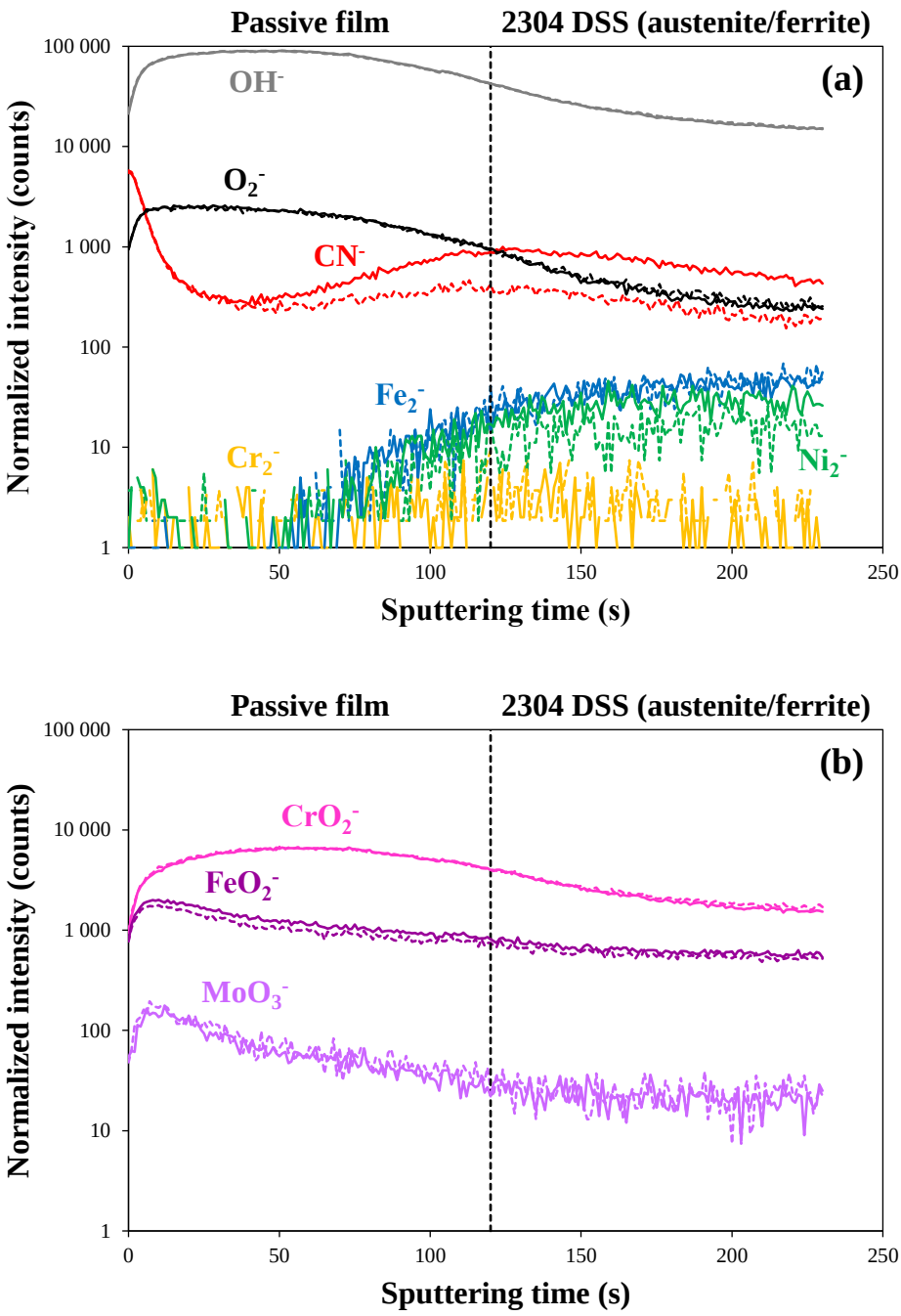


Figure IV-10 Local ToF-SIMS negative ions depth profiles recorded for the passive film formed on the duplex stainless steel, extracted from the austenite (solid lines) and the ferrite (dotted lines) phase regions (BA-IMAGE mode; analyzed zone: 100 × 100 µm²; sputtered zone: 300 × 300 µm²). O_2^-, OH^-, CN^-, Fe_2^-, Cr_2^-, Ni_2^-, FeO_2^-, CrO_2^- and MoO_3^- ions signals are plotted.

Figure IV-9-a and **Figure IV-10-a** show the local ToF-SIMS negative ions depth profiles of O_2^-, OH^-, C^-, CN^-, Fe_2^-, Cr_2^- and Ni_2^- secondary ions extracted from austenite (solid lines) and ferrite (dotted lines) phase regions for the native oxide and the passive films on the duplex stainless steel surface, respectively. The intensity of the signals has been normalized in order to compensate for the difference in the areas of the selected regions. In all cases, the surface can be described by an oxide layer on top of the austenite or ferrite phase metallic substrate. The metal/oxide interface is positioned at 110 $\pm$ 10 s for the native oxide film and at 120 $\pm$ 10 s for the passive film. Under these conditions of analysis, the oxide thickness can be estimated **[Mazenc, 2012]** around 1.9 $\pm$ 0.2 nm for native oxide film and 2.0 $\pm$ 0.2 nm for the passive film. These values are in fair agreement with the XPS data. As observed at the global scale, the O_2^- and OH^- signals indicate that the oxide matrix is hydroxylated for both surfaces and both phases. By comparing the evolution of the O_2^- and OH^- signals obtained for austenite and ferrite phase regions, the native oxide film appears slightly thicker on austenite than on ferrite (difference of $\approx$ 10 s, corresponding to $\approx$ 0.2 nm) while the thickness of the passive film is homogeneous on both phases. As explained previously, the CN^- signal indicates the presence of nitrogen enrichment at the metal/oxide interface for both surfaces and both phases. However, based on the intensity of the CN^- signals, this nitrogen enrichment is significantly more pronounced for austenite than for ferrite. The Fe_2^- profiles reach a plateau in the metal region whereas the Ni_2^- profiles reveal metallic nickel enrichment under the oxide film formed on both phases. Similarly to nitrogen enrichment, the nickel enrichment is more pronounced for austenite than for ferrite.

Figure IV-9-b and **Figure IV-10-b** show the local ToF-SIMS negative ions depth profiles of FeO_2^-, CrO_2^-, and MoO_3^- secondary ions extracted from austenite (solid lines) and ferrite (dotted lines) phase regions of the native and the passive surfaces, respectively. The conclusion on the stratification of the oxide observed in the global analysis is still valid for both phases. Indeed, for austenite and ferrite phase regions of the native and the passive surfaces, the evolution of the FeO_2^- and CrO_2^- profiles suggest a bilayer structure consisting in an outer iron-rich part and an inner chromium-rich part, as already described in the literature using ToF-SIMS **[Fajardo, 2010]**, **[Fajardo, 2014]**, **[Maurice, 2015]**. The MoO_3^- signals are weak throughout the oxide film and their maxima are reached in the outer oxide region, indicating that molybdenum oxides are present mainly in the outer of the oxide layers. For both native and passive surfaces, no significant differences in the evolution of the FeO_2^-, CrO_2^-, and MoO_3^- signals are observable between austenite and ferrite phase regions.

The CrO_2^- / FeO_2^- and MoO_3^- / FeO_2^- area ratios obtained on each phase of the 2304 DSS surface are summarized in the **Table IV-4**. Both for the native and the passive surfaces, these ratios are higher for ferrite than for austenite, showing that the chemical composition of the oxide layer is different on the two phases, with higher chromium and molybdenum contents on ferrite than on austenite. The relationship between the CrO_2^- / FeO_2^-area ratio and the Cr(III) content of the oxide layer established in the previous section can be used in order to estimate locally the Cr(III) content of the oxide layer formed on austenite and ferrite phases. For the native oxide film, Cr(III) contents of 31 and 35 at. % are obtained for austenite and ferrite phases, respectively. For the passive film, Cr(III) contents of 67 and 75 at. % are obtained for austenite and ferrite phases, respectively.

Table IV-4 CrO_2^- / FeO_2^- and MoO_3^- / FeO_2^- area ratios obtained in austenite and ferrite phase regions of the native and the passive duplex stainless steel surfaces.

	Native oxide film		**Passive film**	
Ratio	**CrO_2^- / FeO_2^-**	**MoO_3^- / FeO_2^-**	**CrO_2^- / FeO_2^-**	**MoO_3^- / FeO_2^-**
Austenite regions	1.1	2.0×10^{-2}	4.4	5.1×10^{-2}
Ferrite regions	1.4	2.9×10^{-2}	5.2	6.6×10^{-2}

IV.5. Discussion

XPS and ToF-SIMS analyses indicate that the passive film obtained after electrochemical passivation in 0.05 M H_2SO_4 at the surface of the duplex stainless steel consists in a mixture of oxides and hydroxides composed mainly of Fe(III) and Cr(III) species with a small amount of Mo(IV) and Mo(VI) species. Similar findings have been reported previously for the native oxide film obtained after mechanical polishing at the surface of the same alloy **[CHAPITRE III]**. The oxide matrix becomes more hydroxylated after passivation. Angular XPS analyses suggested that oxide and hydroxide species, which are not stratified for the native oxide film, are stratified for the passive film, with hydroxide species concentrated in the outer region. However, no stratification of oxide and hydroxide species was revealed by ToF-SIMS depth profiles for any of the surfaces.

According to ToF-SIMS depth profiles, iron species are preferentially located in the outer oxide region and chromium species in the inner oxide region, showing a bilayer structure of both the native oxide film and the passive film, in agreement with previous studies **[Brooks, 1986]**, **[Calinsky, 1989]**, **[Mathieu, 1989]**, **[Mischler, 1991]**, **[Hakiki, 1998]**, **[Abreu, 2004]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Donik, 2009b]**, **[Donik, 2010]**, **[Fajardo, 2010]**, **[Fajardo, 2014]**, **[Maurice, 2015]**. The same stratification was also found locally for the oxide formed on austenite and ferrite phases. Angle-resolved XPS measurements revealed that the stratification of iron and chromium oxide species was significantly more pronounced for the passive film than for the native oxide film. ToF-SIMS depth profiles suggested that molybdenum oxide species were concentrated in the outer part of the oxide film, both for the native and the passive surfaces and on both phases of 2304 DSS. In contrast, Maurice *et al.* **[Maurice, 2015]** demonstrated that molybdenum species were concentrated in the inner part of the native oxide film and in the outer part of the passive film formed on Fe–17Cr–14.5Ni–2.3Mo(100) single crystal.

XPS characterization indicated that the passive film was slightly thinner than the native oxide film, with thicknesses of 2.0 ± 0.2 nm and 2.4 ± 0.1 nm, respectively. This was confirmed by global ToF-SIMS depth profiles. These results might suggest that a part of the oxide (preferentially iron species, as discussed later) was dissolved during electrochemical passivation in acidic electrolyte **[Calinsky, 1989]**, **[Haupt, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Olsson, 2011]**, **[Maurice, 2015]** or that the migration of species was slower in chromium-rich films, leading to a slower growth rate of the passive film compared to the native oxide film. Local ToF-SIMS depth profiles revealed minor differences in the thickness of the native oxide film formed on the two phases of 2304 DSS with a slightly thicker film on austenite than on ferrite phase regions. The difference in thickness was estimated around 0.2 nm. This result is in good agreement with the previous chapter **[CHAPITRE III]** showing that the native oxide film was thicker on the austenitic single phase (2.8 ± 0.1 nm) alloy than on the ferritic one (2.4 ± 0.1 nm). On the contrary, on the local ToF-SIMS depth recorded for the passive film, no difference in the thickness of the oxide layer formed on each phase was evidenced.

Due to preferential oxidation of iron and chromium, no oxidized nickel is found either for the native or the passive 2304 DSS surface, as commonly reported for stainless steels **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson,**

1995], **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Maurice, 1998]**, **[Shimizu, 2000]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Addari, 2008]**, **[Hamada, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Fredriksson, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**. XPS analyses demonstrated that chromium was significantly enriched in the oxide layer compared to the bulk composition. This enrichment was more pronounced in the passive film (≈ 70 at. %) than in the native oxide film (≈ 37 at. %). This was confirmed by the CrO_2^- / FeO_2^- area ratios obtained from ToF-SIMS depth profiles which exhibited higher values for the passive surface than for the native one. Furthermore, a linear relationship has been established between the CrO_2^- / FeO_2^- area ratio obtained by ToF-SIMS and the Cr(III) content of the oxide layer obtained by XPS. These results show, in agreement with previous studies on stainless steels **[Calinsky, 1989]**, **[Haupt, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Olsson, 2011]**, **[Maurice, 2015]**, and, to our knowledge, for the first time for a duplex stainless steel, that electrochemical passivation of 2304 DSS promoted Cr(III) enrichment compared to the native surface. This can be explained by the preferential dissolution of iron oxide in acidic electrolyte whereas the dissolution rate of chromium oxide is extremely low **[Calinsky, 1989]**, **[Kirchheim, 1989]**, **[Kirchheim, 1990]**, **[Haupt, 1995]**, **[Maurice, 2015]**. After passivation, iron content in the underlying metal was reduced while chromium content was roughly unchanged compared to the native surface, suggesting that metallic iron was also preferentially dissolved during passivation.

ToF-SIMS 3D chemical maps of FeO_2^- and CrO_2^- ions indicated that the oxide composition was not homogeneous. Indeed, the oxide formed on ferrite phase regions was richer in chromium than the oxide formed on austenite phase regions, both for the native and the passive duplex stainless steel surfaces, in agreement with previous works **[Olsson, 1995]**, **[Vignal, 2010]**, **[Vignal, 2011]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Vignal, 2014]**. This heterogeneity was confirmed by CrO_2^- / FeO_2^- area ratios obtained from local ToF-SIMS depth profiles, which were higher on ferrite than on austenite phase regions. This can be explained by the higher chromium bulk content of the ferrite phase (estimated around 28.2 at. %) compared to the austenite one (estimated around 21.5 at. %) for 2304 DSS. Thanks to the relationship between the CrO_2^- / FeO_2^- area ratio and the Cr(III) content of the oxide layer, the Cr(III) content of the surface oxide formed locally on austenite and ferrite phases was estimated. For the native oxide film, Cr(III) contents of 31 and 35 at. % are obtained for the austenite and ferrite phases, respectively. The results are in good agreement with the Cr(III) contents obtained for the native oxide film formed on austenitic (28.9 ± 2.4 at. %) and ferritic (37.4 ± 2.6 at. %) single phase alloys having the same composition as the two phases in the studied duplex

stainless steel **[CHAPITRE III]**. For the passive film, Cr(III) contents of 67 and 75 at. % were obtained for the austenite and ferrite phases, respectively. The difference in the chromium content of the oxide formed on the two phases is less pronounced for the native oxide film (about 4 at. %) than for the passive film (about 8 at. %) and remains relatively close to the difference in the chromium bulk content of austenite and ferrite phases (estimated around 6.7 at. %). Therefore, passivation seems to enhance the chemical composition differences of the oxide film formed on each phase.

Similarly to chromium, molybdenum is enriched in the oxide layer and this enrichment, measured by XPS, is more pronounced in the passive film (≈ 2.2 at. %) than in the native oxide film (≈ 1.1 at. %), as previously reported **[Maurice, 2015]**. These results were confirmed by the MoO_3^- / FeO_2^- area ratios obtained from ToF-SIMS depth profiles. The evolution of the MoO_3^- signal suggested that the molybdenum oxide enrichment during passivation occurred preferentially in the outer oxide region. The local MoO_3^- / FeO_2^- area ratios revealed that the oxide was richer in molybdenum on ferrite regions than on austenite regions, as a consequence of the higher molybdenum bulk content of ferrite (0.33 at. %) compared to austenite (0.21 at. %).

XPS analyses and ToF-SIMS depth profiles indicated the presence of metallic nickel enrichment at the metal/oxide interface, as commonly reported for stainless steels, including DSSs. This is explained by the selective oxidation of iron and chromium compared to nickel **[Olefjord, 1990]**, **[Olsson, 2011]**, **[Maurice, 2015]**. The nickel enrichment was more pronounced beneath the passive film (13.5 at. %) than beneath the native oxide film (8.5 at. %) as a consequence of preferential iron dissolution during passivation **[Maurice, 2015]**. Local ToF-SIMS depth profiles suggested that the nickel enrichment was more pronounced under the oxide layer on the austenite phase than on the ferrite one, consistent with the nickel bulk contents of the two phases (5.6 at. % in austenite and 3.1 at. % in ferrite).

XPS and ToF-SIMS characterizations showed that nitrogen was present at the metal/oxide interface and strongly enriched compared to the bulk. In the case of electrochemically-formed passive films, nitrogen enrichment has been attributed to nitrogen anodic segregation during passivation, leading to the formation of a mixed-nitride phase either at the metal/oxide interface or incorporated in the passive film **[Willenbruch, 1990]**, **[Marcus, 1992a]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Halada, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Ha, 2009]**. Passivation was not

found to induce any further nitrogen enrichment in this study. Local ToF-SIMS depth profiles revealed that the nitrogen enrichment was significantly more pronounced for austenite than for ferrite, in agreement with the nitrogen bulk contents of the two phases (0.59 at. % in austenite and 0.08 at. % in ferrite). This work is in agreement with previous studies **[Olsson, 1995]**, **[Femenia, 2004]** demonstrating the presence of nickel and nitrogen enrichments for both phases of DSSs, which were more pronounced on austenite than on ferrite due to higher bulk contents.

IV.6. Conclusions

The aim of this work was to characterize and compare the native surface (obtained after mechanical polishing) and the passive surface (obtained after electrochemical passivation in 0.05 M H_2SO_4) of a duplex stainless steel by the coupling of XPS and ToF-SIMS, in order to understand the mechanisms of formation and the properties of surface oxides on DSSs. Particular attention was paid to the distribution of alloying elements (Cr, Mo, Ni and N) in the oxide layer and in the underlying metal on austenite and ferrite phases.

The surface oxide layers formed on 2304 DSS were first investigated at the global scale. The passive film can be described by a mixture of oxide and hydroxides composed mainly of Fe(III) and Cr(III) species with a small amount of Mo(IV) and Mo(VI) species. Similar results have been obtained previously on the native oxide film **[CHAPITRE III]**. The passive film is slightly thinner than the native oxide film. Iron and molybdenum are concentrated in the outer oxide region and chromium in the inner oxide region. Chromium and molybdenum are enriched in the oxide layer and these enrichments are enhanced by passivation due to preferential dissolution of iron. No oxidized nickel was detected but metallic nickel was enriched at the metal/oxide interface. This enrichment is more pronounced for the passive film than for the native oxide layer. The level of nitrogen enrichment at the metal/oxide interface is found to be similar for the native and the passive surfaces.

The oxide layer was then characterized locally on austenite and ferrite phases of the duplex stainless steel. ToF-SIMS 3D chemical maps allowed us to observe the austenite and ferrite phases and to extract local depth profiles. Minor differences in the thickness of the native oxide film were evidenced, while the thickness of the passive film was similar on the two

phases. The stratification of the oxide (outer Fe- and Mo-rich layer and inner Cr-rich layer) was observed on both phases. Thanks to the methodology developed in this work, chemical differences of the native and passive surface oxides on the two phases were demonstrated. The contents of chromium and molybdenum in the oxide layer were found to be higher on the ferrite than on the austenite phase, as a consequence of higher bulk contents. For chromium, the correlation between XPS and ToF-SIMS results allowed us to estimate the local Cr(III) content in the oxide layers formed on the two phases. The difference in chromium oxide content between austenite and ferrite phases was enhanced after passivation. Nickel and nitrogen are enriched in the metal under the oxide layer for the two phases. The enrichment is more pronounced for the austenite than for the ferrite phase as a result of higher bulk content.

CHAPITRE V : Adhesion of marine bacteria on duplex stainless steel in artificial seawater – Early stage of biofilm formation

---

V.1. Abstract

The aim of this work was to investigate the bacteria-surface interactions occurring during the first hour of adhesion of marine *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 at the surface of 2304 lean Duplex Stainless Steel (DSS) in seawater-based media. A complete characterization was performed, coupling microscopy (epifluorescence microscopy, SEM and AFM), XPS, ToF-SIMS as well as electrochemical techniques. An innovative quantitative interpretation of XPS data was proposed in order to discuss the contents of proteins and polysaccharides within the biofilm. The coupling of XPS and ToF-SIMS led to the conclusion that in presence of nutrients, bacterial adhesion induced chromium enrichment of the oxide layer in close vicinity to the bacteria. Electrochemical characterization in presence of nutrients suggested that the presence of bacteria (i) inhibited corrosion, which might be linked to a more protective passive layer, and (ii) induced a decrease in the concentration in dissolved oxygen, as a consequence of bacterial respiration.

V.2. Introduction

V.2.1. State of the art

Microorganisms, and more specifically bacteria, tend to adhere to surfaces, resulting in the formation of biofilms. Biofilms are described as heterogeneous structures composed of aggregates of microorganisms, often embedded in a self-produced matrix, in which both organic and inorganic particles can be trapped **[Costerton, 1995]**, **[Donlan, 2002a]**, **[Flemming, 2016]**. Biofilm formation involves different steps, from the initial adhesion of

cells at the surface, first reversible and then irreversible, followed by the biofilm maturation and finally the detachment of biofilm parts and/or the dispersion of cells allowing the microbial colonization of other sites **[Stoodley, 2002]**, **[Petrova, 2016]**. The matrix of the biofilm is highly hydrated and contains high-molecular-weight biopolymers produced by the microorganisms, known as Extracellular Polymeric Substances (EPS), which consist in a mixture of polysaccharides, proteins, lipids, DNA and humic substances **[Sheng, 2010]**, **[Flemming, 2010]**, **[Flemming, 2016]**. The composition of EPS depends on many factors such as the bacterial strain, their proximity or attachment to the cell wall or the growth conditions **[Beech, 1999b]**, **[Beech, 1999c]**, **[Beech, 2000b]**, **[Gubner, 2000]**, **[Torres-Bautista, 2015]**, **[Yang, 2016]**. For instance, in the case of the marine aerobic *Pseudomonas* NCIMB 2021, Torres-Bautista *et al.* **[Torres-Bautista, 2015]** mentioned that the Loosely-Bound EPS contained more sugars than proteins while the Tightly-Bound EPS were highly concentrated in proteins. The production of EPS can promote, among other things, microbial adhesion to surfaces and cohesion in the biofilm **[Donlan, 2002a]**, **[Vu, 2009]**, **[Yuan, 2009], [Gubner, 2000]**, **[Flemming, 2010]**. As an example, Gubner *et al.* **[Gubner, 2000]** noted that the formation of a conditioning EPS layer on 304 and 316 stainless steels might promote adhesion of *Pseudomonas* NCIMB 2021 in artificial seawater, depending on the type and concentration of EPS.

The negative consequences of biofilms are (i) persistent infections **[Costerton, 1999]**, (ii) biofouling, leading for example to reduction of heat transfer efficiency or increase friction resistance of heat exchangers **[Melo, 1997]**, **[Flemming, 2002]**, **[Tian, 2012]**, and (iii) deterioration of materials, which, in the case of metallic materials, is referred to as biocorrosion, or Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) **[Beech, 1999a]**, **[Videla, 2005]**, **[Little, 2008]**, **[Lewandowski, 2009]**, **[Thierry, 2011]**, **[Little, 2014]**. The physico-chemical conditions at the substrate/biofilm interface can be radically different from the bulk aqueous phase, through the establishment of gradients within the biofilm (dissolved oxygen, pH, ions concentration or redox potential), which might in turn promote physico-chemical reactions leading to the initiation and/or the acceleration of corrosion processes **[Beech, 1999a]**, **[Videla, 2005]**, **[Lewandowski, 2009]**, **[Little, 2014]**. Both anodic and cathodic processes can be affected, leading to a general modification of corrosion mechanisms. Biocorrosion has been reported in many natural and industrial environments, including seawater, freshwater, soil, oil and gas industry, heat exchangers or cooling circuits, as well as medical devices, causing severe environmental, sanitary and health issues.

Various biocorrosion mechanisms have been continuously proposed in the literature, as a result of the diversity of interactions between microorganisms, metal and environment. Sulfato-Reducing Bacteria induce biocorrosion of various stainless steels, due to the formation of metallic sulfide at the expense of the passive film, leading to pitting corrosion **[Chen, 1997]**, **[Chen, 1998]**, **[González, 1998]**, **[Werner, 1998]**, **[Ismail, 1999]**, **[Antony, 2007]**, **[Sheng, 2007]**, **[Antony, 2008]**, **[Nguyen, 2008]**, **[Li, 2009]**, **[Yuan, 2009]**, **[Antony, 2010]**, **[Yuan, 2013]**, **[Arkan, 2016]**, **[Dec, 2016]**, **[Dec, 2017]**. Cases of biocorrosion in natural freshwater have also been attributed to Manganese-Oxidizing Bacteria, which oxidize soluble Mn(II) species into deposits of manganese dioxide, which are strong oxidant species **[Dickinson, 1996]**, **[Dickinson, 1997]**, **[Little, 1998]**, **[Shi, 2003]**, **[Marconnet, 2008b]**. As a result, the Open Circuit Potential (OCP) is shifted to more noble values and pitting corrosion might be promoted, which is referred to as ennoblement by certain authors **[Dickinson, 1996]**, **[Dickinson, 1997]**, **[Little, 2008]**, **[Landoulsi, 2009]**, **[Little, 2014]**. Iron-Oxidizing Bacteria induce the formation of ferric oxide and/or oxi-hydroxide, which promotes crevice corrosion **[Suleiman, 1994]**, **[Chamritski, 2004]**, **[Starosvetsky, 2008]**. A mixture of Iron- and Manganese-Oxidizing Bacteria has been found to induce de-alloying of 316 stainless steel (enrichment in Si and depletion in Cr and Fe) **[Moradi, 2011]**. Iron-Reducing Bacteria are susceptible to respire Fe(III) species present in the passive film and to reduce them into soluble Fe(II) species, leading in certain cases to a removal of the passive film **[Little, 1998]**, **[Lee, 2003]**. Johansson *et al.* **[Johansson, 1999]** suggested that EPS might contribute to corrosion by trapping some species. More specifically, XPS analyses suggested that iron accumulated in the biofilm formed at the surface of 304 stainless steel exposed to the exopolymer-producing *Burkholderia* sp. bacteria.

Aerobic bacteria, such as *Pseudomonas* species present in marine environments, have been found to be involved in biocorrosion processes of stainless steels **[Morales, 1993]**, **[Beech, 2000b]**, **[Yuan, 2007a]**, **[Yuan, 2008]**, **[Yuan, 2009]**, **[Hamzah, 2013]**, **[Xia, 2015]**, **[Li, 2016a]**, **[Li, 2016b]**, **[Li, 2017]**, **[Xu, 2017a]**, **[Zhou, 2018]**. It has been proposed that the combination of active oxygen consumption by bacteria and decrease of oxygen diffusion within the biofilm leads to the formation of differential aeration cells, which, together with the presence of chloride ions in seawater-based media, induce severe pitting corrosion. Moradi *et al.* **[Moradi, 2014]** suggested that the adhesion of *Pseudoalteromonas* sp. and consequent biofilm formation at the surface of 2205 duplex stainless steel in artificial seawater containing peptone induce a significant decrease in the oxygen concentration at the substrate/solution

interface, resulting in a rate reduction of cathodic process and a decrease of the OCP during exposure. In contrast, Li *et al.* **[Li, 2016a]** observed a shift of the OCP in the positive direction during exposure of high nitrogen nickel-free stainless steel in 2216E culture medium inoculated with *Pseudomonas aeruginosa*, attributed to a catalysis of the cathodic reaction. In addition to bacteria, diatoms can be associated to biocorrosion of stainless steels **[Landoulsi, 2011]**. Biocorrosion can also be encountered in the presence of human osteoclasts **[Cadosch, 2009]** or in simulated body fluids containing proteins **[Wan, 2012]**.

Stainless steels, including duplex stainless steel (DSSs), owe their corrosion resistance to the spontaneous formation of a surface oxide layer, commonly referred to as the passive film, which leads to a marked decrease in the dissolution kinetics of the underlying alloy. Passivation has been extensively studied in the case of austenitic and ferritic stainless steels **[Frankenthal, 1976]**, **[Marcus, 1988]**, **[Olefjord, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Marcus, 1992a]**, **[Vanini, 1994]**, **[Maurice, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Olsson, 2002]**, **[Olsson, 2003]**, **[Keller, 2004]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**, **[Tardio, 2015]** while the amount of studies is more limited in the case of DSSs **[Olsson, 1995]**, **[Schmidt-Rieder, 1999]**, **[Femenia, 2004]**, **[Donik, 2009a]**, **[Fredriksson, 2010]**, **[Vignal, 2010]**, **[Luo, 2011]**, **[Vignal, 2011]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Vignal, 2013a]**, **[CHAPITRE III]**, **[CHAPITRE IV]**.

The passive film is generally described as a mixed oxi-hydroxide layer composed mainly of chromium and iron and typically 1-3 nm thick. Chromium and iron are usually found in their trivalent states, preferentially in the inner and outer parts of the passive film, respectively. The passive film is significantly enriched in Cr(III) compared to the bulk due to preferential chromium oxidation and/or preferential iron dissolution and this enrichment is more pronounced when passivation is performed in acidic electrolyte **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Maurice, 2015]**. In the case of Ni-bearing stainless steels, no oxidized nickel is detected while metallic nickel is enriched under the passive film, as a result of preferential oxidation of iron and chromium **[Clayton, 1986]**, **[Olefjord, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Maurice, 1998]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**. In the case of Mo-bearing stainless steel, a slight amount of oxidized molybdenum is incorporated in the passive film, as Mo(IV) and/or Mo(VI) **[Marcus, 1988]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1995]**, **[Högström, 2013]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Maurice, 2015]**. In the case of N-bearing stainless steels, nitrogen has been found significantly enriched in the underlying metal **[Marcus, 1992a]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Olefjord, 1996]**. Due to chemical

differences between the austenite and ferrite phases of DSSs, more particularly higher chromium and molybdenum contents in ferrite and higher nickel and nitrogen contents in austenite, the chemical composition of the passive film as well as the underlying metal at the surface of DSSs is not homogeneous **[Olsson, 1995]**, **[Schmidt-Rieder, 1999]**, **[Femenia, 2004]**, **[Vignal, 2010]**, **[Vignal, 2011]**, **[Vignal, 2013a]**, **[CHAPITRE III]**, **[CHAPITRE IV]**. Because the corrosion resistance of stainless steels is provided by their passivity, the evolution of the passive film properties (thickness and chemical composition) during biofilm formation can be associated to biocorrosion processes.

Geesey *et al.* **[Geesey, 1996]** performed biofilm formation at the surface of 316L stainless steel in a culture medium inoculated with either pure cultures of *Citrobacter freundii* and *Desulfovibrio gigas* or co-cultures of the two bacterial strains. Auger Electron Spectroscopy (AES) analyses revealed that the biofilm formation induced chemical changes in the near-surface region of the passive film that were enhanced with time. *Citrobacter freundii* was found to induce a significant depletion in chromium compared to nickel that was more pronounced at grain boundaries than at grains as a result of selective colonization at grain boundaries. *Desulfovibrio gigas* was found to induce a significant depletion in iron compared to nickel as well as a significant increase in sulfur accumulation at grain boundaries. The authors suggested that these changes might weaken the passive film, allowing chloride ions easier access to the underlying bulk alloy and promoting formation and propagation of pits.

Pendyala *et al.* **[Pendyala, 1996]** noticed by AES that biofilm formation at the surface of 304 stainless steel in minimal salts medium inoculated with a mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Klebsiella pneumoniae* induces chemical changes of the oxide film close to the bulk. The relative concentration of iron decreased while the relative concentration of chromium increased. The authors speculated that Fe may have been carried away by the flowing media and that Cr compounds may have been redeposited on the surface.

Beech *et al.* **[Beech, 2000a]** showed that immersion of 316 stainless steel in marine medium inoculated with *Pseudomonas* NCIMB 2021 leads to extensive micropitting possibly linked to the production of bacterial metabolites such as acidic polysaccharides and organic acids. XPS analyses revealed that the formation of the biofilm induces a thinning of the passive film

together with an increased concentration of chromium and a decreased concentration of iron, likely due to the increased concentration of Cr within micropits as a result of Fe loss.

Yuan *et al.* **[Yuan, 2007a]** demonstrated by XPS that the biofilm formation at the surface of 304 stainless steel in nutrient-rich artificial seawater inoculated with *Pseudomonas* NCIMB 2021 induced an increase of Cr content and a decrease of Fe content in the outermost layer, which, in agreement with the results obtained by Beech *et al.* **[Beech, 2000b]** with the same bacterial strain, may be the result of extensive micropitting underneath the heterogeneous biofilms on the stainless steel coupon surface. Moreover, the XPS Fe 2p, Cr 2p and O 1s high-resolution spectra showed that (i) the thickness of the passive film decreased due to the attack of bacteria and aggressive anions, (ii) bacteria induced modification of the Fe^{2+}/Fe^{3+} ratio, suggesting implication of *Pseudomonas* NCIMB 2021 and its EPS in the oxidation/reduction reactions of iron, (iii) for the control coupons, Cr^{3+} species are mainly Cr_2O_3, while in presence of bacteria, $Cr(OH)_3$ is more significant, explaining why the chromium enrichment in the surface film induced by *Pseudomonas* NCIMB 2021 does not increase the resistance of the passive film, (iv) the Cr^{6+} species are CrO_4^- for the control coupons and CrO_3 in presence of bacteria and (v) oxides are more abundant than hydroxides for the control coupons and hydroxides are more abundant than oxides in presence of bacteria.

Using an original methodology based on ToF-SIMS, Seyeux *et al.* **[Seyeux, 2015]** provided direct evidence that the surface of 316L stainless steel remained passivated under adhering *E. coli* cells in the early stage of biofilm formation in saline medium. The oxide was significantly enriched in chromium after adhesion of *E. coli* compared to the reference coupon. This effect was also observed but less pronounced on the oxide not covered by bacteria, indicating that the presence of bacteria affects not only the surface under them but also around them. The authors suggested that the chromium enrichment in the oxide film induced by bacteria may enhance passivity under general corrosion conditions.

Recent studies conducted on 2205 **[Xu, 2017a]** and 2304 **[Zhou, 2018]** duplex stainless steels showed that the formation of aerobic marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in 2216E culture medium at 37°C for 14 days caused an accelerated pitting corrosion. Based on XPS analysis, the authors discussed the possible formation of CrN and soluble CrO_3 species in presence of bacteria.

V.2.2. Objectives

The aim of this work is to characterize the bacteria-surface interactions occurring during the adhesion of marine *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 and subsequent biofilm formation at the surface of 2304 Duplex Stainless Steel (DSS) in artificial seawater without (ASW) and with (ASW+N) addition of nutrients. The early stage of biofilm formation (1 hour adhesion) is considered. The morphology of the early biofilm will be characterized by microscopy techniques (epifluorescence microscopy, FEG-SEM and AFM). The number of viable cultivable suspended and adhering cells will be discussed. XPS and ToF-SIMS analyses will be performed in order to characterize the chemical nature of the early biofilm as well as the oxide layer formed at the surface of 2304 DSS. Electrochemical characterization (OCP monitoring, anodic and cathodic polarization curves) will be performed in order to investigate the effect of early biofilm formation on the corrosion behavior of 2304 DSS. Longer exposure times (24 hours and 1 week) will be studied in the next chapter **[CHAPITRE VI]**.

V.3. Materials and methods

V.3.1. Metallic material

This study was carried out using 1 mm thick plates of 2304 lean Duplex Stainless Steel (DSS) from APERAM with a cold-rolled, annealed and pickled surface finish. The chemical composition (in at. %) of 2304 DSS is: Fe (balance), Cr (24.6), Ni (4.4), Mn (1.5), Si (0.88), Cu (0.33), Mo (0.27), N (0.36), C (0.07), S (< 10 ppm). Sigmameter analysis revealed that the surface of 2304 DSS was composed of approximately 54 % ferrite regions and 46 % austenite regions. For the adhesion experiments, the coupons dimensions were 10 × 12 mm². For the electrochemistry experiments, the coupons were 30 mm diameter disks, the tightness between the disk and the sample holder was ensured by an O-ring and the area exposed to the electrolyte was 4.2 cm². The surfaces were abraded with a series of SiC papers and polished with 6 µm, 3 µm and 1 µm diamond spray, successively. The polished samples were then ultrasonically cleaned for 10 min in acetone, ethanol and distilled water, successively, and dried with compressed air. The samples were finally stored in air between 2 and 4 weeks, following a procedure described in a previous chapter **[CHAPITRE III]**. The day before

adhesion experiments, the coupons were again ultrasonically cleaned for 10 min in acetone, ethanol and distilled water, successively, and dried with compressed air.

V.3.2. Electrolytes

Artificial seawater (ASW) and nutrient-rich artificial seawater (ASW+N) were used in this study. The composition (in g/L) of ASW is: NaCl (24.62), $MgCl_2(H_2O)_6$ (11.06), Na_2SO_4 (4.11), $CaCl_2(H_2O)_2$ (1.54), KCl (0.78), $NaHCO_3$ (0.20). In ASW+N, peptone (3.0 g/L) and yeast extract (1.5 g/L) were added. The pH was adjusted to 8.0 by adding 0.1 M NaOH. ASW and ASW+N solutions were finally sterilized by 0.22 µm filtration and stored at 4°C before use.

V.3.3. Bacteria

The bacterial strain used in this study was the marine aerobic *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021. The bacteria were stored at −196°C in glycerol. A work stock was kept at −20°C. The culture of bacteria followed three steps. First, bacteria were inoculated on Marine Agar 2216 (BD Difco) **[Annexe C]** plates and incubated for 2-3 days at 20°C. Then, isolated colonies were transferred into 5 mL of Marine Broth 2216 culture medium (BD Difco) **[Annexe C]** and incubated at 30°C under continuous agitation during 8 hours. Finally, bacteria were subcultured in 200 mL of Marine Broth 2216 culture medium at 30°C under continuous agitation during 40 hours (until the early-stationary phase). The bacteria were then harvested by centrifugation (7000 g; 10 min; 20°C) and washed in ASW solution. This step was repeated 3 times in order to remove residues from the culture medium. A bacterial suspension in ASW was then prepared by adjusting the optical density measured at 400 nm between 0.8 and 0.9. This suspension was then ten-time diluted either in ASW or in ASW+N solution in order to get a concentration of 10^7 CFU/mL for all the experiments.

V.3.4. Adhesion experiments

The 2304 DSS coupons were exposed with the polished face upward to the ASW and ASW+N bacterial suspensions in static conditions at 20°C for 1 hour. Control experiments were performed in the sterile ASW and ASW+N solutions in the same conditions. After

1 hour adhesion, the suspending liquid was eliminated and the non-adhering bacteria were removed by rinsing the coupons in sterile ASW solution. For the count of viable cultivable cells, adhering bacteria – detached from the coupons in 10 mL of sterile ASW for 2 min in ultrasonic bath – and suspended bacteria were inoculated on Marine Agar 2216 plates and incubated at 20°C for 2-3 days.

V.3.5. Coupons preparation

Following the adhesion experiments, the coupons preparation depended on the upcoming analysis technique. For epifluorescence microscopy analysis, adherent cells were labeled with a fluorochrome solution (DAPI, Molecular Probes, Invitrogen). For AFM analysis, bacterial fixation was performed in 3 % glutaraldehyde in 0.01 M cacodylate buffer (pH = 7.2) at 4°C for 2 hours and the coupons were rinsed in distilled water. For XPS and ToF-SIMS analyses, fixation was performed using the glutaraldehyde solution, then the coupons were rinsed with the cacodylate buffer and dehydration was performed using a graded ethanol series (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, and 100 % two times for 15 min each) and acetone (15 min) **[Seyeux, 2015]**. For SEM analysis, fixation was performed (same procedure), then the coupons were rinsed with the cacodylate buffer and dehydration was performed using a graded ethanol series (same procedure) and isoamyl acetate and finally the coupons were sputter-coated with Au/Pd for 2 min **[Seyeux, 2015]**. In all cases, the same procedures were applied to the control coupons immersed in the sterile ASW and ASW+N solutions.

V.3.6. Surface characterization

V.3.6.1. Epifluorescence microscopy

Epifluorescence microscopy analysis was performed with an Olympus BX51 microscope and images processing was performed with the analySIS software version 3.2.

V.3.6.2. SEM analysis

Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy (FEG-SEM) analysis was performed using a Jeol 7000F microscope (secondary electrons images, accelerating voltage = 10.0 kV).

V.3.6.3. AFM analysis

Atomic Force Microscopy (AFM) analysis was performed using a CSI Nano-Observer microscope in oscillating mode. Height, amplitude and phase images were recorded simultaneously. Images processing was performed using the Gwyddion software version 2.49.

V.3.6.4. XPS analysis

Table V-1 Values of the photoionization cross-sections (σ_X), the inelastic mean free paths (λ_X^Y) and the densities (D_X^Y) used in this work.

XPS core level	C 1s	N 1s	Fe $2p_{3/2}$	Cr $2p_{3/2}$	Ni $2p_{3/2}$	Mo $3d_{5/2}$
σ_X	1.00	1.80	10.82	7.69	14.61	5.62
$\lambda_X^{polyethylene}$ (nm)	3.96	-	-	3.17	-	-
λ_X^{BSA} (nm)	3.24	2.99	-	2.60	-	-
$\lambda_X^{glucose}$ (nm)	-	3.06	-	2.67	-	-
λ_X^{oxide} (nm)	-	2.10	1.63	1.83	1.40	2.34
λ_X^{metal} (nm)	-	1.74	1.35	1.52	1.17	1.94
$D_X^{polyethylene}$ (mol.cm^{-3})	0.0643	-	-	-	-	-
D_X^{BSA} (mol.cm^{-3})	0.0620	0.0172	-	-	-	-
$D_X^{glucose}$ (mol.cm^{-3})	-	0	-	-	-	-

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) analysis was performed with a Thermo Electron Escalab 250 spectrometer, using a monochromated Al Kα X-ray source ($h\nu$ = 1486.6 eV). The base pressure in the analysis chamber was maintained at 10^{-9} mbar. The spectrometer was calibrated using Au $4f_{7/2}$ at 84.1 eV. The take-off angle was 90° and the analyzed area was a 500 µm diameter disk. Survey spectra were recorded with a pass energy of 100 eV at a step size of 1 eV and high resolution spectra of the C 1s, N 1s, O 1s, Fe 2p, Cr 2p, Ni 2p and Mo 3d core level regions were recorded with a pass energy of 20 eV at a step size of 0.1 eV. Curve fitting of the spectra was performed with the Thermo Electron software Avantage version 5.938 using an iterative Shirley-type background subtraction. Symmetrical peaks were used except for the Fe 2p, Cr 2p, Ni 2p, and Mo 3d metallic components. The values of the

photoionization cross-sections (σ_X) at 1486.6 eV taken from Scofield **[Scofield, 1976]**, the inelastic mean free paths (λ_X^Y) calculated by the TPP2M formula **[Tanuma, 1991]** and the densities (D_X^Y) considered in this chapter are compiled in the **Table V-1**.

V.3.6.5. ToF-SIMS analysis

Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS) analysis was performed using a ToF-SIMS 5 spectrometer (IonTof - Munster Germany) operating at a pressure of approximately 10^{-9} mbar. Data acquisition and post processing analysis were performed using the SurfaceLab software version 6.5. The spectrometer was run in BA-IMAGE mode in order to obtain a high lateral resolution (≈ 150 nm) and the primary ion pulse was split into 4 short pulses in order to improve the mass resolution (M/ΔM ≈ 5000). Prior to each measurement, the surface was slightly sputtered during approximately 5 s using a Cs^+ ion sputter gun in order to eliminate the carbonaceous pollution from the surface. Negative secondary ions were analyzed because they provide a better sensitivity for oxide species.

2D chemical maps of the outermost surface were recorded using a pulsed 25 keV Bi^+ primary ion source delivering 0.3 pA of target current over a 30 × 30 µm² or 100 × 100 µm² area. 3D chemical maps were recorded using a pulsed 25 keV Bi^+ primary ion source delivering 0.3 pA of target current over a 30 × 30 µm² area interlaced with a 1 keV Cs^+ sputter beam delivering 50 nA of target current over a 500 × 500 µm² area with a 45° incidence to the specimen surface. Bi^+ primary ion flux below 10^{12} ions/cm² was used to ensure static analysis conditions. Analysis was centered inside the sputtered crater to avoid edge effects. Local mass spectra and depth profiles were extracted from the 3D chemical maps by selecting regions of interest (surface covered by bacteria or beside the bacteria).

For the depth profiles, the intensity of the ionized fragments, all measured quasi-simultaneously, was plotted vs the Cs^+ ion sputtering time. The intensity was reported using a logarithmic scale, which gave equal emphasis to signals of all intensities. The variation of the ion intensity with sputtering time reflected the variation of the in-depth concentration but was also dependent on the matrix from which the ions were emitted. The metal/oxide interface was positioned at the sputtering time corresponding to 80 % of the maximum intensity of the Ni_2^- signal. Under these conditions of analysis, the sputtering rate of the oxide can be

estimated around 0.039 nm/s **[Mazenc, 2012]**. CrO_2^- / FeO_2^- and MoO_3^- / FeO_2^- area ratios were calculated by dividing the areas of the CrO_2^- and FeO_2^- and of the MoO_3^- and FeO_2^- mass spectra peaks, respectively, cumulated in the oxide region, from a sputtering time of 2 s to a sputtering time corresponding to the metal/oxide interface.

V.3.7. Electrochemical characterization

The electrochemical measurements have been performed using a Gamry Interface 1000 potentiostat. Sterile and bacteria-inoculated ASW+N solutions were used. The working electrode was the 2304 DSS coupon, the counter electrode was a platinum disk and the reference electrode was a Saturated Calomel Electrode (SCE) placed in a bridge tube filled with sterile saturated potassium chloride solution. The electrochemical cell was a glass cylinder. The working electrode was placed in a sample holder at the bottom of the cell. The counter electrode and the bridge tube containing the reference electrode were placed in a drilled rubber stopper and inserted from the top of the cell, providing sealing of the cell. An electrolyte volume of 50 mL was added (either sterile or bacteria-inoculated ASW+N solution). Experiments were carried out at 20°C in static conditions. First, the Open Circuit Potential (OCP) was monitored during 1 hour, then, anodic and cathodic polarization curves were recorded separately, starting from −20 or +20 mV/OCP, respectively, using a scan rate of 0.17 mV/s.

Before experiments, the cell, sample holder, rings, counter electrode, bridge tube and rubber stopper were sterilized by immersion in 70° ethanol at least for 4 hours and then dried. The cell, sample holder and rings were then autoclaved at 121°C for 20 min for sterilization and cooled down before use. The counter electrode and the bridge tube were rinsed with sterile distilled water. After experiments, the counter electrode, bridge tube, the reference electrode and the rubber stopper were decontaminated with a disinfectant solution and rinsed with sterile distilled water. The decontamination of the cell, sample holder and rings consisted in immersion for approximately 10 min in bleach, autoclaving at 121°C for 30 min, washing in bleach and finally in dish-washer. These sterilization and decontamination procedures successfully allowed avoiding undesirable growth of microorganisms during experiments.

V.4. Results and discussion

V.4.1. Microscopic characterization

V.4.1.1. Epifluorescence microscopy

Figure V-1-a and **Figure V-1-b** show the epifluorescence microscopy images obtained after 1 hour immersion of 2304 DSS in the bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions, respectively. The adhering bacteria are rod-shaped and form chains as a result of the binary fission process **[Yuan, 2007a]**.

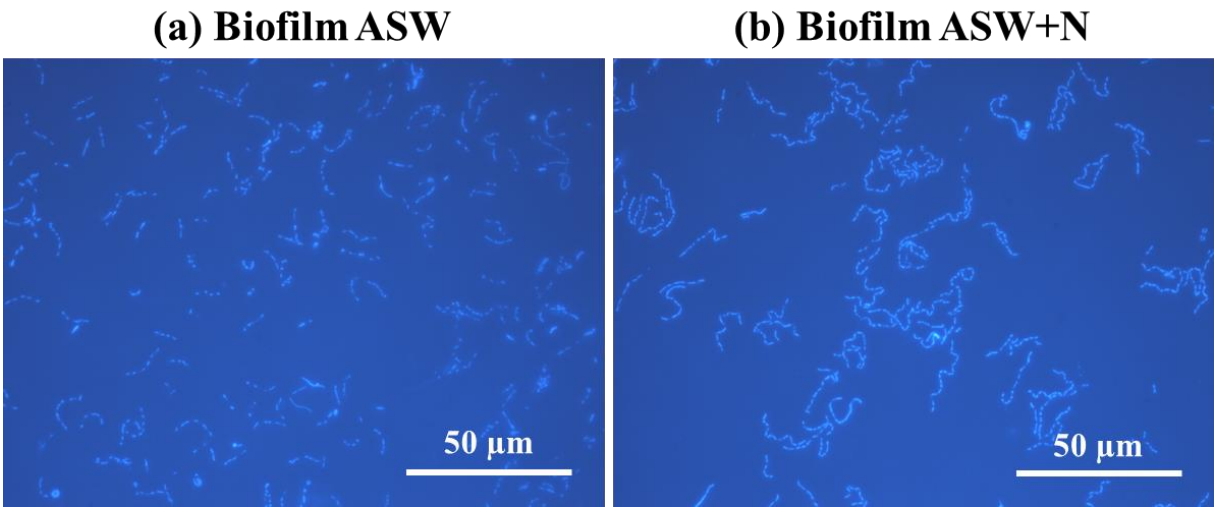


Figure V-1 Epifluorescence microscopy images obtained after 1 hour immersion of 2304 DSS in (a) ASW and (b) ASW+N solutions inoculated with bacteria.

The bacterial surface coverage is 3.3 ± 1.3 % in ASW and 2.8 ± 0.7 % in ASW+N (mean values and standard deviations obtained from 10 images), showing no significant effect of the presence of nutrients. Considering that the area of a single cell is about 1.5 µm², these coverages correspond to a total adhering cell number of $2.2 \pm 0.8 \times 10^6$ cells/cm² in ASW and $1.9 \pm 0.4 \times 10^6$ cells/cm² in ASW+N. These results indicate that 1 hour adhesion of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 at the surface of 2304 DSS corresponds to the early stage of biofilm formation with a low bacterial surface coverage.

V.4.1.2. SEM analysis

As expected, on the SEM images obtained after 1 hour immersion in the control ASW (**Figure V-2-a**) and ASW+N (**Figure V-2-b**) solutions, no bacteria are observed. On the contrary, after 1 hour immersion in the bacteria-inoculated ASW (**Figure V-2-c**) and ASW+N (**Figure V-2-d**) solutions, adhering cells of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 are identified. As mentioned earlier, the cells are rod-shaped and form chains. The cell size is approximately 1-2 µm long in ASW, 1-3 µm long in ASW+N and 0.4-0.6 µm wide both in ASW and ASW+N. These results show that the cells are slightly bigger in presence of nutrients, in agreement with the literature **[Kjelleberg, 1982]**, **[Givskov, 1994]**, **[Lever, 2015]**. No pitting is identified at the surface of 2304 DSS after 1 hour immersion in the control or in the bacteria-inoculated solutions.

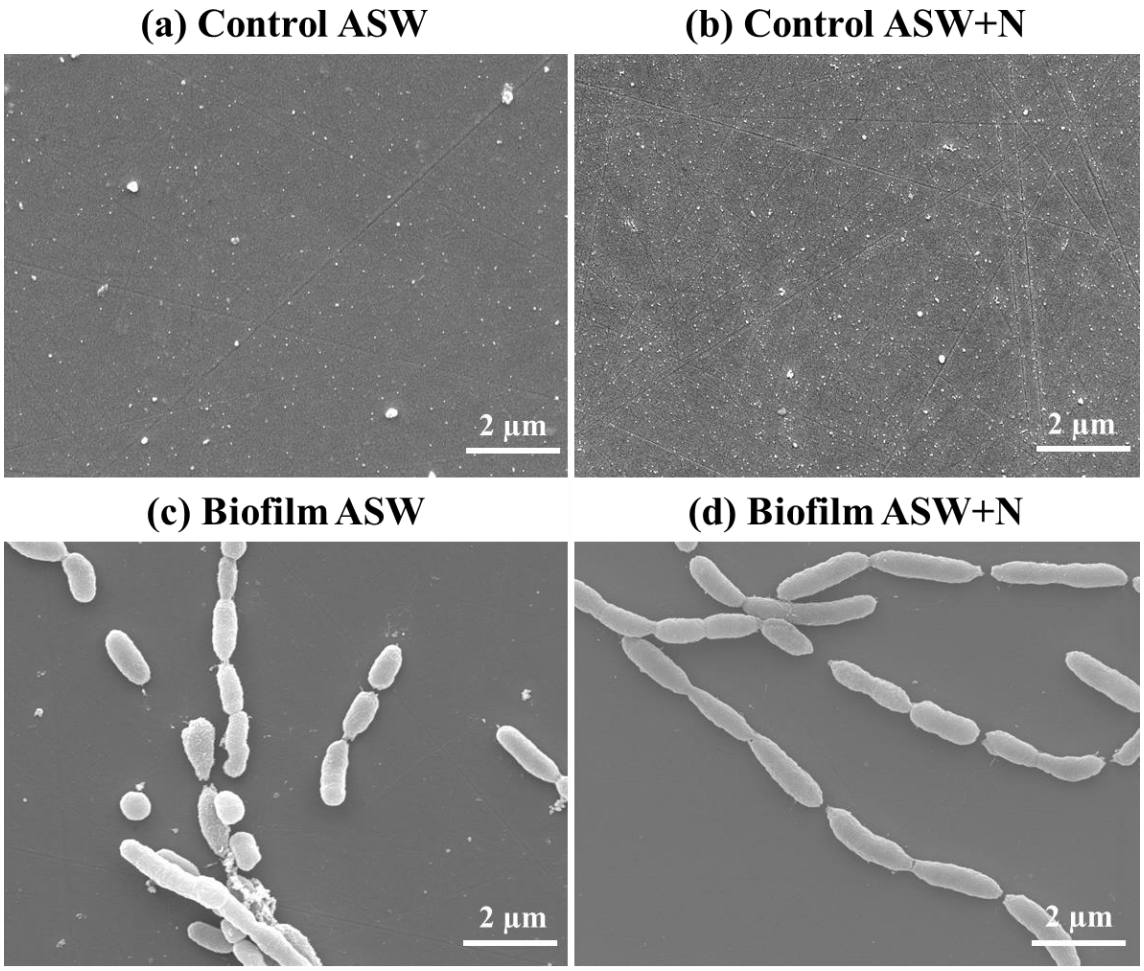


Figure V-2 SEM images obtained after 1 hour immersion of 2304 DSS in (a) the control ASW solution, (b) the control ASW+N solution, (c) the bacteria-inoculated ASW solution and (d) the bacteria-inoculated ASW+N solution.

V.4.1.3. AFM analysis

AFM characterization has been performed only in the ASW+N solution. **Figure V-3-a**, **Figure V-3-b** and **Figure V-3-c** show the AFM height, amplitude and phase images (oscillating mode) obtained after 1 hour immersion in the control ASW+N solution, the bacteria-inoculated ASW+N solution and after ultrasonic removal of the ASW+N biofilm, respectively.

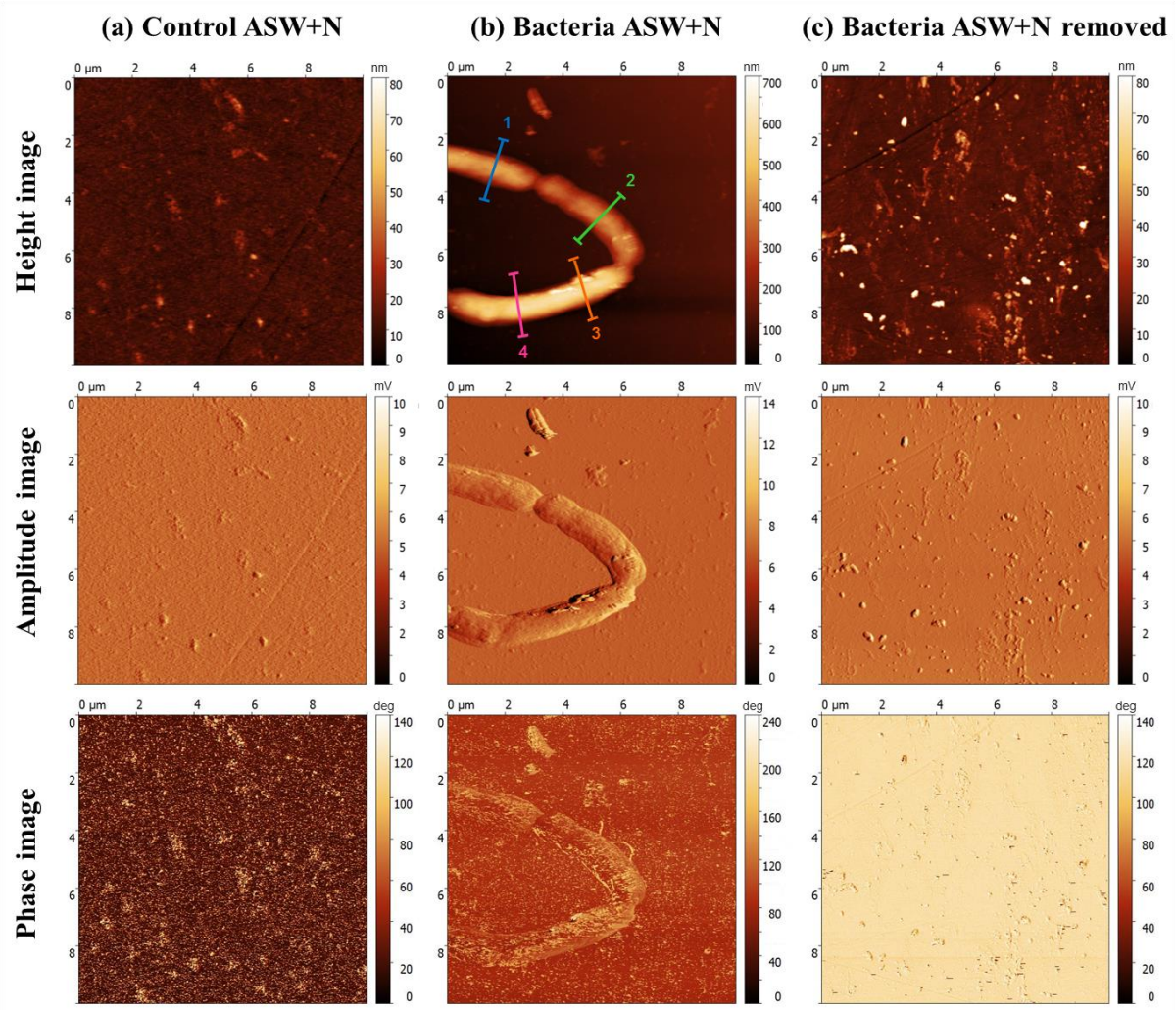


Figure V-3 AFM height, amplitude and phase images (oscillating mode) obtained after 1 hour immersion of 2304 DSS in (a) the control ASW+N solution, (b) the bacteria-inoculated ASW+N solution and (c) after ultrasonic removal of the biofilm.

As expected, no bacteria are visible at the surface of 2304 DSS after immersion in the sterile ASW+N solution. Small particles (few hundreds nanometers diameter and few tens nanometers height) are visible at the surface, which might correspond to adsorbed salts and/or nutrients.

After immersion in the ASW+N solution inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021, adhering bacteria are present at the surface. The presence of flagella close to the bacteria is evidenced on the phase image. On the AFM images, the cells are approximately 1-4 µm long and 0.7-1.6 µm wide, which is higher than on the SEM images. These differences might originate from the differences in the coupons preparation for SEM and AFM analyses. Liu *et al.* **[Liu, 2012]** showed that the height of bacteria imaged by AFM is higher with glutaraldehyde fixation than without fixation, especially for Gram-negative bacteria, due to an increase in the cell rigidity induced by fixation. Glutaraldehyde fixation has been performed both for SEM and AFM coupons preparation, so it is likely not involved here. The smaller cells size observed by SEM might rather be linked to the dehydration procedure performed only for the SEM coupons but not for the AFM ones. Despite the dehydration procedure, a collapse of cells under vacuum during SEM analyses cannot be excluded. Another hypothesis is an enlargement of the lateral dimensions of bacteria (length and width) due to artefacts of AFM measurement **[Osiro, 2012]**. The amplitude and phase images suggest that the bacterial surface is not smooth, which might be linked to the presence of Tightly-Bound EPS at the surface of bacteria. On the surface not covered by the bacteria, small particles (few hundreds nanometers diameter and few tens nanometers height) might be attributed to adsorbed salts and/or nutrients. The presence of Loosely-Bound EPS released on the surface around the bacteria is not identified.

Figure V-4 shows the AFM height profiles obtained on cross sections of bacteria (the corresponding surface lines are shown on the height image in **Figure V-3-b**). On these profiles, the height of bacteria is ranging between approximately 300 and 550 nm. This underlines that the height of different bacteria as well as the height at different locations of a single bacteria is not uniform. The mean and standard deviation of the bacterial height (obtained from 20 profiles on 2 images) is 435 $\pm$ 97 nm. This value is close to the bacteria width obtained by SEM.

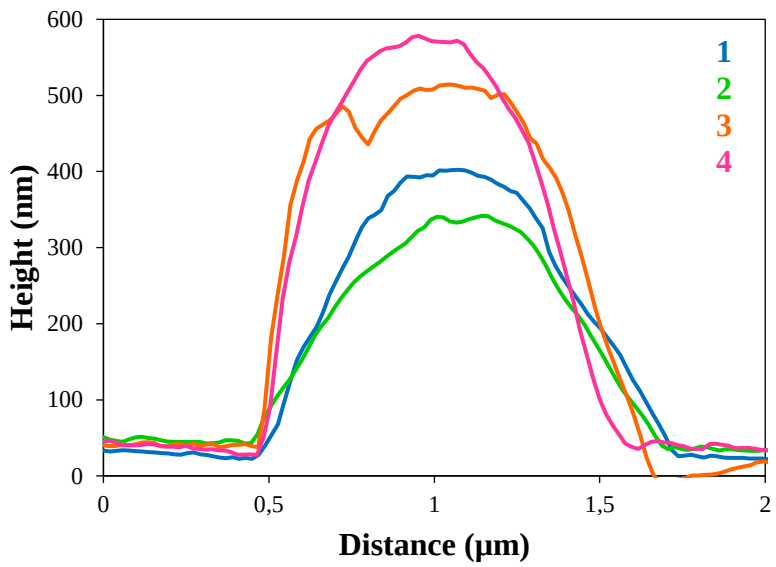


Figure V-4 AFM height profiles obtained on cross sections of bacteria adhering at the surface of 2304 DSS after 1 hour immersion in bacteria-inoculated ASW+N solution.

On the images obtained after removal of the early biofilm, no bacteria are observed, confirming that the ultrasonic procedure induces bacterial detachment. Small particles (few hundreds nanometers diameter and few tens nanometers height) are identified, which might correspond to remaining adsorbed salts and/or nutrients despite the ultrasonic procedure. Larger particles (few hundreds nanometers diameter and up to 100 nm height) might correspond to bacterial debris. In all cases, no pitting is evidenced at the surface of 2304 DSS.

V.4.2. Count of viable cultivable cells

Figure V-5 shows the number of viable cultivable planktonic bacteria (Colony Forming Unit/mL) and viable cultivable adhering bacteria (CFU/cm²), initially and/or after 1 hour adhesion of 2304 DSS in the ASW and ASW+N bacterial suspensions (mean and standard deviations obtained for 3 independent cultures).

As expected, the initial ASW and ASW+N suspensions contain similar number of viable cultivable cells ($8.9 \pm 3.4 \times 10^6$ and $8.6 \pm 5.0 \times 10^6$ CFU/mL, respectively). After 1 hour adhesion, the number of suspended viable cultivable cells is about 6.3 times higher after immersion in the ASW+N suspension ($5.2 \pm 3.7 \times 10^7$ CFU/mL) than in the ASW suspension ($8.3 \pm 4.2 \times 10^6$ CFU/mL).

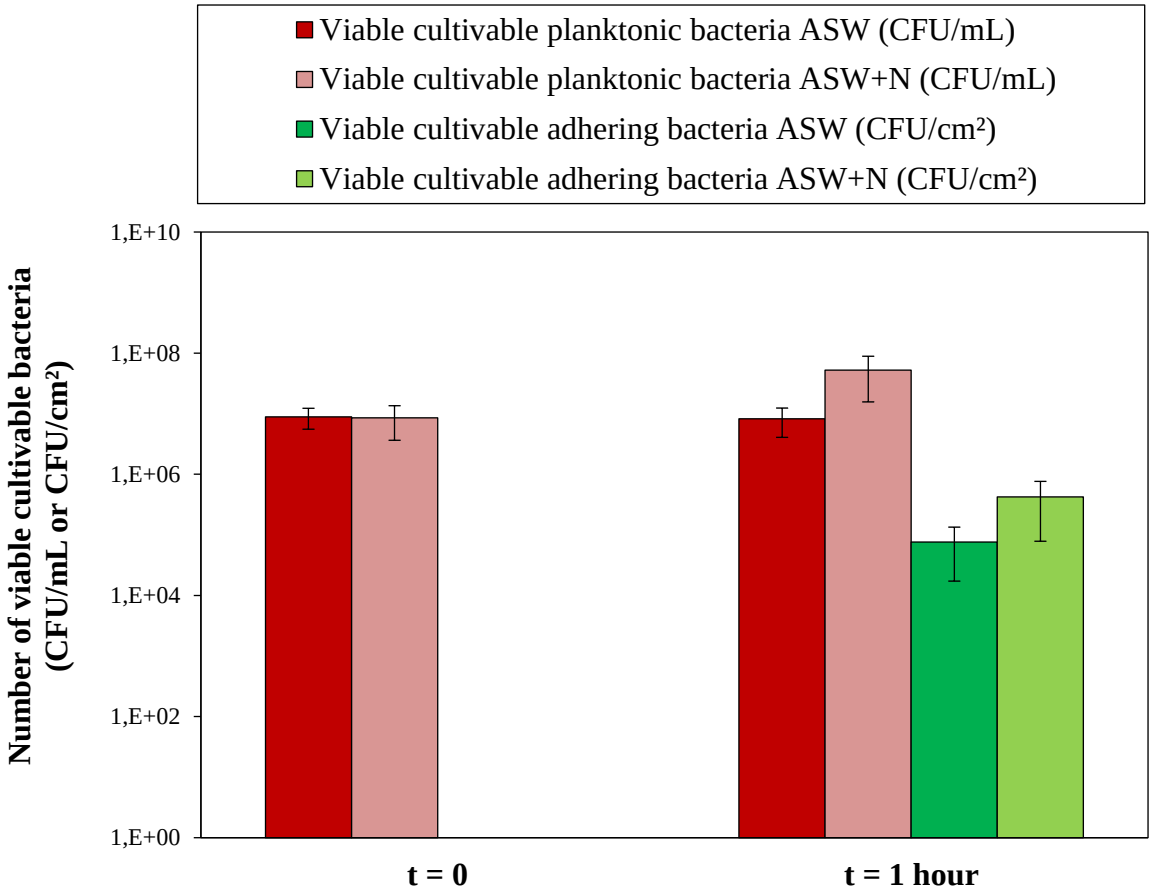


Figure V-5 Number of viable cultivable planktonic bacteria (CFU/mL) and viable cultivable adhering bacteria (CFU/cm²), initially and after 1 hour adhesion for 2304 DSS in the ASW and ASW+N bacterial suspensions.

After 1 hour adhesion, the number of adhering viable cultivable cells is about 5.5 times higher after immersion in the ASW+N suspension ($4.2 \pm 3.4 \times 10^5$ CFU/cm²) than in the ASW suspension ($7.6 \pm 5.9 \times 10^4$ CFU/cm²). These results suggest that the presence of nutrients induces an increase of the number of viable cultivable cells, both in suspension and adhering at the surface of 2304 DSS. The increase factor is roughly the same for the cells in suspension and the adhering cells, suggesting that the number of viable cultivable adhering cells is related to the number of viable cultivable cells in suspension. According to the epifluorescence microscopy images, the number of total adhering cells is roughly similar after 1 hour adhesion in the ASW ($2.2 \pm 0.8 \times 10^6$ cells/cm²) and ASW+N suspensions ($1.9 \pm 0.4 \times 10^6$ cells/cm²). However, the proportion of viable cultivable adhering cells is significantly higher in the ASW+N suspension (≈ 22 %) than in the ASW suspension (≈ 3 %).

V.4.3. XPS characterization

V.4.3.1. Qualitative characterization

The chemical composition of the organic species, the oxide layer and the underlying metal was investigated by XPS after 1 hour immersion of 2304 DSS in ASW without bacteria (control ASW), nutrient-rich ASW without bacteria (control ASW+N), ASW inoculated with bacteria (biofilm ASW) and nutrient-rich ASW inoculated with bacteria (biofilm ASW+N).

Figure V-6 shows the XPS survey spectra. In all cases, the main elements detected at the surface are carbon, oxygen, nitrogen, iron, chromium and nickel. No molybdenum is detected due to the low Mo content of 2304 DSS. The characteristic elements of ASW (sodium, chlorine, magnesium, sulfur, calcium and potassium) are not observed, suggesting that the amount of adsorbed salts on the 2304 DSS surface is low.

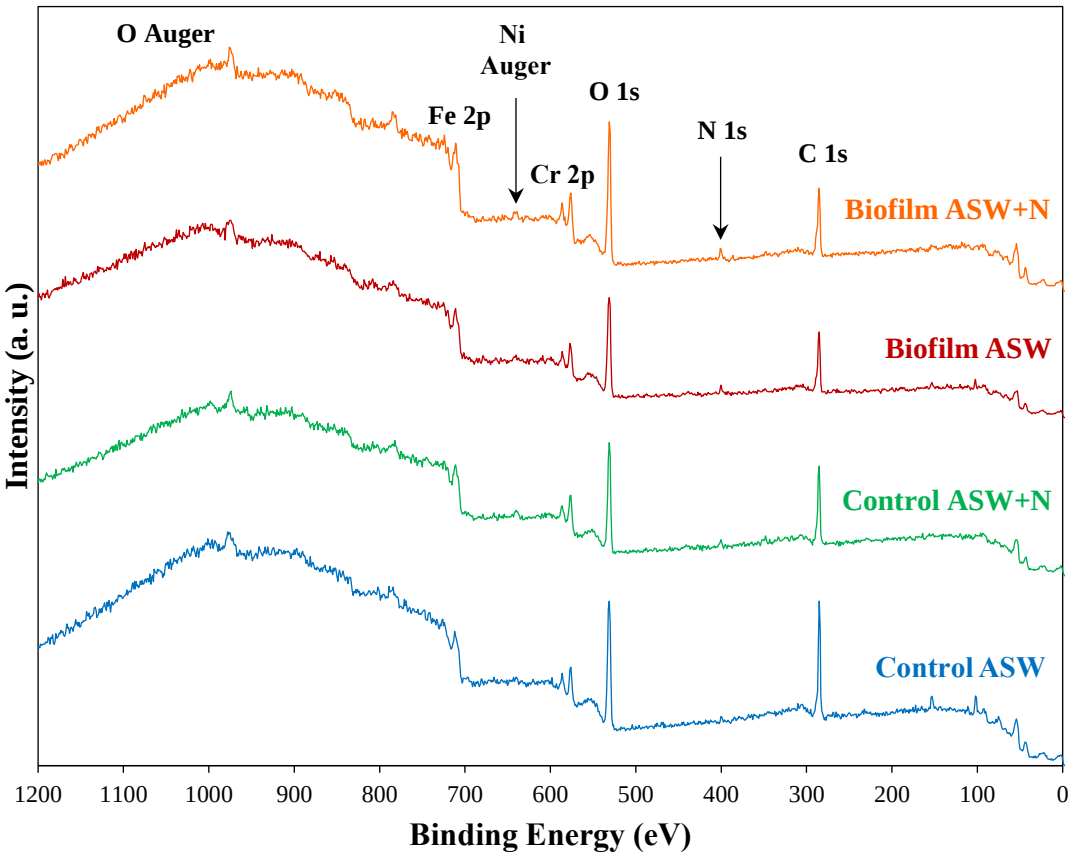


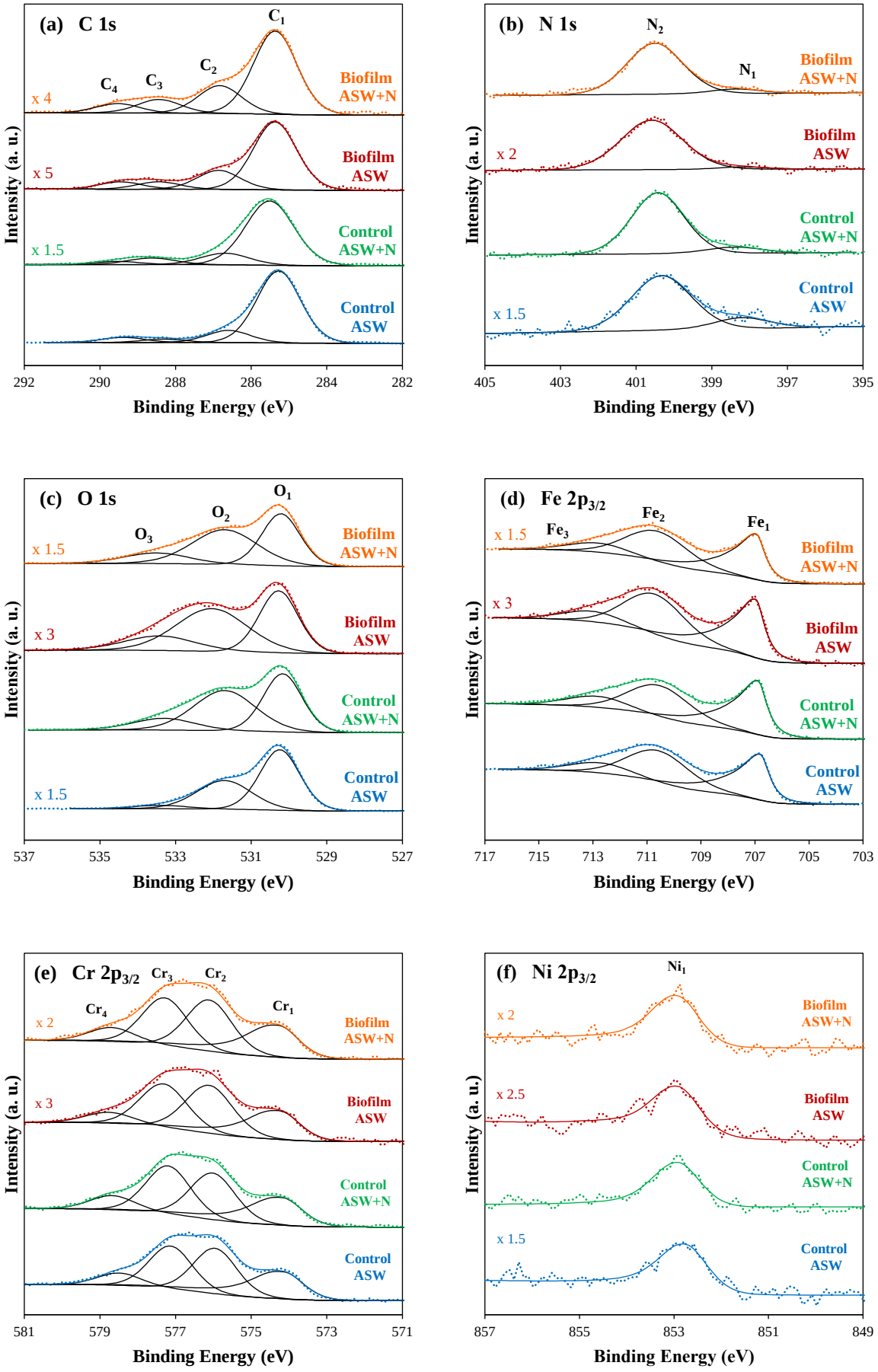
Figure V-6 XPS survey spectra recorded after 1 hour immersion of 2304 DSS in ASW and ASW+N solutions without and with inoculation of bacteria.

Therefore, characteristic elements of the organic matter originating from the adventitious contamination, the nutrients and/or the early biofilm (carbon, nitrogen and oxygen) and of the 2304 DSS substrate (iron, chromium and nickel) are evidenced.

Figure V-7 shows the C 1s, N 1s, O 1s, Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ and Mo 3d core level spectra obtained after 1 hour immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with inoculation of bacteria. The peak assignment and fitting parameters (Binding Energy and Full Width at Half Maximum) used in each case are summarized in the **Table V-2**.

Table V-2 Peak assignment and fitting parameters used for the decomposition of XPS core level spectra recorded after 1 hour immersion of 2304 DSS in ASW and ASW+N solutions without and with inoculation of bacteria (*Asymmetric peak).

XPS core level	Component	Assignment	BE (eV)	FWHM (eV)
C 1s	C_1	**C**–C and **C**–H	285.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1
	C_2	**C**–O and **C**–N	286.8 ± 0.2	1.5 ± 0.1
	C_3	O–**C**–O and N–**C**=O	288.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1
	C_4	O–**C**=O	289.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1
N 1s	N_1	Nitrogen in the alloy	398.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1
	N_2	**N**–C and **N**–C=O	400.5 ± 0.2	1.9 ± 0.2
O 1s	O_1	Metal oxides	530.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1
	O_2	Metal hydroxides, **O**=C–N and **O**=C–O	531.8 ± 0.2	2.1 ± 0.2
	O_3	Adsorbed water, **O**–C, **O**–C–O and **O**–C=O	533.4 ± 0.1	2.1 ± 0.2
Fe $2p_{3/2}$	Fe_1	Fe_{met}	706.9 ± 0.1	0.79*
	Fe_2	Fe(III)	710.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1
	Fe_3	Fe(III) (satellite)	712.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1
Cr $2p_{3/2}$	Cr_1	Cr_{met}	574.3 ± 0.1	1.31*
	Cr_2	Cr(III)	576.1 ± 0.1	1.5 ± 0.1
	Cr_3	Cr(III) (satellite)	577.2 ± 0.1	1.5 ± 0.1
	Cr_4	Cr(III) (satellite)	578.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1
Ni $2p_{3/2}$	Ni_1	Ni_{met}	852.9 ± 0.1	1.13*
Mo $3d_{5/2}$	Mo_1	Mo_{met}	227.8 ± 0.1	0.81*
	Mo_2	Mo(IV)	229.4 ± 0.2	2.4 ± 0.1
	Mo_3	Mo(VI)	232.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1
Mo $3d_{3/2}$	Mo_1’	Mo_{met}	230.9 ± 0.1	0.81*
	Mo_2’	Mo(IV)	232.5 ± 0.2	2.4 ± 0.1
	Mo_3’	Mo(VI)	235.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1


(a) C 1s
C1
C2
C3
C4
x 4
x 5
x 1.5
Biofilm ASW+N
Biofilm ASW
Control ASW+N
Control ASW
Intensity (a. u.)
292 290 288 286 284 282
Binding Energy (eV)
(b) N 1s
N2
N1
x 2
x 1.5
Biofilm ASW+N
Biofilm ASW
Control ASW+N
Control ASW
Intensity (a. u.)
405 403 401 399 397 395
Binding Energy (eV)
(c) O 1s
O1
O2
O3
x 1.5
x 3
x 1.5
Biofilm ASW+N
Biofilm ASW
Control ASW+N
Control ASW
Intensity (a. u.)
537 535 533 531 529 527
Binding Energy (eV)
(d) Fe 2p3/2
Fe1
Fe2
Fe3
x 1.5
x 3
Biofilm ASW+N
Biofilm ASW
Control ASW+N
Control ASW
Intensity (a. u.)
717 715 713 711 709 707 705 703
Binding Energy (eV)
(e) Cr 2p3/2
Cr1
Cr2
Cr3
Cr4
x 2
x 3
Biofilm ASW+N
Biofilm ASW
Control ASW+N
Control ASW
Intensity (a. u.)
581 579 577 575 573 571
Binding Energy (eV)
(f) Ni 2p3/2
Ni1
x 2
x 2.5
x 1.5
Biofilm ASW+N
Biofilm ASW
Control ASW+N
Control ASW
Intensity (a. u.)
857 855 853 851 849
Binding Energy (eV)

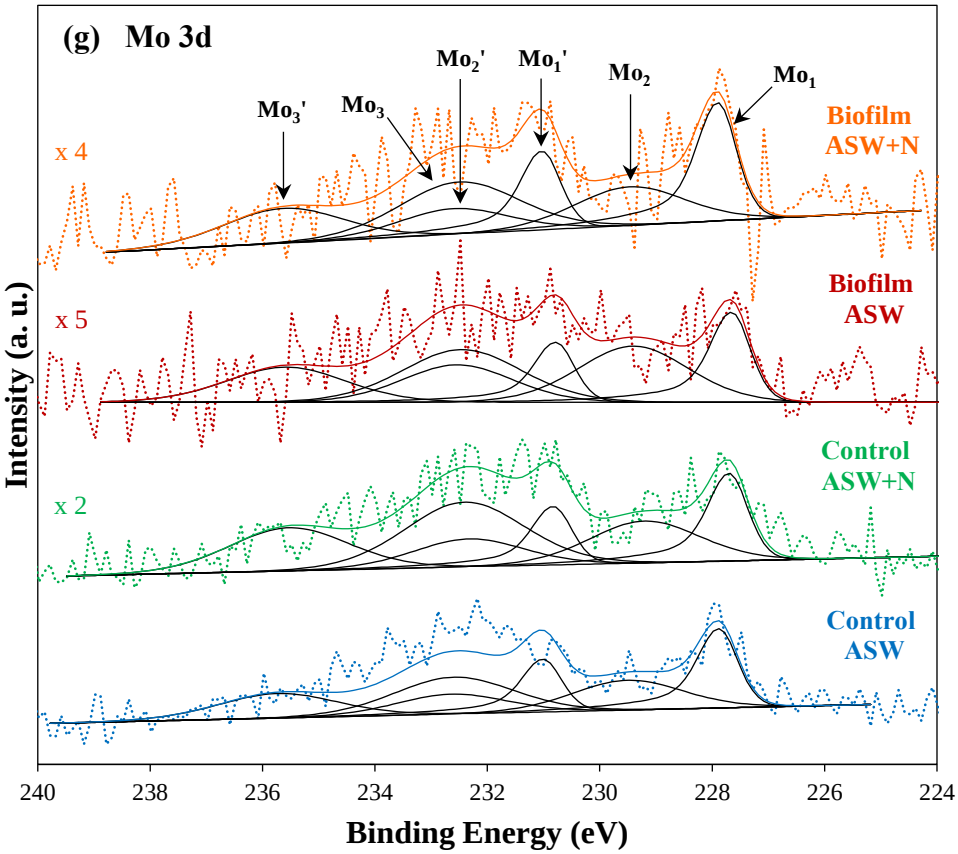


Figure V-7 XPS core level spectra recorded after 1 hour immersion of 2304 DSS in ASW and ASW+N solutions without and with inoculation of bacteria.

The C 1s core level spectra (**Figure V-7-a**) are decomposed into four components assigned to (C_1) carbon only bound to carbon and hydrogen (**C**–C and **C**–H) in hydrocarbons (found in lipids and side chains of polysaccharides and proteins), (C_2) carbon with a single bond with oxygen or nitrogen (**C**–O and **C**–N) in alcohol (found in polysaccharides including amino sugars and uronic acids), amine (found in proteins, amino acids and amino sugars) or amide/peptide bond (found in proteins) functions, (C_3) carbon with two single bonds or one double bond with oxygen (O–**C**–O and N–**C**=O) in acetal (found in polysaccharides including amino sugars and uronic acids) or amide/peptide bond (found in proteins) functions and (C_4) carbon with one double bond and one single bond with oxygen (O=**C**–O) in carboxyl (found in proteins, amino acids, uronic acids and lipids) or ester (found in lipids) functions **[Rubio, 2002]**, **[Pradier, 2005]**, **[Landoulsi, 2008b]**, **[Rouxhet, 2011]**, **[Yang, 2016]**.

In the N 1s core level spectra (**Figure V-7-b**), a weak peak (N_1) reveals the presence of nitrogen in the alloy (either in solid solution or as nitride) **[Marcus, 1992a]**, **[Vanini, 1994]** while a major symmetrical peak (N_2) corresponds to nitrogen bound to carbon (**N**–C and **N**–C=O) in amine (found in proteins, amino acids and amino sugars) or amide/peptide bond groups (found in proteins) **[Rubio, 2002]**, **[Pradier, 2005]**, **[Frateur, 2007]**, **[Ithurbide, 2007]**, **[Torres-Bautista, 2015]**. No protonated amine groups are detected ($R–\underline{N}H_3^+$ signal would appear between 401.3 and 401.7 eV) **[Boonaert, 2000]**, **[Pradier, 2005]**, **[Leone, 2006]**, **[Ahimou, 2007]**, **[Rouxhet, 2011]**, **[Yin, 2015]**, **[Yang, 2016]**.

The O 1s core level spectra (**Figure V-7-c**) are decomposed into three components attributed to (O_1) metal oxides, (O_2) metal hydroxides and oxygen with a double bond with carbon (**O**=C–N and **O**=C–O) in amide/peptide bond (found in proteins), carboxyl (found in proteins, amino acids, uronic acids and lipids) and ester (found in lipids) functions and (O_3) attributed to adsorbed water and oxygen making a single bond with carbon (**O**–C, **O**–C–O and **O**–C=O) in alcohol (found in polysaccharides including amino sugars and uronic acids), acetal (found in polysaccharides including amino sugars and uronic acids), carboxyl (found in proteins, amino acids, uronic acids and lipids) and ester (found in lipids) functions **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1995]**, **[Keller, 2004]**, **[Frateur, 2007]**, **[Landoulsi, 2008b]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Maurice, 2015]**, **[Yang, 2016]**. Therefore, the decomposition of the O 1s core level spectra does not allow a complete identification of the contributions originating from the oxide layer formed on the substrate and the adsorbed oxygen-containing organic species (proteins, polysaccharides and lipids).

The Fe $2p_{3/2}$ core level spectra (**Figure V-7-d**) are decomposed into three components assigned to (Fe_1) metallic iron and (Fe_2), (Fe_3) Fe(III) oxide and/or hydroxide species with a discrete multiplet structure attributed to multiplet splitting of the Fe(III) compounds **[Mansour, 2010]**, **[Maurice, 2015]**. The Cr $2p_{3/2}$ core level spectra (**Figure V-7-e**) exhibit four components assigned to (Cr_1) metallic chromium and (Cr_2), (Cr_3), (Cr_4) Cr(III) oxide and/or hydroxide species with a discrete multiplet structure attributed to multiplet splitting of the Cr(III) compounds **[Maurice, 2000]**, **[Diaz, 2012]**, **[Maurice, 2015]**. The Ni $2p_{3/2}$ core level spectra (**Figure V-7-f**) present a single component characteristic of (Ni_1) metallic nickel, indicating the absence of oxidized nickel **[Marcus, 1992b]**, **[De Vito, 1992]**, **[Torres-Bautista, 2015]**, **[Maurice, 2015]**.

In the Mo 3d core level spectra (**Figure V-7-g**), doublets have to be defined for each component due to the spin-orbit splitting between Mo $3d_{5/2}$ and Mo $3d_{3/2}$ core levels (3.13 eV) **[Marcus, 1988]**. Three doublets can be distinguished, attributed to (Mo_1), (Mo_1') metallic molybdenum, (Mo_2), (Mo_2') Mo(IV) oxide and/or hydroxide species and (Mo_3), (Mo_3') Mo(VI) oxide and/or hydroxide species **[Clayton, 1986]**, **[Marcus, 1988]**, **[Brox,1988]**, **[Olefjord, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 2002]**, **[Petrova, 2011]**, **[Högström, 2013]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Maurice, 2015]**.

Note that after immersion in the sterile ASW solution, the decomposition of the Mo 3d spectra suggests that another contribution is present. It is assumed that it is due to As $L_2M_{45}M_{45}$ Auger lines around 232 eV **[Soma, 1994]**, **[Groenewold, 2013]**. This hypothesis is supported by the detection of As $L_3M_{45}M_{45}$ Auger lines around 268 eV (not shown) **[Soma, 1994]**, **[Groenewold, 2013]**. Arsenic species might originate from the cacodylate buffer used in the fixation procedure and/or from traces in the nutrients (peptone and yeast extract). In order to minimize the overestimation of the quantity of molybdenum species due to the overlapping with arsenic species, the height of the (Mo_1), (Mo_2) and (Mo_3') components was controlled so that the envelope fits the experimental data points, taking into account the theoretical area ratio between Mo $3d_{5/2}$ and Mo $3d_{3/2}$ core levels (the area of each component in the Mo $3d_{3/2}$ core level is fixed 1.5 times lower than the area of each corresponding component in the Mo $3d_{5/2}$ core level).

The Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ and Mo 3d core level spectra suggest that the oxide layer formed on 2304 DSS after 1 hour immersion in the different solutions consists in a mixture of oxides and hydroxides composed mainly of Fe(III) and Cr(III) with a small amount of Mo(IV) and Mo(VI) while no oxidized nickel is detected, as commonly reported for stainless steels **[Frankenthal, 1976]**, **[Clayton, 1986]**, **[Olefjord, 1990]**, **[Willenbruch, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1994]**, **[Vanini, 1994]**, **[Olsson, 1995]**, **[Maurice, 1996]**, **[Olefjord, 1996]**, **[De Cristofaro, 1997]**, **[Maurice, 1998]**, **[Shimizu, 2000]**, **[Schmidt-Rieder, 2003]**, **[Addari, 2008]**, **[Hamada, 2010]**, **[Olsson, 2011]**, **[Fredriksson, 2012]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**, **[Tardio, 2015]**. A contribution corresponding to nitrogen present in the alloy is detected in the N 1s core level spectra. The detection of metallic components in the Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ and Mo 3d core level spectra indicates that the thickness of the oxide layer is of the order of a few nanometers in all cases.

The C 1s, N 1s and O 1s core level spectra show that organic species are present at the surface after 1 hour immersion both in the sterile and the bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions. A complex mixture of proteins, amino acids, polysaccharides (including amino sugars and uronic acids) and lipids is expected, originating from the adventitious contamination, the nutrients and the biofilm (Tightly Bound EPS on the bacteria and/or Loosely Bound EPS around the bacteria).

In order to discuss the nature and the content of the organic compounds adsorbed at the surface, different atomic ratios have been calculated from the C 1s and N 1s spectra, as defined in first approximation by **Equation V-1 [Torres Bautista, 2015]**:

$$\frac{X}{Y} = \frac{I_X / \sigma_X \lambda_X^{BSA} T_X}{I_Y / \sigma_Y \lambda_Y^{BSA} T_Y} \qquad \textbf{Equation V-1}$$

where $I_{X,Y}$ is the intensity of the considered peak in the C 1s or N 1s core level, $\sigma_{X,Y}$ the photoionization cross-section of the C 1s or N 1s core level, $\lambda_{X,Y}^{BSA}$ the inelastic mean free path of photoelectrons emitted by the C 1s or N 1s core level in the matrix of organic species (estimated for a BSA layer) and $T_{X,Y}$ the transmission function of C 1s or N 1s core levels.

The $C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio represents the content of hydrocarbon-type organic species (originating from lipids, side chains of polysaccharides and/or proteins), the $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio represents the content of nitrogen-containing organic species (originating from proteins, amine groups in amino acids and/or amino sugars) and the $(C_2+C_3+C_4-2\times N_2)/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio represents the content of oxygen-containing organic species other than proteins and amino acids (originating from polysaccharides, lipids and/or other oxygenated species such as hydroxyl groups) **[Yang, 2016]**. The values of these atomic ratios are summarized in the **Table V-3**.

Table V-3 Atomic ratios calculated from the XPS C 1s and N 1s core level spectra recorded after 1 hour immersion of 2304 DSS in the sterile and bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions.

Sample	$C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$	$N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$	$(C_2+C_3+C_4-2\times N_2)/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$
Control ASW	0.76	0.02	0.18
Control ASW+N	0.72	0.04	0.16
Biofilm ASW	0.63	0.06	0.19
Biofilm ASW+N	0.58	0.07	0.22

After 1 hour immersion in the control ASW solution, the $C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio is the highest, suggesting that hydrocarbon-type organic species are dominating. The $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio is the lowest, suggesting that the content of nitrogen-containing organic species is low. The $(C_2+C_3+C_4-2\times N_2)/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio suggests that oxygen-containing organic species are present. These results might be explained by a high content of lipids and/or adventitious hydrocarbon contamination. Polysaccharides are not likely expected but cannot be excluded. Other oxygenated species such as hydroxyl groups might also be present.

After 1 hour immersion in the control ASW+N solution, the $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio slightly increases, which can be explained by the adsorption of proteins and/or amino acids originating from the nutrients. The $(C_2+C_3+C_4-2\times N_2)/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio slightly decreases, suggesting that no polysaccharides from the nutrients are adsorbed. The $C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio slightly decreases but remains high, suggesting that the surface remains dominated by hydrocarbon-type organic species, most likely lipids (polysaccharides cannot be excluded), and that the adsorbed nutrients do not fully cover the surface. As mentioned earlier, other oxygenated species such as hydroxyl groups might also be present.

After 1 hour immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021, the $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio increases compared to the corresponding control samples. This indicates that nitrogen-containing organic species (proteins, amine groups in amino acids and/or amino sugars) from the early biofilm (TB EPS at the surface of bacteria and/or LB EPS around bacteria) are detected. The $C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio is lower in presence of bacteria, which can be interpreted as a decrease of the hydrocarbon-type species replaced by nitrogen-containing organic species. After immersion in the bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions, the $(C_2+C_3+C_4-2\times N_2)/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio is not significantly affected compared to the control sample, suggested that oxygen-containing organic species are not major components of the early biofilm.

V.4.3.2. Quantitative characterization

The composition of the oxide layer and the underlying metal as well as the thickness of the oxide layer were calculated using a model consisting in an homogeneous and continuous oxide layer composed of Fe(III), Cr(III), Mo(IV) and Mo(VI) species on top of the underlying metal composed of Fe, Cr and Ni, Mo and N. The system of equations associated to this model has been reported in details in a previous chapter **[CHAPITRE III]**. **Table V-4** reports the quantitative results concerning the oxide and the underlying metal of 2304 DSS obtained after 1 hour immersion in the ASW and ASW+N solutions, without and with inoculation of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021.

Table V-4 XPS quantitative results (thickness of the oxide, compositions of the oxide and the underlying metal) obtained after 1 hour immersion of 2304 DSS in the ASW and ASW+N solutions, without and with inoculation of bacteria.

Sample			**Control ASW**	**Control ASW+N**	**Biofilm ASW**	**Biofilm ASW+N**
Oxide thickness (nm)			2.4	2.3	2.3	2.3
Chemical composition (at. %)	**Oxide layer**	**Fe(III)**	43.9	41.9	45.7	46.5
		Cr(III)	52.5	55.1	51.2	51.4
		Mo(IV) / Mo(VI)	3.6	3.0	3.1	2.1
	Underlying metal	**Fe**	55.7	58.1	58.8	57.5
		Cr	28.7	26.1	25.3	26.3
		Ni	8.9	11.3	13.2	10.8
		Mo	1.8	0.8	1.0	1.1
		N	4.9	3.7	1.7	4.3
	Bulk alloy	**Fe**	balance (67.6)			
		Cr	24.6			
		Ni	4.4			
		Mo	0.3 (0.27)			
		N	0.4 (0.36)			

The thickness of the oxide layer is in the range of 2.3-2.4 nm. The iron content in the oxide is in between 41.9 and 46.5 at. %, which is lower than in the bulk (67.6 at. %). Chromium content in the oxide is comprised between 51.2 and 55.1 at. %, which shows a significant chromium oxide enrichment compared to the bulk (24.6 at. %). Molybdenum content in the oxide is comprised between 2.1 and 3.6 at. %, which shows that molybdenum is also enriched

in the oxide compared to the bulk (0.3 at. %). Complementary measurements performed on 2304 DSS immersed 1 hour in sterile ASW and ASW+N solutions without the procedure of fixation and dehydration (not shown) indicated that the molybdenum oxide content was lower (1.2 and 1.7 at. %, respectively). This suggests that the procedure of fixation and dehydration promotes molybdenum oxide enrichment, or that the content of molybdenum oxide is overestimated due to the overlapping of Mo 3d core level with As $L_2M_{45}M_{45}$ Auger lines mentioned earlier. As mentioned earlier, no oxidized nickel is detected.

Iron content in the underlying metal is comprised between 55.7 and 58.8 at. %, which is lower than its bulk content. Chromium content in the underlying metal is comprised between 25.3 and 28.7 at. %, which is close to its bulk content. Nickel content in the underlying metal is comprised between 8.9 and 13.2 at. %, which shows a metallic nickel enrichment in the underlying metal compared to the bulk (4.4 at. %). Molybdenum content in the underlying metal is comprised between 0.8 and 1.8 at. %, which shows a metallic molybdenum enrichment in the underlying metal compared to the bulk. Nitrogen content in the underlying metal is comprised between 1.7 and 4.9 at. %, which shows a strong nitrogen enrichment in the underlying metal compared to the bulk (0.4 at. %).

The XPS data suggest that the thickness and the composition of the oxide layer as well as the composition of the underlying metal remain stable after 1 hour immersion in ASW and ASW+N solutions with and without inoculation of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021. Neither the nutrients nor the early biofilm affect the oxide layer and the underlying metal formed at the surface of 2304 DSS. Nevertheless, given the depth analyzed by XPS ($\approx$ 10 nm) and the mean thickness of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 cells determined by AFM (435 $\pm$ 97 nm), only the oxide and the underlying metal not covered by bacteria is analyzed by XPS, while no information is obtained by this technique on the surface directly under the bacteria.

The equivalent thickness of the organic layer (originating from adventitious contamination and/or adsorbed nutrients) formed after immersion in the control ASW and ASW+N solutions was calculated by considering a model with an homogeneous and continuous organic layer of hydrocarbon species as well as nitrogen- and/or oxygen-containing species on top of the oxide layer formed on the underlying metal (**Figure V-8-a**).

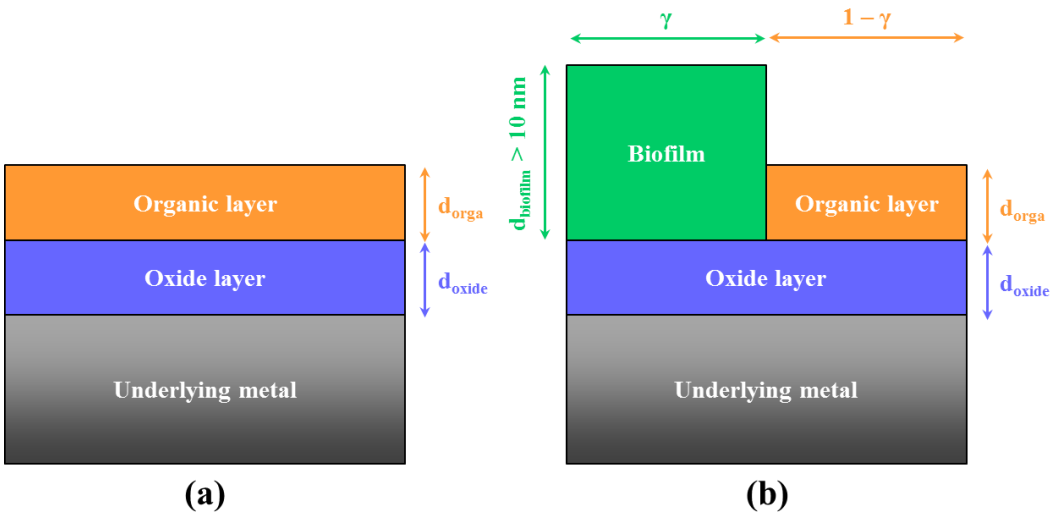


Figure V-8 Models used for XPS quantitative characterization of the 2304 DSS surfaces after 1 hour immersion in the ASW and ASW+N solutions (a) without and (b) with inoculation of bacteria.

Based on this model, the following system of 2 equations with 2 unknowns (k and d_{orga}) is obtained for a take-off angle of 90°:

$$I_C^{orga} = k\sigma_C\lambda_C^{orga}D_C^{orga}T_C\left[1 - exp\left(-\frac{d_{orga}}{\lambda_C^{orga}}\right)\right] \quad \textbf{Equation V-2}$$

$$I_{Cr}^{oxide} = k\sigma_{Cr}\lambda_{Cr}^{oxide}D_{Cr}^{oxide}T_{Cr}\left[1 - exp\left(-\frac{d_{oxide}}{\lambda_{Cr}^{oxide}}\right)\right]exp\left(-\frac{d_{orga}}{\lambda_{Cr}^{orga}}\right) \quad \textbf{Equation V-3}$$

with I_X^Y the intensity of photoelectrons emitted by the element X (for the considered core level) in the matrix Y, k a constant characteristic of the spectrometer, σ_X the photoionization cross-section of the core level of the element X, λ_X^Y the inelastic mean free path of photoelectrons emitted by the core level of the element X in the matrix Y, D_X^Y the density of the element X in the matrix Y, T_X the transmission function for the electrons emitted by the core level of the element X, d_{orga} the thickness of the organic layer and d_{oxide} the thickness of the oxide layer.

I_C^{orga} was defined as the total intensity of the C 1s signals ($C_1 + C_2 + C_3 + C_4$) and I_{Cr}^{oxide} was the intensity of Cr(III) species in the Cr $2p_{3/2}$ core level spectra ($Cr_2 + Cr_3 + Cr_4$). λ_C^{orga} and λ_{Cr}^{orga} were estimated by the linear combination of $\lambda_C^{polyethylene}$ and λ_C^{BSA} as well as $\lambda_{Cr}^{polyethylene}$ and λ_{Cr}^{BSA}, respectively, with respect to the proportions of hydrocarbon-species

(modeled by polyethylene) approximated by C_1/C_{tot} as well as nitrogen- and/or oxygen-containing species (modeled by BSA) approximated by $1 - C_1/C_{tot}$ in the organic layer. D_C^{orga} was estimated. D_{Cr}^{oxide} and d_{oxide} were taken from the previous calculations.

The thickness of the organic layer is obtained by the combination of **Equation V-2** and **Equation V-3**. Thicknesses of 5.6 and 4.5 nm are obtained for 1 hour immersion in the sterile ASW and ASW+N solutions, respectively, assuming a homogeneous and continuous organic layer.

Given the composition of Tightly-Bound (TB) and Loosely-Bound (LB) EPS **[Torres Bautista, 2015]**, mostly proteins and polysaccharides are expected to be detected by XPS on the biofilm. In order to simplify the problem, amino sugars and uronic acids were not taken into account in this analysis.

The surface obtained after immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 is considered as an homogeneous and discontinuous biofilm layer composed of proteins (modeled by BSA) and polysaccharides (modeled by glucose) with a coverage γ and a thickness $\gg \lambda$ (*i.e.* $>$ 10 nm). Beside the biofilm, an homogeneous and discontinuous organic layer of hydrocarbon species (modeled by polyethylene) as well as nitrogen- and/or oxygen-containing species (modeled by BSA) with a coverage $1 - \gamma$ (assumed to have the same composition and thickness compared to the ASW or ASW+N control samples) is considered. The biofilm layer and the organic layer are present on top of the oxide layer formed on the underlying metal (**Figure V-8-b**).

Based on this model, the following system of 2 equations with 2 unknowns (k and γ) is obtained for a take-off angle of 90°:

$$I_N^{amine+amide} = k(1-\gamma)\sigma_N\lambda_N^{orga}D_N^{orga}T_N\left[1 - exp\left(-\frac{d_{orga}}{\lambda_N^{orga}}\right)\right] + k\gamma\sigma_N\lambda_N^{biofilm}D_N^{biofilm}T_N \quad \textbf{Equation V-4}$$

$$I_{Cr}^{oxide} = k(1-\gamma)\sigma_{Cr}\lambda_{Cr}^{oxide}D_{Cr}^{oxide}T_{Cr}\left[1 - exp\left(-\frac{d_{oxide}}{\lambda_{Cr}^{oxide}}\right)\right]exp\left(-\frac{d_{orga}}{\lambda_{Cr}^{orga}}\right) \quad \textbf{Equation V-5}$$

with I_X^Y the intensity of photoelectrons emitted by the element X (in the considered core level) in the matrix Y, k a constant characteristic of the spectrometer, σ_X the photoionization cross-

section of the core level of the element X, λ_X^Y the inelastic mean free path of photoelectrons emitted by the core level of the element X in the matrix Y, D_X^Y the density of the element X in the matrix Y, T_X the transmission function of the core level of the element X, d_{orga} the thickness of the organic layer and d_{oxide} the thickness of the oxide layer.

$I_N^{amine+amide}$ was the intensity of nitrogen in the form of amine and/or amide (present both in the organic layer and in the biofilm) in the N 1s core level spectra (N_2) and I_{Cr}^{oxide} was the intensity of Cr(III) species in the Cr $2p_{3/2}$ core level spectra (Cr_2 + Cr_3 + Cr_4). λ_N^{orga} and λ_{Cr}^{orga} were estimated by the linear combination of $\lambda_N^{polyethylene}$ and λ_N^{BSA} as well as $\lambda_{Cr}^{polyethylene}$ and λ_{Cr}^{BSA}, respectively, with respect to the proportions of polyethylene (approximated by C_1/C_{tot}) and BSA (approximated by 1 – C_1/C_{tot}) in the organic layer formed on the correspondent ASW or ASW+N control samples. d_{orga} was supposed unchanged compared to the correspondent ASW or ASW+N control samples. D_N^{orga} was approximated taking into account the $N_2/(N_2+C_1+C_2+C_3+C_4)$ atomic ratios obtained for the ASW or ASW+N control samples and for a BSA powder reference (spectra not shown), as described by **Equation V-6:**

$$D_N^{orga} = D_N^{BSA} \times \frac{\left(\frac{N_2}{N_2 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4}\right)_{orga}}{\left(\frac{N_2}{N_2 + C_1 + C_2 + C_3 + C_4}\right)_{BSA}} \qquad \textbf{Equation V-6}$$

$\lambda_N^{biofilm}$ was estimated by the linear combination of λ_N^{BSA} and $\lambda_N^{glucose}$ with respect to the hypothetical proportions of BSA (ranging from 0 to 100 %) and glucose (ranging from 100 to 0 %) in the biofilm. $D_N^{biofilm}$ was estimated. Finally, $D_{Cr}^{oxide}$and d_{oxide} were taken from the previous calculations.

The early biofilm coverage (γ) is obtained by the combination of **Equation V-4** and **Equation V-5**. In this model, the proportions of proteins (modeled by BSA) and polysaccharides (modeled by glucose) within the biofilm (TB EPS at the surface of bacteria and LB EPS around bacteria) are not known. Therefore, the biofilm coverage was calculated for a hypothetical biofilm composition ranging from 0 % BSA – 100 % glucose to 100 % BSA – 0 % glucose, as shown in the **Figure V-9**.

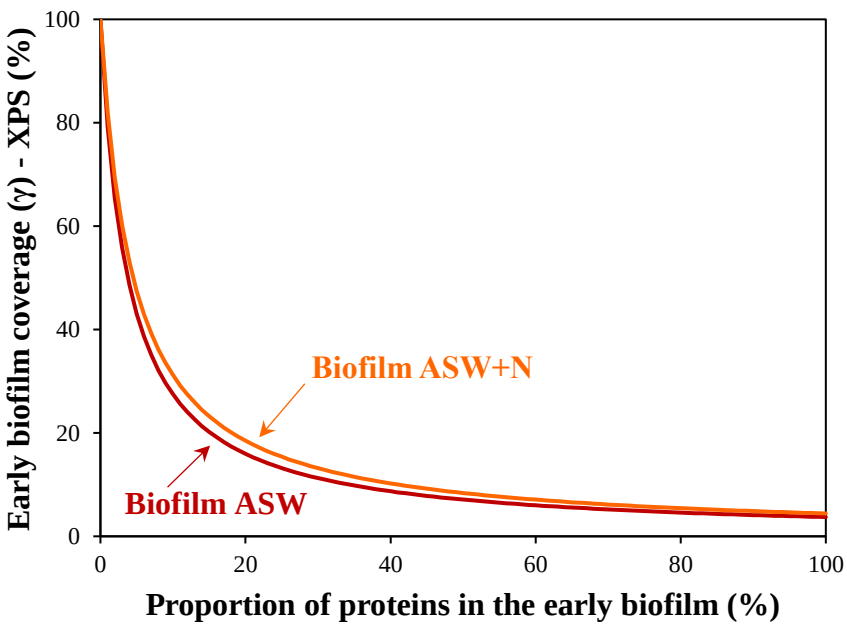


Figure V-9 Early biofilm coverage (γ) calculated from XPS data as a function of hypothetical proportion of proteins (modeled by BSA) in the early biofilm.

Whatever the proportions of BSA and glucose considered in the model, the early biofilm coverage is roughly similar in ASW and in ASW+N, in good agreement with the microscopy results. The early biofilm coverage decreases if the proportion of proteins (BSA) assumed within the biofilm increases. In other words, taking into account the presence of polysaccharides (glucose) leads to a higher calculated biofilm coverage.

Based on the SEM and AFM images, it can be hypothesized that the amount of LB EPS released by bacteria is low in the early stage of biofilm formation. Therefore, the early biofilm formed after 1 hour immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 is expected to consist only in the bacterial cells primarily adhering at the surface of 2304 DSS. As a consequence, the coverages calculated from XPS data are expected to correspond to the ones obtained by microscopy (3.3 $\pm$ 1.3 % in ASW and 2.8 $\pm$ 0.7 % in ASW+N).

The best correspondence is obtained for a biofilm composition of 63 % proteins (BSA model) – 37 % polysaccharides (glucose model) and 62 % proteins (BSA model) – 38 % polysaccharides (glucose model) in ASW and ASW+N solutions, respectively. According to these results, the proportion of proteins in the early biofilm is higher than the one of

polysaccharides. These results suggest that after 1 hour adhesion of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 at the surface of 2304 DSS, the composition of the early biofilm is very close in the ASW and ASW+N solutions.

Torres Bautista *et al.* **[Torres Bautista, 2015]** showed that the TB EPS secreted by *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 were mainly composed of proteins (≈ 86 %). In this work, the proportion of proteins within the biofilm was found lower, which could be explained, if the presence of loosely bound EPS is excluded after 1 hour adhesion, supposing that the TB EPS do not fully cover the surface of bacteria. Therefore, polysaccharides arising from the cell membranes might be detected. Boonaert *et al.* **[Boonaert, 2000]** showed by XPS that the surfaces of two lactic acid bacteria were essentially made of proteins and polysaccharides. For one bacterial strain, the polysaccharides concentration was about twice that of proteins. For the other bacterial strain, the concentration of polysaccharides increased between the exponential and stationary growth phases, which was attributed to either a fragmentation of the S-layer or a synthesis of polysaccharides and/or (lipo)teichoic acids protruding through the S-layer. These examples highlight that the chemical composition of the surface of bacteria strongly depends on the bacterial strain as well as the growth conditions.

V.4.4. ToF-SIMS characterization

Figure V-10 shows the ToF-SIMS 2D chemical maps (100 × 100 µm² and 30 × 30 µm²) of the CN^- and OH^- ions recorded at the outermost surface of the 2304 DSS samples after 1 hour exposure in the bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions. The CN^- chemical maps allow the imaging of the bacteria adhering on the surface, considering that nitrogen-containing species such as proteins (amino sugars cannot be excluded) are present at the surface of bacteria, in agreement with XPS results. The halo effect around the bacteria might be interpreted as the presence of LB EPS in close vicinity to the bacteria, but measurement artefacts due to the roughness of the surface covered by bacteria cannot be excluded.

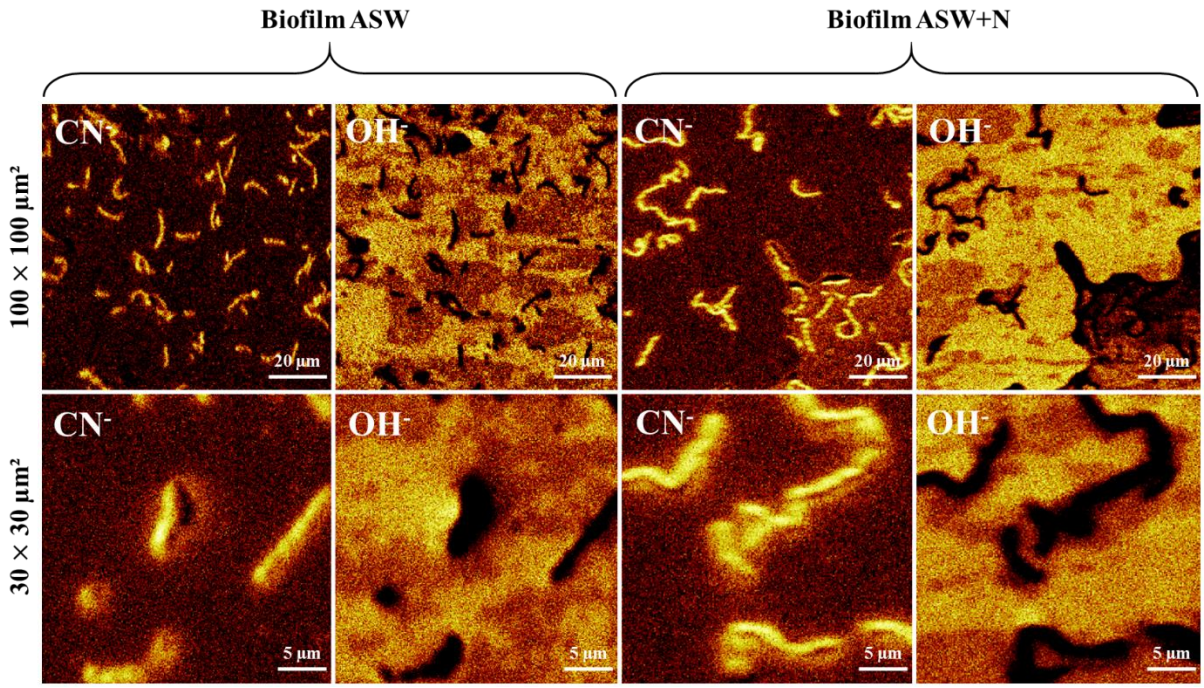


Figure V-10 ToF-SIMS 2D chemical maps of the CN^- and OH^- ions recorded at the outermost surface of 2304 DSS after 1 hour immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria. Analyzed zone: 100 × 100 µm² or 30 × 30 µm².

On the 100 × 100 µm² CN^- images, surface coverages of 4 % and 5 % are measured in ASW and in ASW+N, respectively, which is slightly higher but in the same order of magnitude than the epifluorescence microscopy results (3.3 ± 1.3 % in ASW and 2.8 ± 0.7 % in ASW+N). On the 30 × 30 µm² CN^- images, the width of bacteria is approximately 0.5 µm (both in ASW and ASW+N), also in good agreement with the SEM images. The cells are not clearly individually identified, so that the bacterial length is not discussed here. On the 100 × 100 µm² CN^- chemical map recorded in the ASW+N solution, a specific region with slightly higher CN^- ion intensity can be seen on the lower right corner. This might originate from the nutrients (containing proteins and amino acids) adsorbed at the surface.

On the OH^- chemical maps, the black regions (*ie* low intensity regions) correspond to the position of the bacteria, indicating that OH^- ions are mostly related to the oxide layer. Furthermore, light and dark regions are identified on the surface not covered by the bacteria, which, based on the results presented in a previous chapter **[CHAPITRE IV]**, represent the oxide formed on the ferrite and austenite phases, respectively. These images seem to indicate that bacterial adhesion occurs preferentially on the oxide film formed on the austenite phase on or near the austenite-ferrite phase boundaries.

This interpretation is in good agreement with the results of Sreekumari *et al.* **[Sreekumari, 2001]** who showed that the initial attachment of *Pseudomonas* sp. cells on 304L stainless steel occurred on or near the grain boundaries in the case of the base metal and the austenite-ferrite interface in the case of the weld metal, due to elemental segregation at grain boundaries and/or to high energy level of the grain boundaries compared to the matrix. Similarly, Geesey *et al.* **[Geesey, 1996]** reported that *Citrobacter freundii* cells preferentially colonize grain boundaries over grains in the surface oxide film on 316L stainless steel, and this trend extended for some time after initial colonization, while no conclusion was possible concerning *Desulfovibrio gigas*. The authors specify that either physical/topographical or chemical reasons might explain the adhesion of bacteria at the surface oxide film grain boundaries, such as the fact that grain boundaries occurred as cavities or depressions in the oxide film or the high surface energy of grain boundaries in the surface oxide film.

ToF-SIMS 3D chemical maps (30 × 30 µm²) have been recorded by performing combined and interlaced analysis and sputtering of the surface. The bacteria have been totally sputtered, as it can be seen on the associated depth profiles presented later (**Figure V-13-a** and **Figure V-13-b**). **Figure V-11** shows the 3D chemical maps (cumulated throughout the entire sputtered region) of the CN^- ions. The presence of bacteria is again identified, confirming the presence of nitrogen-containing species such as proteins (amino sugars cannot be excluded). In the case of the ASW+N sample, the presence of adsorbed nutrients at the surface not covered by the bacteria is not clearly identified. Thanks to these maps, regions of interest can be defined, corresponding to the surface either covered by bacteria (represented in green in the lower part of the figure) or beside bacteria (represented in blue).

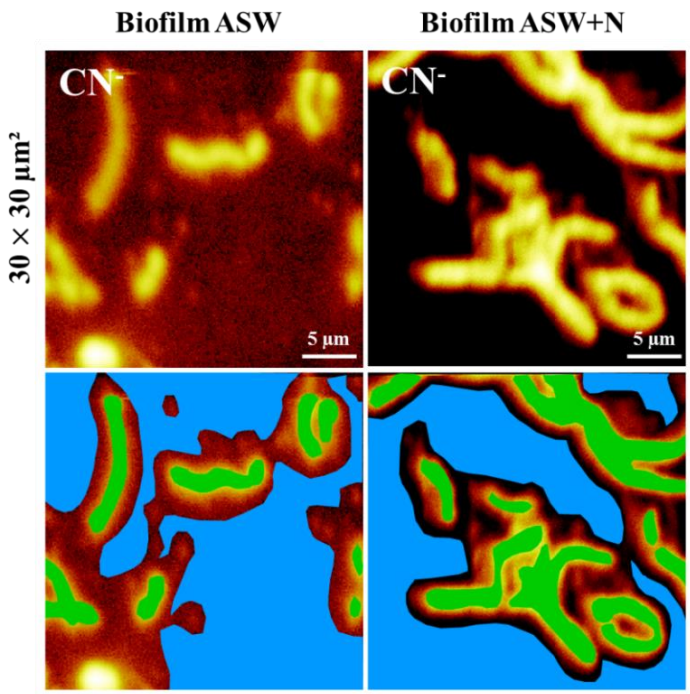


Figure V-11 ToF-SIMS 3D chemical maps of the CN^- ions recorded at the surface of 2304 DSS after 1 hour immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria. Analyzed zone: 30 × 30 µm². Sputtered zone: 500 × 500 µm². Regions of interest (ROIs) corresponding to the surface covered by bacteria (green areas) and beside bacteria (blue areas) are represented.

The mass spectra (cumulated throughout the entire sputtered region) were extracted from these regions of interest in order to compare the intensities of the peaks (normalized with respect to the area of each region of interest) and to define the main ionized fragments related to the bacteria. The ratios of the normalized intensities detected on the bacteria and beside the bacteria, reported in the **Table V-5**, indicate which ions are the best markers of the bacteria. The ionized fragments related to the bacteria include hydrocarbon ions (C^-, CH^-, CH_2^-, CH_3^-, C_2^-, C_2H^-, C_3^-, C_3H^-, $C_3H_2^-$, $C_3H_3^-$, C_4^- and C_4H^-), nitrogen-containing ions (NH^-, CN^-, C_2N^-, C_2NH^-, CN_2^-, $C_2NH_2^-$ and CNO^-), oxygen-containing ions (C_2O^-, C_2OH^-, $C_2OH_3^-$, CO_2H^- and $C_2O_2H_3^-$), phosphorus-containing ions (P^-, PO^-, PO_2^-, PO_3^-, $P_2O_6CNH^-$ and $P_2O_7CNH^-$), sulfur-containing ions ($^{32}S^-$, $^{32}SH^-$, $^{34}S^-$ and $^{32}SO^-$) and chlorine-containing ions ($^{35}Cl^-$ and $^{37}Cl^-$). The hydrocarbon ions likely originate from lipids and/or side chains of polysaccharides and proteins.

Table V-5 Main ionized fragments detected by ToF-SIMS and related to the bacteria.

Category	Ion	Mass (m/z)	Intensity on bacteria / Intensity beside bacteria (normalized)	
			ASW	ASW+N
Hydrocarbon ions	C^-	12.0005	6.4	10.7
	CH^-	13.0084	9.4	17.6
	CH_2^-	14.0162	10.0	25.5
	CH_3^-	15.0240	7.4	9.3
	C_2^-	24.0005	12.3	15.5
	C_2H^-	25.0084	14.4	20.2
	C_3^-	36.0005	27.2	18.0
	C_3H^-	37.0084	16.5	18.5
	$C_3H_2^-$	38.0162	13.8	15.0
	$C_3H_3^-$	39.0240	23.7	23.0
	C_4^-	48.0005	29.7	15.2
	C_4H^-	49.0084	7.6	18.0
Oxygen-containing ions	C_2O^-	39.9955	28.4	15.7
	C_2OH^-	41.0033	21.3	18.9
	$C_2OH_3^-$	43.0189	7.3	12.6
	CO_2H^-	44.9982	13.3	19.8
	$C_2O_2H_3^-$	59.0139	4.5	12.6
Nitrogen-containing ions	NH^-	15.0114	4.1	17.5
	CN^-	26.0036	54.2	56.4
	C_2N^-	38.0036	98.1	66.8
	C_2NH^-	39.0114	44.9	66.7
	CN_2^-	40.0067	Only on bacteria	43.3
	$C_2NH_2^-$	40.0193	46.1	26.6
	CNO^-	41.9985	50.5	34.9
Phosphorus-containing ions	P^-	30.9743	7.1	7.9
	PO^-	46.9692	10.2	11.9
	PO_2^-	62.9641	6.2	6.1
	PO_3^-	78.9592	3.9	3.3
	$P_2O_6CNH^-$	184.9285	Only on bacteria	Only on bacteria
	$P_2O_7CNH^-$	200.9234	Only on bacteria	Only on bacteria
Sulfur-containing ions	$^{32}S^-$	31.9726	10.2	10.4
	$^{32}SH^-$	32.9804	10.6	14.2
	$^{34}S^-$	33.9684	9.3	11.5
	$^{32}SO^-$	47.9675	9.1	8.5
	$^{35}Cl^-$	34.9694	17.6	16.7
	$^{37}Cl^-$	36.9665	17.6	16.6

The nitrogen-containing ions are the best markers for the bacteria (high intensity ratio). More particularly, the CNO^- ions have previously been found to be related to proteins **[Compère, 2001]**, **[Poleunis, 2002b]**, **[Pradier, 2005]**. This indicates that nitrogen-containing organic species such as proteins and/or amino sugars are present. The oxygen-containing ions might originate from different oxygen-containing organic species, such as polysaccharides (including amino sugars and uronic acids) proteins and/or lipids. Previous studies **[Compère, 2001]**, **[Poleunis, 2002b]**, **[Pradier, 2005]** reported that C_2O^- and CO_2H^- ions are related to carbohydrates. From these works it can be hypothesized that the C_2O^- ions (containing one oxygen atom) arise from polysaccharides while the CO_2H^- ions (containing two oxygen atoms) arise from uronic acids and/or lipids.

The phosphorus-containing ions might originate from inorganic species (phosphate and/or pyrophosphate ions) present as traces in water and/or released by the bacterial metabolism and/or from organic species (for instance phosphate groups in phospholipids, phosphoproteins, adenosine tri-, di- and monophosphate, DNA and/or RNA) involved in bacterial structures such as cell membranes and metabolic reactions. The detection of high mass phosphorus-containing ions ($P_2O_6CNH^-$ and $P_2O_7CNH^-$) suggests that complex biomolecules containing phosphorus atoms are present. The sulfur-containing ions might originate from inorganic species (sulfate ions) present in the ASW and ASW+N solutions and/or from organic species (for instance in some proteins containing sulfur). Finally, the chloride ions likely originate from inorganic chloride ions present in the ASW and ASW+N solutions.

The 3D chemical maps (cumulated throughout the entire sputtered region) of the ions listed in the **Table V-5** allow the imaging of the bacteria. Examples are shown in the **Figure V-12** for ions representative of each category: C_2^- for hydrocarbon ions, CNO^- for nitrogen-containing ions, C_2O^- and CO_2H^- for oxygen-containing ions containing one or two oxygen atoms, respectively, PO_2^- and $P_2O_6CNH^-$ for phosphorus-containing ions, S^- for sulfur-containing ions and Cl^- for chlorine-containing ions.

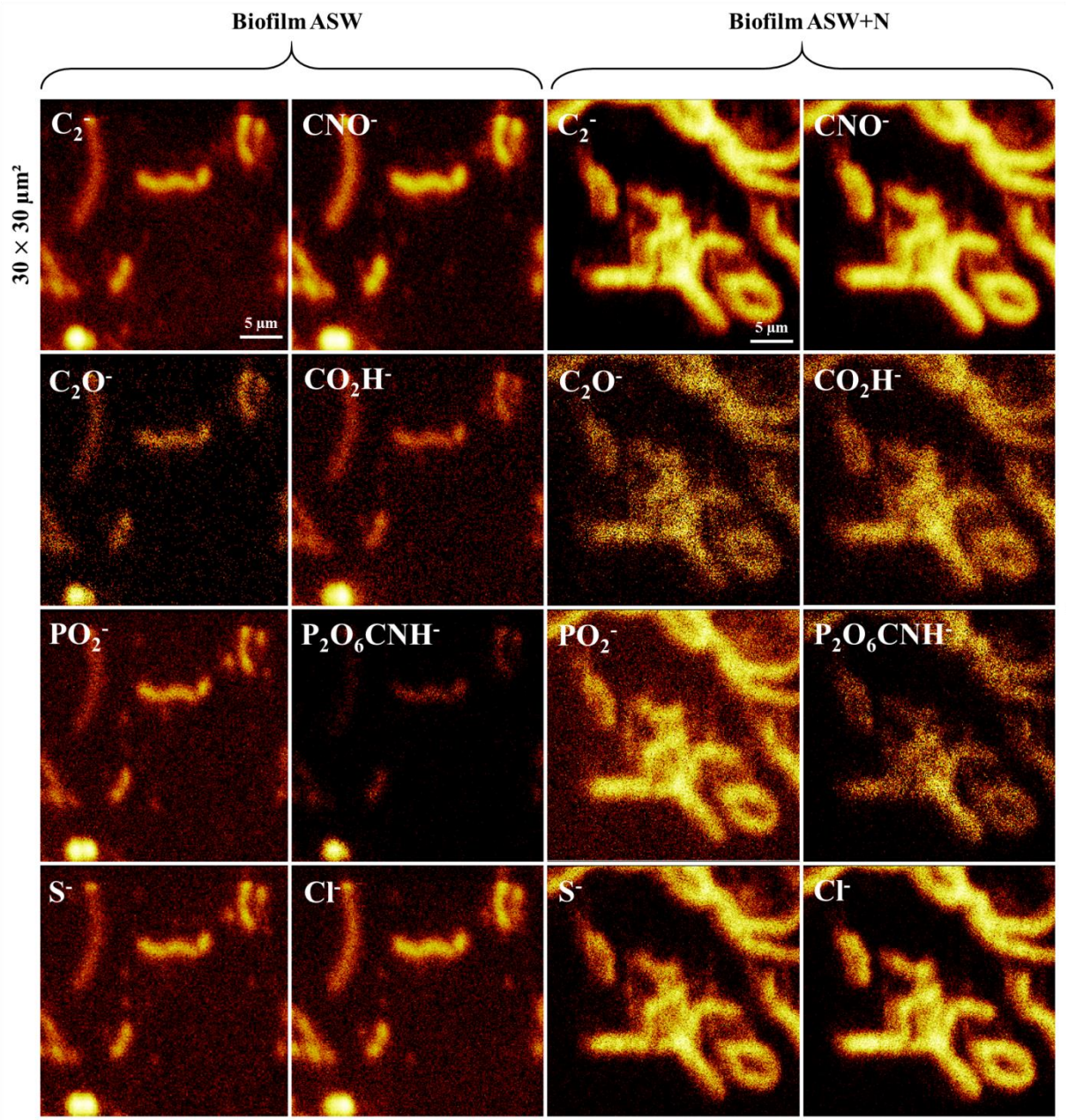
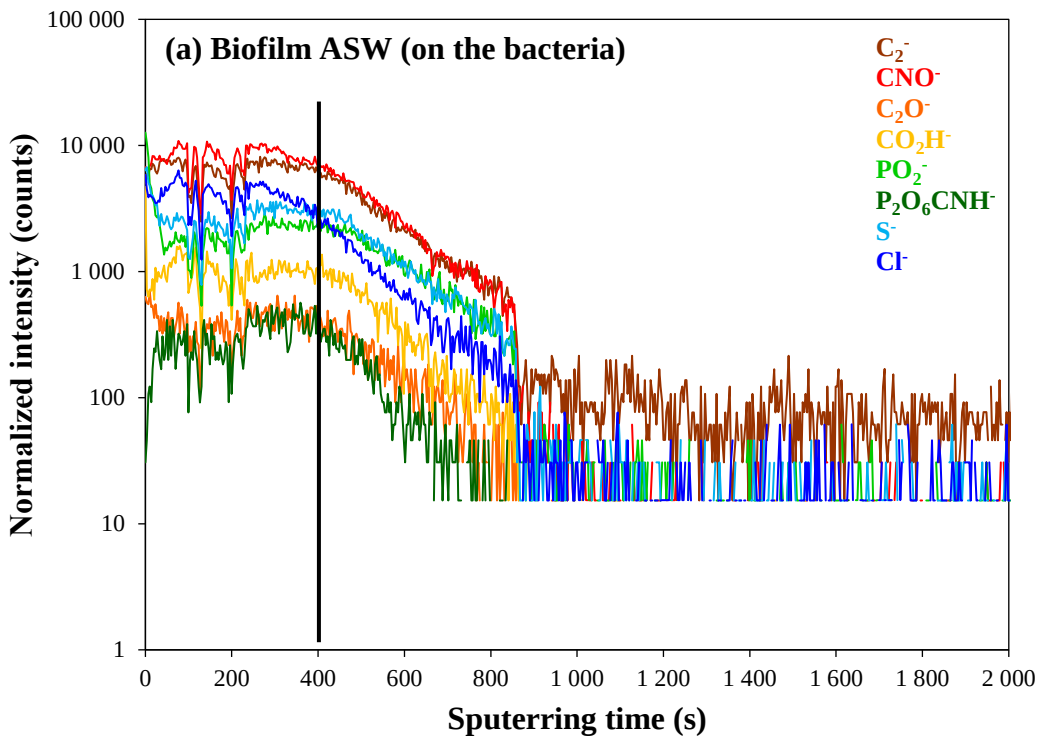
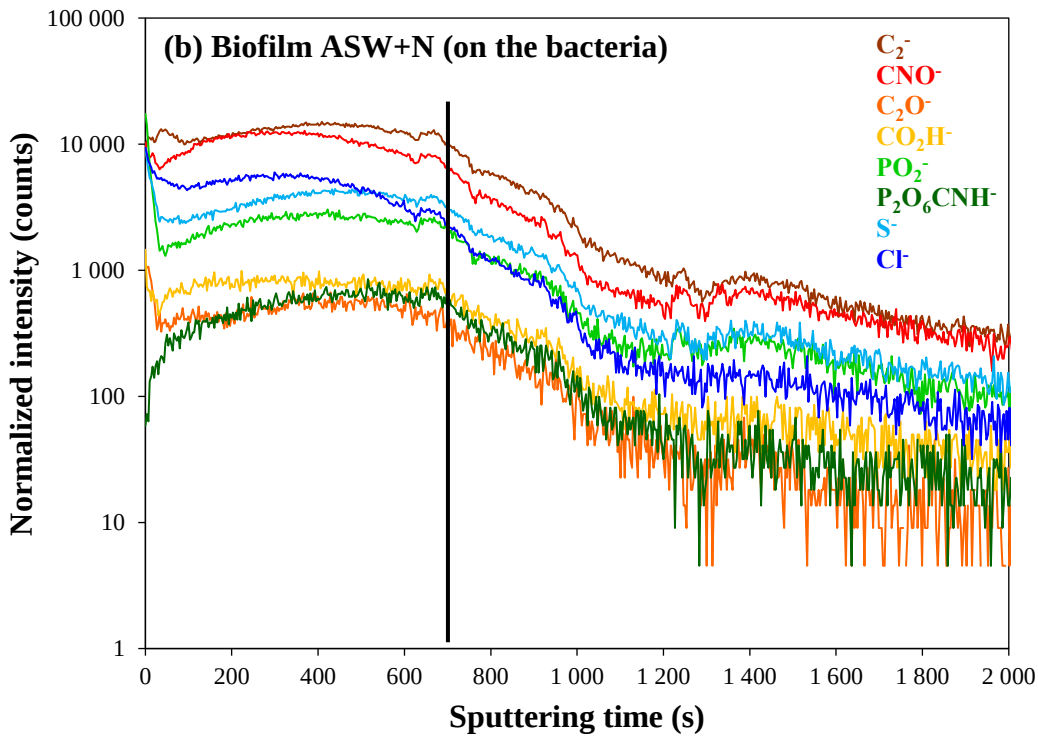


Figure V-12 ToF-SIMS 3D chemical maps of the C_2^-, CNO^-, C_2O^-, CO_2H^-, PO_2^-, $P_2O_6CNH^-$, S^- and Cl^- ions recorded at the surface of 2304 DSS after 1 hour immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria. Analyzed zone: 30 × 30 µm². Sputtered zone: 500 × 500 µm².

Figure V-13-a and **Figure V-13-b** show the normalized ToF-SIMS depth profiles of the C_2^-, CNO^-, C_2O^-, CO_2H^-, PO_2^-, $P_2O_6CNH^-$, S^- and Cl^- ions recorded after immersion in the bacteria-containing ASW and ASW+N solutions, respectively, extracted from the regions of interest (ROIs) corresponding to the surface covered by bacteria. The region exhibiting high intensities of the different ions corresponds to the bacteria. When the intensities of these ions decrease, the 2304 DSS substrate is reached. No clear interface between the bacteria and the substrate is evidenced. Indeed, the regions of interest include different bacteria whose thicknesses, based on AFM analyses, are not expected to be uniform (and the thickness of single bacteria is also not uniform). Nevertheless, the region exhibiting roughly constant ions intensities is observed until ≈ 400 s for the ASW sample and ≈ 700 s for the ASW+N one. This suggests that the average thickness of the bacteria is higher in ASW+N than in ASW on these specific analyzed zones and/or that two bacteria are overlapping in the case of the ASW+N analyzed area. The Cl^- signal seems to start decreasing before 400 s (ASW) and 700 s (ASW+N) of sputtering (whereas constant intensities are still observed on the other ions), which could indicate that chloride ions are adsorbed at the surface of bacteria. The other signals show very similar behaviors, so that no stratification within the bacteria of the different organic species (lipids, polysaccharides and proteins) is identified.

Figure V-13-c and **Figure V-13-d** show the normalized ToF-SIMS depth profiles of the C_2^-, CNO^-, C_2O^-, CO_2H^-, PO_2^-, $P_2O_6CNH^-$, S^- and Cl^- ions recorded after immersion in the bacteria-containing ASW and ASW+N solutions, respectively, extracted from the regions of interest (ROIs) beside the bacteria. Compared to the profiles obtained on the bacteria, the intensities of all the different ions are significantly lower. This confirms that these ions are mostly related to the bacteria. The signals from the organic species decrease very rapidly. Given the equivalent thicknesses (determined by XPS) of the organic layer formed after immersion in ASW (5.6 nm) and ASW+N solutions (4.5 nm), it is likely sputtered within a few seconds.


(a) Biofilm ASW (on the bacteria)
C_2^-
CNO^-
C_2O^-
CO_2H^-
PO_2^-
$P_2O_6CNH^-$
S^-
Cl^-
Normalized intensity (counts)
100 000
10 000
1 000
100
10
1
0
200
400
600
800
1 000
1 200
1 400
1 600
1 800
2 000
Sputerring time (s)


(b) Biofilm ASW+N (on the bacteria)
C_2^-
CNO^-
C_2O^-
CO_2H^-
PO_2^-
$P_2O_6CNH^-$
S^-
Cl^-
Normalized intensity (counts)
100 000
10 000
1 000
100
10
1
0
200
400
600
800
1 000
1 200
1 400
1 600
1 800
2 000
Sputtering time (s)

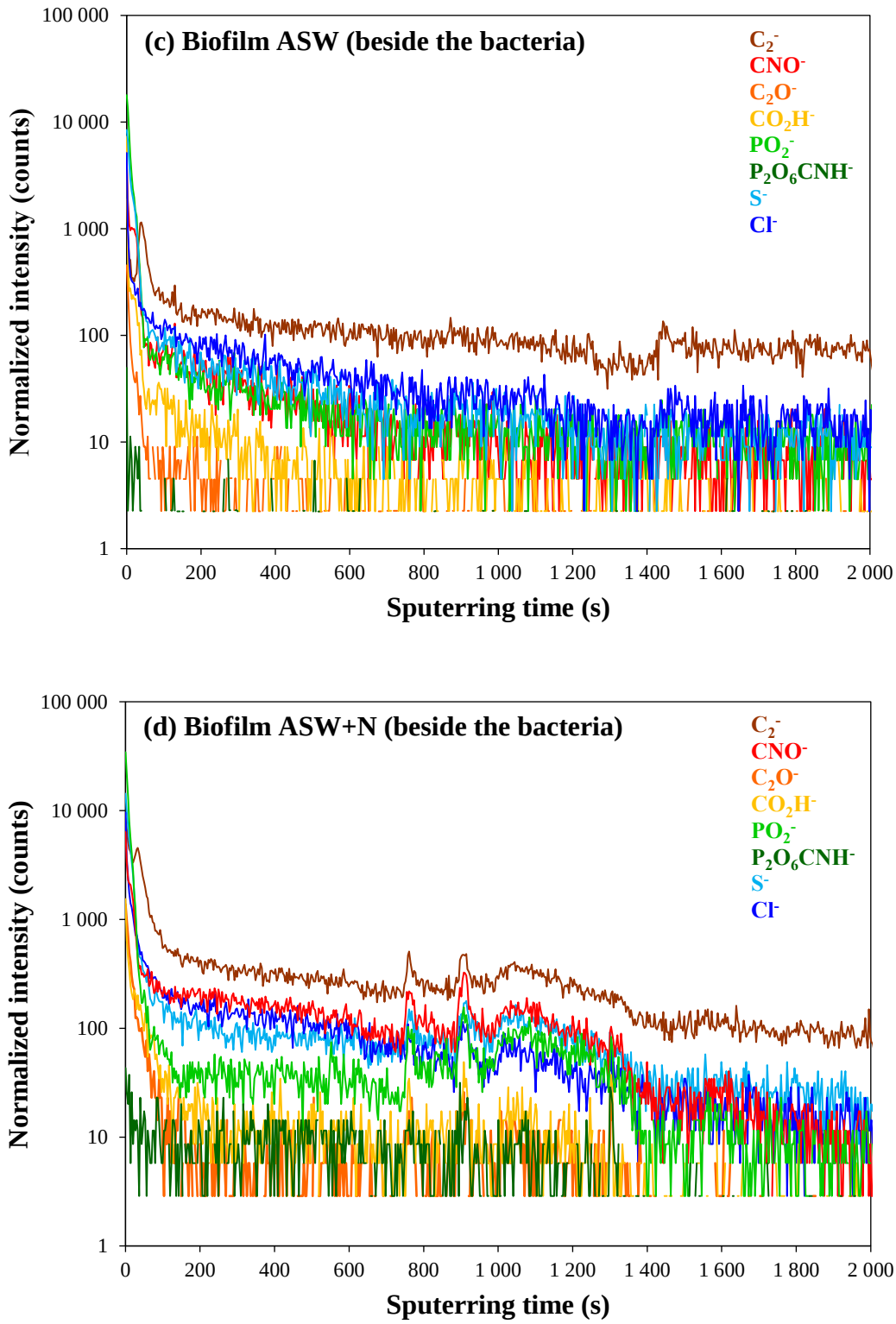
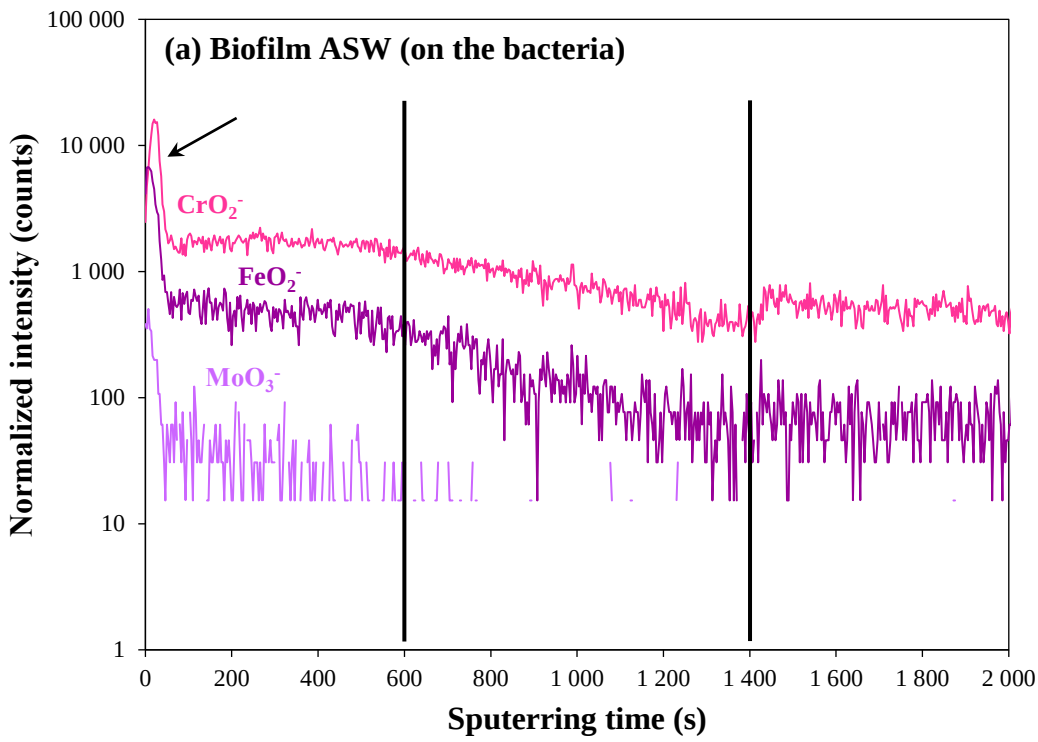
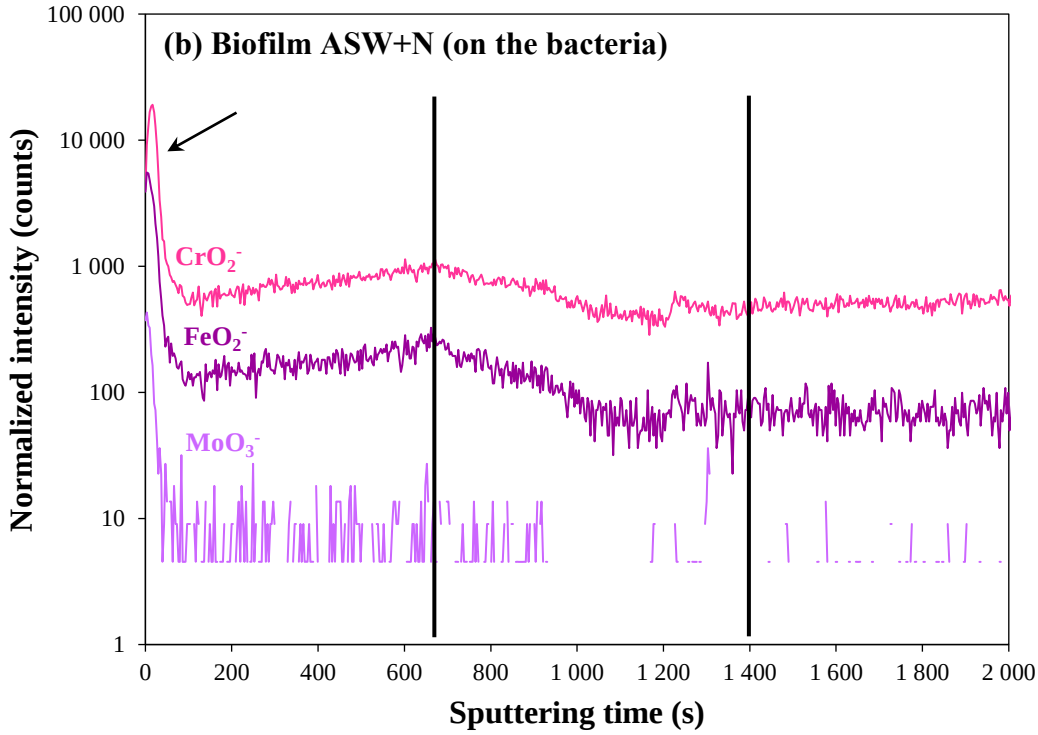


Figure V-13 ToF-SIMS depth profiles of the C_2^-, CNO^-, C_2O^-, CO_2H^-, PO_2^-, $P_2O_6CNH^-$, S^- and Cl^- secondary ions recorded at the surface of 2304 DSS after 1 hour immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria, extracted from the Regions of Interest (ROIs) corresponding to the surface with bacteria and beside the bacteria. Analyzed zone: 30 × 30 µm². Sputtered zone: 500 × 500 µm².

Figure V-14-a and **Figure V-14-b** show the normalized ToF-SIMS depth profiles of the FeO_2^-, CrO_2^- and MoO_3^- ions (related to iron, chromium and molybdenum oxides, respectively) recorded after immersion in the bacteria-containing ASW and ASW+N solutions, respectively, and extracted from the regions of interest corresponding to the surface covered by bacteria. The normalized ToF-SIMS depth profiles extracted from the regions of interest beside the bacteria are shown in **Figure V-14-c** for the ASW sample and in **Figure V-14-d** for the ASW+N sample.

In all cases, the maxima of the FeO_2^-, CrO_2^- and MoO_3^- signals located at the very beginning of the depth profiles (≈ 20 s), as indicated by the arrows, correspond to the oxide film formed at the surface of 2304 DSS uncovered by the bacteria. In the regions of interest corresponding to the surface covered by bacteria, this suggests that uncovered oxide film is present in close vicinity of the bacteria. A magnification of the zone on the depth profiles corresponding to the oxide film uncovered by the bacteria is shown on the **Figure V-15**. The maxima of the FeO_2^- and MoO_3^- signals are reached before the maxima of the CrO_2^- ones, which suggests that the oxide film exhibits a bilayer structure, consisting in an outer iron- and molybdenum-rich region and an inner chromium-rich region, in agreements with previous chapters **[CHAPITRE III]**, **[CHAPITRE IV]**. For each studied region of interest (both on and beside the bacteria), the metal/oxide interface, defined as the sputtering time corresponding to 80 % of the Ni_2^- maximum (not shown), is positioned at 46 ± 2 s in ASW and 41 ± 2 s in ASW+N. Under these conditions of analysis, the thickness of the oxide layer not covered by bacteria can be estimated **[Mazenc, 2012]** around 1.8 ± 0.1 nm in ASW and 1.6 ± 0.1 nm in ASW+N, which is slightly thinner but in the same order of magnitude than the results obtained by XPS (2.3 nm in both cases).


(a) Biofilm ASW (on the bacteria)
Normalized intensity (counts)
100 000
10 000
1 000
100
10
1
CrO2-
FeO2-
MoO3-
0
200
400
600
800
1 000
1 200
1 400
1 600
1 800
2 000
Sputerring time (s)


(b) Biofilm ASW+N (on the bacteria)
Normalized intensity (counts)
100 000
10 000
1 000
100
10
1
CrO2-
FeO2-
MoO3-
0
200
400
600
800
1 000
1 200
1 400
1 600
1 800
2 000
Sputtering time (s)

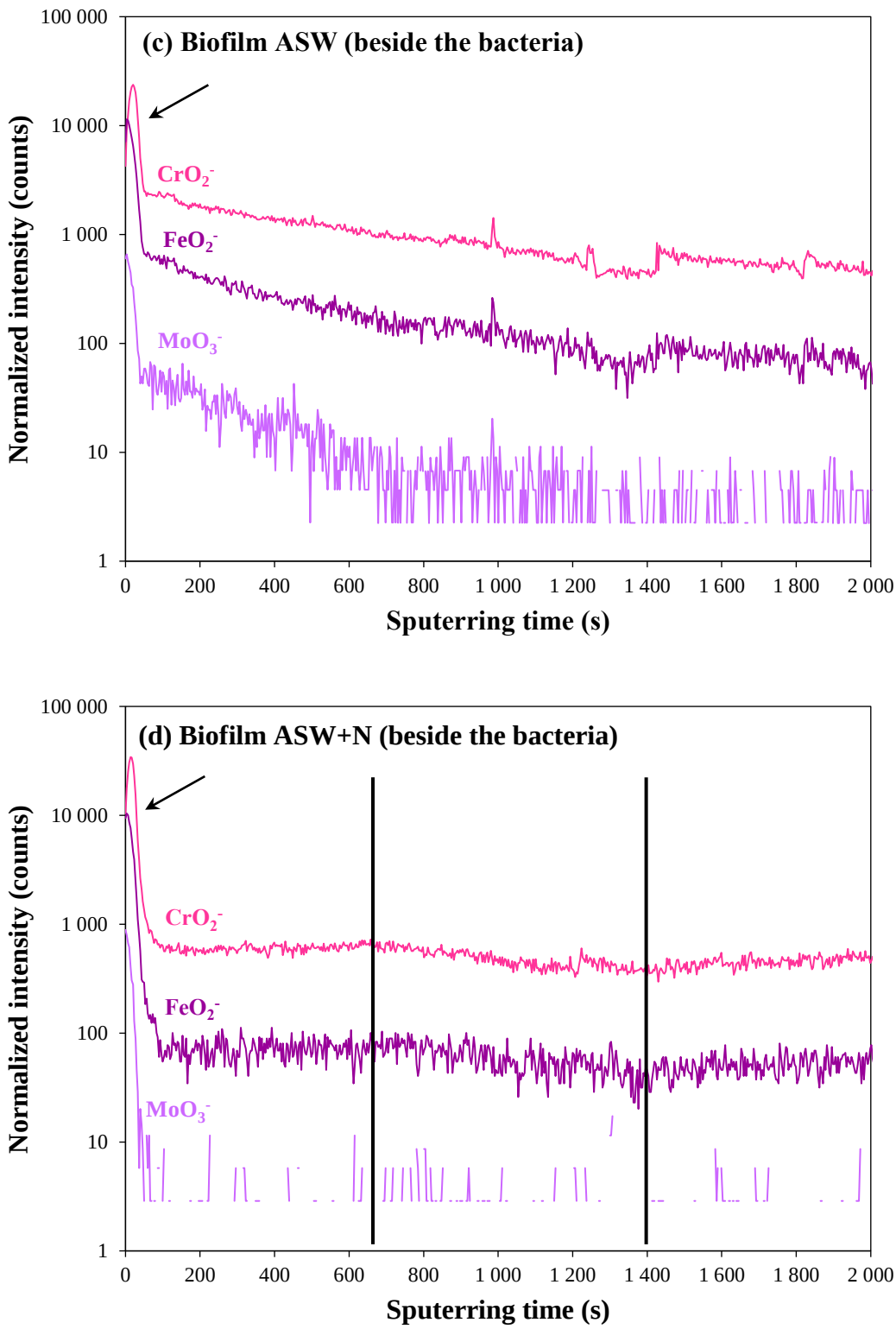


Figure V-14 ToF-SIMS depth profiles of the FeO_2^-, CrO_2^- and MoO_3^- secondary ions recorded at the surface of 2304 DSS after 1 hour immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria, extracted from the Regions of Interest (ROIs) corresponding to the surface with bacteria and beside the bacteria. Analyzed zone: 30 × 30 µm². Sputtered zone: 500 × 500 µm².

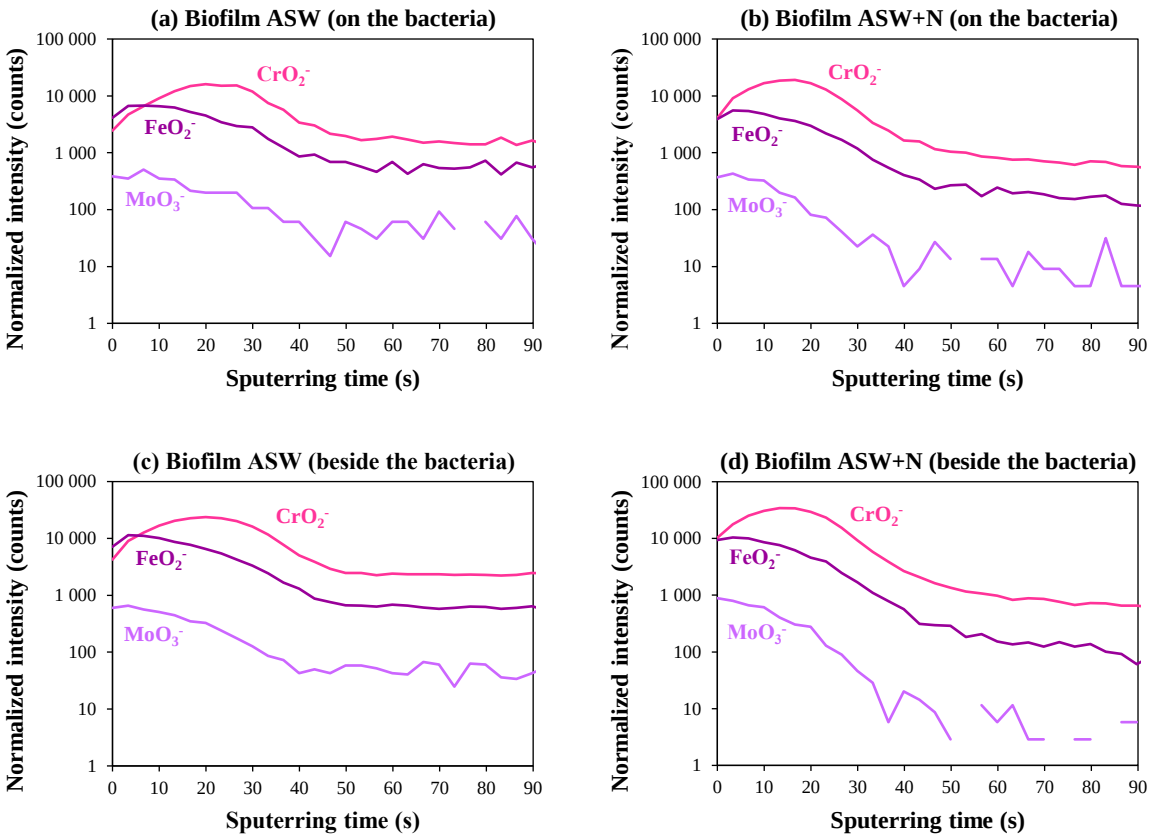


Figure V-15 Magnification of the ToF-SIMS depth profiles of the FeO_2^-, CrO_2^- and MoO_3^- secondary ions in the zone corresponding to the oxide film not covered by the bacteria.

For the region corresponding to longer sputtering times, the evolution of the FeO_2^- and CrO_2^- signals show different behaviors on the depth profiles of the biofilm samples acquired on and beside the bacteria. For the ASW biofilm sample (i) on the bacteria (**Figure V-14-a**), the FeO_2^- and CrO_2^- signals remain high and nearly constant until ≈ 600 s, then decrease and stabilize until ≈ 1400 s while (ii) beside the bacteria (**Figure V-14-c**), the FeO_2^- and CrO_2^- signals decrease continuously. For the ASW+N biofilm sample (i) on the bacteria (**Figure V-14-b**), the FeO_2^- and CrO_2^- signals first increase and reach a maximum at ≈ 680 s, then decrease and stabilize at ≈ 1400 s while (ii) beside the bacteria (**Figure V-14-d**), the FeO_2^- and CrO_2^- signals follow the same but less pronounced evolution. The intensity of the MoO_3^- signal being very low, it will not be discussed here. These results seem to reveal the presence of an oxide film under the bacteria, as already shown by ToF-SIMS in the case of *Escherichia coli* adhering on 316L stainless steel **[Seyeux, 2015]**. As described in the case of the depth profiles of the ions related to the bacteria, no clear bacteria/substrate interface is evidenced on these depth profiles, because of the strong non-uniformity of the thickness of the bacteria. Therefore, the thickness of the oxide film under the bacteria cannot be determined.

In order to discuss the composition of the oxide film, CrO_2^- / FeO_2^- area ratios have been calculated for the ROIs corresponding to the surface with bacteria (not covered oxide in close vicinity to the bacteria) and to the surface beside the bacteria (not covered oxide beside the bacteria). These ratios can be converted into Cr(III) concentrations **[CHAPITRE IV]** and compared to the Cr(III) concentration obtained by XPS. Given the absence of a clear bacteria/substrate interface on the ToF-SIMS depth profiles, these ratios were not calculated for the oxide under bacteria. The results are summarized in the **Table V-6**.

Table V-6 Cr(III) contents obtained from ToF-SIMS and XPS data after 1 hour immersion of 2304 DSS in the sterile and bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions.

Cr(III) content (at. %)	**Biofilm ASW**		**Biofilm ASW+N**	
Determined by ToF-SIMS	**Close to bacteria**	**Beside bacteria**	**Close to bacteria**	**Beside bacteria**
	46.8	47.9	62.5	62.5
Determined by XPS	**Away from bacteria**		**Away from bacteria**	
	51.2		51.4	

After immersion in the bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions, the Cr(III) contents obtained from ToF-SIMS data (deduced from the CrO_2^- / FeO_2^- ratio) in the ROIs close to and beside the bacteria are not significantly different. In the case of the biofilm ASW sample, a good agreement is found between ToF-SIMS and XPS analyses. In the case of the biofilm ASW+N sample, the Cr(III) content obtained by ToF-SIMS is higher than the Cr(III) content obtained by XPS. This might be linked to the fact that the area analyzed by XPS is much larger (disk of 500 µm diameter) than the one analyzed by ToF-SIMS (30 × 30 µm²). Therefore, the not covered oxide analyzed by XPS is, in average, more distant to the bacteria than the one analyzed by ToF-SIMS. It can be hypothesized that in the case of the biofilm ASW+N sample, short-range bacteria/oxide interactions (in the order of magnitude of a few µm) induce a chromium enrichment of the non-covered oxide film close to and beside the bacteria, as already observed by Seyeux *et al.* **[Seyeux, 2015]**. A similar behavior can be expected for the oxide present under the bacteria **[Seyeux, 2015]** but it cannot be measured in this work. The presence of nutrients might promote the bacterial activity, leading to the modification of the composition of the oxide film only for the biofilm ASW+N sample.

V.4.5. Electrochemical characterization

V.4.5.1. OCP evolution

Electrochemical characterization has been performed in ASW+N solution, without and with inoculation of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021. First, the Open Circuit Potential (OCP) evolution was monitored over immersion time (1 hour). Representative examples are shown in the **Figure V-16**. In the sterile ASW+N solution, the OCP remains stable. In presence of bacteria, the initial value of the OCP is close to the one obtained in the sterile solution, but in most cases a slight continuous decrease is observed when the immersion time increases. After 1 hour immersion in presence of bacteria, the OCP is not stabilized.

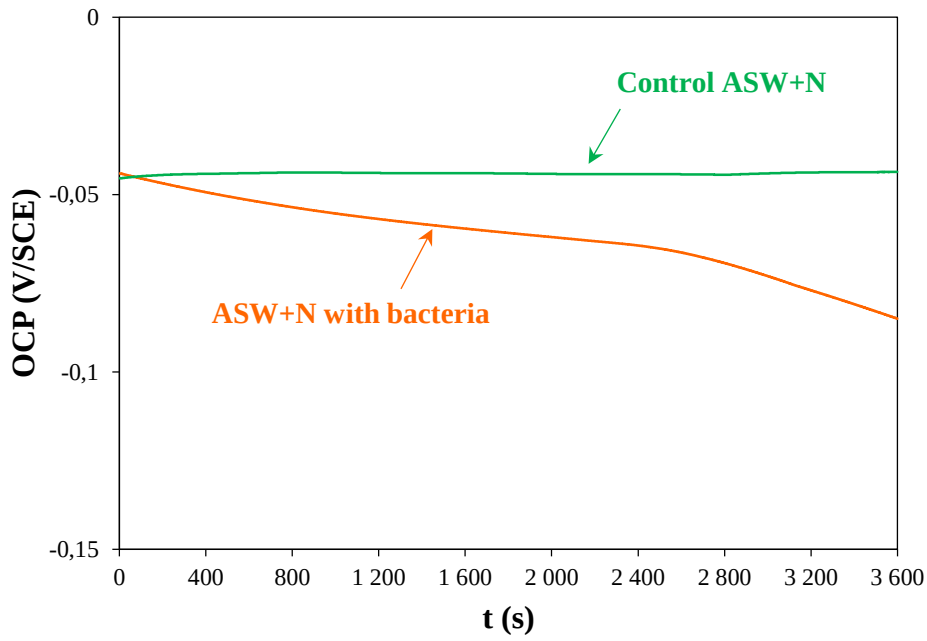


Figure V-16 Typical evolution of the Open Circuit Potential (OCP) with immersion time (1 hour) for 2304 DSS in the ASW+N solution, without and with inoculation of bacteria.

V.4.5.2. Anodic and cathodic polarization curves

After the 1 hour immersion at the OCP in ASW+N solution without and with bacteria, anodic and cathodic polarization curves have been recorded separately, as shown in **Figure V-17-a** and **Figure V-17-b**, respectively.

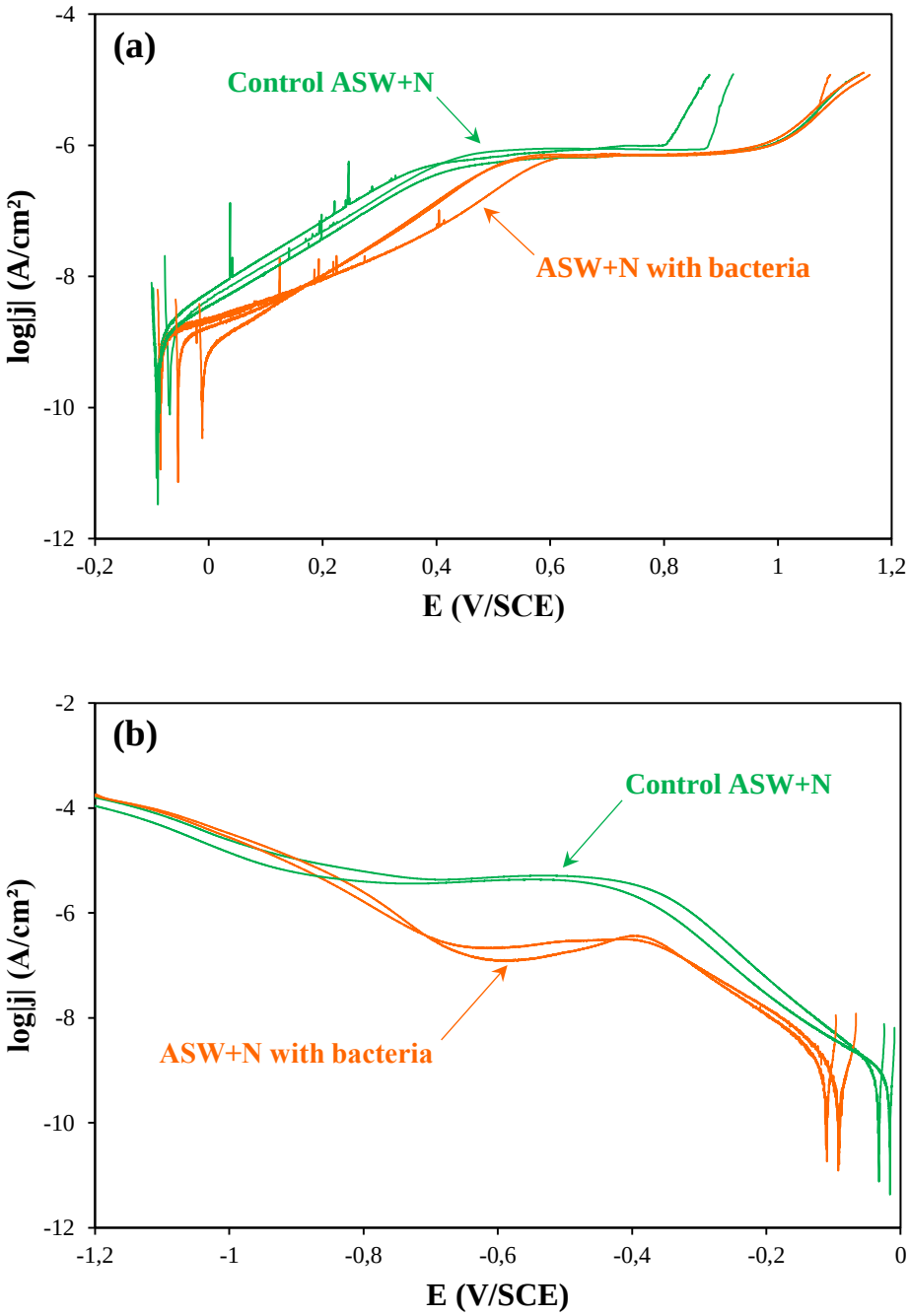


Figure V-17 (a) Anodic and (b) cathodic polarization curves of 2304 DSS recorded after 1 hour immersion at the OCP in the ASW+N solution without and with inoculation of bacteria. Scan rate: 0.17 mV/s.

On the anodic polarization curves (**Figure V-17-a**), the corrosion potential (E_{corr}) value is -0.083 ± 0.013 V/SCE in sterile medium (mean value and standard deviation obtained on 3 coupons) and -0.050 ± 0.037 V/SCE in presence of bacteria (mean value and standard deviation obtained on 3 coupons with 2 independent cultures). In this case, E_{corr} is slightly

higher in presence of bacteria. On the cathodic polarization curves (**Figure V-17-b**), the corrosion potential (E_{corr}) value is -0.024 ± 0.012 V/SCE (mean value and standard deviation obtained on 2 coupons with 2 independent cultures) and -0.101 ± 0.13 V/SCE in presence of bacteria (mean value and standard deviation obtained on 2 coupons with 2 independent cultures). In this case, E_{corr} is significantly lower in presence of bacteria.

The anodic polarization curves obtained in sterile and bacteria-inoculated ASW+N solutions (**Figure V-17-a**) show that the anodic current density increases from E_{corr} to ≈ 0.5-0.6 V/SCE. The absence of passive plateau might be the consequence of non-stationary conditions using a scan rate of 0.17 mV/s **[Annexe E]**. In all cases, current peaks are observed in the anodic domain, attributed to metastable pitting due to the presence of chloride ions **[Garfias-Mesias, 1999]**. The anodic current density in presence of bacteria is about a decade lower than in the sterile solution. This cannot be simply explained by a decrease in the active surface following bacteria adhesion because the bacterial surface coverage determined by epifluorescence microscopy after 1 hour in the bacteria-inoculated ASW+N solution is low (2.8 ± 0.7 %). Therefore, this suggests that the adhesion of *Pseudoaltermonas* NCIMB 2021 affects the anodic behavior of 2304 DSS.

For the three anodic polarization curves obtained in sterile ASW+N solution, slight variations in the anodic current density and in E_{corr} are observed, but the main difference concerns the pitting behavior. In one case, no pitting is evidenced. The progressive increase in current observed from ≈ 1 V/SCE is rather attributed to transpassivity, corresponding to the oxidation of Cr(III) into Cr(VI) and/or water decomposition **[Peguet, 2012]**. In the two other cases presented here, the steep current increase in the ≈ 0.8-0.9 V/SCE is attributed to pitting **[Peguet, 2012]**. Therefore, both transpassivity and pitting can be observed, suggesting that the operating temperature is close to the Critical Pitting Temperature of 2304 DSS **[Peguet, 2012]**. Note that the occurrence of metastable pitting does not necessary imply the occurrence of stable pitting when the potential increases. For the three anodic polarization curves obtained in presence of bacteria, slight variations in the anodic current density and in E_{corr} are observed, but in this case no pitting is evidenced. These results seem to indicate that the adhesion of *Pseudoalteromonas* NCIMB in ASW+N solution inhibit the pitting corrosion of 2304 DSS, which might be linked to a more protective passive film.

On the cathodic polarization curves obtained in sterile and bacteria-inoculated ASW+N solutions (**Figure V-17-b**), different potential domains are observed. The experiments have been repeated twice and a good reproducibility has been observed. The increase in the cathodic current density (in absolute value) from E_{corr} to ≈ -0.4 V/SCE might be associated to the partial reduction of the oxide film formed at the surface of 2304 DSS **[Le Bozec, 2001]**. The cathodic current plateau observed between ≈ -0.4 and ≈ -0.7 V/SCE corresponds to the reduction of dissolved oxygen **[Le Bozec, 2001]**. The value of the cathodic current density of the plateau is ≈ 4-5 µA/cm² in sterile solution and ≈ 0.2-0.5 µA/cm² in presence of bacteria (in absolute value). Therefore, the presence of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 induces a significant decrease (about 13 times) in the cathodic current density of the plateau. As mentioned previously, given the low bacterial coverage after 1 hour adhesion, this cannot be explained by a decrease in the active surface. Therefore, the decrease in the cathodic current density of the plateau is likely a consequence of a decrease of the concentration in dissolved oxygen due to oxygen consumption by bacterial respiration, leading to a decrease in the cathodic reaction rate. At lower potentials, the increase in the cathodic current density (in absolute value) corresponds to hydrogen evolution reaction.

Le Bozec *et al.* **[Le Bozec, 2001]** showed that the oxygen reduction current density increased linearly with increasing oxygen concentration in the solution for polished and passivated 904L stainless steel in natural seawater. Assuming that the initial dissolved oxygen concentration in sterile ASW+N solution is 7.2 mg/L **[Benson, 1984]**, a final dissolved oxygen concentration of 0.6 mg/L is therefore expected after 1 hour bacterial adhesion. These results are in good agreement with the concept that aerobic bacteria create anoxic zones suitable for the growth of anaerobic bacteria **[Antony, 2010]**. The bacterial respiration rate, corresponding to the bacterial oxygen consumption rate, depends on many factors such as the bacterial strain, the growth phase, the concentration in nutrients or in oxygen, the flow rate or the temperature **[Longmuir, 1954]**, **[Schulze, 1964]**, **[Smith, 1998]**, **[Riedel, 2013]**, **[Gong, 2016]**, **[Xu, 2017b]**.

Considering a bacterial concentration of 5×10^7 CFU/mL and hypothesizing that (i) the bacterial concentration is uniform, (ii) the number of respiring bacteria does not significantly increase within 1 hour, (iii) the respiration rate is the same for all bacteria and remains stable within 1 hour and (iv) no oxygen from the air phase is dissolved into the solution, the respiration rate of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 in ASW+N solution can be estimated

around 4.1×10^{-15} mol O_2/CFU/h. This value is in the same order of magnitude than the results obtained on marine bacteria incubated in artificial seawater at 25°C between 30 and 40 hours **[Gong, 2016]**. It would be interesting to perform similar measurements in the ASW solution inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 in order to evaluate the effect of nutrients on the bacterial respiration rate.

It has been suggested that bacterial oxygen consumption induces an inhibition of corrosion when the biofilm covers uniformly the surface and the microbial activity in the biofilm is uniformly distributed **[Hernandez, 1994]**, **[Little, 2002]**, **[Lewandowski, 2009]**, **[Videla, 2009]**. However, it seems that this mechanism is limited to laboratory conditions. In the case of heterogeneous biofilms, the active oxygen consumption combined to the limited oxygen access to the surface leads to the formation of differential aeration cells which promote corrosion **[Little, 2002]**, **[Lewandowski, 2009]**.

In our work, adhesion of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 at the surface of 2304 DSS in ASW+N solution has been found to induce a decrease in the anodic current density as well as an inhibition of pitting corrosion. This better corrosion resistance might be the result of a more protective passive layer. The enrichment in chromium of the oxide film close to the bacteria evidenced in ASW+N solution is the result of bacterial activity. It might be due to modifications of the physico-chemical conditions (for example a decrease in pH promoting preferential dissolution of iron) or to the reduction of Fe(III) species into Fe(II) species through anaerobic respiration processes.

V.5. Conclusions

The aim of this work was to characterize the bacteria-surface interactions occurring in the early stage of biofilm formation following 1 hour adhesion of marine *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 at the surface of 2304 Duplex Stainless Steel (DSS) in artificial seawater without (ASW) and with (ASW+N) addition of nutrients.

Microscopic characterization (epifluorescence microscopy, SEM and AFM) showed that the bacterial surface coverage was low both in ASW and ASW+N solutions. The presence of Loosely-Bound EPS released around the bacteria was not identified. No pits were identified at

the surface. The number of viable and cultivable cells was found to increase in presence of nutrients, both for bacteria in the suspension and adhering at the surface of 2304 DSS. ToF-SIMS chemical images suggested that preferential bacterial adhesion took place on the oxide formed on austenite regions near the austenite-ferrite phase boundaries.

According to XPS and ToF-SIMS analyses, the oxide film formed at the surface of 2304 DSS was composed mainly of Fe(III) and Cr(III) species with a small amount of Mo(IV) and Mo(VI) species. Chromium and molybdenum were enriched in the oxide layer while nickel, nitrogen and molybdenum were enriched in the underlying metal compared to the bulk. The oxide film exhibited a bilayer structure consisting in an outer iron- and molybdenum-rich region and an inner chromium-rich region. ToF-SIMS analysis demonstrated that the oxide film was locally enriched in chromium in the oxide film in close vicinity to the bacteria when nutrients were present. The presence of an oxide film under the bacteria was evidenced.

The chemical nature of the early biofilm was investigated by XPS and ToF-SIMS. A model was proposed for the early stage biofilm in order to interpret quantitatively the XPS data, considering proteins (BSA model) and polysaccharides (glucose model). Very close proportions of proteins and polysaccharides within the early biofilm were found after bacterial adhesion in ASW (63 % proteins – 37 % polysaccharides) and ASW+N (62 % proteins – 38 % polysaccharides). ToF-SIMS results indicated that different ionized fragments were related to bacteria (hydrocarbon ions, oxygen-containing ions, nitrogen-containing ions, phosphorus-containing ions, sulfur-containing ions).

Electrochemical characterization suggested that adhesion of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 at the surface of 2304 DSS inhibited stable pitting propagation, which might be linked to the presence of a more protective passive film. It was proposed that bacterial respiration in presence of a large amount of nutrients induced a significant decrease in the dissolved oxygen concentration, leading to a decrease in the cathodic reaction rate. Bacterial activity seems to be responsible for the modifications of the oxide film in close vicinity to the bacteria identified after immersion in the ASW+N solution inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021.

In order to complete this work, longer bacterial adhesion times (24 hours and 1 week) will be studied in the next chapter **[CHAPITRE VI]**.

CHAPITRE VI : Adhesion of marine bacteria on duplex stainless steel in artificial seawater – Later stages of biofilm formation

---

VI.1. Abstract

The aim of this work was to investigate the bacteria-surface interactions occurring during biofilm formation after 24 hours and 1 week adhesion of marine aerobic *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 at the surface of 2304 Duplex Stainless Steel (DSS) in seawater-based media. A complete characterization was performed, coupling microscopy (epifluorescence microscopy, SEM and AFM), XPS as well as electrochemical techniques. The influence of nutrients on the biofilm morphology, the number of viable cultivable cells and the production of Loosely Bound EPS was investigated. After 1 week bacterial adhesion, significant modifications of the oxide layer were evidenced. The oxide layer was found to be slightly thinner compared to the control coupons, suggesting that biofilm formation mitigated the growth of the oxide layer. Fe(II) species were detected while in presence of nutrients, a further Cr(III) enrichment was noted, likely related to the formation of chromium hydroxide. Electrochemical measurements indicated a decrease in the dissolved oxygen concentration over adhesion time due to bacterial respiration. Biofilm formation over long immersion times was found to promote corrosion of 2304 DSS.

VI.2. Introduction

VI.2.1. State of the art

Microorganisms, and more specifically bacteria, tend to adhere to surfaces, resulting in the formation of biofilms. Biofilms are described as heterogeneous structures composed of aggregates of microorganisms, often embedded in a self-produced matrix, in which both

organic and inorganic particles can be trapped **[Costerton, 1995]**, **[Donlan, 2002a]**, **[Flemming, 2016]**. The matrix of the biofilm is highly hydrated and contains high-molecular-weight biopolymers produced by the microorganisms, known as Extracellular Polymeric Substances (EPS), which consist in a mixture of polysaccharides, proteins, lipids, DNA and humic substances **[Sheng, 2010]**, **[Flemming, 2010]**, **[Flemming, 2016]**. The composition of EPS depends on many factors such as the bacterial strain, their proximity or attachment to the cell wall or the growth conditions **[Beech, 1999b]**, **[Beech, 1999c]**, **[Beech, 2000b]**, **[Gubner, 2000]**, **[Torres-Bautista, 2015]**, **[Yang, 2016]**.

The physico-chemical conditions at the substrate/biofilm interface can be markedly different from the bulk aqueous phase, through the establishment of gradients within the biofilm (dissolved oxygen, pH, ions concentration or redox potential), which might in turn promote physico-chemical reactions leading to the initiation and/or the acceleration of corrosion processes **[Beech, 1999a]**, **[Beech, 2004b]**, **[Videla, 2005]**, **[Lewandowski, 2009]**, **[Little, 2014]**. The influence of microorganisms on the corrosion behavior of metallic materials is known as biocorrosion, or Microbiologically Influenced Corrosion (MIC). Various mechanisms of biocorrosion have been proposed in the literature, depending on the type of material, microorganism(s) and environment. For instance, aerobic bacteria, such as *Pseudomonas* species present in marine environments, have been found to be involved in biocorrosion processes of stainless steels **[Morales, 1993]**, **[Beech, 2000a]**, **[Yuan, 2007a]**, **[Yuan, 2008]**, **[Yuan, 2009]**, **[Hamzah, 2013]**, **[Xia, 2015]**, **[Li, 2016a]**, **[Li, 2016b]**, **[Li, 2017]**, **[Xu, 2017a]**, **[Zhou, 2018]**. It has been proposed that the combination of active oxygen consumption by bacteria and decrease of oxygen diffusion within the biofilm leads to the formation of differential aeration cells, which, together with the presence of chloride ions in seawater-based media, induce severe pitting corrosion.

For stainless steels **[Frankenthal, 1976]**, **[Clayton, 1986]**, **[Marcus, 1988]**, **[Olefjord, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Marcus, 1992a]**, **[Vanini, 1994]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Olsson, 2002]**, **[Olsson, 2003]**, **[Keller, 2004]**, **[Högström, 2013]**, **[Maurice, 2015]**, **[Tardio, 2015]** and more particularly for duplex stainless steels (composed of a mixed austenite-ferrite microstructure) **[Olsson, 1995]**, **[Schmidt-Rieder, 1999]**, **[Femenia, 2004]**, **[Donik, 2009a]**, **[Fredriksson, 2010]**, **[Vignal, 2010]**, **[Luo, 2011]**, **[Vignal 2011]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Vignal, 2013a]**, **[CHAPITRE III]**, **[CHAPITRE IV]** the corrosion resistance is provided by the formation of a thin layer (about 1-3 nm thick) composed mainly

of iron and chromium oxides and hydroxides, referred to as the passive film. Therefore, the stability of the oxide layer formed at the surface of stainless steels (in terms of thickness and chemical composition) during biofilm formation is a key question in order to understand the biocorrosion mechanisms of these alloys **[Geesey, 1996]**, **[Pendyala, 1996]**, **[Beech, 2000a]**, **[Yuan, 2007a]**, **[Seyeux, 2015]**, **[Xu, 2017a]**, **[Zhou, 2018]**.

VI.2.2. Objectives

The aim of this work is to investigate the bacteria-surface interactions occurring during the adhesion of marine aerobic *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 at the surface of 2304 Duplex Stainless Steel (DSS) in seawater-based media. The previous chapter was focused on the early stage of biofilm formation (1 hour adhesion) **[CHAPITRE V]**. In the present work, later stages of biofilm formation (24 hours and 1 week adhesion) are considered. The morphology of the biofilm is characterized by microscopy techniques (epifluorescence microscopy, SEM and AFM). The number of viable cultivable planktonic and adhering cells is discussed. XPS analyses are performed in order to characterize the chemical nature of the biofilm as well as the oxide layer formed at the surface of 2304 DSS. Electrochemical measurements (OCP, anodic and cathodic polarization curves) are performed in order to investigate the effect of biofilm formation on the corrosion behavior of 2304 DSS.

VI.3. Materials and methods

VI.3.1. Metallic material

This study was carried out using 1 mm thick plates of 2304 lean Duplex Stainless Steel (DSS) from APERAM with a cold-rolled, annealed and pickled surface finish. The chemical composition (in at. %) of 2304 DSS is: Fe (balance), Cr (24.6), Ni (4.4), Mn (1.5), Si (0.88), Cu (0.33), Mo (0.27), N (0.36), C (0.07), S (< 10 ppm). Sigmameter analysis revealed that the surface of 2304 DSS was composed of 53.9 % ferrite regions and 46.1 % austenite regions. For the adhesion experiments, the coupons dimensions were 10 × 12 mm². For the electrochemistry experiments, the coupons were 30 mm diameter disks, the tightness between the disk and the sample holder was ensured by an O-ring and the area exposed to the electrolyte was 4.2 cm². The surfaces were abraded with a series of SiC papers and polished

with 6 µm, 3 µm and 1 µm diamond spray, successively. The polished samples were then ultrasonically cleaned for 10 min in acetone, ethanol and distilled water, successively, and dried with compressed air. The samples were finally stored in air between 2 and 4 weeks, following a procedure described in a previous chapter **[CHAPITRE III]**. The day before adhesion experiments, the coupons were again ultrasonically cleaned for 10 min in acetone, ethanol and distilled water, successively, and dried with compressed air.

VI.3.2. Electrolytes

Artificial seawater (ASW) and nutrient-rich artificial seawater (ASW+N) were used in this study. The composition (in g/L) of ASW is: NaCl (24.62), $MgCl_2(H_2O)_6$ (11.06), Na_2SO_4 (4.11), $CaCl_2(H_2O)_2$ (1.54), KCl (0.78), $NaHCO_3$ (0.20). In ASW+N, peptone (3.0 g/L) and yeast extract (1.5 g/L) were added. The pH was adjusted to 8.0 by adding 0.1 M NaOH. ASW and ASW+N solutions were finally sterilized by 0.22 µm filtration and stored at 4°C before use.

VI.3.3. Bacteria

The bacterial strain used in this study was the marine aerobic *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021. The bacteria were stored at −196°C in glycerol. A work stock was kept at −20°C. The culture of bacteria followed three steps. First, bacteria were inoculated on Marine Agar 2216 (BD Difco) **[Annexe C]** plates and incubated for 2-3 days at 20°C. Then, isolated colonies were transferred into 5 mL of Marine Broth 2216 culture medium (BD Difco) **[Annexe C]** and incubated at 30°C under continuous agitation during 8 hours. Finally, bacteria were subcultured in 200 mL of Marine Broth 2216 culture medium at 30°C under continuous agitation during 40 hours (until the early-stationary phase). The bacteria were then harvested by centrifugation (7000 g; 10 min; 20°C) and washed in ASW solution. This step was repeated 3 times in order to remove residues from the culture medium. A bacterial suspension in ASW was then prepared by adjusting the optical density measured at 400 nm between 0.8 and 0.9. This suspension was then ten-time diluted either in ASW or in ASW+N solution in order to get a concentration of 10^7 CFU/mL for all the experiments.

VI.3.4. Adhesion experiments

The 2304 DSS coupons were exposed with the polished face upward to the ASW and ASW+N bacterial suspensions in static conditions at 20°C for 24 hours or 1 week. Control experiments were performed in the sterile ASW and ASW+N solutions in the same conditions. After adhesion, the suspending liquid was eliminated and the non-adhering bacteria were removed by rinsing the coupons in sterile ASW solution. For the count of viable cultivable cells, adhering bacteria were detached from the coupons in 10 mL of sterile ASW using an ultrasonic bath for 2 min and this bacterial suspension was inoculated on Marine Agar 2216 plates and incubated at 20°C for 2-3 days.

VI.3.5. Coupons preparation

Following the adhesion experiments, the coupons preparation depended on the upcoming analysis technique. For epifluorescence microscopy analysis, adherent cells were labeled with a fluorochrome solution (DAPI, Molecular Probes, Invitrogen). For AFM analysis, bacterial fixation was performed in 3 % glutaraldehyde in 0.01 M cacodylate buffer (pH = 7.2) at 4°C for 2 hours and the coupons were rinsed in distilled water. For XPS analysis, fixation was performed using the glutaraldehyde solution, then the coupons were rinsed with the cacodylate buffer and dehydration was performed using a graded ethanol series (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, and 100 % two times for 15 min each) and acetone (15 min) **[Seyeux, 2015]**. For SEM analysis, fixation was performed (same procedure), then the coupons were rinsed with the cacodylate buffer and dehydration was performed using a graded ethanol series (same procedure) and isoamyl acetate and finally the coupons were sputter-coated with Au/Pd for 2 min **[Seyeux, 2015]**. In all cases, the same procedures were applied to the control coupons immersed in the sterile ASW and ASW+N solutions.

VI.3.6. Surface characterization

VI.3.6.1. Epifluorescence microscopy

Epifluorescence microscopy analysis was performed with an Olympus BX51 microscope and images processing was performed with the analySIS software version 3.2.

VI.3.6.2. SEM analysis

Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy (FEG-SEM) analysis was performed using a Jeol 7000F microscope (secondary electrons images, accelerating voltage = 10.0 kV).

VI.3.6.3. AFM analysis

Atomic Force Microscopy (AFM) analysis was performed using a CSI Nano-Observer microscope in oscillating mode. Height, amplitude and phase images were recorded simultaneously. Image processing was performed using the Gwyddion software version 2.49.

VI.3.6.4. XPS analysis

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) analysis was performed with a Thermo Electron Escalab 250 spectrometer, using a monochromated Al Kα X-ray source ($h\nu$ = 1486.6 eV). The base pressure in the analysis chamber was maintained at 10^{-9} mbar. The spectrometer was calibrated using Au $4f_{7/2}$ at 84.1 eV. The take-off angle was 90° and the analyzed area was a 500 µm diameter disk. Survey spectra were recorded with a pass energy of 100 eV at a step size of 1 eV and high resolution spectra of the C 1s, N 1s, O 1s, Fe 2p, Cr 2p, Ni 2p and Mo 3d core level regions were recorded with a pass energy of 20 eV at a step size of 0.1 eV. Curve fitting of the spectra was performed with the Thermo Electron software Avantage version 5.938 using an iterative Shirley-type background subtraction. Symmetrical peaks were used except for the Fe 2p, Cr 2p, Ni 2p, and Mo 3d metallic components. The values of the photoionization cross-sections (σ_X) at 1486.6 eV taken from Scofield **[Scofield, 1976]**, the inelastic mean free paths (λ_X^Y) calculated by the TPP2M formula **[Tanuma, 1991]** and the densities (D_X^Y) used for XPS quantitative analyses have been reported in the previous chapter **[CHAPITRE V]**.

VI.3.7. Electrochemical characterization

The electrochemical measurements have been performed using a Gamry Interface 1000 potentiostat. Sterile and bacteria-inoculated ASW+N solutions were used. The working electrode was the 2304 DSS coupon, the counter electrode was a platinum disk and the

reference electrode was a Saturated Calomel Electrode (SCE) placed in a bridge tube filled with sterile saturated potassium chloride solution. The electrochemical cell was a glass cylinder. The working electrode was placed in a sample holder at the bottom of the cell. The counter electrode and the bridge tube containing the reference electrode were placed in a drilled rubber stopper and inserted from the top of the cell, providing sealing of the cell. Before use, the setup was sterilized following a procedure described in the previous chapter **[CHAPITRE V]**. An electrolyte volume of 50 mL was added (either sterile or bacteria-inoculated ASW+N solution). Experiments were carried out at 20°C in static conditions. First, the Open Circuit Potential (OCP) was monitored during 24 hours or 1 week, then, anodic and cathodic polarization curves were recorded separately, starting from −20 or +20 mV/OCP, respectively, using a scan rate of 0.17 mV/s. After experiments, the setup was decontaminated following a procedure described in the previous chapter **[CHAPITRE V]**.

VI.4. Results and discussion

VI.4.1. Microscopic characterization

VI.4.1.1. Epifluorescence microscopy

Figure VI-1 shows the epifluorescence images obtained after 24 hours and 1 week immersion of 2304 DSS in the ASW and ASW+N solutions inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021. The bacteria adhering at the surface of 2304 DSS seem to form aggregates. **Table VI-1** shows the bacterial coverage and the total number of adhering cells obtained by epifluorescence microscopy after 24 hours and 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria (mean values and standard deviations obtained from 10 fields). The data obtained after 1 hour immersion in the previous chapter **[CHAPITRE V]** are added for comparison**.**

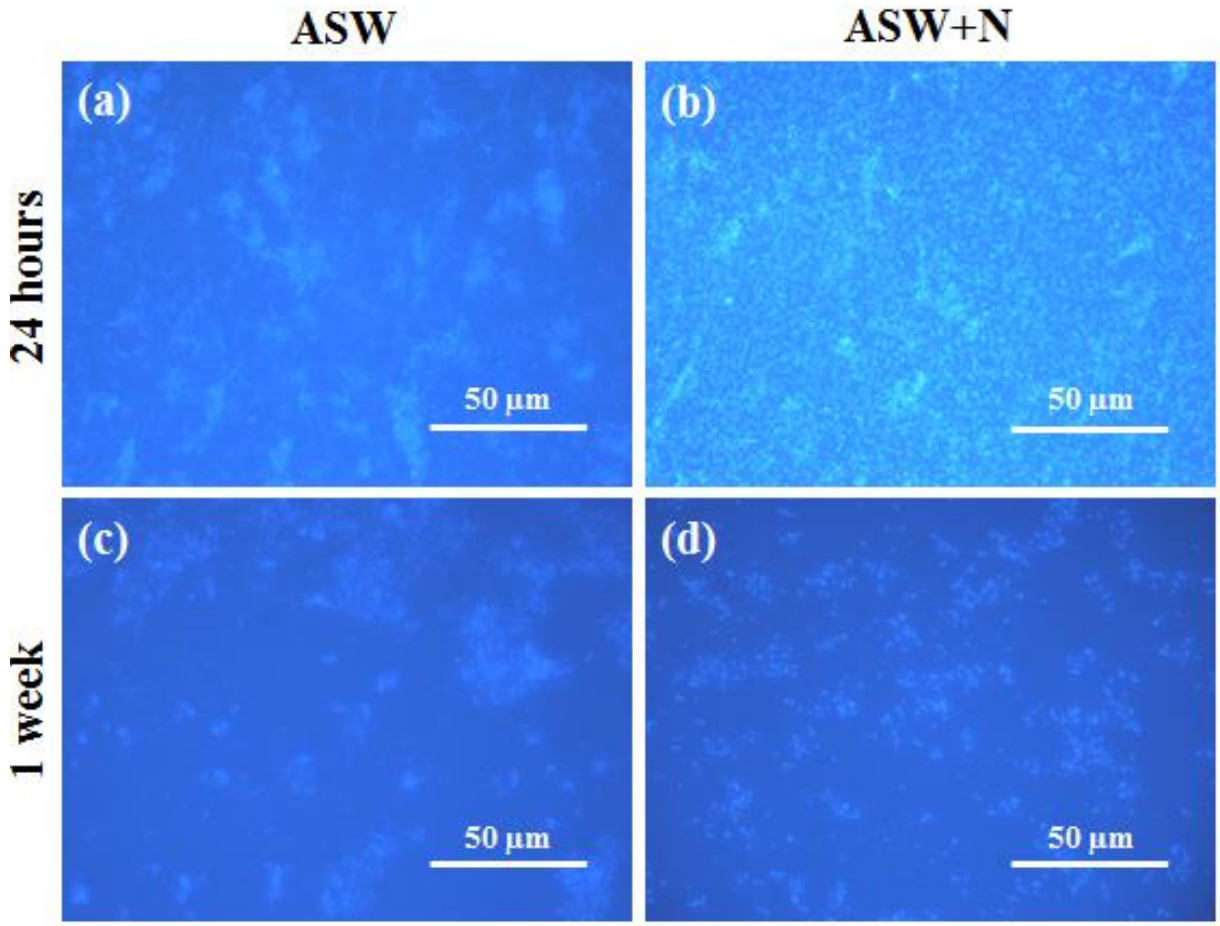


Figure VI-1 Epifluorescence microscopy images obtained after (a) 24 hours immersion in ASW, (b) 24 hours immersion in ASW+N, (c) 1 week immersion ASW and (d) 1 week immersion in ASW+N.

After 24 hours adhesion, the surface coverage is found to be similar in the ASW (27.4 ± 5.1 %) and ASW+N (28.8 ± 4.2 %) solutions inoculated with bacteria. This shows a marked increase of the bacterial coverage compared to the results obtained after 1 hour adhesion in the ASW (3.3 ± 1.3 %) and ASW+N (2.8 ± 0.7 %) solutions inoculated with bacteria **[CHAPITRE V]**. After 24 hours, considering that the area of a single cell is about 1.0 µm² in ASW and 1.5 µm² in ASW+N, the total number of adhering cells is found to be similar in the ASW ($2.7 \pm 0.5 \times 10^7$ cells/cm²) and ASW+N ($1.9 \pm 0.3 \times 10^7$ cells/cm²) solutions inoculated with bacteria. These values are about 10 times higher than the results obtained after 1 hour adhesion in the ASW ($2.2 \pm 0.8 \times 10^6$ cells/cm²) and ASW+N ($1.9 \pm 0.4 \times 10^6$ cells/cm²) solutions inoculated with bacteria **[CHAPITRE V]**.

Table VI-1 Bacterial coverage and total number of adhering cells obtained by epifluorescence microscopy after 1 hour, 24 hours and 1 week immersion ASW and ASW+N.

Adhesion time	Solution	Bacterial coverage (%)	Total adhering cells number (cells/cm²)
1 hour*	**ASW**	3.3 ± 1.3	$2.2 \pm 0.8 \times 10^6$
	ASW+N	2.8 ± 0.7	$1.9 \pm 0.4 \times 10^6$
24 hours	**ASW**	27.4 ± 5.1	$2.7 \pm 0.5 \times 10^7$
	ASW+N	28.8 ± 4.2	$1.9 \pm 0.3 \times 10^7$
1 week	**ASW**	12.7 ± 8.0	$1.2 \pm 0.8 \times 10^7$
	ASW+N	2.8 ± 0.9	$2.8 \pm 2.0 \times 10^6$

***** Obtained from the data presented in the previous chapter **[CHAPITRE V]**.

After 1 week adhesion, the bacterial coverage is found to be higher in the ASW solution inoculated with bacteria (12.7 ± 8.0 %) than in the ASW+N one (2.8 ± 0.9 %). This shows a decrease of the bacterial coverage compared to the results obtained after 24 hours, especially in ASW+N. After 1 week, considering that the area of a single cell is about 1.0 µm² (both in ASW and ASW+N), the total number of adhering cells is found to be higher in the ASW solution inoculated with bacteria ($1.2 \pm 0.8 \times 10^7$) than in the ASW+N one ($2.8 \pm 2.0 \times 10^6$ cells/cm²). In ASW, no significant difference is observed compared to the results obtained after 24 hours while in ASW+N, the total adhering cells number is about 7 times lower than the results obtained after 24 hours.

VI.4.1.2. SEM analysis

On the SEM images recorded after 24 hours immersion in the sterile ASW (**Figure VI-2-a**) and ASW+N (**Figure VI-2-b**) solutions and after 1 week immersion in the sterile ASW (**Figure VI-3-a**) and ASW+N (**Figure VI-3-b**) solutions, no bacteria are observed at the surface of 2304 DSS. Particles are observed, which might correspond to adsorbed salts and/or nutrients. After 24 hours immersion in the bacteria-inoculated ASW (**Figure VI-2-c** and **Figure VI-2-c'**) and ASW+N (**Figure VI-2-d** and **Figure VI-2-d'**) solutions and after 1 week immersion in the bacteria-inoculated ASW (**Figure VI-3-c** and **Figure VI-3-c'**) and ASW+N (**Figure VI-3-d** and **Figure VI-3-d'**) solutions, adhering rod-shaped cells of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 are identified at the surface of 2304 DSS.

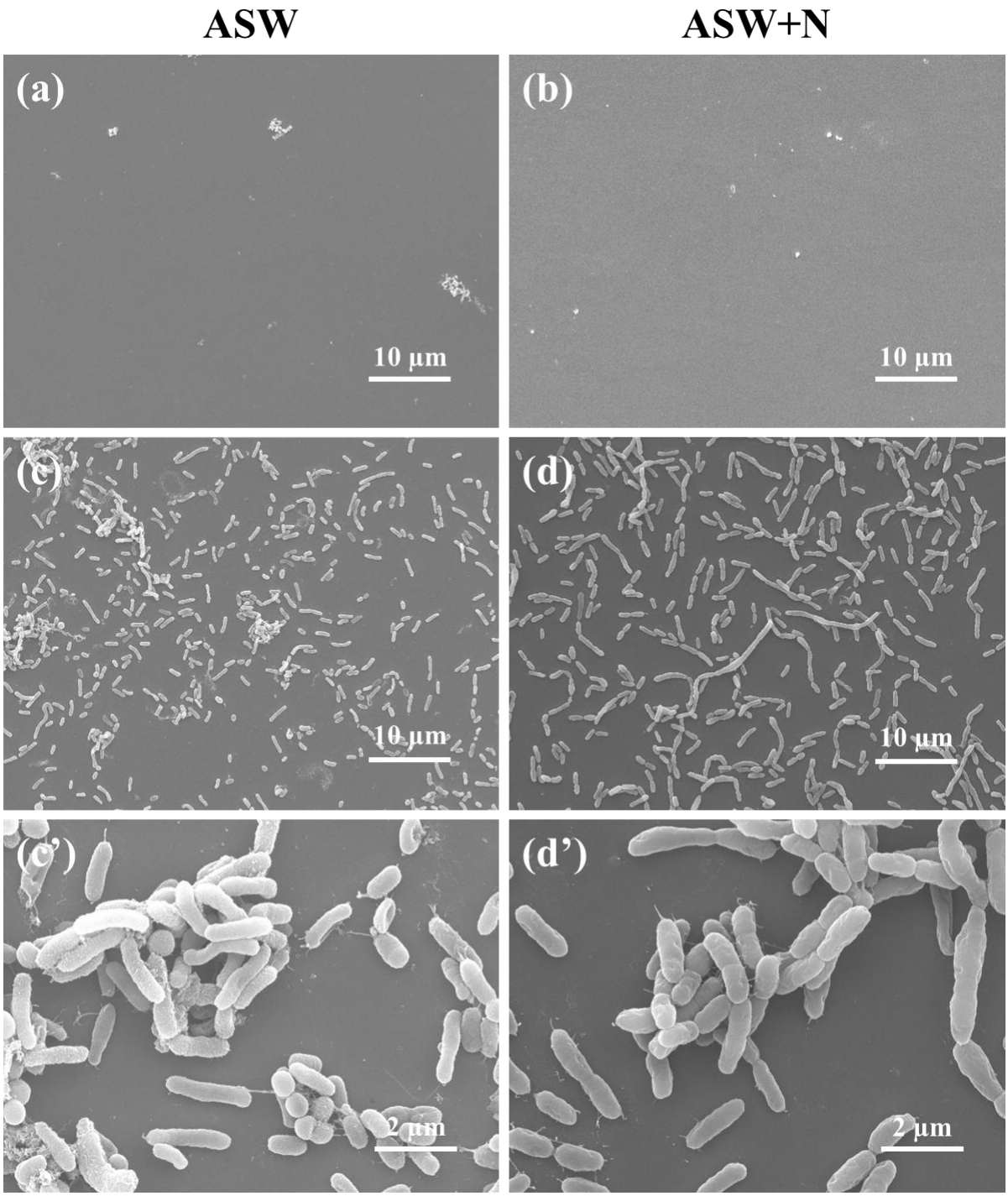


Figure VI-2 SEM images obtained after 24 hours immersion in (a) the sterile ASW solution, (b) the sterile ASW+N solution, (c), (c') the ASW solution inoculated with bacteria and (d), (d') the ASW+N solution inoculated with bacteria (secondary electron images, accelerating voltage = 10.0 kV).

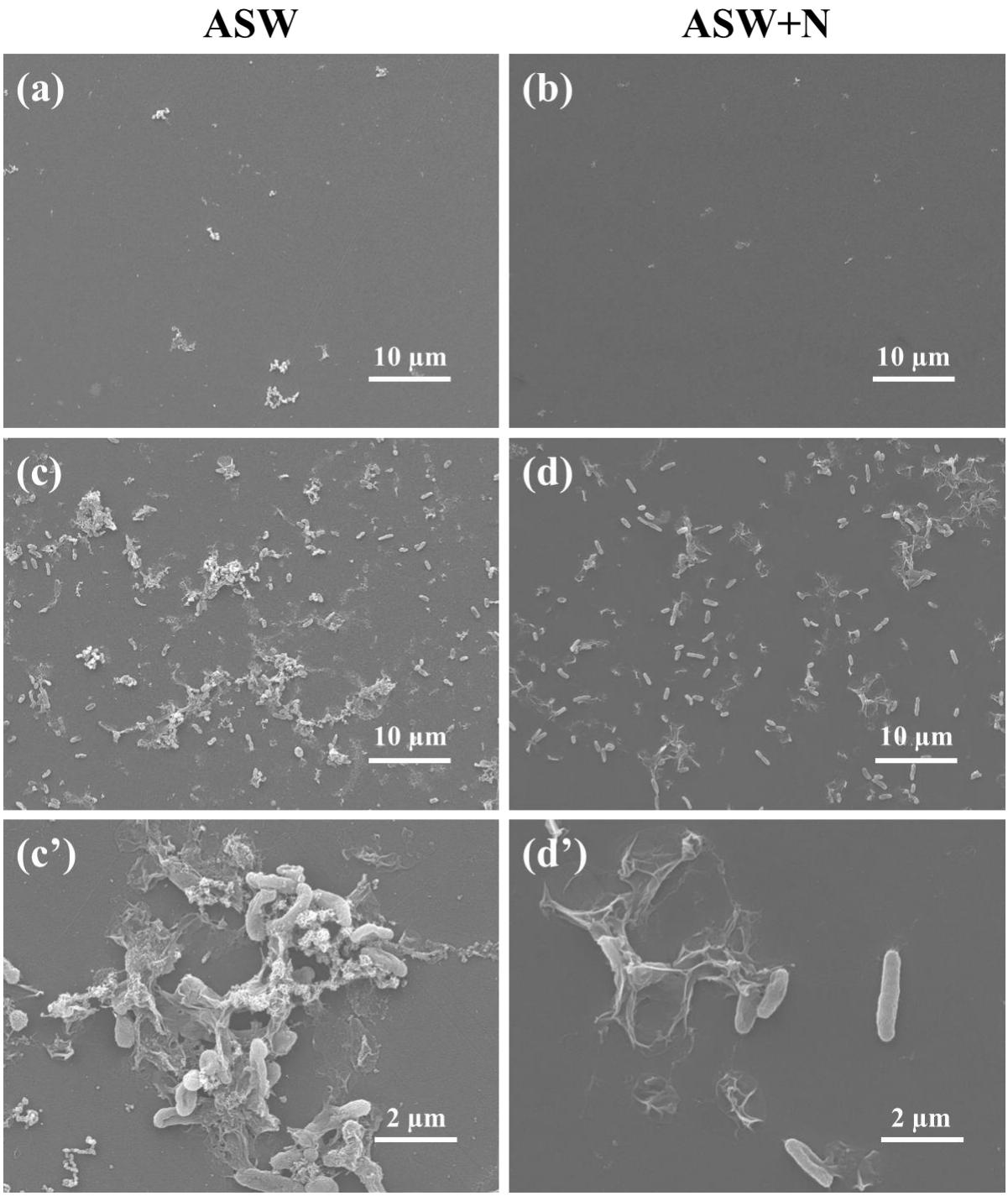


Figure VI-3 SEM images obtained after 1 week immersion in (a) the sterile ASW solution, (b) the sterile ASW+N solution, (c), (c') the ASW solution inoculated with bacteria and (d), (d') the ASW+N solution inoculated with bacteria (secondary electron images, accelerating voltage = 10.0 kV).

After 24 hours adhesion, the cell size is approximately 1-2 µm long and 0.4-0.6 µm wide in ASW while it is approximately 1-4 µm long and 0.5-0.8 µm wide in ASW+N, showing that the cells are bigger in presence of nutrients. Compared to the results obtained after 1 hour adhesion **[CHAPITRE V]**, no significant difference concerning the cell size is observed in ASW, while the length and width of cells increase in ASW+N.

After 1 week adhesion, the cell size is approximately 1-2 µm long and 0.4-0.6 µm wide both in ASW and ASW+N. Compared to the results obtained after 24 hours adhesion, no significant difference concerning the cell size is observed in ASW, while the length and width of cells decrease in ASW+N. The evolution of the cell size with adhesion time in ASW and ASW+N is in good agreement with the literature, which indicates that the lack of nutrients **[Kjelleberg, 1982]**, **[Givskov, 1994]**, **[Lever, 2015]** and/or dissolved oxygen **[Gong, 2016]** (phenomenon of starvation) induces a decrease in the cell size and/or cell volume in order to maximize the surface/volume ratio.

After 24 hours, cells aggregates are present both in ASW and ASW+N. Thin filaments are visible within the aggregates, which might correspond to LB EPS released by bacteria. After 1 week, cells aggregates are also visible both in ASW and ASW+N. The cell structure appears to be damaged and bacterial content seems to be spread at the surface, likely as a consequence of cells lysis. No pitting is identified at the surface of 2304 DSS after immersion in the control or in the bacteria-inoculated solutions.

VI.4.1.3. AFM analysis

AFM characterization has been performed for the samples exposed to the ASW+N solution. **Figure VI-4-a**, **Figure VI-4-b** and **Figure VI-4-c** show the AFM height, amplitude and phase images (oscillating mode) obtained after 24 hours immersion in the control ASW+N solution, the bacteria-inoculated ASW+N solution and after ultrasonic removal of the ASW+N biofilm, respectively. **Figure VI-5-a**, **Figure VI-5-b** and **Figure VI-5-c** show the corresponding AFM images obtained after 1 week immersion.

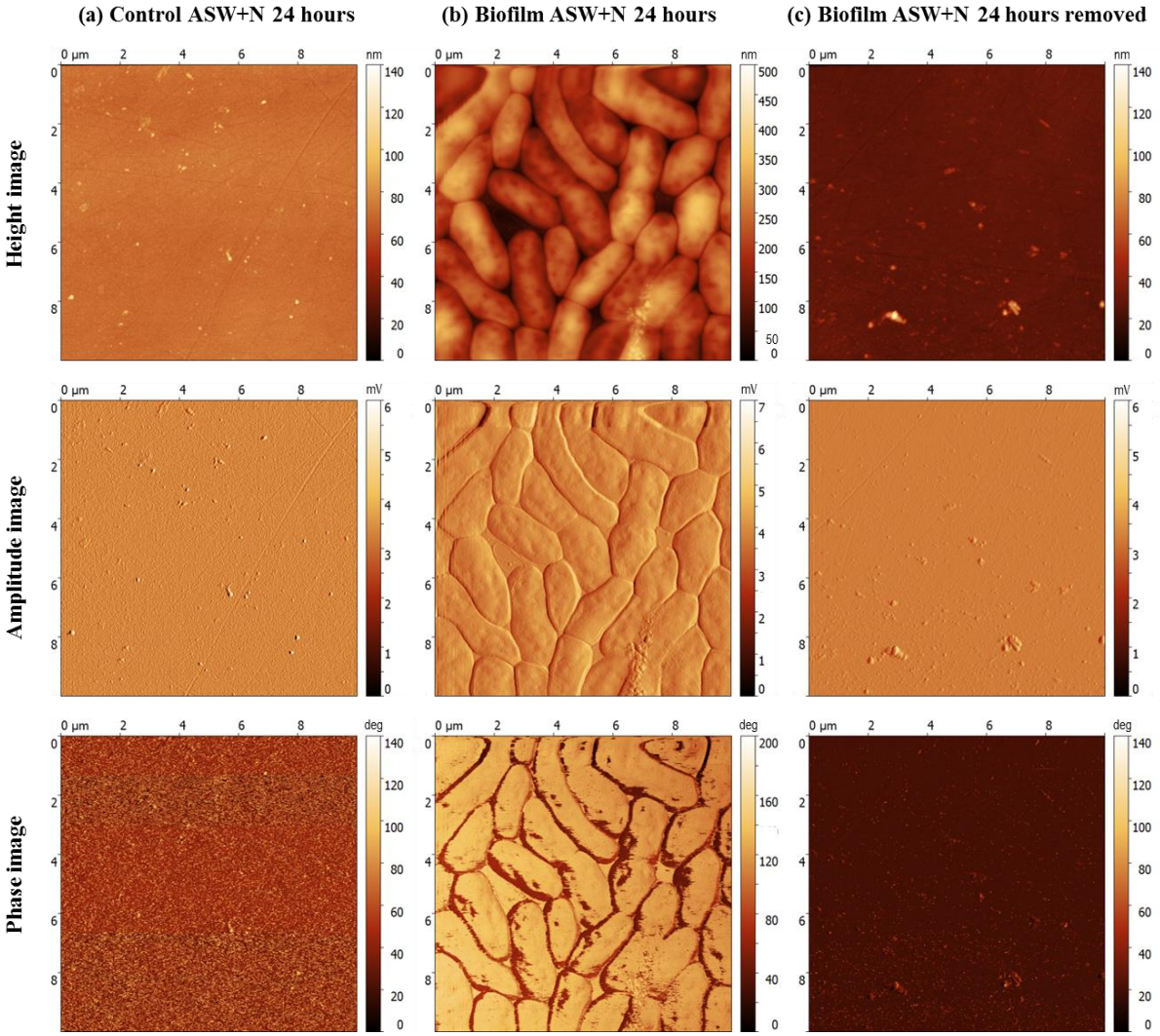


Figure VI-4 AFM height, amplitude and phase images (oscillating mode) obtained after 24 hours immersion of 2304 DSS in (a) the control ASW+N solution, (b) the bacteria-inoculated ASW+N solution and (c) after ultrasonic removal of the biofilm.

As expected, no bacteria are visible at the surface of 2304 DSS after 24 hours and 1 week immersion in the sterile ASW+N solution. Small particles (few hundreds nanometers diameter and few tens nanometer height) are visible at the surface, which might correspond to adsorbed salts and/or nutrients. After 24 hours and 1 week immersion in the ASW+N solution inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021, adhering bacteria are present at the surface. After 1 week, the presence of flagella (approximately 100 nm width and 10 nm height) on the surface close to the bacteria is evidenced **[El-Kirat-Chatel, 2017]**.

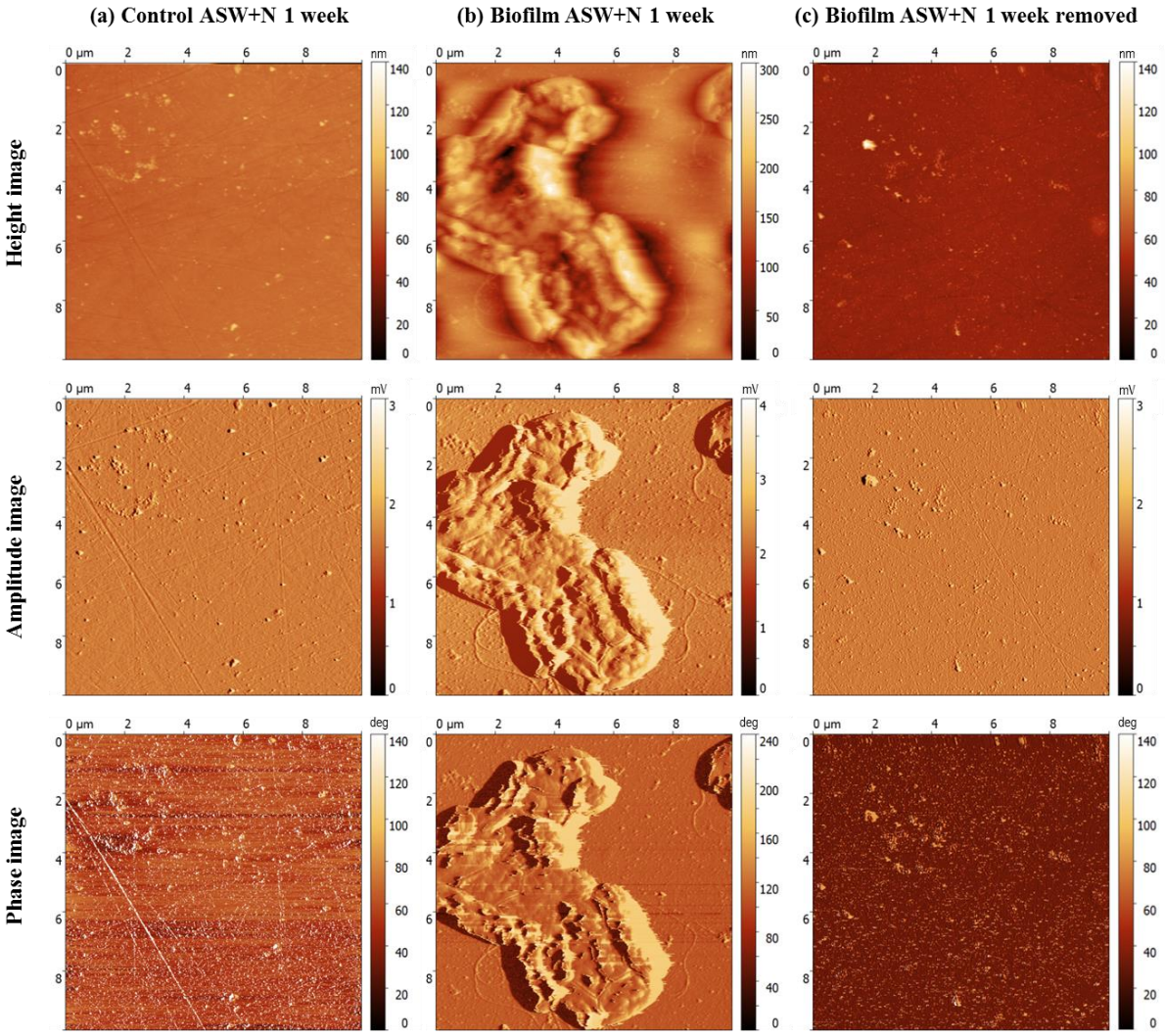


Figure VI-5 AFM height, amplitude and phase images (oscillating mode) obtained after 1 week immersion of 2304 DSS in (a) the control ASW+N solution, (b) the bacteria-inoculated ASW+N solution and (c) after ultrasonic removal of the biofilm.

After 24 hours, the surface coverage is high and the cells exhibit high contact with each other, which was not observed on the SEM images. On the AFM images, the cells are approximately 1.5-4.5 µm long and 0.8-1.5 µm wide, which is higher than on the SEM images. Similar differences were noted after 1 hour immersion **[CHAPITRE V]**. Different hypotheses can be considered in order to explain the differences in the cell size measured by SEM and AFM. First, it can originate from the coupons preparation, as the dehydration procedure was performed only for the SEM coupons but not for the AFM ones. Second, a collapse of cells under vacuum during SEM analyses cannot be excluded, despite the dehydration procedure. Third, the lateral dimensions of bacteria obtained by AFM analyses might be overestimated due to measurement artefacts **[Osiro, 2012]**.

Based on height profiles performed on cross sections of bacteria, the height of bacteria is found to be 252 ± 48 nm after 24 hours adhesion (mean and standard deviation obtained from 20 profiles on 2 images), which is lower than the height measured after 1 hour adhesion (435 ± 97 nm) **[CHAPITRE V]**. Small particles (few hundreds nanometers diameter and few tens nanometers height) are present at the surface of bacteria as well as at the surface of 2304 DSS beside bacteria, which might correspond to adsorbed salts and/or nutrients. The presence of LB EPS released around bacteria is not clearly detected on the AFM images. After 1 week, aggregates (few micrometers diameter) are present at the surface, within which the cells are not clearly individually identified, which might be the assigned to highly damaged cells structure, as observed on the SEM images. Height profiles on cross sections of aggregates show that the height is not uniform and ranges between 100 to 300 nm, consistent with the presence of cells, damaged cells and/or LB EPS released around the bacteria. On the surface of 2304 DSS beside the aggregates, small particles (few hundreds nanometers diameter and few tens nanometers height) are present, which might correspond to adsorbed salts and/or nutrients.

On the images obtained after removal of the biofilm, no bacteria are identified, confirming that the ultrasonic procedure induces bacterial detachment. Small particles (few hundreds nanometers diameter and few tens nanometers height) are identified, which might correspond to remaining adsorbed salts and/or nutrients despite the ultrasonic procedure. Larger particles (few hundreds nanometers diameter and up to 100 nm height) might correspond to bacterial debris. In all cases, no pitting is evidenced at the surface of 2304 DSS.

VI.4.1.4. Summary

While after 1 hour adhesion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021, an early biofilm was formed at the surface of 2304 DSS (low bacterial coverage) **[CHAPITRE V]**, the biofilm formed after 24 hours can be considered as mature (high bacterial coverage) and a declining biofilm is observed after 1 week (decrease of the bacterial coverage), especially in ASW+N.

VI.4.2. Count of viable cultivable cells

Figure VI-6 shows the number of viable cultivable planktonic bacteria (CFU/mL) and viable cultivable adhering bacteria (CFU/cm²) after 24 hours and 1 week adhesion of 2304 DSS in the ASW and ASW+N bacterial suspensions (mean and standard deviations obtained for 3 independent cultures). The data obtained for the initial suspensions and after 1 hour adhesion **[CHAPITRE V]** are included for comparison.

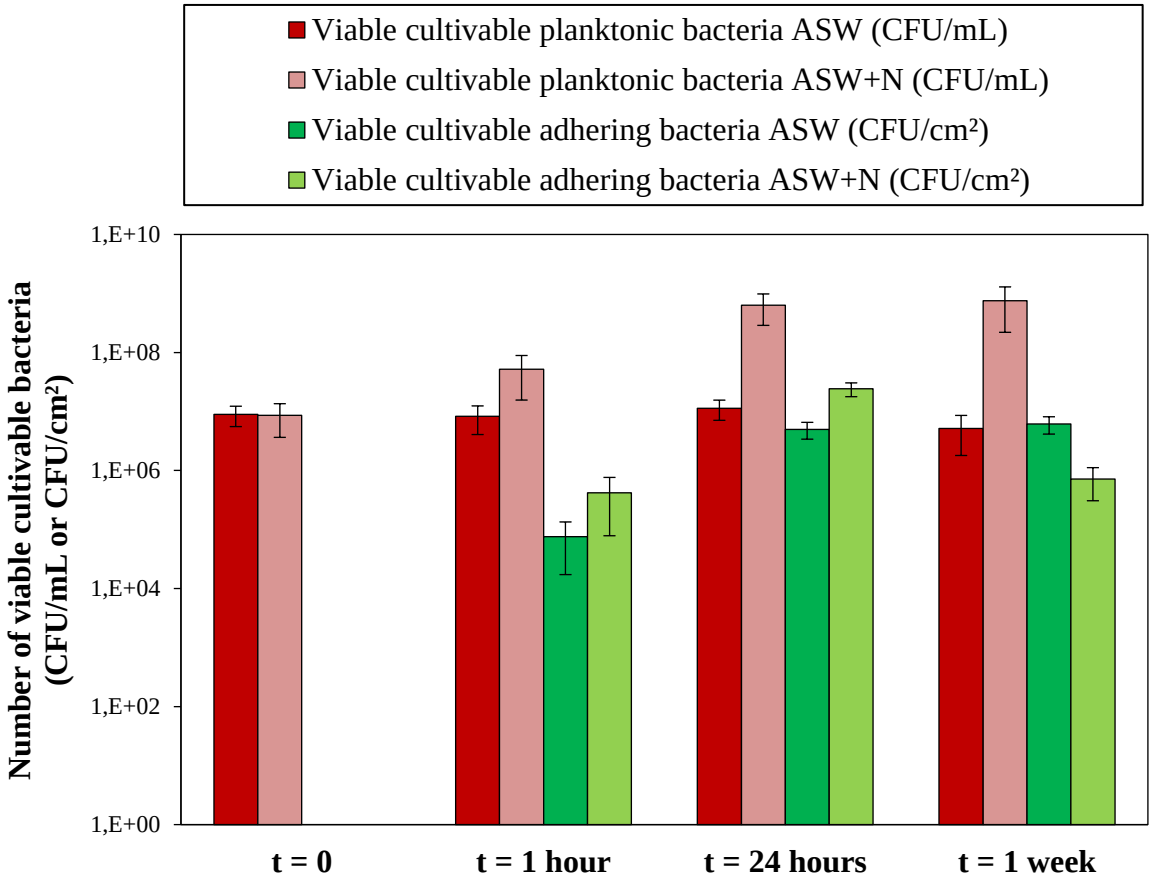


Figure VI-6 Number of viable cultivable planktonic bacteria (CFU/mL) and viable cultivable adhering bacteria (CFU/cm²), initially, after 1 hour **[CHAPITRE V]**, 24 hours and 1week adhesion for 2304 DSS in the ASW and ASW+N bacterial suspensions.

No significant variations of the number of viable cultivable planktonic bacteria are evidenced for the ASW bacterial suspension, initially ($8.9 \pm 3.4 \times 10^6$ CFU/mL), after 1 hour ($8.3 \pm 4.2 \times 10^6$ CFU/mL), after 24 hours ($1.1 \pm 0.4 \times 10^7$ CFU/mL) and after 1 week ($5.2 \pm 4.4 \times 10^6$ CFU/mL) adhesion. On the contrary, a continuous increase of the number of viable cultivable planktonic bacteria is evidenced for the ASW+N bacterial suspension, initially (8.6 ± 5.0 ×

10^6 CFU/mL), after 1 hour (5.2 ± 3.7 × 10^7 CFU/mL), after 24 hours (6.4 ± 3.5 × 10^8 CFU/mL) and after 1 week (7.6 ± 5.4 × 10^8 CFU/mL) adhesion. Therefore, it can be concluded that the presence of nutrients induces a significant and continuous increase of the number of viable cultivable planktonic bacteria.

After immersion of 2304 DSS in the ASW bacterial suspension, even if the number of viable cultivable planktonic bacteria remains roughly constant over adhesion time, the number of viable cultivable adhering bacteria increases from 1 hour (7.6 ± 5.9 × 10^4 CFU/cm²) to 24 hours (5.0 ± 1.6 × 10^6 CFU/cm²) and remains roughly stable after 1 week (6.2 ± 2.0 × 10^6 CFU/cm²). After immersion of 2304 DSS in the ASW+N bacterial suspension, in which the number of viable cultivable planktonic bacteria continuously increases over adhesion time, the number of viable cultivable adhering bacteria increases from 1 hour (4.2 ± 3.4 × 10^5 CFU/cm²) to 24 hours (2.4 ± 0.6 × 10^7 CFU/cm²) and decreases after 1 week (7.1 ± 4.1 × 10^5 CFU/cm²). Therefore, for short adhesion times (1 hour and 24 hours), the presence of nutrients causes an increase of the number of viable cultivable adhering bacteria, whereas for longer adhesion time (1 week), the presence of nutrients seems to cause a decrease of the number of viable cultivable adhering bacteria. This might be explained by a detachment of bacteria due to less adhesive biofilm formed in presence of nutrients **[Allen, 2018]**.

VI.4.3. XPS characterization

The chemical composition of the organic species, the oxide layer and the underlying metal was investigated by XPS after 24 hours and 1 week immersion of 2304 DSS in ASW without bacteria (control ASW), nutrient-rich ASW without bacteria (control ASW+N), ASW inoculated with bacteria (biofilm ASW) and nutrient-rich ASW inoculated with bacteria (biofilm ASW+N).

VI.4.3.1. Qualitative characterization

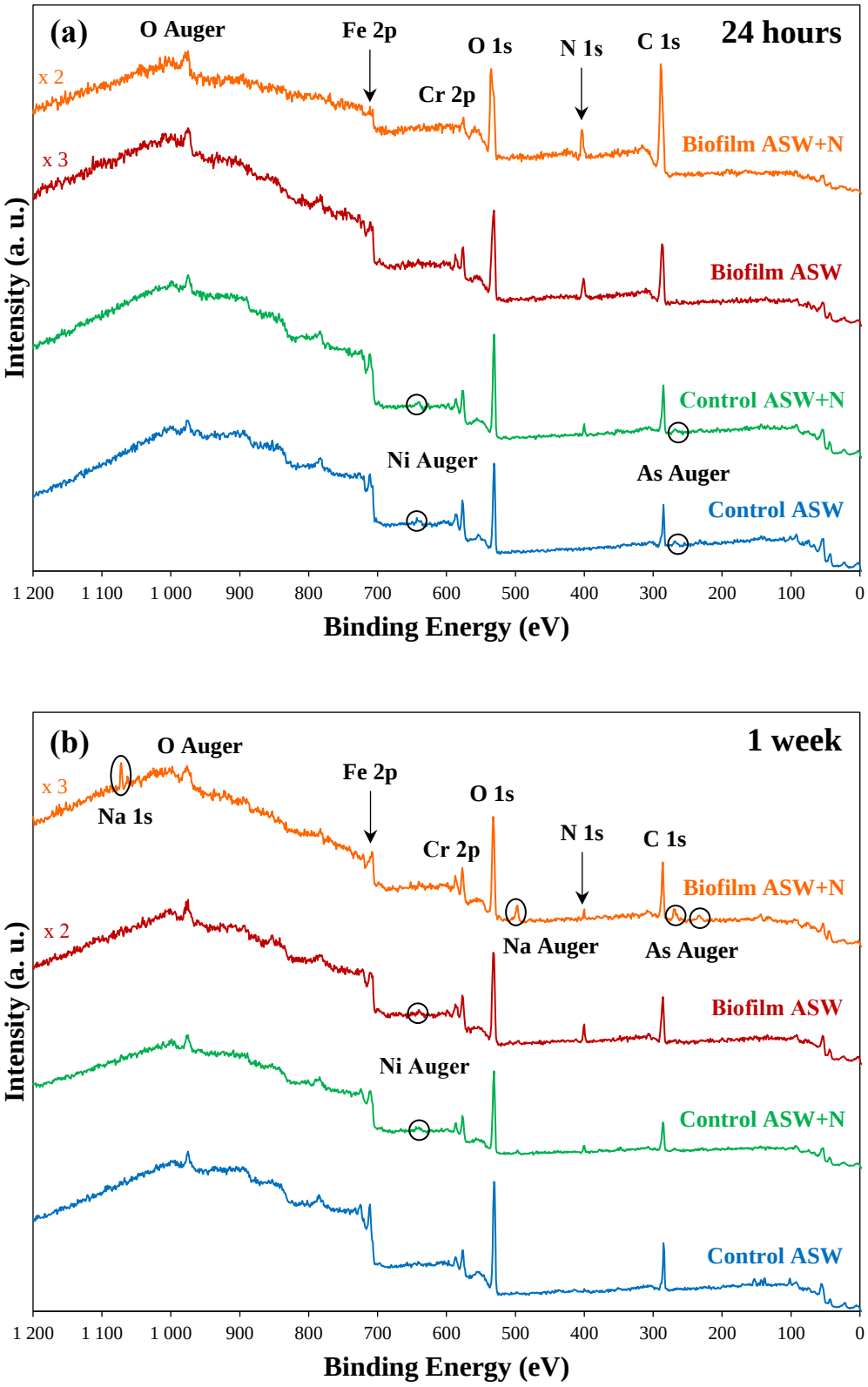


Figure VI-7 XPS survey spectra recorded after (a) 24 hours and (b) 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with bacteria.

Figure VI-7 shows the XPS survey spectra recorded after immersion in the sterile and bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions. In all cases, the main elements detected at the surface are carbon, oxygen, nitrogen, iron and chromium. Nickel is not systematically detected as the signal is attenuated by the oxide layer and/or the organic species adsorbed at the surface of 2304 DSS. No molybdenum is detected due to the low Mo content of 2304 DSS. After 1 week immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria, sodium is detected, which arises from the seawater. In all other cases, the elements characteristic of ASW (sodium, chlorine, magnesium, sulfur, calcium and potassium) are not observed, suggesting that the amount of adsorbed salts is low.

Note that after 1 week immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria, As $L_2M_{45}M_{45}$ (around 232 eV) and As $L_3M_{45}M_{45}$ (around 268 eV) Auger lines are observable **[Soma, 1994]**, **[Groenewold, 2013]**. As explained in the previous chapter **[CHAPITRE V]**, arsenic species might originate from the cacodylate buffer used for the fixation procedure and/or from trace elements in the nutrients (peptone and yeast extract).

Therefore, elements characteristic of the organic matter originating from the adventitious contamination, the nutrients and/or the biofilm (carbon, nitrogen and oxygen) as well as elements characteristic of the metallic substrate and/or the oxide layer formed on 2304 DSS (iron, chromium and nickel) are evidenced.

The C 1s, N 1s, O 1s, Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ and Mo 3d core level spectra have been recorded after 24 hours and 1 week immersion in the sterile and bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions. The peaks assignment and fitting parameters used in each case are summarized in the **Table VI-2**.

Table VI-2 Peaks assignment and fitting parameters used for the decomposition of XPS core level spectra recorded after 24 hours and 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with bacteria. Binding Energy (eV) / Full Width at Half Maximum (eV).

Core level	Component	Attribution	24 hours				1 week			
			Control ASW	Control ASW+N	Biofilm ASW	Biofilm ASW+N	Control ASW	Control ASW+N	Biofilm ASW	Biofilm ASW+N
C 1s	C_1	**C**–C, **C**–H	285.3 / 1.4	285.5 / 1.4	285.5 / 1.5	285.4 / 1.5	285.3 / 1.3	285.5 / 1.4	285.7 / 1.5	285.9 / 1.5
	C_1*		-	-	287.7 / 1.5	287.7 / 1.5	-	-	-	-
	C_2	**C**–O, **C**–N	286.7 / 1.4	286.8 / 1.4	286.9 / 1.5	286.8 / 1.5	286.8 / 1.3	286.9 / 1.4	287.1 / 1.5	287.6 / 1.5
	C_2*		-	-	289.1 / 1.5	289.1 / 1.5	-	-	-	-
	C_3	O–**C**–O, N–**C**=O	288.3 / 1.4	288.6 / 1.4	288.6 / 1.5	288.5 / 1.5	288.4 / 1.3	288.6 / 1.4	288.7 / 1.5	289.0 / 1.5
	C_3*		-	-	290.8 / 1.5	190.8 / 1.5	-	-	-	-
	C_4	O–**C**=O	289.4 / 1.4	289.6 / 1.4	289.6 / 1.5	289.5 / 1.5	289.5 / 1.3	289.5 / 1.4	289.7 / 1.5	290.0 / 1.5
	C_4*		-	-	291.8 / 1.5	291.8 / 1.5	-	-	-	-
N 1s	N_1	Alloyed nitrogen	398.2 / 1.8	398.4 / 1.7	398.4 / 1.7	398.4 / 1.6	398.2 / 1.8	398.4 / 1.6	398.4 / 1.8	398.7 / 1.8
	N_2	**N**–C, **N**–C=O	400.2 / 1.9	400.5 / 1.7	400.7 / 2.0	400.6 / 1.9	400.2 / 1.9	400.6 / 1.7	400.8 / 2.1	400.8 / 1.8
	N_2*		-	-	402.9 / 2.0	402.9 / 1.9	-	-	-	-
O 1s	O_1	Metal oxides	530.2 / 1.2	530.2 / 1.2	530.2 / 1.2	530.2 / 1.2	530.2 / 1.3	530.2 / 1.2	530.3 / 1.2	530.3 / 1.2
	O_2	Metal hydroxides, **O**=C–N, **O**=C–O	531.5 / 2.1	531.6 / 2.1	531.7 / 2.1	531.7 / 2.1	531.9 / 2.1	531.7 / 2.0	531.8 / 2.1	531.9 / 2.1
	O_2*		-	-	533.9 / 2.1	534.0 / 2.1	-	-	-	-
	O_3	Adsorbed water, **O**–C, **O**–C–O, **O**–C=O	533.4 / 2.1	533.3 / 2.1	533.3 / 2.1	533.2 / 2.1	533.2 / 2.1	533.5 / 2.0	533.5 / 2.1	533.8 / 2.1
	O_3*		-	-	535.5 / 2.1	535.5 / 2.1	-	-	-	-
Fe $2p_{3/2}$	Fe_1	Fe_{met}	706.9 / 0.79	706.9 / 0.79	706.9 / 0.79	706.9 / 0.79	706.9 / 0.79	706.9 / 0.79	706.9 / 0.79	706.9 / 0.79
	Fe_2	Fe(II) oxide/hydroxide	-	-	-	-	-	-	709.3 / 2.8	709.4 / 2.9
	Fe_3	Fe(III) oxide/hydroxide	710.7 / 2.8	710.7 / 2.8	710.7 / 2.7	710.6 / 2.8	710.4 / 2.8	710.3 / 2.9	710.6 / 2.8	710.6 / 2.9
	Fe_4	Fe(III) oxide/hydroxide (satellite)	712.7 / 2.8	712.7 / 2.8	712.8 / 2.7	712.8 / 2.8	712.7 / 2.8	712.7 / 2.9	712.7 / 2.8	712.8 / 2.9
Cr $2p_{3/2}$	Cr_1	Cr_{met}	574.3 / 1.31	574.2 / 1.31	574.2 / 1.31	574.3 / 1.31	574.2 / 1.31	574.2 / 1.31	574.3 / 1.31	574.2 / 1.31
	Cr_2	Cr(III) oxide/hydroxide	576.1 / 1.4	576.1 / 1.5	576.1 / 1.4	576.1 / 1.4	576.0 / 1.4	576.1 / 1.4	576.2 / 1.5	576.2 / 1.6
	Cr_3	Cr(III) oxide/hydroxide (satellite)	577.3 / 1.4	577.3 / 1.5	577.2 / 1.4	577.3 / 1.4	577.2 / 1.4	577.3 / 1.4	577.4 / 1.5	577.3 / 1.6
	Cr_4	Cr(III) oxide/hydroxide (satellite)	578.6 / 1.4	578.7 / 1.5	578.5 / 1.4	578.6 / 1.4	578.5 / 1.4	578.6 / 1.4	578.8 / 1.5	578.6 / 1.6
Ni $2p_{3/2}$	Ni_1	Ni_{met}	852.9 / 1.13	852.9 / 1.13	852.9 / 1.13	852.9 / 1.13	852.9 / 1.13	852.9 / 1.13	852.9 / 1.13	852.9 / 1.13
Mo 3d	Mo_1	Mo_{met} (Mo $3d_{5/2}$)	227.9 / 0.81	227.7 / 0.81	227.9 / 0.81	227.8 / 0.81	227.9 / 0.81	227.9 / 0.81	227.9 / 0.81	227.9 / 0.81
	Mo_1'	Mo_{met} (Mo $3d_{3/2}$)	231.0 / 0.81	230.8 / 0.81	231.0 / 0.81	230.9 / 0.81	231.0 / 0.81	231.0 / 0.81	231.0 / 0.81	231.0 / 0.81
	Mo_2	Mo(IV) oxide/hydroxide (Mo $3d_{5/2}$)	229.5 / 2.4	229.4 / 2.4	229.3 / 2.4	229.3 / 2.4	229.4 / 2.4	229.4 / 2.4	229.4 / 2.4	229.4 / 2.4
	Mo_2'	Mo(IV) oxide/hydroxide (Mo $3d_{3/2}$)	232.6 / 2.4	232.5 / 2.4	232.4 / 2.4	232.4 / 2.4	232.5 / 2.4	232.5 / 2.4	232.5 / 2.4	232.5 / 2.4
	Mo_3	Mo(VI) oxide/hydroxide (Mo $3d_{5/2}$)	232.5 / 2.6	232.4 / 2.6	232.4 / 2.4	232.5 / 2.4	232.6 / 2.6	232.6 / 2.6	232.5 / 2.6	232.6 / 2.6
	Mo_3'	Mo(VI) oxide/hydroxide (Mo $3d_{3/2}$)	235.6 / 2.6	235.5 / 2.6	235.5 / 2.4	235.6 / 2.4	235.7 / 2.6	235.7 / 2.6	235.6 / 2.6	235.7 / 2.6

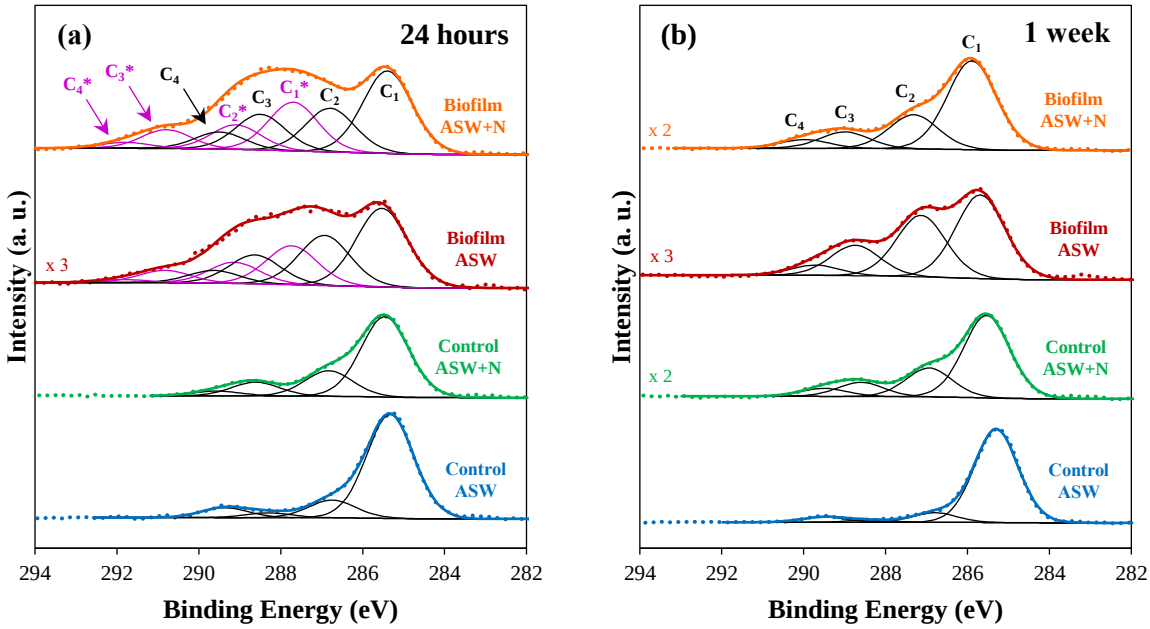


Figure VI-8 C 1s core level spectra recorded after (a) 24 hours and (b) 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with bacteria.

The C 1s core level spectra recorded after 24 hours (**Figure VI-8-a**) and 1 week (**Figure VI-8-b**) immersion are decomposed into four components assigned to (C_1) carbon only bound to carbon and hydrogen (**C**–C and **C**–H) in hydrocarbons (found in lipids and side chains of polysaccharides and proteins), (C_2) carbon with a single bond with oxygen or nitrogen (**C**–O and **C**–N) in alcohol (found in polysaccharides including amino sugars and uronic acids), amine (found in proteins, amino acids and amino sugars) or amide/peptide bond (found in proteins) functions, (C_3) carbon with two single bonds or one double bond with oxygen (O–**C**–O and N–**C**=O) in acetal (found in polysaccharides including amino sugars and uronic acids) or amide/peptide bond (found in proteins) functions and (C_4) carbon making one double bond and one single bond with oxygen (O=**C**–O) in carboxyl (found in proteins, amino acids, uronic acids and lipids) or ester (found in lipids) functions **[Rubio, 2002]**, **[Pradier, 2005]**, **[Landoulsi, 2008b]**, **[Rouxhet, 2011]**, **[Yang, 2016]**.

After 24 hours immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria, a differential charging effect is evidenced, resulting in the appearance of (C_1*), (C_2*), (C_3*) and (C_4*) components with an energy shift of +2.3 (in ASW) and +2.4 eV (in ASW+N) compared to the (C_1), (C_2), (C_3) and (C_4) components.

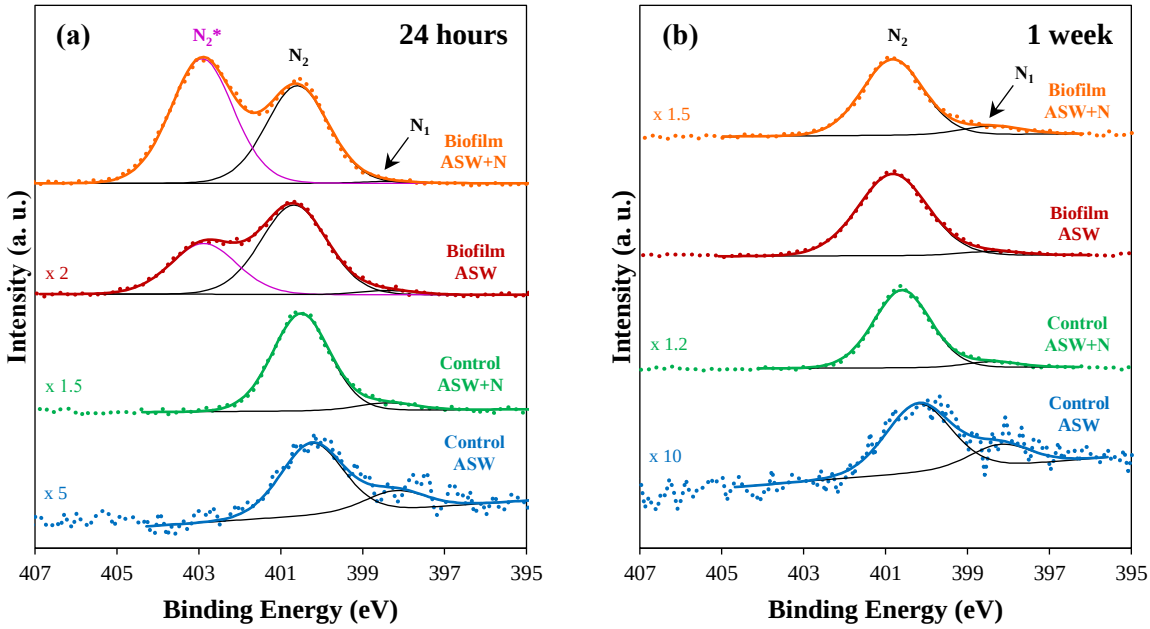


Figure VI-9 N 1s core level spectra recorded after (a) 24 hours and (b) 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with bacteria.

In the N 1s core level spectra recorded after 24 hours (**Figure VI-9-a**) and 1 week (**Figure VI-9-b**) immersion, a weak peak (N_1) reveals the presence of nitrogen in the alloy (either in solid solution or as nitride) **[Marcus, 1992a]**, **[Vanini, 1994]** while a major symmetrical peak (N_2) corresponds to nitrogen bound to carbon (**N**–C and **N**–C=O) in amine (found in proteins, amino acids and amino sugars) or amide/peptide bond groups (found in proteins) **[Rubio, 2002]**, **[Pradier, 2005]**, **[Frateur, 2007]**, **[Ithurbide, 2007]**, **[Torres-Bautista, 2015]**. No protonated amine groups are detected (R–**N**H_3^+ signal would appear between 401.3 and 401.7 eV) **[Boonaert, 2000]**, **[Pradier, 2005]**, **[Leone, 2006]**, **[Ahimou, 2007]**, **[Rouxhet, 2011]**, **[Yin, 2015]**, **[Yang, 2016]**.

After 24 hours immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria, a differential charging effect is evidenced, resulting in the appearance of a (N_2*) component with an energy shift of +2.3 (in ASW) and +2.4 eV (in ASW+N) compared to the (N_2) component.

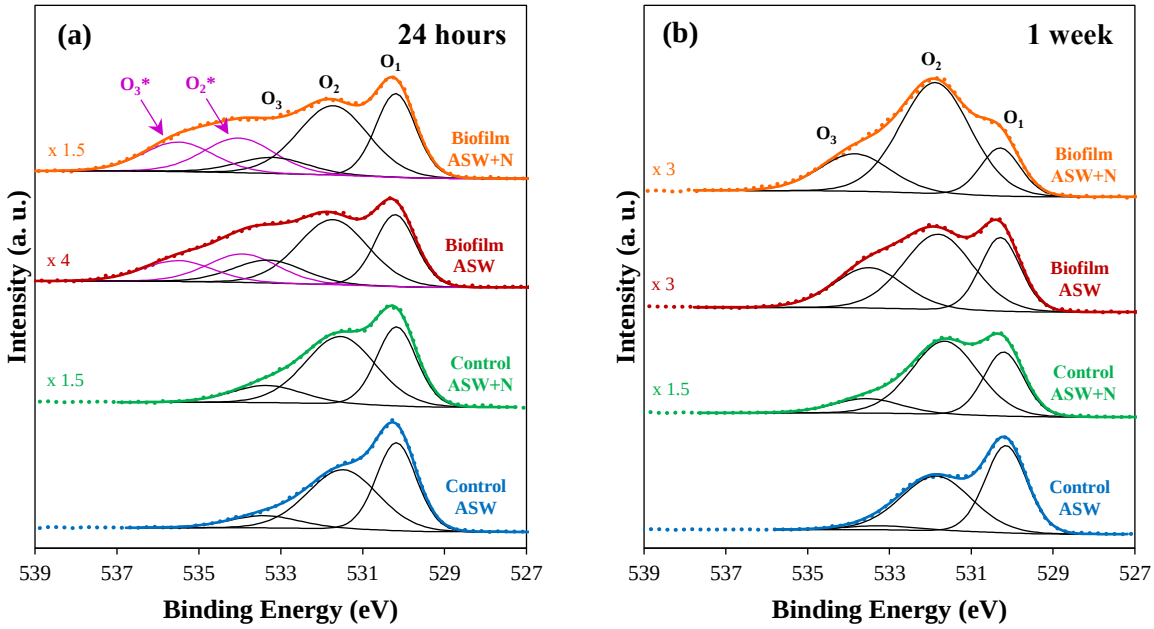


Figure VI-10 O 1s core level spectra recorded after (a) 24 hours and (b) 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with bacteria.

The O 1s core level spectra recorded after 24 hours (**Figure VI-10-a**) and 1 week (**Figure VI-10-b**) immersion are decomposed into three components attributed to (O_1) metal oxides, (O_2) metal hydroxides and oxygen with a double bond with carbon (**O**=C–N and **O**=C–O) in amide/peptide bond (found in proteins), carboxyl (found in proteins, amino acids, uronic acids and lipids) and ester (found in lipids) functions and (O_3) adsorbed water and oxygen making a single bond with carbon (**O**–C, **O**–C–O and **O**–C=O) in alcohol (found in polysaccharides including amino sugars and uronic acids), acetal (found in polysaccharides including amino sugars and uronic acids), carboxyl (found in proteins, amino acids, uronic acids and lipids) and ester (found in lipids) functions **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 1995]**, **[Keller, 2004]**, **[Frateur, 2007]**, **[Landoulsi, 2008b]**, **[Vignal, 2013a]**, **[Maurice, 2015]**, **[Yang, 2016]**. Therefore, the decomposition of the O 1s core level spectra does not allow a complete identification of the contributions originating from the substrate and the adsorbed oxygen-containing organic species (proteins, polysaccharides and lipids).

After 24 hours immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria, a differential charging effect is evidenced, resulting in the appearance of (O_2*) and (O_3*) components with an energy shift of +2.3 (in ASW) and +2.4 eV (in ASW+N) compared to the (O_2) and (O_3) components.

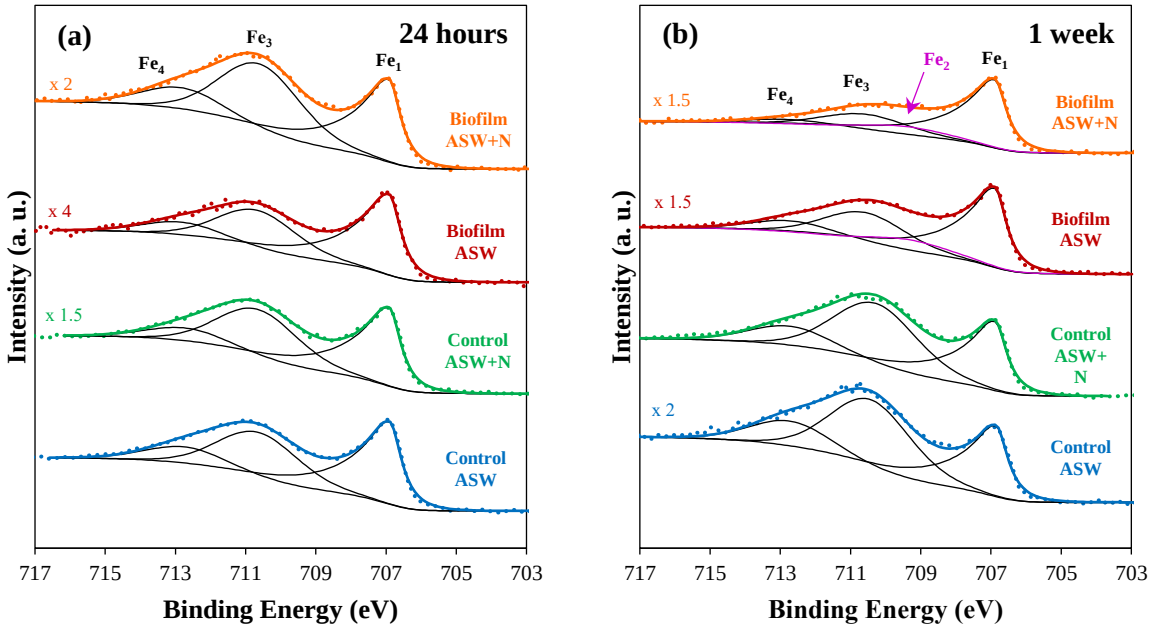


Figure VI-11 Fe $2p_{3/2}$ core level spectra recorded after (a) 24 hours and (b) 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with bacteria.

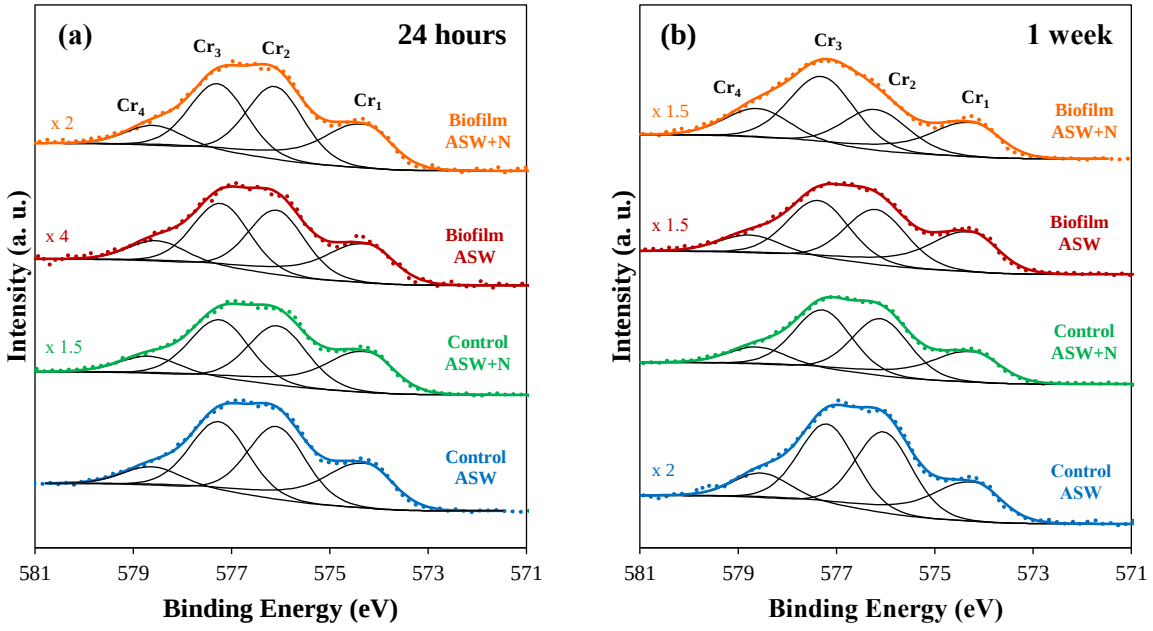


Figure VI-12 Cr $2p_{3/2}$ core level spectra recorded after (a) 24 hours and (b) 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with bacteria.

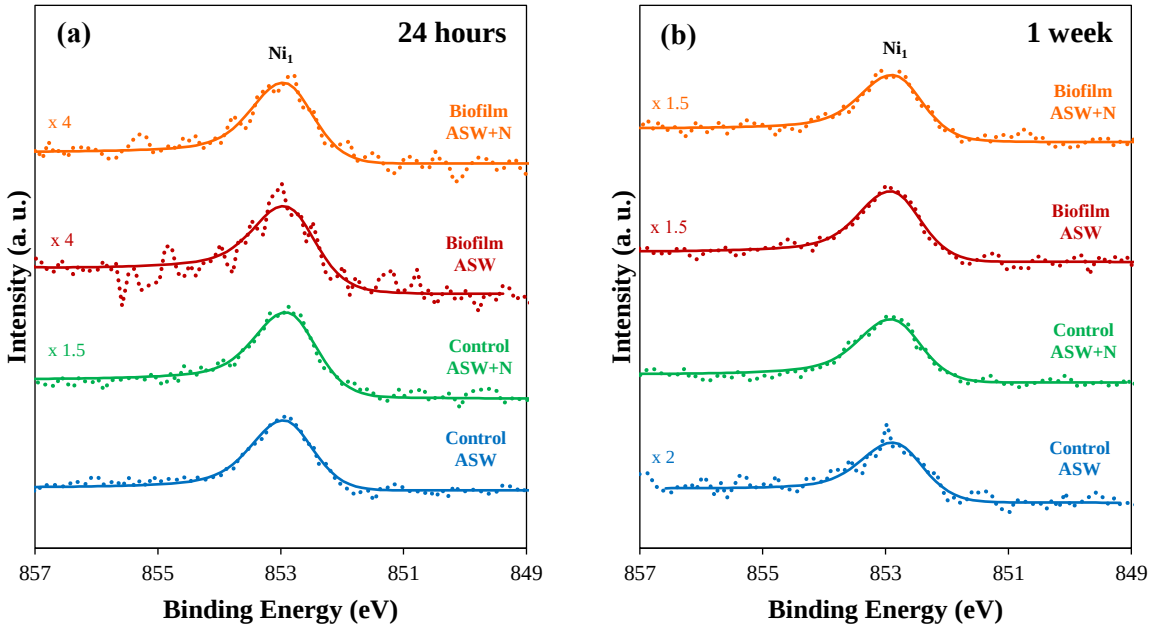


Figure VI-13 Ni $2p_{3/2}$ core level spectra recorded after (a) 24 hours and (b) 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with bacteria.

The Fe $2p_{3/2}$ core level spectra recorded after 24 hours (**Figure VI-11-a**) and 1 week (**Figure VI-11-b**) immersion exhibit four components attributed to (Fe_1) metallic iron, (Fe_2) Fe(II) oxide and/or hydroxide species (only after 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria) and (Fe_3), (Fe_4) Fe(III) oxide and/or hydroxide species with a discrete multiplet structure attributed to multiplet splitting of the Fe(III) compounds **[Mansour, 2010]**, **[Maurice, 2015]**.

The Cr $2p_{3/2}$ core level spectra recorded after 24 hours (**Figure VI-12-a**) and 1 week (**Figure VI-12-b**) immersion exhibit four components assigned to (Cr_1) metallic chromium and (Cr_2), (Cr_3), (Cr_4) Cr(III) oxide and/or hydroxide species with a discrete multiplet structure attributed to multiplet splitting of the Cr(III) compounds **[Maurice, 2000]**, **[Diaz, 2012]**, **[Maurice, 2015]**. After 1 week immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria, the increase of the proportion of the (Cr_3) component (at 577.3 $\pm$ 0.1 eV), attributed to a multiplet of Cr(III) oxides but also hydroxides, likely reveals a higher amount of chromium hydroxides **[Biesinger, 2004]**, **[Biesinger, 2011]**.

The Ni $2p_{3/2}$ core level spectra recorded after 24 hours (**Figure VI-13-a**) and 1 week (**Figure VI-13-b**) immersion present a single component characteristic of (Ni_1) metallic nickel **[Marcus, 1992b]**, **[De Vito, 1992]**, **[Torres-Baustista, 2015]**, **[Maurice, 2015]**. No oxidized nickel is detected.

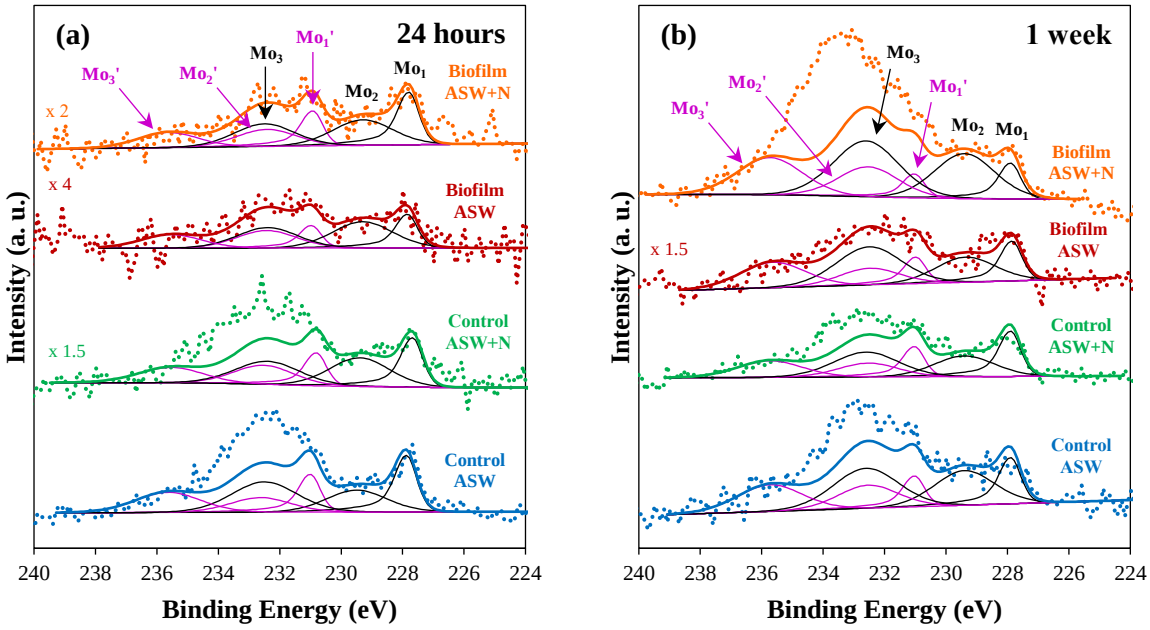


Figure VI-14 Mo 3d core level spectra recorded after (a) 24 hours and (b) 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with bacteria.

In the Mo 3d core level spectra recorded after 24 hours (**Figure VI-14-a**) and 1 week (**Figure VI-14-b**) immersion, doublets have to be defined for each component due to the spin-orbit splitting between Mo $3d_{5/2}$ and Mo $3d_{3/2}$ core levels (3.13 eV) **[Marcus, 1988]**. Three doublets can be distinguished, attributed to (Mo_1), (Mo_1') metallic molybdenum, (Mo_2), (Mo_2') Mo(IV) oxide and/or hydroxide species and (Mo_3), (Mo_3') Mo(VI) oxide and/or hydroxide species **[Clayton, 1986]**, **[Marcus, 1988]**, **[Brox,1988]**, **[Olefjord, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Olsson, 2002]**, **[Petrova, 2011]**, **[Högström, 2013]**, **[Mesquita, 2013]**, **[Maurice, 2015]**. The theoretical area ratio between Mo $3d_{5/2}$ and Mo $3d_{3/2}$ core levels was taken into account for the decomposition of the spectra (the area of each component in the Mo $3d_{3/2}$ core level is fixed 1.5 times lower than the area of each corresponding component in the Mo $3d_{5/2}$ core level).

As observed after 1 hour immersion **[CHAPITRE V]**, the decomposition of the Mo 3d spectra suggests that, in some cases (and particularly after 1 week immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria), another contribution is present. It is assumed that it is due to As $L_2M_{45}M_{45}$ Auger lines around 232 eV **[Soma, 1994]**, **[Groenewold, 2013]**. This hypothesis is supported by the detection of As $L_3M_{45}M_{45}$ Auger lines around 268 eV on the survey spectra (**Figure VI-7**) **[Soma, 1994]**, **[Groenewold, 2013]**. As mentioned previously, arsenic species may originate from the cacodylate buffer and/or from trace elements in the nutrients. The intensities of the (Mo_1), (Mo_2) and (Mo_3') components were used to estimate the concentration of the metallic Mo, Mo(IV) and Mo(VI) species, respectively, as there is no overlapping at the binding energy of these components with the As Auger peak.

Considering the thickness analyzed by XPS (≈ 10 nm) and the height of bacteria after 1 hour (435 ± 97 nm) **[CHAPITRE V]**, 24 hours (252 ± 48 nm) and 1 week (100-300 nm) immersion, the surface under the bacteria does not contribute to XPS measurements. The photoelectrons come from the surface of bacteria and the surface of 2304 DSS not covered by the bacteria. The Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ and Mo 3d core level spectra suggest that the oxide layer formed on 2304 DSS after 24 hours and 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with inoculation of bacteria consists in a mixture of oxides and hydroxides composed mainly of Fe(III) and Cr(III) species, with a small amount of Mo(IV) and Mo(VI) species. After 1 week immersion in ASW and ASW+N solutions inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021, Fe(II) species are detected. As commonly reported for stainless steels, no oxidized nickel is detected **[Frankenthal, 1976]**, **[Clayton, 1986]**, **[Olefjord, 1990]**, **[De Vito, 1992]**, **[Maurice, 1996]**, **[Maurice, 1998]**, **[Maurice, 2015]**, **[Tardio, 2015]**. A contribution corresponding to nitrogen present in the alloy is detected in the N 1s core level spectra. The detection of metallic components in the Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ and Mo 3d core level spectra indicates that the thickness of the oxide layer is of the order of a few nanometers in all cases.

The C 1s, N 1s and O 1s core level spectra show that organic species are present at the surface after 24 hours and 1 week immersion in the sterile and bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions. A complex mixture of proteins, amino acids, polysaccharides (including amino sugars and uronic acids) and lipids is expected, originating from the adventitious contamination, the nutrients and the biofilm (TB EPS attached to the bacteria and/or LB EPS around the bacteria). After 24 hours immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated

with bacteria, the C 1s, N 1s and O 1s core level spectra are subject to a differential charging effect. Compared to the C_1, C_2, C_3, C_4, N_2, O_2 and O_3 components, the C_1*, C_2*, C_3*, C_4*, N_2*, O_2* and O_3* components present an energy shift of +2.3 and +2.4 eV in ASW and ASW+N, respectively. All components corresponding to the organic species are affected by this charging effect, whereas the other components are not. No charging effect is observed for the corresponding ASW and ASW+N control samples, indicating that the presence of the 24 hours biofilm at the surface causes this charging effect. The exact origin of the charging effect remains unclear. It might be linked to the high bacterial surface coverage and/or to a higher amount of overlapping bacteria after 24 hours of bacterial adhesion.

In order to discuss the nature and the content of the organic compounds adsorbed at the surface, different atomic ratios have been calculated from the C 1s and N 1s spectra, as defined in first approximation by **Equation VI-1 [Torres Bautista, 2015]**:

$$\frac{X}{Y} = \frac{I_X / \sigma_X \lambda_X^{BSA} T_X}{I_Y / \sigma_Y \lambda_Y^{BSA} T_Y}$$ **Equation VI-1**

where $I_{X,Y}$ is the intensity of the considered peak in the C 1s or N 1s core level, $\sigma_{X,Y}$ the photoionization cross-section of the C 1s (1.00) or N 1s (1.80) core level, $\lambda_{X,Y}^{BSA}$ the inelastic mean free path of photoelectrons emitted by the C 1s (3.24 nm) or N 1s (2.99 nm) core level in the matrix of organic species (estimated for a BSA layer) and $T_{X,Y}$ the transmission function of C 1s (3079) or N 1s (3233) core levels.

The $C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio represents the content of hydrocarbon-type organic species (originating from lipids, side chains of polysaccharides and/or proteins), the $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio represents the content of nitrogen-containing organic species (originating from proteins, amine groups in amino acids and/or amino sugars) and the $(C_2+C_3+C_4-2\times N_2)/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio represents the content of oxygen-containing organic species other than proteins and amino acids (originating from polysaccharides, lipids and/or other oxygenated species such as hydroxyl groups) **[Yang, 2016]**.

Table VI-3 Atomic ratios calculated from the XPS C 1s and N 1s core level spectra recorded after 1 hour, 24 hours and 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions without and with inoculation of bacteria.

Sample		$C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$	$N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$	$(C_2+C_3+C_4-2\times N_2)/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$
1 hour*	**Control ASW**	0.76	0.02	0.18
	Control ASW+N	0.72	0.04	0.16
	Biofilm ASW	0.63	0.06	0.19
	Biofilm ASW+N	0.58	0.07	0.22
24 hours	**Control ASW**	0.75	0.02	0.19
	Control ASW+N	0.59	0.08	0.16
	Biofilm ASW	0.41	0.14	0.18
	Biofilm ASW+N	0.41	0.13	0.21
1 week	**Control ASW**	0.84	0.01	0.14
	Control ASW+N	0.56	0.10	0.15
	Biofilm ASW	0.39	0.14	0.19
	Biofilm ASW+N	0.56	0.07	0.23

*Obtained from the data presented in the previous chapter **[CHAPITRE V]**.

The values of the atomic ratios obtained after 24 hours and 1 week immersion are summarized in the **Table VI-3**. The data obtained after 1 hour immersion **[CHAPITRE V]** have been added for comparison.

After immersion in the control ASW solution, the $C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio is high, suggesting that hydrocarbon-type organic species are dominating. The $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio is low, suggesting that the content of nitrogen-containing organic species is low. The $(C_2+C_3+C_4-2\times N_2)/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio suggests that oxygen-containing organic species are present. Similar results have been obtained after 1 hour immersion in the control ASW solution **[CHAPITRE V].** These results may be explained by a high content of lipids at the surface. Polysaccharides are not likely expected but cannot be excluded. Other oxygenated species such as hydroxyl groups may also be present. After immersion in the control ASW+N solution, the $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio is found to increase with the immersion time, suggesting a continuous adsorption of nitrogen-containing organic species from the nutrients (proteins and/or amino acids). The $(C_2+C_3+C_4-2\times N_2)/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio remains stable with immersion time and close to the values obtained after immersion in the control ASW solution, suggesting that no oxygen-containing organic species such as polysaccharides from the nutrients are adsorbed. The $C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio decreases with the immersion time, suggesting that the hydrocarbon-type organic species, most likely lipids (polysaccharides cannot be excluded), are progressively replaced by the nitrogen-containing organic species. As mentioned earlier, other oxygenated species such as hydroxyl groups might also be present.

After immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021, the $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio increases compared to the corresponding control samples (except for the biofilm formed after 24 hours immersion in ASW+N). This indicates that nitrogen-containing organic species (proteins, amine groups in amino acids and/or amino sugars) from the biofilm (TB EPS attached to the surface of bacteria and/or LB EPS around bacteria) are detected. After 1 week immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria, the $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio is lower compared to the control sample, which might indicate a lower content of nitrogen-containing organic species in the biofilm and/or a desorption of nutrients. The $C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$

atomic ratio is lower in presence of bacteria, which can be interpreted as a decrease of the amount of lipids, replaced by nitrogen-containing organic species. The $(C_2+C_3+C_4-2\times N_2)/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio increases in presence of bacteria, suggesting that oxygen-containing organic species such as polysaccharides are present in the biofilm (except for the biofilm formed after 24 hours in ASW).

After 1 hour immersion in the bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions **[CHPAPITRE V]**, lower $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratios and higher $C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratios are obtained, which can be explained by the increase of the bacterial coverage from 1 hour to 24 hours. After 24 hours and 1 week immersion in the ASW solution inoculated with bacteria, the $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ and $C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratios are similar despite a decrease of the bacterial coverage from 24 hours to 1 week immersion. This suggests that LB EPS containing proteins are present at the surface around adhering bacteria after 1 week immersion in the bacteria-inoculated ASW solution. In the ASW+N solution inoculated with bacteria, the $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio decreases and the $C_1/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio increases from 24 hours to 1 week immersion, which can be explained by the decrease of the bacterial coverage. The $(C_2+C_3+C_4-2\times N_2)/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratios remains stable during immersion in the bacteria-inoculated ASW and ASW+N solutions.

VI.4.3.2. Quantitative characterization

The thickness and the composition of the oxide layer and the composition of the underlying metal were determined using a model consisting in (1) an homogeneous and continuous oxide layer, composed of Fe(III), Fe(II) (when detected), Cr(III), Mo(IV) and Mo(VI) species on top of (2) the underlying metal composed of Fe, Cr, Ni, Mo and N. The system of equations associated to this model has been reported in details in a previous chapter **[CHAPITRE III]**. **Table VI-4** reports the XPS quantitative results (thickness of the oxide layer, composition of the oxide layer and composition of the underlying metal) obtained after 24 hours and 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions, without and with inoculation of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021. The data obtained after 1 hour immersion **[CHAPITRE V]** have been added for comparison.

Table VI-4 XPS quantitative results (thickness of the oxide layer, compositions of the oxide layer and the underlying metal) obtained after 1 hour, 24 hours and 1 week immersion of 2304 DSS in the ASW and ASW+N solutions without and with inoculation of bacteria.

Sample			1 hour*				24 hours				1 week			
			Control ASW	Control ASW+N	Biofilm ASW	Biofilm ASW+N	Control ASW	Control ASW+N	Biofilm ASW	Biofilm ASW+N	Control ASW	Control ASW+N	Biofilm ASW	Biofilm ASW+N
Oxide layer thickness (nm)			2.4	2.3	2.3	2.3	2.2	2.2	2.1	2.4	2.8	2.5	2.1	2.2
Chemical composition (at. %)	Oxide layer	Fe(III)	43.9	41.9	45.7	46.5	41.9	44.8	39.0	50.9	45.9	52.2	30.9	16.4
		Fe(II)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.7	6.4
		Cr(III)	52.5	55.1	51.2	51.4	55.1	52.1	58.0	46.9	48.9	45.7	57.8	68.3
		Mo(IV) / Mo(VI)	3.6	3.0	3.1	2.1	3.0	3.1	3.0	2.2	5.2	2.1	3.6	8.9
	Underlying Metal	Fe	55.7	58.1	58.8	57.5	59.0	57.5	59.0	59.2	55.4	58.5	56.2	53.9
		Cr	28.7	26.1	25.3	26.3	27.5	25.7	24.6	26.6	28.0	23.5	26.5	25.2
		Ni	8.9	11.3	13.2	10.8	10.2	11.6	11.1	11.4	11.3	13.1	11.7	12.1
		Mo	1.8	0.8	1.0	1.1	1.2	1.1	0.8	1.1	1.7	1.0	0.8	1.1
		N	4.9	3.7	1.7	4.3	2.1	4.1	4.5	1.7	3.6	3.9	4.8	7.7
	Bulk alloy	Fe	balance (67.6)											
		Cr	24.6											
		Ni	4.4											
		Mo	0.27											
		N	0.36											

*Obtained from the data presented in the previous chapter **[CHAPITRE V]**.

After 24 hours immersion in the different solutions, the thickness of the oxide layer is in the range of 2.1-2.4 nm. After 1 week immersion in the ASW and ASW+N sterile solutions, a slight increase in the thickness of the oxide layer is observed (2.8 and 2.5 nm, respectively). On the contrary, after 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria, no increase in the thickness of the oxide layer is noted (2.1 and 2.2 nm, respectively).

The Fe(III) content of the oxide layer is in the range of 39.0 to 50.9 at. % after 24 hours immersion, while it is comprised between 16.4 and 52.2 at. % after 1 week immersion, which is lower than in the bulk (67.6 at. %). After 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria, the Fe(II) content of the oxide layer is found to be 7.7 and 6.4 at. %, respectively. The Cr(III) content of the oxide layer is comprised between 46.9 and 58.0 at. % after 24 hours immersion, while it is comprised between 45.7 and 68.3 at. % after 1 week immersion, which shows that chromium is significantly enriched in the oxide layer compared to the bulk (24.6 at. %). The molybdenum content of the oxide layer (Mo(IV) + Mo(VI)) is comprised between 2.2 and 3.1 at. % after 24 hours immersion, while it is comprised between 2.1 and 8.9 at. % after 1 week immersion, which shows that molybdenum is significantly enriched in the oxide layer compared to the bulk (0.27 at. %). Complementary measurements performed in the sterile ASW and ASW+N solutions without the procedure of fixation and dehydration (not shown) indicated that the molybdenum content of the oxide layer is 1.2 and 2.2 at. % after 24 hours immersion, respectively, while it is 1.6 and 1.5 at. % after 1 week immersion, respectively. This suggests that the procedure of fixation and dehydration promotes molybdenum oxide enrichment, or that the content of molybdenum oxide is overestimated due to the overlapping of Mo 3d core level with As $L_2M_{45}M_{45}$ Auger lines. As mentioned earlier, no oxidized nickel is detected.

The iron content of the underlying metal is comprised between 57.5 and 59.2 at. % after 24 hours immersion, while it is comprised between 53.9 and 58.5 at. % after 1 week immersion, which is lower than the iron bulk content. The chromium content of the underlying metal is comprised between 24.6 and 27.5 at. % after 24 hours immersion, while it is comprised between 23.5 and 28.0 at. % after 1 week immersion, which remains close to the chromium bulk content. The nickel content in the underlying metal is between 10.2 and 11.6 at. % after 24 hours immersion, while it is between 11.3 and 13.1 at. % after 1 week immersion, which shows that nickel is enriched in the underlying metal compared to the bulk (4.4 at. %). The molybdenum content of the underlying metal is between 0.8 and 1.2 at. % after 24 hours

immersion, while it is between 0.8 and 1.7 at. % after 1 week immersion, which shows that molybdenum is enriched in the underlying metal compared to the bulk. The nitrogen content of the underlying metal is between 1.7 and 4.5 at. % after 24 hours immersion, while it is between 3.6 and 7.7 at. % after 1 week immersion, which shows that nitrogen is strongly enriched in the underlying metal compared to the bulk (0.36 at. %).

After 24 hours immersion in the different solutions, the thickness and the composition of the oxide layer and the composition of the underlying metal remain close to those determined after 1 hour immersion **[CHAPITRE V]**. It can be concluded that neither the nutrients nor the bacteria affect the nature of the surface of 2304 DSS after 24 hours immersion. After 1 week immersion in the ASW and ASW+N sterile solutions, a slight increase in the thickness of the oxide layer is noted, suggesting that longer exposure promotes the growth of the oxide layer. No significant modification of the composition of the oxide layer and the underlying metal is detected in the sterile solutions. After 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria, no increase in the thickness of the oxide layer is observed, suggesting that the presence of bacteria mitigates the growth of the oxide layer. The presence of bacteria induces the formation of Fe(II) species. The presence of Fe(II) species might be the result of the decrease in the dissolved oxygen concentration due to the bacterial respiration **[CHAPITRE V]**. A bacterial reduction of Fe(III) species to Fe(II) species through assimilatory (*i.e.* synthesis of biomolecules) or dissimilatory (*i.e.* respiration) metabolic processes might be involved **[Schröder, 2003]**. The Fe(II) species might be bound to the EPS produced by the bacteria **[Beech, 2004b]**. In presence of bacteria and nutrients, a further Cr(III) enrichment in the oxide layer is observed (68.3 at. %). This result is in good agreement with previous studies performed with different stainless steels and/or bacterial strains **[Pendyala, 1996]**, **[Beech, 2000a]**, **[Yuan, 2007a]**, **[Seyeux, 2015]**. According to the Cr $2p_{3/2}$ core level spectrum (**Figure VI-12-b**), this Cr(III) enrichment may be related to the formation of chromium hydroxides, as stated previously **[Yuan, 2007a]**. After 1 week immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria, the nitrogen content in the underlying metal is found to increase.

Figure VI-15 shows schematically the evolution of the surface of 2304 DSS during adhesion of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021. Initially, the surface consists in the oxide layer formed on top of the metallic 2304 DSS surface.

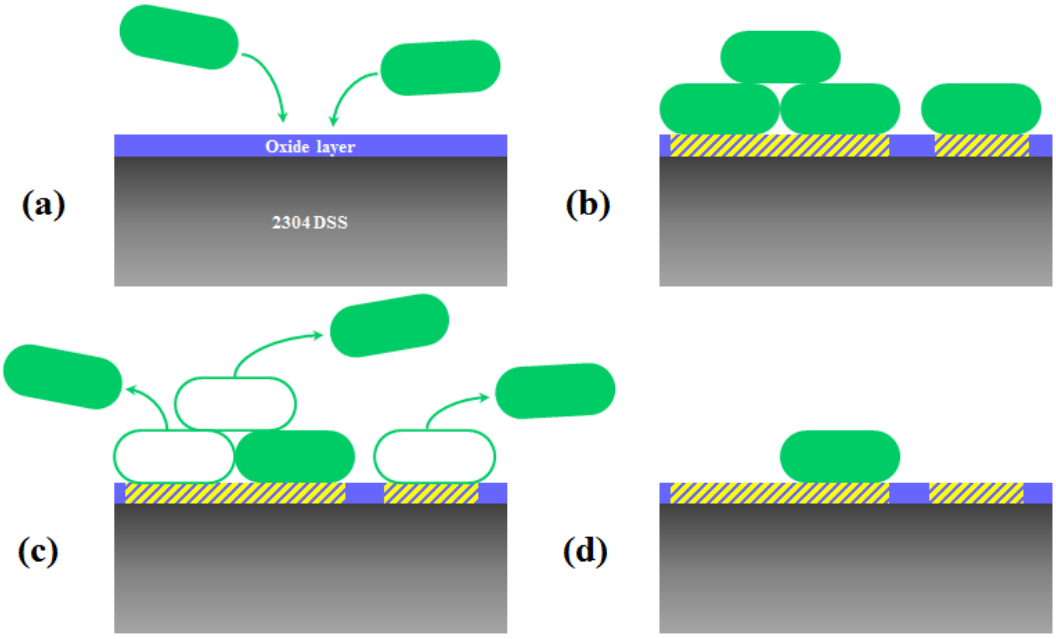


Figure VI-15 Schematic representation of the evolution of the 2304 DSS surface during adhesion of bacteria. The dashed areas correspond to the parts of the oxide layer undergoing modifications as a consequence of bacteria/oxide interactions.

After immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria, bacterial adhesion occurs at the surface (**Figure VI-15-a**), and after 24 hours, the bacterial coverage is high (**Figure VI-15-b**). As mentioned earlier, only the oxide layer not covered by bacteria can be analyzed by XPS. No modification of the oxide layer not covered by the bacteria has been identified after 24 hours. We have shown in the previous chapter **[CHAPITRE V]** that after 1 hour immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria, the oxide layer in close vicinity to the bacteria was enriched in chromium compared to the rest of the surface, suggesting the existence of short-range bacteria/oxide interactions. Therefore, it can be hypothesized that the oxide layer under the bacteria is modified after 24 hours immersion, but it cannot be measured by XPS. When the immersion time increases, detachment of bacteria from the surface occurs (**Figure VI-15-c**). Therefore, after 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria, the bacterial coverage decreases and areas of the surface that were covered by bacteria are no longer covered (**Figure VI-15-d**). As a result, the modifications of the oxide layer can be measured by XPS. This interpretation explains why modifications of the oxide layer are identified by XPS after 1 week immersion and not after 24 hours immersion.

The equivalent thickness of the organic layer (originating from adventitious contamination and/or adsorbed nutrients) formed after 24 hours and 1 week immersion in the control ASW and ASW+N solutions was calculated with a model consisting in an homogeneous and continuous organic layer composed of hydrocarbon-type species as well as nitrogen- and/or oxygen-containing species on top of the oxide layer formed on the underlying metal (**Figure VI-16-a**). The system of equations associated to this model has been detailed in the previous chapter **[CHAPITRE V]**.

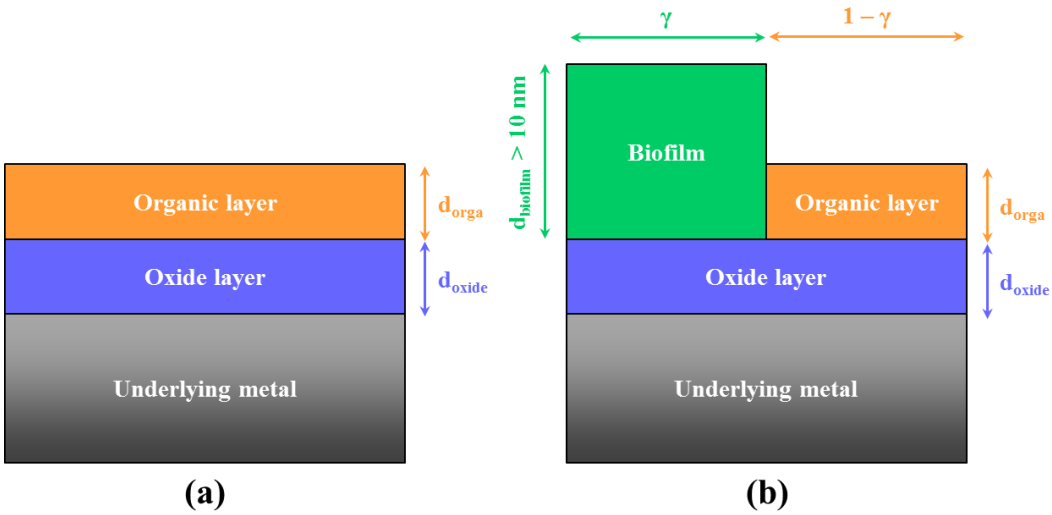


Figure VI-16 Models used for XPS quantitative characterization of the 2304 DSS surfaces after 24 hours and 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions (a) without and (b) with inoculation of bacteria.

Table VI-5 summarizes the results obtained after 24 hours and 1 week immersion. The data obtained for 1 hour immersion **[CHAPITRE V]** have been added for comparison. The equivalent thickness of the organic layer is comprised between 3.2 and 5.6 nm. It can be noted that neither the presence of nutrients nor the increase of immersion time affects significantly the thickness of the organic layer. However, the evolution of the $N_2/(C_1+C_2+C_3+C_4+N_2)$ atomic ratio discussed earlier suggested a continuous adsorption of nitrogen-containing organic species from the nutrients (proteins and/or amino acids). Therefore, it is suggested that the proteins and/or amino acids adsorbing at the surface replace the other species initially present in the contamination layer.

Table VI-5 Equivalent thickness of the organic layer formed after 1 hour, 24 hours and 1 week immersion in the ASW and ASW+N sterile solutions.

Adhesion time	1 hour*	24 hours	1 week
Control ASW	5.6 nm	3.2 nm	5.5 nm
Control ASW+N	4.5 nm	4.0 nm	3.4 nm

*Obtained from the data presented in the previous chapter **[CHAPITRE V]**.

Given the composition of Tightly Bound (TB) and Loosely Bound (LB) EPS **[Torres Bautista, 2015]**, mostly proteins and polysaccharides are expected to be detected by XPS on the biofilm. In order to simplify the problem, amino sugars and uronic acids were not taken into account in this analysis.

The coverage of the biofilm formed after 24 hours and 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria was estimated with a model composed of an homogeneous and discontinuous biofilm layer composed of proteins and polysaccharides with a coverage γ and a thickness $\gg \lambda$ (*i.e.* $>$ 10 nm). Beside the biofilm, an homogeneous and discontinuous organic layer composed of hydrocarbon-type species as well as nitrogen- and/or oxygen-containing species with a coverage $1-\gamma$ (assumed to have the same composition and thickness compared to the ASW or ASW+N control samples) is considered. The biofilm and the organic layer are present on top of the oxide layer formed on the underlying metal (**Figure VI-16-b**). The system of equations associated to this model has been detailed in a previous work **[CHAPITRE V]**.

The proportion of proteins (modeled by BSA) and polysaccharides (modeled by glucose) within the biofilm (tightly bound EPS at the surface of bacteria and loosely bound EPS around bacteria) is not known. Therefore, the biofilm coverage was calculated for a hypothetical biofilm composition ranging from 0 % proteins (assumed to be BSA) – 100 % polysaccharides (assumed to be glucose) to 100 % proteins – 0 % polysaccharides, as shown in the **Figure VI-17**.

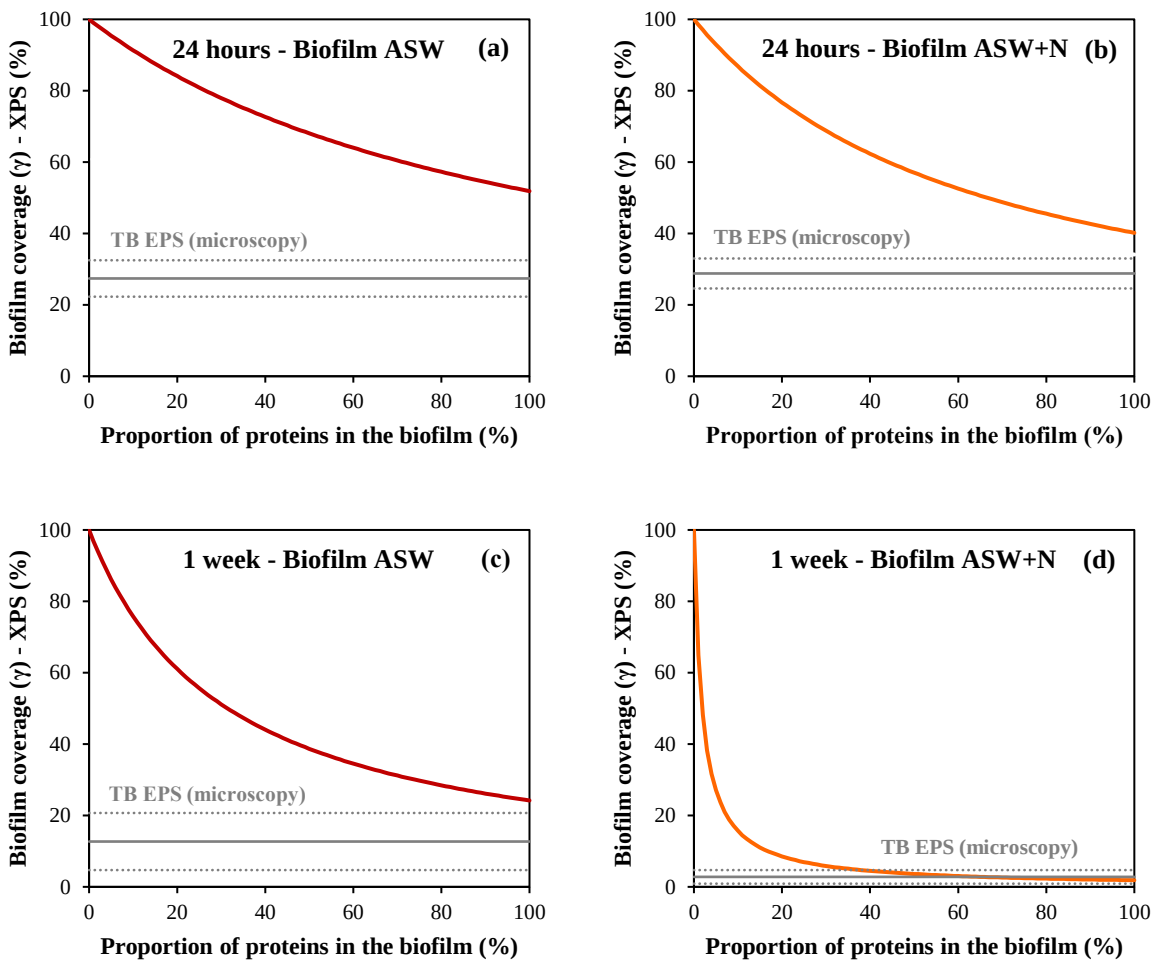


Figure VI-17 Biofilm coverage (γ) calculated from XPS data as a function of the hypothetical proportion of proteins (modeled by BSA) in the biofilm. (a) Biofilm formed after 24 hours in ASW, (b) biofilm formed after 24 hours in ASW+N, (c) biofilm formed after 1 week in ASW and (d) biofilm formed after 1 week in ASW+N. The bacterial coverage obtained by epifluorescence microscopy (*i.e.* TB EPS coverage) is indicated.

In all cases, the biofilm coverage decreases if the proportion of proteins (BSA) assumed within the biofilm increases. In other words, taking into account the presence of polysaccharides (glucose) leads to a higher calculated biofilm coverage. Whatever the proportions of proteins (BSA) and polysaccharides (glucose) considered in the model, the biofilm coverage increases as follows: 1 week ASW+N < 1 week ASW < 24 hours ASW+N < 24 hours ASW. The evolution of the biofilm coverage after 1 week immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria is very close to the ones obtained after 1 hour immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria **[CHAPITRE V]**.

After 24 hours immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria as well as after 1 week immersion in the ASW solution inoculated with bacteria, the biofilm coverage determined by XPS remains higher than the bacterial coverage determined by epifluorescence microscopy (*i.e.* TB EPS coverage), whatever the proportions of proteins (BSA) and polysaccharides (glucose) considered in the model. This indicates that, in addition to TB EPS fixed at the surface of bacteria, LB EPS released by bacteria and adsorbed at the surface of 2304 DSS are detected. Other bacterial structures might be present, such as membrane vesicles **[Schwechheimer, 2015]**. After 1 week immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria, the biofilm coverage determined by XPS is either equal to – for a proportion of proteins (BSA) comprised between approximately 50 and 100 % – or higher than – for a proportion of proteins (BSA) comprised between approximately 0 and 50 % – the bacterial coverage determined by epifluorescence microscopy (*i.e.* TB EPS coverage). This indicates that the conclusion on the presence of LB EPS released by bacteria and adsorbed at the surface of 2304 DSS depends on the proportion of proteins (BSA) in the model.

After 1 hour immersion **[CHAPITRE V]**, it has been hypothesized that no LB EPS were produced, which allowed us to determine the chemical composition of the surface of bacteria (*i.e.* TB EPS) in the ASW (63 % proteins – 37 % polysaccharides) and ASW+N (62 % proteins – 38 % polysaccharides) solutions inoculated with bacteria. The chemical composition of the biofilm can be supposed unchanged for longer immersion times. According to this hypothesis, the biofilm coverage after 24 hours immersion is 63 % in ASW and 52 % in ASW+N while after 1 week immersion it is 33 % in ASW and 3 % in ASW+N. Using these data, the TB EPS (present at the surface of bacteria) and the LB EPS (present around the bacteria) coverages can be separated according to **Equation VI-2**:

$$\gamma_{biofilm} = \gamma_{TB\ EPS} + \gamma_{LB\ EPS}$$ **Equation VI-2**

with $\gamma_{biofilm}$ the coverage of the biofilm obtained by XPS, $\gamma_{TB\ EPS}$ the coverage of the TB EPS, corresponding to the bacterial coverage obtained by epifluorescence microscopy and $\gamma_{LB\ EPS}$ the coverage of LB EPS.

Figure VI-18 shows the TB EPS and LB EPS coverages obtained after 24 hours and 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021. The coverages obtained after 1 hour immersion **[CHAPITRE V]** have been added for comparison. The LB EPS coverage after 1 hour immersion is 0 % in ASW and ASW+N as it was supposed that no LB EPS were produced **[CHAPITRE V]**. After 24 hours immersion, the LB EPS coverage is found to be 36 % in ASW and 23 % in ASW+N. After 1 week immersion, the LB EPS coverage is found to be 20 % in ASW and 0 % in ASW+N.

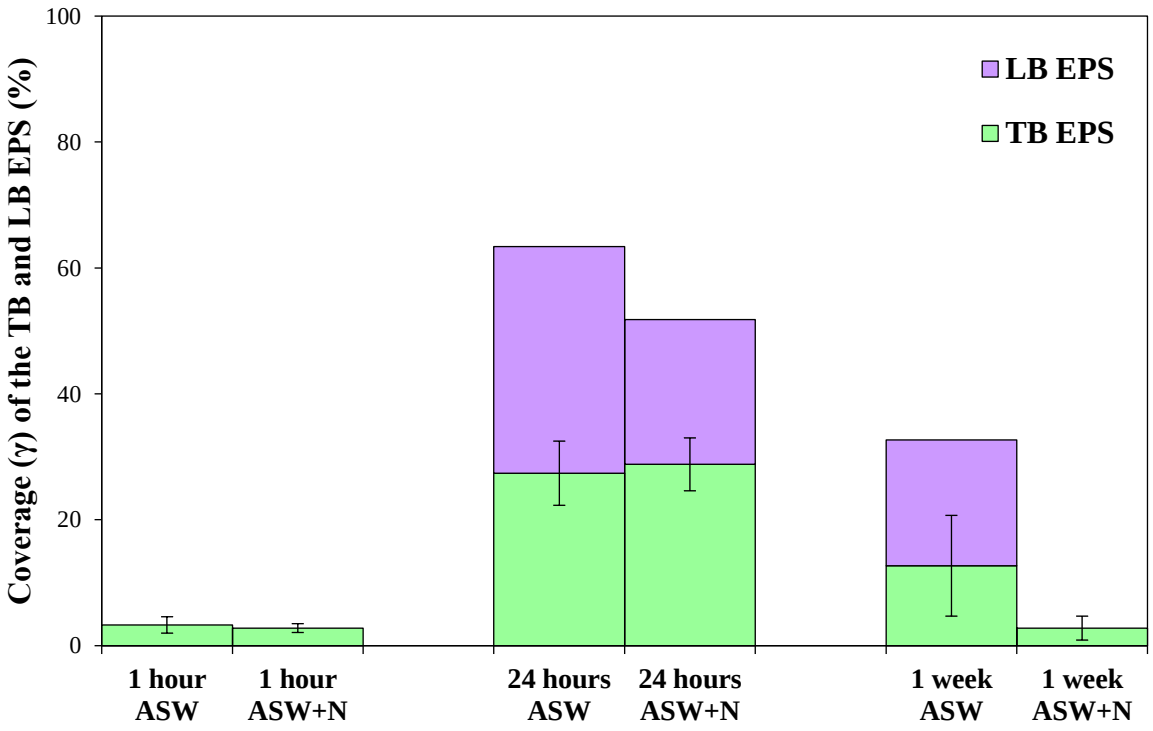


Figure VI-18 Evolution of the TB EPS and LB EPS coverages obtained after 1 hour **[CHAPITRE V]**, 24 hours and 1 week immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria. Chemical compositions of 63 % proteins (BSA) – 37 % polysaccharides (glucose) and 62 % proteins (BSA) – 38 % polysaccharides (glucose) were considered for the biofilms formed in ASW and ASW+N, respectively **[CHAPITRE V]**.

After 24 hours immersion in the ASW and ASW+N solutions inoculated with bacteria, the TB EPS coverage (at the surface of bacteria) increases compared to the results obtained after 1 hour and LB EPS (around bacteria) are evidenced. The LB EPS represent a significant part of the biofilm. The proportion of LB EPS within the biofilm is higher in ASW (57 %) than in ASW+N (44 %). These results suggest that the absence of nutrients promotes the production of EPS by *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 after 24 hours.

After 1 week immersion in the ASW solution inoculated with bacteria, both the TB EPS and the LB coverages decrease compared to the results obtained after 24 hours. The LB EPS represent a significant part of the biofilm (61 %), which remains close to the part determined after 24 hours immersion. After 1 week immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria, the TP EPS coverage is considerably reduced compared to the results obtained after 24 hours. Moreover, no LB EPS are identified in this case. These results indicate that after 1 week immersion, both the TB EPS and the LB EPS coverages decrease. These decreases are more pronounced in presence of nutrients.

Our results are in good agreement with the idea that the production of EPS contributes to the growth of the biofilm and promotes the survival of the bacteria within the biofilm **[Gubner, 2000]**, [**Donlan, 2002a]**, **[Vu, 2009]**, **[Yuan, 2009]**, **[Flemming, 2010], [Flemming, 2016]**. In the case of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021, the absence of nutrients seems to promote the production of EPS and the survival of cells for longer immersion times. A possible explanation is that the oxygen consumption by bacterial respiration leads to a severe decrease in the dissolved oxygen concentration **[CHAPITRE V]**, so that the oxygen concentration becomes a limiting factor to the development of the biofilm **[Gong, 2016]**. The number of viable cultivable planktonic bacteria for the ASW suspension has been found to remain stable over immersion time while a continuous increase has been observed for the ASW+N suspension. Therefore, in presence of nutrients, a more pronounced decrease in the dissolved oxygen concentration can be expected with time, leading to a more pronounced decrease in the TB EPS and LB EPS coverages.

VI.4.4. Electrochemical characterization

VI.4.4.1. OCP evolution

Electrochemical characterization has been performed in the ASW+N solution, without (control) and with (biofilm) inoculation of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021. First, the Open Circuit Potential (OCP) was monitored over immersion time (up to 1 week). Representative examples are shown in the **Figure VI-19**.

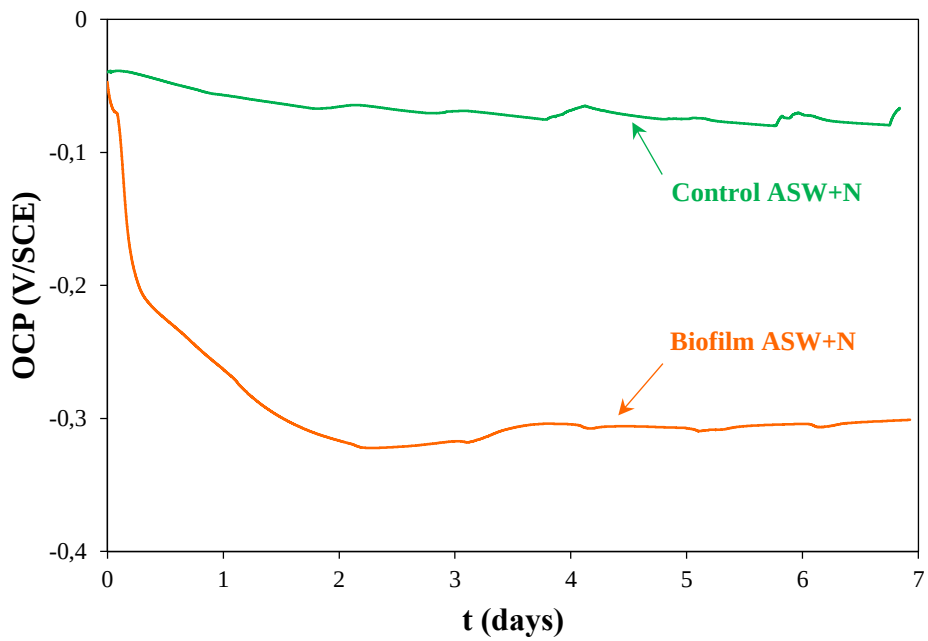


Figure VI-19 Typical evolution of the Open Circuit Potential (OCP) over immersion time (up to 1 week) of 2304 DSS in the ASW+N solution without and with inoculation of bacteria.

In the sterile ASW+N solution, the OCP slightly decreases during the 2 first days and then remains roughly stable up to 1 week. In presence of bacteria, the initial value of the OCP is close to the one obtained in the sterile solution, but a significant decrease is observed during the 2 first days followed by a stabilization, in agreement with previous works **[Moradi, 2014]**. The initiation of this OCP decrease was already noted after 1 hour immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria **[CHAPITRE V]**.

VI.4.4.2. Anodic and cathodic polarization curves

After 24 hours and 1 week immersion at the OCP in the ASW+N solution without (control) and with (biofilm) inoculation of bacteria, anodic and cathodic polarization have been recorded separately, as shown in **Figure VI-20-a** and **Figure VI-20-b**, respectively.

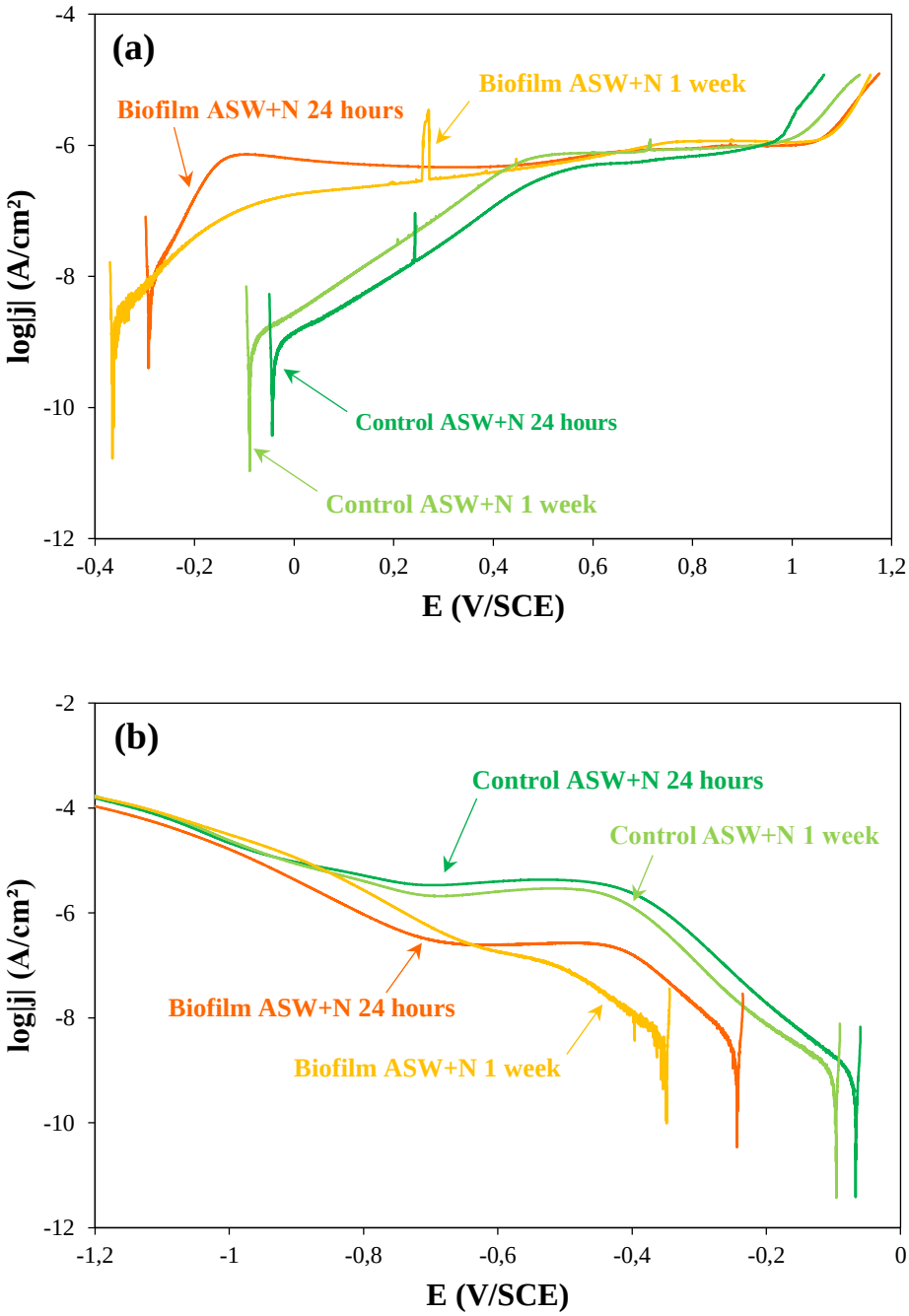


Figure VI-20 (a) Anodic and (b) cathodic polarization curves of 2304 DSS recorded after 24 hours and 1 week immersion at the OCP in the ASW+N without and with inoculation of bacteria. Scan rate: 0.17 mV/s.

On the anodic polarization curves (**Figure VI-20-a**), the corrosion potential (E_{corr}) is found to be −0.044 V/SCE and −0.089 V/SCE after 24 hours and 1 week immersion in the sterile medium, respectively, while values of −0.293V/SCE and −0.365 V/SCE are found after 24 hours and 1 week immersion in presence of bacteria, respectively. After 1 hour immersion

[CHAPITRE V], E_{corr} was found to be −0.083 ± 0.013 V/SCE and −0.050 ± 0.037 V/SCE in the sterile and bacteria-inoculated ASW+N solutions, respectively. On the cathodic polarization curves (**Figure VI-20-b**), the corrosion potential (E_{corr}) is found to be −0.067 V/SCE and −0.096 V/SCE after 24 hours and 1 week immersion in the sterile medium, respectively, while values of −0.243 V/SCE and −0.348 V/SCE are found after 24 hours and 1 week immersion in presence of bacteria, respectively. After 1 hour immersion **[CHAPITRE V]**, E_{corr} was found to be −0.024 ± 0.012 V/SCE and −0.101 ± 0.013 V/SCE in the sterile and bacteria-inoculated ASW+N solutions, respectively.

It can be concluded that the presence of bacteria induces a significant decrease of the OCP and the corrosion potential over immersion time (1 hour >> 24 hours >> 1 week) while the OCP and the corrosion potential slightly decrease over immersion time in the sterile medium (1 hour > 24 hours > 1 week).

The anodic polarization curves obtained after 24 hours and 1 week immersion in the sterile and bacteria-inoculated ASW+N solutions (**Figure VI-20-a**) show that the anodic current density increases from E_{corr} to ≈ 0.5-0.6 V/SCE. The absence of passive plateau might be the consequence of non-stationary conditions using a scan rate of 0.17 mV/s **[Annexe E]**. Except in the case of the biofilm formed after 24 hours, current peaks are observed in the anodic domain, which can be attributed to metastable pitting due to the presence of chloride ions **[Garfias-Mesias, 1999]**. In the sterile medium, slight variations in the anodic current density are observed after 24 hours and 1 week.

The anodic current density is significantly higher in presence of bacteria compared to the control samples. The value of the anodic current density in presence of bacteria would be even higher by considering that the surface covered by the bacteria after 24 hours (28.8 ± 4.2 %) and 1 week (2.8 ± 0.9 %) is excluded from the active surface. On the contrary, after 1 hour adhesion **[CHAPITRE V]**, the presence of bacteria was found to induce a decrease of the anodic current density compared to the control samples. Therefore, the adhesion of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 clearly affects the anodic behavior of 2304 DSS, but different effects are observed for short (1 hour) and long (24 hours and 1 week) immersion times. The increase in the anodic current observed above ≈ 0.9 V/SCE is attributed to transpassivity and/or water decomposition rather than to pitting **[Peguet, 2012]**.

After 1 hour adhesion **[CHAPITRE V]**, it was concluded that the adhesion of bacteria inhibited the pitting corrosion of 2304 DSS. More data would be required in order to conclude about the role of biofilm formation after longer immersion times (24 hours and 1 week) on the pitting behavior of 2304 DSS. However, considering the increase in the anodic current density, it seems that that longer immersion times (24 hours and 1 week) promotes corrosion of 2304 DSS.

On the cathodic polarization curves obtained after 24 hours and 1 week immersion in the sterile and bacteria-inoculated ASW+N solutions (**Figure VI-20-b**), different potential domains are observed. The increase of the cathodic current density (in absolute value) from E_{corr} to ≈ -0.4 V/SCE might be associated to the partial reduction of the oxide film formed at the surface of 2304 DSS **[Le Bozec, 2001]**. Except for the biofilm formed after 1 week, the cathodic current plateau observed between ≈ -0.4 and ≈ -0.7 V/SCE corresponds to the reduction of dissolved oxygen **[Le Bozec, 2001]**. In the sterile medium, the value of the cathodic current density of the plateau (in absolute value) is found to be ≈ 3-4 µA/cm² after 24 hours and ≈ 2-3 µA/cm² after 1 week. After 1 hour immersion in the sterile medium **[CHAPITRE V]**, a value of ≈ 4-5 µA/cm² was obtained. Therefore, a slight decrease of the cathodic current density of the plateau is observed in the sterile ASW+N solution when the immersion time increases. It might be linked to a decrease in the active surface following the adsorption of nutrients at the surface of 2304 DSS. After 24 hours immersion in presence of bacteria, the value of the cathodic current density of the plateau is found to be ≈ 0.3 µA/cm², which is close to the value obtained after 1 hour immersion in the ASW+N solution inoculated with bacteria (≈ 0.2-0.5 µA/cm²) **[CHAPITRE V]**. This shows that the presence of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 induces a significant decrease of the cathodic current density of the plateau after 1 hour (about 13 times) and after 24 hours (about 12 times) immersion. As mentioned previously, given the bacterial coverage after 1 hour (2.8 ± 0.7 %) and 24 hours (28.8 ± 4.2 %) adhesion, this cannot be explained by a decrease in the active surface area.

Therefore, the decrease in the cathodic current density of the plateau is likely a consequence of a decrease of the concentration of dissolved oxygen due to oxygen consumption by bacterial respiration, leading to a decrease in the cathodic reaction rate. In the previous chapter **[CHAPITRE V]**, the dissolved oxygen concentration after 1 hour immersion in the

bacteria-inoculated medium was estimated around 0.6 mg/L. Because the value of the current density of the plateau remains roughly similar after 24 hours immersion in presence of bacteria, a similar dissolved oxygen concentration is expected. After 1 week immersion in presence of bacteria, the cathodic current plateau is not observed, which suggests that the dissolved oxygen concentration further decreases. The decrease of the cathodic reaction rate in presence of bacteria explains the decrease of the OCP and E_{corr} values over immersion time. At lower potentials, the increase in the cathodic current density (in absolute value) corresponds to hydrogen evolution reaction.

After short-term adhesion of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 (1 hour) **[CHAPITRE V]**, the inhibition of corrosion processes was associated to the presence of a more protective passive film due to bacterial activity. After long-term adhesion of *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 (24 hours and 1 week), the increase in the anodic current density indicates on the contrary that the formation of the biofilm promotes corrosion processes, which might be linked to a less protective passive film. The modifications of the oxide layer evidenced after 1 week immersion (oxide layer thinning, presence of Fe(II), enrichment in Cr(III) and possible formation of chromium hydroxides) are the result of bacterial activity. It might be due to modifications of the physico-chemical conditions (for example a decrease in pH promoting preferential dissolution of iron) or to the reduction of Fe(III) species into Fe(II) species through anaerobic respiration processes.

VI.5. Conclusions

The aim of this work was to characterize the bacteria-surface interactions occurring during biofilm formation for 24 hours and 1 week adhesion of marine aerobic *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 at the surface of 2304 Duplex Stainless Steel (DSS) in artificial seawater without (ASW) and with (ASW+N) addition of nutrients. Significant differences were evidenced compared to the results obtained in the early stage of biofilm formation (1 hour adhesion) the previous chapter **[CHAPITRE V]**.

Microscopic characterization (epifluorescence microscopy, SEM and AFM) showed that the biofilm formed after 24 hours can be considered as mature (high bacterial coverage) while a decline of the biofilm was noted after 1 week (decrease of the bacterial coverage), especially

in ASW+N. Cells adhering at the surface formed aggregates in which LB EPS are likely present. After 1 week, the cells structure appeared to be damaged likely as a consequence of cell lysis. The adhesion time and the presence of nutrients were found to influence the cell size (length, width and height). No pits were identified at the surface of 2304 DSS beside and under the bacteria. The presence of nutrients induced a significant and continuous increase of the number of viable cultivable planktonic bacteria over time. For shorter adhesion times (1 hour and 24 hours), the presence of nutrients induced an increase of the number of viable cultivable adhering bacteria. On the contrary, for longer adhesion time (1 week), the number of viable cultivable adhering bacteria decreased in presence of nutrients.

The biofilm consists in Tightly Bound (TB) EPS covering the surface of bacteria and Loosely Bound (LB) EPS released by bacteria and adsorbed at the surface of 2304 DSS. XPS analysis allowed evidencing and quantifying the presence of LB EPS. After 24 hours, the LB EPS represented a significant part of the biofilm and the absence of nutrients was found to promote the production of LB EPS. After 1 week, the LB EPS also represented a significant part of the biofilm when no nutrients were added to the medium, but in presence of nutrients, no LB EPS were evidenced.

The data indicated that the presence of nutrients was responsible for a more pronounced decrease of the bacterial coverage (*i.e.* TB EPS coverage) after 1 week, a decrease of the number of viable cultivable adhering bacteria after 1 week as well as a lower production of LB EPS after 24 hours and 1 week. The production of LB EPS might contribute to the growth of the biofilm and the survival of cells within the biofilm. It is suggested that the respiration rate of bacteria was higher in presence of nutrients, so that the oxygen became a limiting factor for the growth of bacteria.

The surface of 2304 DSS not covered by bacteria was analyzed by XPS. After 24 hours bacterial adhesion, the oxide layer remained stable compared to the control coupons. After 1 week bacterial adhesion, clear modifications of the oxide layer were evidenced. The oxide layer was found to be slightly thinner compared to the control coupons, suggesting that biofilm formation mitigated the growth of the oxide layer. Fe(II) species were detected while in presence of nutrients, a further Cr(III) enrichment likely related the formation of chromium hydroxides was noted. The oxide layer present under the bacteria cannot be analyzed by XPS but it might be affected by bacteria already after shorter adhesion times.

The electrochemical measurements showed that the presence of bacteria induced a significant decrease of the OCP and E_{corr} over adhesion time, which was assigned to a decrease in the concentration of dissolved oxygen (visible on the cathodic polarization curves) due to bacterial respiration. The presence of bacteria had also an influence on the anodic behavior of 2304 DSS. After 1 hour **[CHAPITRE V]**, a decrease of the anodic current was observed and a pitting corrosion inhibition was observed. On the contrary, after 24 hours and 1 week, an increase of the anodic current was observed, which might indicate that biofilm formation promotes corrosion of 2304 DSS. These phenomena might be associated to a more or less protective passive film depending on bacterial activity and oxide layer modifications during biofilm formation.

Conclusion générale et perspectives

Les aciers inoxydables, et plus particulièrement les aciers inoxydables duplex (alliages biphasés composés d'austénite et de ferrite), doivent leur résistance à la corrosion à la formation spontanée d'une couche d'oxyde à leur surface, couramment qualifiée de film passif. Cette couche d'oxyde a une épaisseur de quelques nanomètres et se compose majoritairement d'oxydes et/ou d'hydroxydes de Fe(III) et de Cr(III). Néanmoins, dans des milieux agressifs, la stabilité de la couche d'oxyde peut être compromise, ce qui peut déclencher des phénomènes de corrosion (localisée ou généralisée) et porter atteinte à l'intégrité des structures. Par exemple, l'adhésion de microorganismes, et plus particulièrement de bactéries, et la formation d'un biofilm à la surface d'un acier inoxydable peut conduire à l'établissement de conditions physico-chimiques particulières à l'interface substrat/biofilm, et ainsi déclencher et/ou accélérer les processus de corrosion. Ce phénomène est qualifié de biocorrosion, ou corrosion influencée par les microorganismes. Une des approches pour étudier la biocorrosion des aciers inoxydables est de considérer l'évolution des propriétés de la couche d'oxyde au cours de la formation du biofilm.

Ces travaux de thèse portent sur la caractérisation des interactions bactéries-surfaces suite à l'adhésion de bactéries marines aérobies *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 en milieu marin. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la couche d'oxyde par un couplage XPS/ToF-SIMS. Nous avons utilisé deux approches : une étude à l'échelle globale de la couche d'oxyde formée sur l'alliage duplex et sur les alliages monophasés correspondants (Chapitre III) et une étude à l'échelle locale de la couche d'oxyde formée sur chaque phase de l'alliage duplex (Chapitre IV). Dans un second temps, nous avons caractérisé la surface de l'alliage duplex au cours de l'adhésion bactérienne, avec pour objectif principal d'étudier l'évolution de la couche d'oxyde suite à la formation du biofilm. Nous avons considéré les premiers stades de la formation du biofilm (Chapitre V) ainsi que des stades plus avancés (Chapitre VI). Cette caractérisation fait appel à des techniques fines d'analyse des surfaces (XPS et ToF-SIMS), à des techniques microscopiques (microscopie à épifluorescence, MEB et AFM) ainsi qu'à des techniques

électrochimiques (suivi du potentiel à l'abandon, courbes de polarisation anodiques et cathodiques).

Le **film d'oxyde natif** (formé après polissage mécanique) et le **film passif** (formé après passivation électrochimique dans H_2SO_4 0.05 M) formés à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 ont été caractérisés par XPS et ToF-SIMS à l'échelle globale, c'est-à-dire que les zones analysées contiennent plusieurs régions de phases ferrite et austénite. Dans les deux cas, la couche d'oxyde a une épaisseur de quelques nanomètres et se compose majoritairement d'oxydes et/ou d'hydroxydes de Fe(III) et de Cr(III) avec des quantités plus faibles de Mo(IV) et de Mo(VI). Le film d'oxyde natif (2.4 $\pm$ 0.1 nm) est légèrement plus épais que le film passif (2.0 $\pm$ 0.2 nm). Après passivation électrochimique, la quantité d'hydroxydes augmente et les espèces hydroxydées se concentrent dans la partie externe de la couche d'oxyde. La couche d'oxyde est enrichie en chrome et en molybdène par rapport au cœur de l'alliage. Ces enrichissements sont plus prononcés pour le film passif que pour le film d'oxyde natif, en conséquence de la dissolution préférentielle de l'oxyde de fer en milieu acide. Pour le film d'oxyde natif, la concentration en chrome est de 37.0 $\pm$ 1.1 % atomiques et la concentration en molybdène est de 1.1 $\pm$ 0.2 % atomiques. Pour le film passif, la concentration en chrome est de 69.8 $\pm$ 3.4 % atomiques et la concentration en molybdène est de 2.2 $\pm$ 0.8 % atomiques. Les oxydes et/ou hydroxydes de fer, de chrome et de molybdène sont stratifiés au sein de la couche d'oxyde : le fer et le molybdène sont concentrés dans la région externe et le chrome est concentré dans la région interne. Le nickel n'est pas détecté sous forme oxydée, ce qui est lié à l'oxydation préférentielle du fer et du chrome par rapport au nickel. Par conséquent, le métal sous la couche d'oxyde est enrichi en nickel par rapport au cœur de l'alliage. L'enrichissement en nickel métallique est plus prononcé pour le film passif (14.0 $\pm$ 2.3 % at.) que pour le film d'oxyde natif (8.5 $\pm$ 1.5 % at.). Le métal sous-jacent est également fortement enrichi en azote, à des niveaux similaires pour les deux types de couches d'oxyde (entre 3 et 4 % at.).

Pour comprendre le lien entre la composition chimique des phases de l'acier inoxydable duplex 2304 et la composition chimique de la couche d'oxyde formée sur chaque phase, nous avons développé deux stratégies : une caractérisation à l'**échelle globale** de la surface de l'alliage duplex et des alliages monophasés correspondants, et une caractérisation à l'**échelle locale** de la surface sur chaque phase de l'alliage duplex. Dans le Chapitre III, nous avons caractérisé le film d'oxyde natif (formé après polissage mécanique) à la surface de l'alliage

duplex et des alliages monophasés correspondants (austénitique et ferritique), dont la composition chimique est très proche de celle des phases de l'alliage duplex, par un couplage XPS/ToF-SIMS (**échelle globale**). L'épaisseur de la couche d'oxyde est légèrement plus élevée pour l'alliage monophasé austénitique (2.8 $\pm$ 0.1 nm) que pour l'alliage duplex et l'alliage monophasé ferritique (2.4 $\pm$ 0.1 nm). La composition chimique de la surface des trois alliages présente des différences qui montrent que la teneur en éléments d'alliage (Fe, Cr, Ni, Mo et N) dans la couche d'oxyde et/ou dans le métal sous-jacent dépend de leur teneur au cœur de l'alliage. Ces résultats suggèrent qu'il existe des différences chimiques de la surface de l'alliage duplex au niveau de chaque phase. Dans le Chapitre IV, nous avons présenté une méthodologie permettant d'analyser le film d'oxyde natif (formé après polissage mécanique) et le film passif (formé après passivation électrochimique dans H_2SO_4 0.05 M) sur les phases ferrite et austénite de l'alliage duplex, par un couplage XPS/ToF-SIMS innovant (**échelle locale)**. Cette méthodologie repose sur le couplage des données quantitatives obtenues par XPS, des cartographies chimiques ToF-SIMS permettant de visualiser les phases de l'alliage duplex et des profils ToF-SIMS extraits des zones d'intérêt correspondant à chacune des phases. L'épaisseur du film d'oxyde natif est légèrement plus élevée sur la phase austénite que sur la phase ferrite, en accord avec les résultats obtenus pour les alliages monophasés. En revanche, l'épaisseur du film passif est similaire sur les deux phases. La stratification des espèces Fe, Cr et Mo au sein de la couche d'oxyde est observée sur chacune des phases. Des différences de composition chimique concernant la couche d'oxyde formée sur chaque phase sont mises en évidence : les teneurs en chrome et en molybdène de la couche d'oxyde sont plus élevées sur la ferrite que sur l'austénite. Grâce à la corrélation des résultats XPS et ToF-SIMS, la concentration en Cr(III) de la couche d'oxyde formée sur chaque phase a pu être estimée. Pour le film d'oxyde natif, la concentration en Cr(III) est de 31.1 % at. sur l'austénite et de 34.5 % at. sur la ferrite. Ces valeurs sont en bon accord avec les résultats obtenus à l'échelle globale pour les alliages monophasés austénitique (28.9 $\pm$ 2.4 % at.) et ferritique (37.4 $\pm$ 2.6 % at.). Pour le film passif, la concentration en Cr(III) est de 68.1 % at. sur l'austénite et de 77.0 % at. sur la ferrite. La différence entre la concentration en Cr(III) de la couche d'oxyde formée sur l'austénite et sur la ferrite est plus prononcée pour le film passif que pour le film d'oxyde natif. L'enrichissement en nickel et en azote est observé à l'interface métal/oxyde pour les deux phases, mais il est plus prononcé pour l'austénite que pour la ferrite. Ainsi, les résultats obtenus à l'échelle globale et à l'échelle locale sont en bon accord et soulignent que la composition chimique de la surface de l'alliage duplex est directement liée à la composition chimique de la phase sous-jacente.

Dans la suite du manuscrit, nous avons caractérisé la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 au cours de l'adhésion de bactéries marines aérobies *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 en eau de mer artificielle sans (**ASW**) et avec (**ASW+N**) ajout de nutriments. Les analyses microscopiques (microscopie à épifluorescence, MEB et AFM) ont permis de caractériser la morphologie du biofilm. Après 1 heure d'adhésion (Chapitre V), le biofilm est dans les **premiers stades** de sa formation : les bactéries adhérentes forment des chaînes (processus de division par fission binaire) et le taux de recouvrement bactérien est faible, aussi bien en ASW (3.3 $\pm$ 1.3 %) qu'en ASW+N (2.8 $\pm$ 0.7 %). Après 24 heures et 1 semaine d'adhésion (Chapitre VI), le biofilm est dans des **stades plus avancés**. Après 24 heures, le biofilm est décrit comme mature : des agrégats bactériens sont présents à la surface et le taux de recouvrement bactérien est élevé, aussi bien en ASW (27.4 $\pm$ 5.1 %) qu'en ASW+N (28.8 $\pm$ 4.2 %). Après 1 semaine, le biofilm est en déclin : la structure des bactéries est endommagée, et le taux de recouvrement bactérien diminue, en ASW (12.7 $\pm$ 8.0 %) mais surtout en ASW+N (2.8 $\pm$ 0.9 %).

Nous avons étudié l'évolution de la couche d'oxyde **à côté des bactéries** au cours de la formation du biofilm. Après 1 heure d'adhésion, la surface de l'alliage duplex a été caractérisée par XPS et par ToF SIMS. Par XPS, nous n'avons pas identifié d'effet des bactéries sur la nature de la couche d'oxyde. Par ToF-SIMS, nous avons montré que la couche d'oxyde s'enrichit en chrome en présence de nutriments (62.5 % at.). Nous avons conclu que des interactions bactéries-oxyde sur de faibles distances (quelques micromètres) induisent un enrichissement en chrome de la couche d'oxyde autour des bactéries. Après 24 heures et 1 semaine d'adhésion, la surface de l'alliage duplex a été caractérisée par XPS. Après 24 heures d'adhésion, nous n'avons pas identifié d'effet des bactéries sur la nature de la couche d'oxyde. Après 1 semaine d'adhésion, nous avons montré plusieurs effets de la présence des bactéries sur la couche d'oxyde : une épaisseur plus faible, la présence d'espèces Fe(II) et, en présence de nutriments, un enrichissement en chrome (68.3 % at.), probablement lié à la formation d'hydroxydes de chrome. Sur les profils ToF-SIMS, nous avons identifié la présence d'une couche d'oxyde **sous les bactéries**. Toutefois, cette couche d'oxyde n'a pas pu être caractérisée dans ces travaux. D'une part, considérant l'épaisseur analysée par XPS ($\approx$ 10 nm) et la hauteur des bactéries après 1 heure (435 $\pm$ 97 nm), 24 heures (252 $\pm$ 48 nm) et 1 semaine (100-300 nm) d'adhésion (mesures AFM en ASW+N), la surface sous les bactéries ne peut pas être analysée par XPS. D'autre part, en l'absence d'interface bactéries/oxyde clairement définie, les profils ToF-SIMS ne permettent pas d'obtenir d'information

concernant la surface sous les bactéries. Etant donné les résultats obtenus pour la couche d'oxyde à côté des bactéries, il est néanmoins probable que la couche d'oxyde sous les bactéries soit affectée par la formation du biofilm

Nous avons également caractérisé la surface du biofilm, composé des bactéries, sur lesquelles des « *Tightly Bound* » EPS sont attachés, et de « *Loosely Bound* » EPS, relâchés à côté des bactéries. Au vu de la complexité des spectres XPS et du nombre élevé d'ions secondaires associés aux bactéries détectés par ToF-SIMS, la composition chimique du biofilm est complexe. Pour la suite des interprétations, nous avons modélisé le biofilm par un film organique composé de protéines et de polysaccharides. Nous avons développé un modèle afin de déterminer, à partir des données XPS, le taux de recouvrement du biofilm en fonction de la proportion de protéines et de polysaccharides dans le biofilm. Après 1 heure d'adhésion, nous avons montré que la surface des bactéries est composée majoritairement de protéines, aussi bien en ASW (63 % de protéines et 37 % de polysaccharides) qu'en ASW+N (62 % de protéines et 38 % de polysaccharides). Après 24 heures et 1 semaine d'adhésion, nous avons considéré que la composition du biofilm est similaire à celle calculée après 1 heure d'adhésion. Nous en avons déduit le taux de recouvrement du biofilm, et, connaissant le taux de recouvrement bactérien (obtenu par microscopie à épifluorescence), le taux de recouvrement des LB EPS a été obtenu. Après 24 heures d'adhésion, les LB EPS représentent une part significative du biofilm, aussi bien en ASW (57 %) qu'en ASW+N (44 %). Après une semaine d'adhésion, le biofilm formé en ASW comprend également une part significative de LB EPS (61 %), alors qu'en ASW+N, le biofilm ne comprend pas de LB EPS. Ainsi, l'absence de nutriments dans le milieu semble favoriser la production de LB EPS, ce qui pourrait contribuer à la croissance du biofilm et à la survie des bactéries au sein du biofilm.

Les mesures électrochimiques réalisées en ASW+N indiquent que la formation du biofilm à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 a une influence sur les processus anodiques et cathodiques. Une baisse significative de la concentration en oxygène dissous a été identifiée, qui est probablement liée à la respiration bactérienne, et qui entraîne une diminution de la vitesse de la réaction cathodique. Après 1 heure d'adhésion, la présence du biofilm semble inhiber la propagation des piqûres à la surface de l'alliage duplex, ce qui pourrait être lié à la présence d'un film passif plus protecteur. Après 24 heures d'adhésion, le biofilm contient une part significative de LB EPS, et après 1 semaine d'adhésion, le biofilm se dégrade (du fait de l'absence d'oxygène et/ou de nutriments dans le milieu) et la couche d'oxyde est

significativement modifiée (épaisseur plus faible, présence de Fe(II), enrichissement en Cr(III) probablement associé à la formation d'hydroxydes de chrome), ce qui semble plutôt favoriser la corrosion de l'alliage duplex.

Plusieurs perspectives émergent de ces travaux de thèse. Tout d'abord, il serait intéressant d'appliquer la méthodologie d'analyse locale de la couche d'oxyde sur chaque phase de l'alliage duplex aux surfaces en présence du biofilm. Il faudrait pour cela réaliser des analyses complémentaires en adaptant les conditions d'analyse au système substrat-oxyde-biofilm (taille de la zone analysée, courants des faisceaux, choix des ions caractéristiques…). Des essais préliminaires réalisés ont montré qu'il est possible des visualiser les phases grâce aux cartographies 3D des ions OH^- en accumulant suffisamment de données dans la partie externe de la couche d'oxyde, et nous avons ainsi confirmé, en présence du biofilm, que la couche d'oxyde est plus riche en chrome sur la ferrite que sur l'austénite. Nous avons aussi montré que la formation du biofilm induit des modifications de la couche d'oxyde. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour en expliquer les mécanismes, comme des modifications physico-chimiques à l'interface biofilm/oxyde (par exemple une baisse de la concentration en oxygène dissous ou une acidification locale), des processus métaboliques (par exemple la respiration du fer) ou un attachement d'ions métalliques aux EPS. Des essais complémentaires seraient nécessaires, comme des mesures locales de concentration en oxygène dissous et de pH. Il n'a pas été possible de caractériser la surface sous les bactéries avec les techniques utilisées dans ce travail. Puisque nous avons montré l'existence d'interactions bactéries-oxyde sur de faibles distances, l'oxyde sous les bactéries est probablement affecté. Il serait intéressant de développer une approche permettant d'avoir accès à l'interface bactéries/oxydes, sans toutefois induire de modifications de la surface, par exemple en détachant le biofilm aux ultra-sons en boîte à gants. Enfin, nous avons vu que les LB EPS peuvent représenter une part significative du biofilm, et que la production des LB EPS semble influencer les caractéristiques du biofilm. Il serait intéressant de mieux caractériser les interactions EPS-surface pour comprendre leur rôle dans la formation du biofilm. Dans cette optique, une étude est en cours au laboratoire, qui porte sur la caractérisation de l'adhésion des EPS produits par *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 à la surface d'un alliage Fe-Cr, par un couplage de microbalance à cristal de quartz/électrochimie (EQCM) et d'XPS. Un des objectifs est de comprendre si le conditionnement de la surface par des EPS favorise (ou non) l'adhésion des bactéries.

Références bibliographiques

– A –

[Abdolahi, 2014] A. Abdolahi, E. Hamzah, Z. Ibrahim, S. Hashim, Microbially influenced corrosion of steels by *Pseudomonas aeruginosa*, Corrosion Reviews 32 (2014) 129–141.

[Abreu, 2004] C. M. Abreu, M. J. Cristóbal, R. Losada, X. R. Nóvoa, G. Pena, M. C. Pérez, Comparative study of passive films of different stainless steels developed on alkaline medium, Electrochimica Acta 49 (2004) 3049–3056.

[Addari, 2008] D. Addari, B. Elsener, A. Rossi, Electrochemistry and surface chemistry of stainless steels in alkaline media simulating concrete pore solutions, Electrochimica Acta 53 (2008) 8078–8086.

[Ahimou, 2007] F. Ahimou, C. J .P. Boonaert, Y. Adriaensen, P. Jacques, P. Thonart, M. Paquot, P. G. Rouxhet, XPS analysis of chemical functions at the surface of *Bacillus subtilis*, Journal of Colloid and Interface Science 309 (2007) 49–55.

[Allen, 2018] A. Allen, O. Habimana, E. Casey, The effects of extrinsic factors on the structural and mechanical properties of *Pseudomonas fluorescens* biofilms: A combined study of nutrient concentrations and shear conditions, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 165 (2018) 127–134.

[Allion, 2004] A. Allion, Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides – Mise au point d'une technique rapide pour déterminer *in situ* l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens, Thèse en Sciences Alimentaires, sous la direction de Marie-Noëlle Bellon-Fontaine (2004).

[Anselme, 2010] K. Anselme, P. Davidson, A. M. Popa, M. Giazzon, M. Liley, L. Ploux, The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale, Acta Biomaterialia 6 (2010) 3824–3846.

[Antony, 2007] P. J. Antony, S. Chongdar, P. Kumar, R. Raman, Corrosion of 2205 duplex stainless steel in chloride medium containing sulfate-reducing bacteria, Electrochimica Acta 52 (2007) 3985–3994.

[Antony, 2008] P. J. Antony, R. K. Singh Raman, R. Mohanram, P. Kumar, R. Raman, Influence of thermal aging on sulfate-reducing bacteria (SRB)-influenced corrosion behaviour of 2205 duplex stainless steel, Corrosion Science 50 (2008) 1858–1864.

[Antony, 2010] P. J. Antony, R. K. Singh Raman, R. Raman, P. Kumar, Role of microstructure on corrosion of duplex stainless steel in presence of bacterial activity, Corrosion Science 52 (2010) 1404–1412.

[Arkan, 2016] S. Arkan, E. Ilhan-Sungur, N. Cansever, Corrosive metabolic activity of *Desulfovibrio* sp. on 316L stainless steel, Journal of Materials Engineering and Performance 25 (2016) 5352–5362.

[Asami, 1976] K. Asami, K. Hashimoto, S. Shimodaira, An ESCA study of the Fe^{2+}/Fe^{3+} ratio in passive films on iron-chromium alloys, Corrosion Science 16 (1976) 387–391.

[Asami, 1978] K. Asami, K. Hashimoto, S. Shimodaira, An XPS study of the passivity of a series of iron–chromium alloys in sulphuric acid, Corrosion Science 18 (1978) 151–160.

– B –

[Baba, 2002] H. Baba, T. Kodama, Y. Katada, Role of nitrogen on the corrosion behavior of austenitic stainless steels, Corrosion Science 44 (2002) 2393–2407.

[Baker, 1993] M. A. Baker, J. E. Castle, The initiation of pitting corrosion at MnS inclusions, Corrosion Science 34 (1993) 667–682.

[Bardwell, 1991] J. A. Bardwell, G. I. Sproule, D. F. Mitchell, B. MacDougall, M. J. Graham, Nature of the passive film on Fe-Cr alloys as studied by ^{18}O Secondary Ion Mass Spectrometry: reduction of the prior film and stability to *ex situ* surface analysis, Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 87 (1991) 1011–1019.

[Bardwell, 1992] J. A. Bardwell, G. I. Sproule, B. MacDougall, M. J. Graham, A. J. Davenport, H. S. Isaacs, *In situ* XANES detection of Cr(VI) in the passive film on Fe-26Cr, Journal of the Electrochemical Society 139 (1992) 371–373.

[Baroux, 2014] B. Baroux, Le phénomène de passivité, in La corrosion des métaux – Passivité et corrosion localisée, Collection : Technique et Ingénierie, Dunod, Paris (2014) 119–138.

[Bautista, 2009] A. Bautista, G. Blanco, F. Velasco, A. Gutiérrez, L. Soriano, F.J. Palomares, H. Takenouti, Changes in the passive layer of corrugated austenitic stainless steel of low nickel content due to exposure to simulated pore solutions, Corrosion Science 51 (2009) 785–792.

[Beech, 1995] I. B. Beech, C. W. S. Cheung, Interactions of exopolymers produced by sulphate-reducing bacteria with metal ions, International Biodeterioration & Biodegradation 35 (1995) 59–72.

[Beech, 1998] I. B. Beech, V. Zinkevich, R. Tapper, R. Gubner, Direct involvement of an extracellular complex produced by a marine sulfate-reducing bacterium in deterioration of steel, Geomicrobiology Journal 15 (1998) 121–134.

[Beech, 1999a] I. B. Beech, C. C. Gaylarde, Recent advances in the study of biocorrosion – An overview, Revista de Microbiologia 30 (1999) 177–190.

[Beech, 1999b] I. Beech, L. Hanjagsit, M. Kalaji, A. L. Neal, V. Zinkevich, Chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 in continuous culture, Microbiology 145 (1999) 1491–1497.

[Beech, 1999c] I. B. Beech, V. Zinkevich, R. Tapper, R. Gubner, R. Avci, Study of the interaction of sulphate-reducing bacteria exopolymers with iron using X-ray photoelectron spectroscopy and time-of-flight secondary ionisation mass spectrometry, Journal of Microbiological Methods 36 (1999) 3–10.

[Beech, 2000a] I. B. Beech, V. Zinkevich, L. Hanjangsit, R. Gubner, R Avci, The effect of *Pseudomonas* NCIMB 2021 biofilm on AISI 316 stainless steel, Biofouling 15 (2000) 3–12.

[Beech, 2000b] I. B. Beech, R. Gubner, V. Zinkevich, L. Hanjangsit, R. Avci, Characterisation of conditioning layers formed by exopolymeric substances of *Pseudomonas* NCIMB 2021 on surfaces of AISI 316 stainless steel, Biofouling 16 (2000) 93–104.

[Beech, 2002] I. B. Beech, J. R. Smith, A. A. Steele, I. Penegar, S. A. Campbell, The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 23 (2002) 231–247.

[Beech, 2004a] I. B. Beech, J. Sunner, Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals, Current Opinion in Biotechnology 15 (2004) 181–186.

[Beech, 2004b] I. B. Beech, Corrosion of technical materials in the presence of biofilm – current understanding and state-of-the art methods of study, International Biodeterioration & Biodegradation 53 (2004) 177–183.

[Beech, 2005] I. B. Beech, J. A. Sunner, K. Hiraoka, Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes, International Microbiology 8 (2005) 157–168.

[Benson, 1984] B. B. Benson, D. Krause Jr., The concentration and isotopic fractionation of oxygen dissolved in freshwater and seawater in equilibrium with the atmosphere, Limnology and Oceanography 29 (1984) 620–632.

[Betova, 2002a] I. Betova, M. Bojinov, T. Laitinen, K. Mäkelä, P. Pohjanne, T. Saario, The transpassive dissolution mechanism of highly alloyed stainless steels. I. Experimental results and modelling procedure, Corrosion Science 44 (2002) 2675–2697.

[Betova, 2002b] I. Betova, M. Bojinov, T. Laitinen, K. Mäkelä, P. Pohjanne, T. Saario, The transpassive dissolution mechanism of highly alloyed stainless steels. II. Effect of pH and solution anion on the kinetics, Corrosion Science 44 (2002) 2699–2723.

[Beverskog, 1999] B. Beverskog, I. Puigdomenech, Pourbaix diagrams for the ternary system of iron-chromium-nickel, Corrosion 55 (1999) 1077–1087.

[Biesinger, 2004] M. C. Biesinger, C. Brown, J. R. Mycroft, R. D. Davidson, N. S. McIntyre, X-ray photoelectron spectroscopy studies of chromium compounds, Surface and Interface Analysis 36 (2004) 1550–1563.

[Biesinger, 2011] M. C. Biesinger, B. P. Payne, A. P. Grosvenor, L. W. M. Lau, A. R. Gerson, R. S. C. Smart, Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni, Applied Surface Science 257 (2011) 2717–2730.

[Bishop, 1995] P. L. Bishop, T. C. Zhang, Y.-C. Fu, Effects of biofilm structure, microbial distributions and mass transport on biodegradation processes, Water Science and Technology 31 (1995) 143–152.

[Block, 2016] J.-C. Block, G. Francius, Voyage dans l'espace intercellulaire des biofilms : nature, cohésion et fonctions des exopolymères, in Interactions matériaux-microorganismes : Bétons et métaux plus résistants à la biodétérioration, Christine Lors, Françoise Feugeas, Bernard Tribollet, EDP Sciences (2016) 235–151.

[Böhmler, 2015] J. Böhmler, H. Haidara, A. Ponche, L. Ploux, Impact of chemical heterogeneities of surfaces on colonization by bacteria, ACS Biomaterials Science and Engineering 1 (2015) 693–704.

[Boonaert, 2000] C. J. P. Boonaert, P. G. Rouxhet, Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties, Applied and Environmental Microbiology 66 (2000) 2548–2554.

[Bonningtonn, 2014] K. E. Bonnington, M. J. Kuehn, Protein selection and export via outer membrane vesicles, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1843 (2014) 1612–1619.

[Bousta, 2016] F. Bousta, Biodétérioration des œuvres d'art, in Interactions matériaux-microorganismes : Bétons et métaux plus résistants à la biodétérioration, Christine Lors, Françoise Feugeas, Bernard Tribollet, EDP Sciences (2016) 327–345.

[Branda, 2005] S. S. Branda, Å. Vik, L. Friedman, and R. Kolter, Biofilms: the matrix revisited, Trends in Microbiology 13 (2005) 20–26.

[Brian-Jaisson, 2016] F. Brian-Jaisson, M. Molmeret, A. Fahs, L. Guentas-Dombrowsky, G. Culioli, Y. Blache, S. Cérantol, A. Ortalo-Magné, Characterization and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances produced by the marine biofilm-forming bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* strain TC14, Biofouling 32 (2016) 547–560.

[Brooks, 1986] A. R. Brooks, C. R. Clayton, K. Doss, Y. C. Lu, On the role of Cr in the passivity of stainless steel, Journal of the Electrochemical Society 133 (1986) 2459–2464.

[Brox, 1988] B. Brox, I. Olefjord, ESCA Studies of MoO_2 and MoO_3, Surface and Interface Analysis 13 (1988) 3–6.

[Bryant, 1990] R. D. Bryant, Edward J. Laishley, The role of hydrogenase in anaerobic biocorrosion, Canadian Journal of Microbiology 36 (1990) 259–264.

[Bulasem, 2002] J. P. Busalmen, M. Vázquez, S. R. de Sánchez, New evidences on the catalase mechanism of microbial corrosion, Electrochimica Acta 47 (2002) 1857–1865.

– C –

[Cabeen, 2005] M. T. Cabeen, C. Jacobs-Wagner, Bacterial cell shape, Nature Reviews Microbiology 3 (2005) 601–610.

[Cabrera, 1948] N. Cabrera, N. F. Mott, Theory of the oxidation of metals, Reports on Progress in Physics 12 (1948) 163–184.

[Cadosch, 2009] D. Cadosch, E. Chan, O. P. Gautschi, H.-P. Simmen, L. Filgueira, Bio-corrosion of stainless steel by osteoclasts—in vitro evidence, Journal of Orthopaedic Research 27 (2009) 841–846.

[Calinsky, 1989] C. Calinski, H.-H. Strehblow, ISS depth profiles of the passive layer on Fe/Cr alloys, Journal of the Electrochemical Society 136 (1989) 1328–1331.

[Castle, 1989] J. E. Castle, J. H. Qiu, A co-ordinated study of the passivation of alloy steels by Plasma Source Mass Spectrometry and X-ray Photoelectron Spectroscopy – I. Characterization of the passive film, Corrosion Science 29 (1989) 591–603.

[Castle, 1990] J. E. Castle, J. H. Qiu, The application of ICP-MS and XPS to studies of ion selectivity during passivation of stainless steels, Journal of the Electrochemical Society 137 (1990) 2031–2038.

[Chamritski, 2004] I. G. Chamritski, G. R. Burns, B. J. Webster, N. J. Laycock, Effect of Iron-Oxidizing Bacteria on pitting of stainless steel, Corrosion 60 (2004) 658–669.

[Charles, 2010] J. Charles, P. Chemelle, The history of duplex developments, nowadays DSS properties and duplex market future trends, Duplex stainless steel, Conference Proceedings, Beaune, France (2010).

[Chen, 1997] G. Chen, C. R. Clayton, Influence of Sulfate-Reducing Bacteria on the passivity of type 304 austenitic stainless steel, Journal of The Electrochemical Society 144 (1997) 3140–3146.

[Chen, 1998] G. Chen, C. R. Clayton, The influence of Sulfate-Reducing Bacteria on the passivity of type 317L austenitic stainless steel, Journal of The Electrochemical Society 145 (1998) 1914–1922.

[Clayton, 1986] C. R. Clayton, Y. C. Lu, A bipolar model of the passivity of stainless steel: the role of Mo addition, Journal of the Electrochemical Society 133 (1986) 2465–2473.

[Clayton, 1989] C. R. Clayton, Y. C. Lu, A bipolar model of the passivity of stainless steels – III. The mechanism of MoO_4^{2-} formation and incorporation, Corrosion Science 29 (1989) 881–898.

[Clayton, 2011] C. R. Clayton, I. Olefjord, Passivity of Austenitic Stainless Steel, in Corrosion mechanisms in theory and practice, Third Edition, Edited by Philippe Marcus, CRC Press (2011) 327–347.

[Cobb, 2010] H. M. Cobb, The history of stainless steel, ASM International (2010).

[Compère, 2001] C. Compère, M.-N. Bellon-Fontaine , P. Bertrand, D. Costa, P. Marcus, C. Poleunis, C.-M. Pradier, B. Rondot, M. G. Walls, Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater, Biofouling 17 (2001) 129–145.

[Costerton, 1978] J. W. Costerton, G. G. Geesey, K.-J. Cheng, How bacteria stick, Scientific American 238 (1978) 86–95.

[Costerton, 1994] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. de Beer, D. Caldwell, D. Korber, G. James, Biofilms, the customized microniche, Journal of Bacteriology 176 (1994) 2137–2142.

[Costerton, 1995] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, H. M. Lappin-Scott, Microbial biofilms, Annual Review of Microbiology 49 (1995) 711–745.

[Costerton, 1999] J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, Science 284 (1999) 1318–1322.

[Cournet, 2010a] A. Cournet, M. Bergé, C. Roques, A. Bergel, M.-L. Délia, Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by *Pseudomonas aeruginosa*, Electrochimica Acta 55 (2010) 4902–4908.

[Cournet, 2010b] A. Cournet, M.-L. Délia, A. Bergel, C. Roques, M. Bergé, Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by a wide range of bacteria including Gram-positive, Electrochemistry Communications 12 (2010) 505–508.

[Crolet, 1992] J.-L. Crolet, From biology and corrosion to biocorrosion, Oceanologica Acta 15 (1992) 87–94.

– D –

[Dagbert, 2004] C. Dagbert, C. Compère, D. Féron, Biodétérioration des matériaux, in Prévention et lutte contre la corrosion: une approche scientifique et technique, Presses polytechniques et universitaire romandes (2004) 703–720.

[Dagbert, 2009] C. Dabgert, Biocorrosion, Techniques de l'Ingénieur COR 130 (2009).

[Dai, 2016] X. Dai, H. Wang, L.-K. Ju, G. Cheng, H. Cong, B.-M. Z. Newby, Corrosion of aluminum alloy 2024 caused by *Aspergillus niger*, International Biodeterioration & Biodegradation 115 (2016) 1–10.

[Da Silva, 2004] S. Da Silva, R. Basséguy, A. Bergel, Electron transfer between hydrogenase and 316L stainless steel: identification of a hydrogenase-catalyzed cathodic reaction in anaerobic mic, Journal of Electroanalytical Chemistry 561 (2004) 93–102.

[Davies, 1991] C. M. Davies, L. M. Evison, Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters, Journal of Applied Bacteriology 70 (1991) 265–274.

[de Beer, 1994] D. de Beer, P. Stoodley, F. Roe, Z. Lewandowski, Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport, Biotechnology and Bioengineering 43 (1994) 1131–1138.

[Dec, 2016] W. Dec, M. Mosiałek, R. P. Socha, M. Jaworska-Kik, W. Simka, J. Michalska, The effect of sulphate-reducing bacteria biofilm on passivity and development of pitting on 2205 duplex stainless steel, Electrochimica Acta 212 (2016) 225–236.

[Dec, 2017] W. Dec, M. Mosiałek, R. P. Socha, M. Jaworska-Kik, W. Simka, J. Michalska, Characterization of *Desulfovibrio desulfuricans* biofilm on high-alloyed stainless steel: XPS and electrochemical studies, Materials Chemistry and Physics 195 (2017) 28–39.

[De Cristofaro, 1997] N. De Cristofaro, M. Piantini, N. Zacchetti, The influence of temperature on the passivation behaviour of a super duplex stainless steel in a boric-borate buffer solution, Corrosion Science 39 (1997) 2181–2191.

[De Vito, 1992] E. De Vito, P. Marcus, XPS study of passive films Formed on molybdenum-implanted austenitic stainless steels, Surface and Interface Analysis 19 (1992) 403–408.

[Diawara, 2010] B. Diawara, Y.-A. Beh, P. Marcus, Nucleation and growth of oxide layers on stainless steels (FeCr) using a virtual oxide layer model, The Journal of Physical Chemistry C 114 (2010) 19299–19307.

[Diaz, 2012] B. Díaz, J. Światowska, V. Maurice, M. Pisarek, A. Seyeux, S. Zanna, S. Tervakangas, J. Kolehmainen, P. Marcus, Chromium and tantalum oxide nanocoatings prepared by filtered cathodic arc deposition for corrosion protection of carbon steel, Surface and Coatings Technology 206 (2012) 3903–3910.

[Dickinson, 1996] W. H. Dickinson, F. Caccavo Jr, Z. Lewandowski, The ennoblement of stainless steel by manganic oxide biofouling, Corrosion Science 38 (1996) 1407–1422.

[Dickinson, 1997] W. H. Dickinson, F. Caccavo, B. Olesen, Z. Lewandowski, Ennoblement of stainless steel by the manganese-depositing bacterium *Leptothrix discophor*, Applied and Environmental Microbiology 63 (1997) 2502–2506.

[Dinh, 2004] H. T. Dinh, J. Kuever, M. Mußmann, A. W. Hassel, M. Stratmann, F. Widdel, Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms, Nature 427 (2004) 829–832.

[Dong, 2011] Z. H. Dong, H. F. Liu, Influence of EPS isolated from thermophilic sulphate-reducing bacteria on carbon steel corrosion, Biofouling 27 (2011) 487–495.

[Donik, 2009a] Č. Donik, A. Kocijan, J. T. Grant, M. Jenko, A. Drenik, B. Pihlar, XPS study of duplex stainless steel oxidized by oxygen atoms, Corrosion Science 51 (2009) 827–832.

[Donik, 2009b] Č. Donik, A. Kocijan, D. Mandrino, I. Paulin, M. Jenko, B. Pihlar, Initial oxidation of duplex stainless steel, Applied Surface Science 255 (2009) 7056–7061.

[Donik, 2010] Č. Donik, D. Mandrino, M. Jenko, Depth profiling and angular dependent XPS analysis of ultra thin oxide film on duplex stainless steel, Vacuum 84 (2010) 1266–1269.

[Donik, 2011] Č. Donik, A. Kocijan, D. Mandrino, M. Jenko, X-Ray Photoelectron Spectroscopy depth profiling of electrochemically prepared thin oxide layers on duplex stainless steel, Metallurgical and Materials Transactions B 42 (2011) 1044–1050.

[Donlan, 2002a] R. M. Donlan, Biofilms: microbial life on surfaces, Emerging Infectious Diseases 8 (2002) 881–890.

[Donlan, 2002b] R. M. Donlan, J. W. Costerton, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, Clinical Microbiology Reviews 15 (2002) 167–193.

[Dowling, 1999] N. J. E. Dowling, Y.-H. Kim, S.-K. Ahn, Y.-D. Lee, Effect of alloying elements and residuals on corrosion resistance of type 444 stainless steel, Corrosion 55 (1999) 187–199.

[Dubiel, 2002] M. Dubiel, C. H. Hsu, C. C. Chien, F. Mansfeld, D. K. Newman, Microbial iron respiration can protect steel from corrosion, Applied and Environmental Microbiology 68 (2002) 1440–1445.

[Dumas, 2007] C. Dumas, A. Mollica, D. Féron, R. Basséguy, L. Etcheverry, A. Bergel, Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials, Electrochimica Acta 53 (2007) 468–473.

[Dumas, 2008a] C. Dumas, R. Basseguy, A. Bergel, Electrochemical activity of *Geobacter sulfurreducens* biofilms on stainless steel anodes, Electrochimica Acta 53 (2008) 5235–5241.

[Dumas, 2008b] C. Dumas, A. Mollica, D. Féron, R. Basseguy, L. Etcheverry, A. Bergel, Checking graphite and stainless anodes with an experimental model of marine microbial fuel cell, Bioresource Technology 99 (2008) 8887–8894.

– E –

[Eashwar, 2015] M. Eashwar, G. Sreedhar, A. L. Kumar, R. Hariharasuthan, J. Kennedy, The enrichment of surface passive film on stainless steel during biofilm development in coastal seawater, Biofouling 31 (2015) 511–525.

[Eklund, 1974] G. S. Eklund, Initiation of pitting at sulfide inclusions in stainless steel, Journal of the Electrochemical Society 121 (1974) 467–473.

[Elbiache, 1992] A. Elbiache, P. Marcus, The role of molybdenum in the dissolution and the passivation of stainless steels with adsorbed sulphur, Corrosion Science 33(1992) 261–269.

[El-Kirat-Chatel, 2017] S. El-Kirat-Chatel, A. Puymege, T. H. Duong, P. Van Overtvelt, C. Bressy, L. Belec, Y. F. Dufrêne, M. Molmeret, Phenotypic heterogeneity in attachment of marine bacteria toward antifouling copolymers unraveled by AFM, Frontiers in Microbiology 8 (2017) 1–12.

[Erazmus-Vignal, 2015] P. Erazmus-Vignal, V. Vignal, S. Saedlou, F. Krajcarz, Corrosion behaviour of sites containing $(Cr, Fe)_2N$ particles in thermally aged duplex stainless steel studied using capillary techniques, atomic force microscopy and potentiostatic pulse testing method, Corrosion Science 99 (2015) 194–204.

[Esbelin, 2018] J. Esbelin, T. Santos, M. Hébraud, Desiccation: An environmental and food industry stress that bacteria commonly face, Food Microbiology 69 (2018) 82–88.

– F –

[Fajardo, 2010] S. Fajardo, D. M. Bastidas, M. P. Ryan, M. Criado, D. S. McPhail, J. M. Bastidas, Low-nickel stainless steel passive film in simulated concrete pore solution: A SIMS study, Applied Surface Science 256 (2010) 6139–6143.

[Fajardo, 2014] S. Fajardo, D. M. Bastidas, M. P. Ryan, M. Criado, D. S. McPhail, R. J. H. Morris, J. M. Bastidas, Low energy SIMS characterization of passive oxide films formed on a low-nickel stainless steel in alkaline media, Applied Surface Science 288 (2014) 423–429.

[Fehlner, 1970] F. P. Fehlner, N. F. Mott, Low-temperature oxidation, Oxidation of Metals 2 (1970) 59–99.

[Femenia, 2001] M. Femenia, J. Pan, C. Leygraf, P. Luukkonen, *In situ* study of selective dissolution of duplex stainless steel 2205 by electrochemical scanning tunnelling microscopy, Corrosion Science 43 (2001) 1939–1951.

[Femenia, 2002] M. Femenia, J. Pan, C. Leygraf, *In situ* local dissolution of duplex stainless steels in 1 M H_2SO_4 + 1 M NaCl by Electrochemical Scanning Tunneling Microscopy, Journal of The Electrochemical Society 149 (2002) B187–B197.

[Femenia, 2003] M. Femenia, C. Canalias, J. Pan, C. Leygraf, Scanning Kelvin Probe Force Microscopy and Magnetic Force Microscopy for characterization of duplex stainless steels, Journal of The Electrochemical Society 150 (2003) B274–B281.

[Femenia, 2004] M. Femenia, J. Pan, C. Leygraf, Characterization of ferrite-austenite boundary region of duplex stainless steels by SAES, Journal of The Electrochemical Society 151 (2004) B581–B585.

[Féron, 2016] D. Féron, Choix des matériaux métalliques et biocorrosion, in Interactions matériaux-microorganismes : Bétons et métaux plus résistants à la biodétérioration, Christine Lors, Françoise Feugeas, Bernard Tribollet, EDP Sciences (2016) 349–370.

[Flemming, 1998] C. A. Flemming, R. J. Palmer Jr, A. A. Arrage, H. C. Van der Mei, D. C. White, Cell surface physicochemistry alters biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide mutants, Biofouling 13 (1998) 213–231.

[Flemming, 2002] H.-C. Flemming, Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures, Applied Microbiology and Biotechnology 59 (2002) 629–640.

[Flemming, 2008] H.-C. Flemming, Why microorganisms live in biofilms and the problem of biofouling, in Marine and Industrial Biofouling, Edited by H.-C. Flemming, P. Sriyutha Murthy, R. Venkatesan and K. E. Cooksey, Springer Series on Biofilms, Volume 4 (2008) 3–12.

[Flemming, 2010] H.-C. Flemming, J. Wingender, The biofilm matrix, Nature Reviews Microbiology 8 (2010) 623–633.

[Flemming, 2011] H. C. Flemming, The perfect slime, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 86 (2011) 251–259.

[Flemming, 2013] H. C. Flemming, M. Meier, T. Schild, Mini-review: microbial problems in paper production, Biofouling 29 (2013) 683–696.

[Flemming, 2016] H.-C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice, S. Kjelleberg, Biofilms: an emergent form of bacterial life, Nature Reviews Microbiology 14 (2016) 563–575.

[Fletcher, 1979] M. Fletcher, G. I. Loeb, Influence of Substratum Characteristics on the attachment of a marine *Pseudomonad* to solid surfaces, Applied and Environmental Microbiology 37 (1979) 67–72.

[Frankel, 1998] G. S. Frankel, Pitting corrosion of metals: A review of the critical factors, Journal of the Electrochemical Society 145 (1998) 2186–2198.

[Frankenthal, 1976] R. P. Frankenthal, D. L. Malm, Analysis of the air-formed oxide film on a series of iron-chromium alloys by Ion-Scattering Spectrometry, Journal of the Electrochemical Society 123 (1976) 186–191.

[Frateur, 2007] I. Frateur, J. Lecoeur, S. Zanna, C.-O. A. Olsson, D. Landolt, P. Marcus, Adsorption of BSA on passivated chromium studied by a flow-cell EQCM and XPS, Electrochimica Acta 52 (2007) 7660–7669.

[Fredriksson, 2010] W. Fredriksson, K. Edström, C.-O. A. Olsson, XPS analysis of manganese in stainless steel passive films on 1.4432 and the lean duplex 1.4162, Corrosion Science 52 (2010) 2505–2510.

[Fredriksson, 2012] W. Fredriksson, S. Malmgren, T. Gustafsson, M. Gorgoi, K. Edström, Full depth profile of passive films on 316L stainless steel based on high resolution HAXPES in combination with ARXPS, Applied Surface Science 258 (2012) 5790–5797.

– G –

[Garfias, 2000] L. F. Garfias and D. J. Siconolfi, *In Situ* high-resolution microscopy on duplex stainless steels, Journal of The Electrochemical Society 147 (2000) 2525–2531.

[Garfias-Mesias, 1996] L. F. Garfias-Mesias, J. M. Skyes, C. D.S. Tuck, The effect of phase compositions on the pitting corrosion of 25 Cr duplex stainless steel in chloride solutions, Corrosion Science 38 (1996) 1319–1330.

[Garfias-Mesias, 1999] L. F. Garcias-Mesias, J. M. Sykes, Metastable pitting in 25 Cr duplex stainless steel, Corrosion Science (1999) 959–987.

[Gaylarde, 1987] C. C. Gaylarde, H. A. Videla, Localised corrosion induced by a marine *Vibrio*, International Biodetetioration 23 (1987) 91–104.

[Geesey, 1988] G. G. Geesey, L. Jang, J. G. Jolley, M. R. Hankins, T. Iwaoka, P. R. Griffiths, Binding of metal ions by extracellular polymers of biofilm bacteria, Water Science and Technology 20 (1988) 161–165.

[Geesey, 1996] G. G. Geesey, R. J.Gillis, R. Avci, D. Daly, M. Hamilton, P. Shope, G. Harkin, The influence of surface features on bacterial colonization and subsequent substratum chemical changes of 316L stainless steel, Corrosion Science 38 (1996) 73–95.

[Ghafoor, 2011] A. Ghafoor, I. D. Hay, B. H. A. Rehm, Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture, Applied and Environmental Microbiology 77 (2011) 5238–5246.

[Givskov, 1994] M. Givskov, L. Eberl, S. Møller, L. K. Poulsen, S. Molin, Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: Analysis of general cross-protection, cell shape, and macromolecular content, Journal of Bacteriology 176 (1994) 7–14.

[Goetz, 1984] R. Goetz, D. Landolt, The influence of chromium content and potential on the surface composition of Fe–Cr–Mo alloys studied by AES, Electrochimica Acta 29 (1984) 667–676.

[Gong, 2016] X. Gong, E. Garcia-Robledo, A. Schramm, N. P. Revsbech, Respiratory kinetics of marine bacteria exposed to decreasing oxygen concentrations, Applied and Environmental Microbiology 82 (2016) 1412–1422.

[González, 1998] J. E. G. González, F. J. H.Santana, J. C. Mirza-Rosca, Effect of bacterial biofilm on 316 SS corrosion in natural seawater by EIS, Corrosion Science 40 (1998) 2141–2154.

[Grabke, 1996] H. J. Grabke, The role of nitrogen in the corrosion of iron and steels, ISIJ International 36 (1996) 777–786.

[Gram, 1884] H. C. Gram, Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten, Fortschritte der Medizin 2 (1884) 185–189.

[Groenewold, 2013] G. S. Groenewold, R. Avci, R. V. Fox, M. Deliorman, Z. Suo, L. Kellerman, Characterization of arsenic contamination on rust from ton containers, Industrial and Engineering Chemistry Research 52 (2013) 1396–1404.

[Gubner, 2000] R. Gubner, I. B. Beech, The effect of extracellular polymeric substances on the attachment of *Pseudomonas* NCIMB 2021 to AISI 304 and 316 stainless steel, Biofouling 15 (2000) 25–36.

[Guo, 2014] L. Q. Guo, M. C. Lin, L. J. Qiao, A. A. Volinsky, Duplex stainless steel passive film electrical properties studied by in situ current sensing atomic force microscopy, Corrosion Science 78 (2014) 55–62.

– H –

[Ha, 2009] H. Y. Ha, H. J. Jang, H. S. Kwon, S. J. Kim, Effects of nitrogen on the passivity of Fe–20Cr alloy, Corrosion Science 51 (2009) 48–53.

[Ha, 2014] H.-Y. Ha, M.-H. jang, T.-H. Lee, J. Moon, Interpretation of the relation between ferrite fraction and pitting corrosion resistance of commercial 2205 duplex stainless steel, Corrosion Science 89 (2014) 154–162.

[Hakiki, 1998] N. E. Hakikia M. Da Cunha Belo, A. M. P. Simões, M. G. S. Ferreira, Semiconducting properties of passive films formed on stainless steels influence of the alloying elements, Journal of The Electrochemical Society 145 (1998) 3821–3829.

[Halada, 1991] G. P. Halada, C. R. Clayon, Photoreduction of hexavalent chromium during X-ray Photoelectron Spectroscopy analysis of electrochemical and thermal films, Journal of The Electrochemical Society 138 (1991) 2921–2927.

[Halada, 1996] G. P. Halada, D. Kim, C. R. Clayton, Influence of nitrogen on electrochemical passivation of high-nickel stainless steels and thin molybdenum-nickel films, Corrosion 52 (1996) 36–46.

[Hall-Stoodley, 2004] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, P. Stoodley, Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, Nature Reviews Microbiology 2 (2004) 95–108.

[Halsall, 2000] J. F. Halsall, M. Kalaji, A. L. Neal, Adsorption of bacterial capsular exopolymers to hydrophilic and hydrophobic surfaces: A 2D-FTIR analysis, Biofouling 16 (2000) 105–118.

[Hamada, 2010] E. Hamada, K. Yamada, M. Nagoshi, N. Makiishi, K Sato, T. Ishii, K. Fukuda, S. Ishikawa, T. Ujiro, Direct imaging of native passive film on stainless steel by aberration corrected STEM, Corrosion Science 52 (2010) 3851–3854.

[Hamilton, 2003] W. A. Hamilton, Microbially Influenced Corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis, Biofouling 19 (2003) 65–76.

[Hamm, 2002a] D. Hamm, C.-O. A. Olsson, D. Landolt, Effect of chromium content and sweep rate on passive film growth on iron–chromium alloys studied by EQCM and XPS, Corrosion Science 44 (2002) 1009–1025.

[Hamm, 2002b] D. Hamm, K. Ogle, C.-O. A. Olsson, S. Weber, D. Landolt, Passivation of Fe–Cr alloys studied with ICP-AES and EQCM, Corrosion Science 44 (2002) 1443–1456.

[Hamzah, 2013] E. Hamzah, M. Z. Hussain, Z. Ibrahim, A. Abdolahi, Influence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria on corrosion resistance of 304 stainless steel, Corrosion Engineering Science and Technology 48 (2013) 116–120.

[Hashimoto, 1979a] K. Hashimoto, K. Asami, K. Teramoto, An X-ray Photo-electron Spectroscopy study on the role of molybdenum in increasing the corrosion resistance of ferritic stainless steels in HCl, Corrosion Science 19 (1979) 3–14.

[Hashimoto, 1979b] K. Hashimoto, K. Asami, An X-ray Photo-electron Spectroscopic study of the passivity of ferritic 19Cr stainless steel in 1 N HCl, Corrosion Science 19 (1979) 251–260.

[Hashimoto, 2007] K. Hashimoto, K. Asami, A. Kawashima, H. Habazaki, E. Akiyama, The role of corrosion-resistant alloying elements in passivity, Corrosion Science 49 (2007) 42–52.

[Haudrechy, 1994] P. Haudrechy, J. Foussereau, B. Mantout, B. Baroux, Nickel release from nickel-plated metals and stainless steels, Contact Dermatitis 31 (1994) 249–255.

[Haugan, 2017] E. B. Haugan, M. Næss, C. Torres Rodriguez, R. Johnsen, M. Iannuzzi, Effect of tungsten on the pitting and crevice corrosion resistance of type 25Cr super duplex stainless steels, Corrosion 73 (2017) 53–67.

[Haupt, 1995] S. Haupt, H.-H. Strehblow, A combined surface analytical and electrochemical study of the formation of passive layers on Fe/Cr alloys in 0.5 M H2SO4, Corrosion Science 37 (1995) 43–54.

[He, 2009] H. He, T. Zhang, C. Zhao, K. Hou, G. Meng, Y. Shao, F. Wang, Effect of alternating voltage passivation on the corrosion resistance of duplex stainless steel, Journal of Applied Electrochemistry 39 (2009) 737–745.

[He, 2016] X. He, J. Wang, L. Abdoli, Hu. Li, Mg^{2+}/Ca^{2+} promotes the adhesion of marine bacteria and algae and enhances following biofilm formation in artificial seawater, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 146 (2016) 289–295.

[Heine, 1990] B. Heine, R. Kirchheim, Dissolution rates of iron and chromium and Fe–Cr–alloys in the passive state, Corrosion Science 31 (1990) 533–538.

[Herisson, 2016] J. Herisson, Biodétérioration des matériaux cimentaires dans les ouvrages d'assainissement, in Interactions matériaux-microorganismes : Bétons et métaux plus résistants à la biodétérioration, Christine Lors, Françoise Feugeas, Bernard Tribollet, EDP Sciences (2016) 303–325.

[Hermas, 2005] A. A. Hermas, M. Nakayama, K. Ogura, Enrichment of chromium-content in passive layers on stainless steel coated with polyaniline, Electrochimica Acta 50 (2005) 2001–2007.

[Hernandez, 1994] G. Hernandez, V. Kucera, D. Thierry, A. Pedersen, M. Hermansson, Corrosion inhibition of steel by bacteria, Corrosion 50 (1994) 603–608.

[Herrera, 2009] L. K. Herrera, H. A. Videla, Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel, International Biodeterioration & Biodegradation 63 (2009) 891–895.

[Högström, 2013] J. Högström, W. Fredriksson, K. Edstrom, F. Björefors, L. Nyholm, C.-O. A. Olsson, Cation profiling of passive films on stainless steel formed in sulphuric and acetic acid by deconvolution of angle-resolved X-ray photoelectron spectra, Applied Surface Science 284 (2013) 700– 714.

[Hoppe, 1994] H.-W. Hoppe, S. Haupt, H.-H. Strehblow, Combined surface analytical and electrochemical study of the formation of passive layers on Fe/Cr alloys in 1 M NaOH, Surface and Interface Analysis 21 (1994) 514–525.

[Hwang, 2012] G. Hwang, S. Kang, M. G. El-Din, Y. Liu, Impact of an extracellular polymeric substance (EPS) precoating on the initial adhesion of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*, Biofouling 28 (2012) 525–238.

[Hwang, 2013] G. Hwang, J. Liang, S. Kang, M. Tong, Y. Liu, The role of conditioning film formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhesion to inert surfaces in aquatic environments, Biochemical Engineering Journal 76 (20103) 90–98.

– I –

[Iken, 2008] H. Iken, L. Etcheverry, A. Bergel, RR. Basseguy, Local analysis of oxygen reduction catalysis by scanning vibrating electrode technique: A new approach to the study of biocorrosion, Electrochimica Acta 54 (2008) 60–65.

[Ilevbare, 2001] G. O. Ilevbare, G. T. Burstein, The role of alloyed molybdenum in the inhibition of pitting corrosion in stainless steels, Corrosion Science 43 (2001) 485–513.

[Ilhan-Sungur, 2007] E. Ilhan-Sungur, N. Cansever, A. Cotuk, Microbial corrosion of galvanized steel by a freshwater strain of sulphate reducing bacteria (*Desulfovibrio* sp.), Corrosion Science 49 (2007) 1097–1109.

[Ilhan-Sungur, 2010] E. Ilhan-Sungur, A. Çotuk, Microbial corrosion of galvanized steel in a simulated recirculating cooling tower system, Corrosion Science 52 (2010) 161–171.

[Ilhan-Sungur, 2015] E. Ilhan-Sungur, T. Unsal-Istek, N. Cansever, Microbiologically influenced corrosion of galvanized steel by *Desulfovibrio* sp. and *Desulfosporosinus* sp. in the presence of Ag–Cu ions, Materials Chemistry and Physics 162 (2015) 839–851.

[Ismail, 1999] K. M. Ismail, A. Jayaraman, T. K. Wood, J. C. Earthman, The influence of bacteria on the passive film stability of 304 stainless steel, Electrochimica Acta 44 (1999) 4685–4692.

[Ithurbide, 2007] A. Ithurbide, I. Frateur, A. Galtayries, P. Marcus, XPS and flow-cell EQCM study of albumin adsorption on passivated chromium surfaces: Influence of potential and pH, Electrochimica Acta 53 (2007) 1336–1345.

– J –

[Jalili, 2004] N. Jalili, K. Laxminarayana, A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences, Mechatronics 14 (2004) 907–945.

[Jargelius-Pettersson, 1998a] R. F. A. Jargelius-Pettersson, Application of the pitting resistance equivalent concept to some highly alloyed austenitic stainless steels, Corrosion 54 (1998) 162–168.

[Jargelius-Pettersson, 1998b] R. F. A. Jargelius-Pettersson, B. G. Pound, Examination of the role of molybdenum in passivation of stainless steels using AC Impedance Spectroscopy, Journal of The Electrochemical Society145 (1998) 1462–1469.

[Jargelius-Pettersson, 1999] R. F. A. Jargelius-Pettersson, Electrochemical investigation of the influence of nitrogen alloying on pitting corrosion of austenitic stainless steels, Corrosion Science 30 1639–1664.

[Javed, 2014] M. A. Javed, P. R. Stoddart, E. A. Palombo, S. L. McArthur, S. A. Wade, Inhibition or acceleration: Bacterial test media can determine the course of microbiologically influenced corrosion, Corrosion Science 86 (2014) 149–158.

[Jayaraman, 1999] A. Jayaraman, F. B. Mansfeld, T. K. Wood, Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms by expressing the antimicrobial peptides indolicidin and bactenecin, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 22 (1999) 167–175.

[Jia, 2017] R. Jia, D. Yang, D. Xu, T. Gu, Electron transfer mediators accelerated the microbiologically influence corrosion against carbon steel by nitrate reducing *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, Bioelectrochemistry 118 (2017) 38–46.

[Jiang, 2017] R. Jiang, Y. Wang, X. Wen, C. Chen, J. Zhao, Effect of time on the characteristics of passive film formed on stainless steel, Applied Surface Science 412 (2017) 214–222.

[Jinglong, 2015] L. Jinlong, L. Tongxiang, W. Chen, D. Limin, Comparison of corrosion properties of passive films formed on coarse grained and ultrafine grained AISI 2205 duplex stainless steels, Journal of Electroanalytical Chemistry 757 (2015) 263–269.

[Jinglong, 2016] L. Jinlong, L. Tongxiang, D. Limin, W. Chen, Influence of sensitization on microstructure and passive property of AISI 2205 duplex stainless steel, Corrosion Science 104 (2016) 144–151.

[Johansson, 1999] L.-S. Johansson, T. Saastamoinen, Investigating early stages of biocorrosion with XPS: AISI 304 stainless steel exposed to *Burkholderia* species, Applied Surface Science 144–145 (2009) 244–248.

[Jones, 2001] L. J. F. Jones, R. Carballido- López, J. Errington, Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*, Cell 104 (2001) 913–922.

[Jung, 2012] R.-H. Jung, H. Tsuchiya, S. Fujimoto, XPS characterization of passive films formed on Type 304 stainless steel in humid atmosphere, Corrosion Science 58 (2012) 62–68.

– K –

[Keller, 2004] P. Keller, H.-H. Strehblow, XPS investigations of electrochemically formed passive layers on Fe/Cr-alloys in 0.5 M H_2SO_4, Corrosion Science 46 (2004) 1939–1952.

[Kempf, 2008] D. Kempf, V. Vignal, N. Martin, S. Virtanen, Relationships between strain, microstructure and oxide growth at the nano- and microscale, Surface and Interface Analysis 40 (2008) 43–50.

[Kim, 1998] D. Kim, S. V. Kagwade, C. R. Clayton, Identification of Mo(V) commonly observed in passive films formed on stainless steels, Surface and Interface Analysis 26 (1998) 155–159.

[Kirchheim, 1989] R. Kirchheim, B. Heine, H. Fischmeister, S. Hofmann, H. Knote, U. Stolz, The passivity of iron-chromium alloys, Corrosion Science 29 (1989) 899–917.

[Kirchheim, 1990] R. Kirchheim, B. Heine, S. Hofmann, H. Hofsäss, Compositional changes of passive films due to different transport rates and preferential dissolution, Corrosion Science 31 (1990) 573–578.

[Kjelleberg, 1982] S. Kjelleberg, B. A. Humphrey, K. C. Marshall, Effect of interfaces on small, starved marine bacteria, Applied and Environmental Microbiology 43 (1982) 1166–1172.

[Kocijan, 2011] A. Kocijan, D. K. Merl, M. Jenko, The corrosion behaviour of austenitic and duplex stainless steels in artificial saliva with the addition of fluoride, Corrosion Science 53 (2011) 776–783.

[Kruger, 1988] J. Kruger, Passivity of metals – a materials science perspective, International Materials Reviews 33 (1988) 113–130.

[Kulakov, 2002] L. A. Kulakov, M. B. McAlister, K. L. Ogden, M. J. Larkin, J. F. O'Hanlon, Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems, Applied and Environmental Microbiology 68 (2002) 1548–1555.

– L –

[Lai, 2002] M. E. Lai, A. Bergel, Direct electrochemistry of catalase on glassy carbon electrodes, Bioelectrochemistry 55 (2002) 157–160.

[Landoulsi, 2008a] J. Landoulsi, M. J. Genet, C. Richard, K. El Kirat, P. G. Rouxhet, S. Pulvin, Ennoblement of stainless steel in the presence of glucose oxidase: Nature and role of interfacial processes, Journal of Colloid and Interface Science 320 (2008) 508–519.

[Landoulsi, 2008b] J. Landoulsi, M. J. Genet, C. Richard, K. El Kirat, S. Pulvin, P. G. Rouxhet, Evolution of the passive film and organic constituents at the surface of stainless steel immersed in fresh water, Journal of Colloid and Interface Science 318 (2008) 278–289.

[Landoulsi, 2009] J. Landoulsi, C. Dagbert, C. Richard, R. Sabot, M. Jeannin, K. El Kirat, S. Pulvin, Enzyme-induced ennoblement of AISI 316L stainless steel: Focus on pitting corrosion behavior, Electrochimica Acta 54 (2009) 7401–7406.

[Landoulsi, 2011] J. Landoulsi, K. E. Cooksey, V. Dupres, Review – Interactions between diatoms and stainless steel: focus on biofouling and biocorrosion, Biofouling 27 (2011) 1105–1124.

[Lappin-Scott, 2014] H. Lappin-Scott, S. Burton, P. Stoodley, Revealing a world of biofilms — the pioneering research of Bill Costerton, Nature Reviews Microbiology 12 (2014) 781–787

[Laspidou, 2002] C. S. Laspidou, B. E. Rittmann, A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass, Water Research 36 (2002) 2711–2720.

[Lawrence, 1991] J. R. Lawrence, D. R. Korber, B. D. Hoyle, J. W. Costerton, D. E. Caldwell, Optical sectioning of microbial biofilms, Journal of Bacteriology 173 (1991) 6558–6567.

[Le Bozec, 2001] N. Le Bozec, C. Compère, M. L'Her, A. Laouenan, D. Costa, P. Marcus, Influence of stainless steel surface treatment on the oxygen reduction reaction in seawater, Corrosion Science 43 (2001) 765–786.

[Lee, 2003] A. K. Lee, D. K. Newman, Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes, Applied Microbiology Biotechnology 62 (2003) 134–139.

[Lee, 2014] J.-S. Lee, K. Fushimi, T. Nakanishi, Y. Hasegawa, Y.-S. Park, Corrosion behaviour of ferrite and austenite phases on super duplex stainless steel in a modified green-death solution, Corrosion Science 89 (2014) 111–117.

[Leistner, 2013] K. Leistner, C. Toulemonde, B. Diawara, A. Seyeux, P. Marcus, Oxide film growth kinetics on metal and alloys II. Numerical simulation of transient behavior, Journal of the Electrochemical Society 160 (2013) C197–C205.

[Leone, 2006] L. Leone, J. Loring, S. Sjöberg, P. Persson, A. Shchukarev, Surface characterization of the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*-an XPS study, Surface and Interface 38 (2006) 202–205.

[Lethola, 2006] M. J. Lehtola, M. Laxander, I. T. Miettinen, A. Hirvonen, T. Vartiainen, P. J. Martikainen, The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes, Water Research 40 (2006) 2151–2160.

[Lever, 2015] M. A. Lever, K. L. Rogers, K. G. Lloyd, J. Overmann, B. Schink, R. K. Thauer, T. M. Hoehler, B. B. Jørgensen, Life under extreme energy limitation: a synthesis of laboratory- and field-based investigations, FEMS Microbiology Reviews 39 (2015) 688–728.

[Levi, 2016] Y. Levi, Les biofilms dans la gestion de la qualité microbienne des eaux destinées à la consommation humaine en cours de distribution, in Interactions matériaux-microorganismes : Bétons et métaux plus résistants à la biodétérioration, Christine Lors, Françoise Feugeas, Bernard Tribollet, EDP Sciences (2016) 173–187.

[Lewandowski, 1997] Z. Lewandowski, W. Dickinson, W. Lee, Electrochemical interactions of biofilms with metal surfaces, Water Science and Technology 36 (1997) 295–302.

[Lewandowski, 2009] Z. Lewandowski, H. Beyenal, Mechanisms of Microbially Influenced Corrosion, in Marine and Industrial Biofouling, Edited by H.-C. Flemming, P. Sriyutha Murthy, R. Venkatesan and K. E. Cooksey, Springer Series on Biofilms, Volume 4 (2009), 35–64.

[Lewis, 2007] K. Lewis, Persister cells, dormancy and infectious disease, Nature Reviews Microbiology 5 (2007) 48–56.

[Lewis, 2010] K. Lewis, Persister cells, Annual Review of Microbiology 64 (2010) 357–372.

[Leygraf, 1979] C. Leygraf, G. Hultquist, I. Olefjord, B.-O. Elfström, V. M. Knyazheva, A. V. Plaskeyev, Y. M. Kolotyrkin, Selective dissolution and surface enrichment of alloy components of passivated Fe18Cr and Fe18Cr3Mo single crystals, Corrosion Science 19 (1979) 343–357.

[Li, 2009] F. Li, M. An, G. Liu, D. Duan, Effects of sulfidation of passive film in the presence of SRB on the pitting corrosion behaviors of stainless steels, Materials Chemistry and Physics 113 (2009) 971–976.

[Li, 2013] K. Li, M. Whitfield, K. J. Van Vliet, Beating the bugs: roles of microbial biofilms in corrosion, Corrosion Reviews 31 (2013) 73–84.

[Li, 2016a] H. Li, E. Zhou, Y. Ren, D. Zhang, D. Xu, C. Yang, H. Feng, Z. Jiang, X. Li, T. Gu, K. Yang, Investigation of microbiologically influenced corrosion of high nitrogen nickel-free stainless steel by *Pseudomonas aeruginosa*, Corrosion Science 111 (2016) 811–821.

[Li, 2016b] H. Li, E. Zhou, D. Zhang, D. Xu, J. Xia, C. Yang, H. Feng, Z. Jiang, X. Li, T. Gu, K. Yang, Microbiologically Influenced Corrosion of 2707 hyper-duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, Scientific Reports 6 (2016) 1–12.

[Li, 2017] H. Li, C. Yang, E. Zhou, C. Yang, H. Feng, Z. Jiang, D. Xu, T. Gu, K. Yang, Microbiologically influenced corrosion behavior of S32654 super austenitic stainless steel in the presence of marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, Journal of Materials Science & Technology 33 (2017) 1596–1603.

[Liang, 2014] C.-H. Liang, H. Wang, N.-B. Huang, Effects of sulphate-reducing bacteria on corrosion behaviour of 2205 duplex stainless steel, Journal of Iron and Steel Research, International 21 (2014) 444–450.

[Liengen, 2014] Understanding Biocorrosion - Fundamentals and Applications, First Edition, Edited by T. Liengen, R. Basséguy, D. Féron and I. Beech, Woodhead Publishing (2014).

[Little, 1988] B. Little, P. Wagner, D. Duquette, Microbiologically induced increase in corrosion current density of stainless steel under cathodic protection, Corrosion 44 (1988) 270–274.

[Little, 1991] B. Little, P. Wagner, F. Mansfeld, Microbiologically influenced corrosion of metals and alloys, International Materials Reviews 36 (1991) 253–272.

[Little, 1992] B. Little, P. Wagner, F. Mansfeld, An overview of Microbiologically Influenced Corrosion, Electrochimica Acta 37 (1992) 2185–2194.

[Little, 1998] B. Little, P. Wagner, K. Hart, R. Ray, D. Lavoie, K. Nealson, C. Aguilar, The role of biomineralization in microbiologically influenced corrosion, Biodegradation 9 (1998) 1–10.

[Little, 2002] B. Little, R. Ray, A Perspective on Corrosion Inhibition by Biofilms, Corrosion 58 (2002) 424–428.

[Little, 2008] B. J. Little, J. S. Lee, R. I. Ray, The influence of marine biofilms on corrosion: A concise review, Electrochimica Acta 54 (2008) 2–7.

[Little, 2014] B. J. Little, J. S. Lee, Microbiologically influenced corrosion: an update, International Materials Reviews 59 (2014) 384–393.

[Liu, 2012] B. Y. Liu, G. M. Zhang, X. L. Li, H. Chen, Effect of glutaraldehyde fixation on bacterial cells observed by Atomic Force Microscopy, Scanning 34 (2012) 6–11.

[Logan, 2009] B. E. Logan, Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells, Nature Reviews Microbiology 7 (2009) 375–381.

[Logan, 2012] B. E. Logan, K. Rabaey, Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies, Science 337 (2012) 686–690.

[Longmuir, 1954] I. S. Longmuir, Respiration rate of bacteria as a function of oxygen concentration, Biochemical Journal 57 (1954) 81–87.

[Lopes, 2006] F. A. Lopes, P. Morin, R. Oliveira, L. F. Melo, Interaction of *Desulfovibrio desulfuricans* biofilms with stainless steel surface and its impact on bacterial metabolism, Journal of Applied Microbiology 101 (2006) 1087–1095.

[Lorenz, 1969] K. Lorenz, G. Medawar, Über das Korrosionsverhalten austenitischer Chrom-Nickel-(Molybdän-) Stähle mit und ohne Stickstoffzusatz unter besonderer Berücksichtigung ihrer Beanspruchbarkeit in chloridhaltigen Lösungen, Thyssenforschung 1 (1969) 97–108.

[Lors, 2016] C. Lors, Biodétérioration des matériaux cimentaires : interactions environnement-microorganismes-matériaux, in Interactions matériaux-microorganismes : Bétons et métaux plus résistants à la biodétérioration, Christine Lors, Françoise Feugeas, Bernard Tribollet, EDP Sciences (2016) 255–282.

[Lothongkum, 2006] G. Lothongkum, P. Wongpanya, S. Morito, T. Furuhara, T. Maki, Effect of nitrogen on corrosion behavior of 28Cr–7Ni duplex and microduplex stainless steels in air-saturated 3.5 wt% NaCl solution, Corrosion Science 48 (2006) 137–153.

[Loto, 2017] C. A. Loto, Microbiological corrosion: mechanism, control and impact – a review, The International Journal of Advanced Manufacturing Technology 92 (2017) 4241–4252.

[Lu, 1989] Y. C. Lu, C. R. Clayton, A. R. Brooks, A bipolar model of the passivity of stainless steels – II. The influence of aqueous molybdate, Corrosion Science 29 (1989) 863–880.

[Lu, 1993] Y. C. Lu, M. B. Ives, C. R. Clayton, Synergism of alloying elements and pitting corrosion resistance of stainless steels, Corrosion Science 35 (1993) 89–96.

[Luo, 2011] H. Luo, C. F. Dong, K. Xiao, X. G. Li, Characterization of passive film on 2205 duplex stainless steel in sodium thiosulphate solution, Applied Surface Science 258 (2011) 631–639.

[Luo, 2012] H. Luo, C. F. Dong, X. G. Li, K. Xiao, The electrochemical behaviour of 2205 duplex stainless steel in alkaline solutions with different pH in the presence of chloride, Electrochimica Acta 64 (2012) 211–220.

[Luo, 2017a] H. Luo, Z. Li, Y.-H. Chen, D. Ponge, M. Rohwerder, D. Raabe, Hydrogen effects on microstructural evolution and passive film characteristics of a duplex stainless steel, Electrochemistry Communications 79 (2017) 28–32.

[Luo, 2017b] H. Luo, X. Wang, C. Dong, K. Xiao, X. Li, Effect of cold deformation on the corrosion behaviour of UNS S31803 duplex stainless steel in simulated concrete pore solution, Corrosion Science 124 (2017) 178–192.

– M –

[Macdonald, 1992] D. D. Macdonald, The Point Defect Model for the passive state, Journal of The Electrochemical Society 139 (1992) 3434–3449.

[Macdonald, 2012] D. D. Macdonald, Some personal adventures in passivity – a review of the Point Defect Model for film growth, Russian Journal of Electrochemistry 48 (2012) 235–258.

[Mameng, 2017] S. H. Mameng, R. Pettersson, C. Leygraf, Effect of stainless steel composition on atmospheric corrosion resistance at a marine site in Dubai, Corrosion 73 (2017) 880–891.

[Mandrino, 2010] D. Mandrino, Č. Donik, M. Jenko, AES of thin oxide layers on a duplex stainless steel surface, Surface and Interface Analysis 42 (2010) 762–765.

[Mandrino, 2011] D. Mandrino, Č. Donik, Chemical-state information obtained by AES and XPS from thin oxide layers on duplex stainless steel surfaces, Vacuum 86 (2011) 18–22.

[Mann, 2012] E. E. Mann, D. J. Wozniak, *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology, FEMS Microbiology Reviews 36 (2012) 893–916.

[Mansfeld, 1991] F. Mansfeld, B. Little, A technical review of electrochemical techniques applied to microbiologically influenced corrosion, Corrosion Science 32 (1991) 247–272.

[Mansfeld, 2007] F. Mansfeld, The interaction of bacteria and metal surfaces, Electrochimica Acta 52 (2007) 7670–7680.

[Mansour, 2010] C. Mansour, G. Berger, M. Fédoroff, G. Lefèvre, A. Pages, E. M. Pavageau, H. Catalette, S. Zanna, Influence of temperature and reducing conditions on the sorption of sulfate on magnetite, Journal of Colloid and Interface Science 352 (2010) 476–482.

[Marconnet, 2006] C. Marconnet, J. Landoulsi, C. Dagbert, C. Richard S. Pulvin, Corrosion des aciers inoxydables induite par les micro-organismes mangano-oxydants, Matériaux & Techniques 94 (2006) 485–493.

[Marconnet, 2008a] C. Marconnet, Y. Wouters, F. Miserque, C. Dagbert, J.-P. Petit, A. Galerie, D. Féron, Chemical composition and electronic structure of the passive layer formed on stainless steels in a glucose-oxidase solution, Electrochimica Acta 54 (2008) 123–132.

[Marconnet, 2008b] C. Marconnet, C. Dagbert, M. Roy, D. Féron, Stainless steel ennoblement in freshwater: From exposure tests to mechanisms, Corrosion Science 50 (2008) 2342–2352.

[Marcus, 1988] P. Marcus, I. Olefjord, A round robin on combined electrochemical and AES/ESCA characterization of the passive films on Fe–Cr and Fe–Cr–Mo alloys, Corrosion Science 28 (1988) 589–602.

[Marcus, 1992a] P. Marcus, M. E. Bussell, XPS study of the passive films formed on nitrogen-implanted austenitic stainless steels, Applied Surface Science 59 (1992) 7–21.

[Marcus, 1992b] P. Marcus, J. M. Grimal, The anodic dissolution and passivation of Ni–Cr–Fe alloys studied by ESCA, Corrosion Science 33 (1992) 805–814.

[Marcus, 1994] P. Marcus, On some fundamental factors in the effect of alloying elements on the passivation of alloys, Corrosion Science 36 (1994) 2155–2158.

[Marcus, 1997] P. Marcus, E. Protopopoff, Thermodynamics of thiosulfate reduction on surfaces of iron, nickel and chromium in water at 25 and 300°C, Corrosion Science 39 (1997) 1741–1752.

[Marcus, 1998] P. Marcus, Surface science approach of corrosion phenomena, Electrochimica Acta 143 (1998) 109–118.

[Marcus, 2008] P. Marcus, V. Maurice, H.-H. Strehblow, Localized corrosion (pitting): A model of passivity breakdown including the role of the oxide layer nanostructure, Corrosion Science 50 (2008) 2698–270.

[Massoud, 2013] T. Massoud, V. Maurice, L. H. Klein, P. Marcus, Nanoscale morphology and atomic structure of passive films on stainless steel, Journal of The Electrochemical Society 160 (2013) C232–C238.

[Mathieu, 1989] H. J. Mathieu, D. Landolt, SIMS/AES characterization of the initial oxidation of an iron-chromium-molybdenum alloy and its base metals at room temperature, Surface and Interface Analysis 14 (1989) 744–750.

[Maurice, 1994] V. Maurice, W. P. Yang, P. Marcus, XPS and STM investigation of the passive film formed on Cr (110) single-crystal surfaces, Journal of The Electrochemical Society 141 (1994) 3016–3027.

[Maurice, 1996] V. Maurice, W. P. Yang, P. Marcus, XPS and STM study of passive films formed on Fe–22Cr (110) single-crystal surfaces, Journal of The Electrochemical Society 143 (1996) 1182–1200.

[Maurice, 1998] V. Maurice, W. P. Yang, P. Marcus, X-Ray Photoelectron Spectroscopy and Scanning Tunneling Microscopy study of passive films formed on (100) Fe–18Cr–13Ni single-crystal surfaces, Journal of The Electrochemical Society 145 (1998) 909–920.

[Maurice, 2000] V. Maurice, S. Cadot, P. Marcus, XPS, LEED and STM study of thin oxide films formed on Cr(110), Surface Science 458 (2000) 195–215.

[Maurice, 2012] V. Maurice, P. Marcus, Passive films at the nanoscale, Electrochimica Acta 84 (2012) 129–138.

[Maurice, 2015] V. Maurice, H. Peng, L. H. Klein, A. Seyeux, S. Zanna, P. Marcus, Effects of molybdenum on the composition and nanoscale morphology of passivated austenitic stainless steel surfaces, Faraday Discussions 180 (2015) 151–170.

[Maximovich, 1995] S. Maximovitch, G. Barral, F. Le Cras, F. Claudet, The electrochemical incorporation of molybdenum in the passive layer of a 17% Cr ferritic stainless steel. Its influence on film stabilityin sulphuric acid and on pitting corrosion in chloride media, Corrosion Science 37 (1995) 271–291.

[Mazenc, 2012] A. Mazenc, A. Galtayries, A. Seyeux, P. Marcus, S. Leclercq, ToF-SIMS study of the behavior of thermally oxidized films formed on nickel-based 690 alloy in high-temperature water, Surface and Interface Analysis 45 (2012) 583–586.

[McBee, 1972] C. L. McBee, J. Kruger, Nature of passive films on iron-chromium alloys, Electrochimica Acta 17 (1972) 1337–1341.

[McNamara, 2005] C. J. McNamara, T. D. Perry, R. Leard, K. Bearce, J. Dante, R. Mitchell, Corrosion of aluminum alloy 2024 by microorganisms isolated from aircraft fuel tanks, Biofouling 21 (2005) 257–265.

[Mehanna, 2008] M. Mehanna, R. Basseguy, M.-L. Delia, L. Girbal, M. Demuez, A. Bergel, New hypotheses for hydrogenase implication in the corrosion of mild steel, Electrochimica Acta 54 (2008) 140–147.

[Mehanna, 2009a] M. Mehanna, R. Basséguy, M.-L. Délia, A. Bergel, Effect of *Geobacter sulfurreducens* on the microbial corrosion of mild steel, ferritic and austenitic stainless steels, Corrosion Science 51 (2009) 2596–2604.

[Mehanna, 2009b] M. Mehanna, R. Basseguy, M.-L. Delia, A. Bergel, Role of direct microbial electron transfer in corrosion of steels, Electrochemistry Communications 11 (2009) 568–571.

[Melo, 1997] L. F. Melo, T. R. Bott, Biofouling in water systems, Experimental Thermal and Fluid Science 14 (1997) 375–381.

[Merchat, 2016] M. Merchat, C. Forêt, Les biofilms dans les circuits de refroidissement industriels, in Interactions matériaux-microorganismes : Bétons et métaux plus résistants à la biodétérioration, Christine Lors, Françoise Feugeas, Bernard Tribollet, EDP Sciences (2016) 190–214.

[Merello, 2003] R. Merello F. J. Botana, J. Botella, M. V. Matres, M. Marcos, Influence of chemical composition on the pitting corrosion resistance of non-standard low-Ni high-Mn–N duplex stainless steels, Corrosion Science 45 (2003) 909–921.

[Mesquita, 2011] T. J. Mesquita, E. Chauveau, M. Mantel, N. Kinsman, R. P. Nogueira, Anomalous corrosion resistance behavior of Mo-containing SS in alkaline media: The role of microstructure, Materials Chemistry and Physics 126 (2011) 602–606.

[Mesquita, 2012] T. J. Mesquita, E. Chauveau, M. Mantel, N. Kinsman, V. Roche, R. P. Nogueira, Lean duplex stainless steels – The role of molybdenum in pitting corrosion of concrete reinforcement studied with industrial and laboratory castings, Materials Chemistry and Physics 132 (2012) 967– 972.

[Mesquita, 2013] T. J. Mesquita, E. Chauveau, M. Mantel, R. P. Nogueira, A XPS study of the Mo effect on passivation behaviors for highly controlled stainless steels in neutral and alkaline conditions, Applied Surface Science 270 (2013) 90–97.

[Mischler, 1988] S. Mischler, H. J. Mathieu D. Landolt, Investigation of a passive film on an iron–chromium alloy by AES and XPS, Surface and Interface Analysis 11 (1998) 182–188.

[Mischler, 1991] S. Mischler, A. Vogel, H. J. Mathieu, D. Landolt, The chemical composition of the passive film on Fe–24Cr and Fe–24Cr–11Mo studied by AES, XPS and SIMS, Corrosion Science 32 (1991) 925–944.

[Monnartz, 1911] P. Monnartz, Iron-chromium alloys with special consideration of resistance to acids, Metallurgie 8 (1911) 161–176.

[Monroe, 2007] D. Monroe, Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms, PLoS Biology 5 (2007) 2458–2461.

[Montemor, 2000] M. F. Montemor, M. G. S. Ferreira, N. E. Hakiki, M. Da Cunha Belo, Chemical composition and electronic structure of the oxide formed on 316L stainless steel and nickel based alloys in high temperature aqueous environments, Corrosion Science 42 (2000) 1635–1650.

[Moradi, 2011] M. Moradi, J. Duan, H. Ashassi-Sorkhabi, X. Luan, De-alloying of 316 stainless steel in the presence of a mixture of metal-oxidizing bacteria, Corrosion Science 53 (2011) 4282–4290.

[Moradi, 2014] M. Moradi, Z. Song, L. Yang, J. Jiang, J. He, Effect of marine *Pseudoalteromonas* sp. on the microstructure and corrosion behaviour of 2205 duplex stainless steel, Corrosion Science 84 (2014) 103–112.

[Morales, 1993] J. Morales, P. Esparza, S. González, R. Salvarezza, M. P. Arévalo, The role of *Pseudomonas aeruginosa* on the localized corrosion of 304 stainless steel, Corrosion Science 34 (1993) 1531–1540.

[Moreno, 2014] D. A. Moreno, J. R. Ibars, J. L. Polo, J. M. Bastidas, EIS monitoring study of the early microbiologically influenced corrosion of AISI 304L stainless steel condenser tubes in freshwater, Journal of Solid State Electrochemistry 18 (2014) 377–388.

[Moura, 2008] V. S. Moura, L. D. Lima, J. M. Pardal, A. Y. Kina, R. R. A. Corte, S. S. M. Tavares, Influence of microstructure on the corrosion resistance of the duplex stainless steel UNS S31803, Materials Characterization 59 (2008) 1127–1132.

[Mystkowska, 2017] J. Mystkowska, J. A. Ferreira, K. Leszczynska, S. Chmielewska, J. R. Dąbrowski, P. Wiecinski, K. J. Kurzydłowski, Biocorrosion of 316LV steel used in oral

cavity due to *Desulfotomaculum nigrificans* bacteria, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 105 (2017) 222–229.

– N –

[Nan, 2015] L. Nan, D. Xu, T. Gu, X. Song, K. Yang, Microbiological influenced corrosion resistance characteristics of a 304L-Cu stainless steel against *Escherichia coli*, Materials Science and Engineering C 48 (2015) 228–234.

[Newman, 1987] R. C. Newman, T. Shahrabi, The effect of alloyed nitrogen or dissolved nitrate ions on the anodic behaviour of austenitic stainless steel in hydrochloric acid, Corrosion Science 27 (1987) 827–838.

[Nguyen, 2008] T. M. P. Nguyen, X. Sheng, Y.-P. Ting, S. O. Pehkonen, Biocorrosion of AISI 304 stainless steel by *Desulfovibrio desulfuricans* in seawater, Industrial & Engineering Chemistry Research, 47 (2008) 4703–4711.

[Nilsson, 2010] J.-O. Nilsson, G. Chai, The physical properties of DSS, Duplex stainless steel, Conference Proceedings, Beaune, France (2010).

– O –

[Oh, 2015] K. N. Oh, S. H. Ahn, K. S. Eom, H. S. Kwon, A Study on the localized corrosion and repassivation kinetics of Fe–20Cr–xNi (x = 0–20 wt%) stainless steels via electrochemical analysis, Corrosion Science 100 (2015) 158–168.

[Okamoto, 1973] G. Okamoto, Passive film on 18–8 stainless steel structure and its function, Corrosion Science 13 (1973) 471–489.

[Olefjord, 1980] I. Olefjord, The passive state of stainless steels, Materials Science and Engineering 42 (1980) 161–171.

[Olefjord, 1982] I. Olefjord, B.-O. Elfström, The composition of the surface during passivation of stainless steels, Corrosion 38 (1982) 46–52.

[Olefjord, 1985] I. Olefjord, B. Brox, U. Jevelstam, Surface Composition of Stainless Steels during Anodic Dissolution and passivation studied by ESCA, Journal of The Electrochemical Society 132 (1985) 2854–2861.

[Olefjord, 1990] I. Olefjord, L. Wegrelius, Surface analysis of passive state, Corrosion Science 31 (1990) 89–98.

[Olefjord, 1996] I. Olefjord, L. Wegrelius, The influence of nitrogen on the passivation of stainless steels, Corrosion Science 38 (1996) 1203–1220.

[Olesen, 2000] B. H. Olesen, R. Avci, Z. Lewandowski, Manganese dioxide as a potential cathodic reactant in corrosion of stainless steels, Corrosion Science 42 (2000) 211–227.

[Olsson, 1994] C.-O. A. Olsson, S. E. Hörnström, An AES and XPS study of the high alloy austenitic stainless steel 254 SMO ® tested in a ferric chloride solution, Corrosion Science 136 (1994) 141–151.

[Olsson, 1995] C.-O. A. Olsson, The influence of nitrogen and molybdenum on passive films formed on the austeno-ferritic stainless steel 2205 studied by AES and XPS, Corrosion Science 37 (1995) 467–479.

[Olsson, 2000] C-O. A. Olsson, D. Hamm, D. Landolt, Electrochemical Quartz Crystal Microbalance studies of the passive behavior of Cr in a sulfuric acid solution, Journal of The Electrochemical Society 147 (2000) 2563–2571.

[Olsson, 2002] C.-O. A. Olsson, H.-J. Mathieu, D. Landolt, Angle-resolved XPS analysis of molybdenum and tungsten in passive films on stainless steel PVD alloys, Surface and Interface Analysis 34 (2002) 130–134.

[Olsson, 2003] C.-O. A. Olsson, D. Landolt, Passive films on stainless steels–chemistry, structure and growth, Electrochimica Acta 48 (2003) 1093–1104.

[Olsson, 2011] C.-O. A. Olsson, S. Malmgren, M. Gorgoi, K. Edström, Quantifying the metal nickel enrichment on stainless steel, Electrochemical and Solid-State Letters (2011) C1–C3.

[Ornek, 2002] D. Ornek, A. Jayaraman, B. C. Syrett, C. H. Hsu, F. B. Mansfeld, T. K. Wood, Pitting corrosion inhibition of aluminum 2024 by *Bacillus* biofilms secreting polyaspartate or gamma-polyglutamate, Applied Microbiology and Biotechnology 58 (2002) 651–657.

[Ortiz, 1990] C. Ortiz, P. S. Guiamet, H. A. Videla, Relationship between biofilms and corrosion of steel by microbial contaminants of cutting-oil emulsions, International Biodeterioration 26 (1990) 315–326.

[Osiro, 2012] D. Osiro, R. B. Filho, O. B. G. Assis, L. A. de Castro Jorge, L. A. Colnago, Measuring bacterial cells size with AFM, Brazilian Journal of Microbiology 43 (2012) 341–347.

[O'Toole, 1998] G. A. O'Toole, R. Kolter, Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, Molecular Microbiology 30 (1998) 295–304.

– P –

[Pardo, 2008a] A. Pardo, M. C. Merino, A. E. Coy, F. Viejo, R. Arrabal, E. Matykina, Effect of Mo and Mn additions on the corrosion behavior of AISI 304 and 316 stainless steels in H_2SO_4, Corrosion Science 50 (2008) 780–794.

[Pardo, 2008b] A. Pardo, M. C. Merino, A. E. Coy, F. Viejo, R. Arrabal, E. Matykina, Pitting corrosion behaviour of austenitic stainless steels – combining effects of Mn and Mo additions, Corrosion Science 50 (2008) 1796–1806.

[Pedersen, 1991] A. Pedersen, M. Hermannsson, Inhibition of metal corrosion by bacteria, Biofouling 3 (1991) 1–11.

[Peguet, 2011] L. Peguet, A. Gaugain, Localized corrosion resistance of duplex stainless steels: methodology and properties; a review paper, Revue de Métallurgie 108 (2011) 231–243.

[Peguet, 2012] L. Peguet, A. Gaugain, C. Dussart, B. Malki, B. Baroux, Statistical study of the critical pitting temperature of 22-05 duplex stainless steel, Corrosion Science 60 (2012) 280–283.

[Pendyala, 1996] J. Pendyala, G. G. Geesey, P. Stoodley, M. Hamilton, G. Harkin, Chemical effects of biofilm colonization on 304 stainless steel, Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films 14 (1996) 1755–1760.

[Pereira, 2002] M. O. Pereira, M. Kuehn, S. Wuertz, T. Neu, L. F. Melo, Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm, Biotechnology and Bioengineering 78 (2002) 164–171.

[Perren, 2001a] R. A. Perren, T. A. Suter, P. J. Uggowitzer, L. Weber, R. Magdowski, H. Böhni, M. O. Speidel, Corrosion resistance of super duplex stainless steels in chloride ion containing environments: investigations by means of a new microelectrochemical method. I. Precipitation-free states, Corrosion Science 43 (2001) 707–726.

[Perren, 2001b] R. A. Perren, T. Suter, C. Solenthaler, G. Gullo, P. J. Uggowitzer, H. Böhni, M. O. Speidel, Corrosion resistance of super duplex stainless steels in chloride ion containing environments: investigations by means of a new microelectrochemical method. II. Influence of precipitates, Corrosion Science 43 (2001) 727–745.

[Petrova, 2011] M. Petrova, M. Bojinov, S. Zanna, P. Marcus, Mechanism of anodic oxidation of molybdenum in nearly-neutral electrolytes studied by electrochemical impedance spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy, Electrochimica Acta 56 (2011) 7899–7906.

[Petrova, 2016] O. E. Petrova, K. Sauer, Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion, Current Opinion in Microbiology 30 (2016) 67–78.

[Ploux, 2007] L. Ploux, S. Beckendorff, M. Nardin, S. Neunlist, Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 57 (2007) 174–181.

[Ploux, 2011] L. Ploux, A. Ponche, K. Anselme, Bacteria/material interfaces: Role of the material and cell wall properties, in Surface and interfacial aspects of cell adhesion, Edited by A. Carré and K. L. Mittal, CRC Press (2011) 65–101.

[Poleunis, 2002a] C. Poleunis, C. Rubio, C. Compère, P. Bertrand, Role of salts on the BSA adsorption on stainless steel in aqueous solutions. II. ToF-SIMS spectral and chemical mapping study, Surface and Interface Analysis 34 (2002) 55–58.

[Poleunis, 2002b] C. Poleunis, C. Compère, P. Bertrand, Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: characterization of stainless steel surfaces immersed in natural seawater, Journal of Microbiological Methods 48 (2002) 195–205.

[Potgieter, 1991] J. H. Potgieter, M. B. Cortie, Determination of the microstructure and alloy element distribution in experimental duplex stainless steels, Materials Characterisation 26 (1991) 155–165.

[Potgieter, 2008] J. H. Potgieter, P. A. Olubambi, L. Cornish, C. N. Machio, E.-S. M. Sherif, Influence of nickel additions on the corrosion behaviour of low nitrogen 22% Cr series duplex stainless steels, Corrosion Science 50 (2008) 2572–2579.

[Pradier, 2000] C. M. Pradier, P. Bertrand, M. N. Bellon-Fontaine, C. Compère, D. Costa, P. Marcus, C. Poleunis, B. Rondot, M. G. Walls, Adsorption of proteins on an AISI 316 stainless-steel surface in natural seawater, Surface and Interface Analysis 30 (2000) 45–49.

[Pradier, 2002] C. M. Pradier, D. Costa, C. Rubio, C. Compère, P. Marcus, Role of salts on BSA adsorption on stainless steel in aqueous solutions. I. FT-IRRAS and XPS characterization, Surface and Interface Analysis 34 (2002) 50–54.

[Pradier, 2005] C. M. Pradier, C. Rubio, C. Poleunis, P. Bertrand, P. Marcus, C. Compère, Surface characterization of three marine bacterial strains by Fourier Transform IR, X-ray Photoelectron Spectroscopy, and Time-of-Flight Secondary-Ion Mass Spectrometry, correlation with adhesion on stainless steel surfaces, The Journal of Physical Chemistry B 109 (2005) 9540–9549.

– Q –

[Qiao, 2017] Y.-J. Qiao, Y. Qiao, L. Zou, X.-S. Wu, J.-H. Liu, Biofilm promoted current generation of *Pseudomonas aeruginosa* microbial fuel cell via improving the interfacial redox reaction of phenazines, Bioelectrochemistry 117 (2017) 34–39.

[Qiu, 2010] L. Qiu, G. Xu, Peak overlaps and corresponding solutions in the X-ray photoelectron spectroscopic study of hydrodesulfurization catalysts, Applied Surface Science 256 (2010) 3413–3417.

– R –

[Ramstedt, 2011] M. Ramstedt, R. Nakao, S. N. Wai, B. E. Uhlin, J.-F. Boily, Monitoring surface chemical changes in the bacterial cell wall: multivariate analysis of cryo-x-ray photoelectron spectroscopy data, The Journal of Biological Chemistry 286 (2011) 12389–12396.

[Ravindranath, 1995] K. Ravindranath, S. N. Malhotra, The influence of aging on the intergranular corrosion of 22 chromium–5 nickel duplex stainless steel, Corrosion Science 37 (1995) 121–132.

[Refait, 2016] P. Refait, M. Jeannin, R. Sabot, S. Sablé, I. Lanneluc, A. Romaine, S. Necib, S. Pineau, Les interactions fer-soufre dans les phénomènes de biocorrosion, in Interactions matériaux-microorganismes : Bétons et métaux plus résistants à la biodétérioration, C. Lors, F. Feugeas, B. Tribollet, EDP Sciences (2016) 235–252.

[Revesz, 1978] A. G. Revesz, J. Kruger, Passivity of Metals, R.P. Frankenthal and J. Kruger Eds, The Electrochemical Society, Princeton, NJ (1979) 137–155.

[Riedel, 2013] T. E. Riedel, W. M. Berelson, K. H. Nealson, S. E. Finkel, Oxygen consumption rates of bacteria under nutrient-limited conditions, Applied and Environmental Microbiology 79 (2013) 4921–4931.

[Robin, 2008] R. Robin, F. Miserque, V. Spagnol, Correlation between composition of passive layer and corrosion behavior of high Si-containing austenitic stainless steels in nitric acid, Journal of Nuclear Materials 375 (2008) 65–71.

[Robineau, 2017] M. Robineau, A. Romaine, R. Sabot, M. Jeannin, V. Deydier S. Necib, P. Refait, Galvanic corrosion of carbon steel in anoxic conditions at 80 °C associated with a heterogeneous magnetite (Fe_3O_4)/mackinawite (FeS) layer, Electrochimica Acta 255 (2017) 274–285.

[Roe, 1996] F. L. Roe, Z. Lewandowski, T. Funk, Simulating microbiologically influenced corrosion by depositing extracellular biopolymers on mild steel surfaces, Corrosion 52 (1996) 744–752.

[Romaine, 2015] A. Romaine, M. Jeannin, R. Sabot, S. Necib, P. Refait, Corrosion processes of carbon steel in argillite: Galvanic effects associated with the heterogeneity of the corrosion product layer, Electrochimica Acta 182 (2015) 1019–1028.

[Ross, 1990] M. Ross, D. A. Young, R. Grover, Theory of the iron phase diagram at earth core conditions, Journal of the Geophysical Research 95 (1990) 21713–21716.

[Rossi, 2000] A. Rossi, B. Elsener, G. Hähner, M. Textor, N. D. Spencer, XPS, AES and ToF-SIMS investigation of surface films and the role of inclusions on pitting corrosion in austenitic stainless steels, Surface and Interface Analysis 29 (2000) 460–467.

[Rouvre, 2016] I. Rouvre, R. Basseguy, Exacerbation of the mild steel corrosion process by direct electron transfer between [Fe-Fe]-hydrogenase and material surface, Corrosion Science 111 (2016) 199–211.

[Roux, 2016] S. Roux, Biodétérioration bétons, in Interactions matériaux-microorganismes : Bétons et métaux plus résistants à la biodétérioration, Christine Lors, Françoise Feugeas, Bernard Tribollet, EDP Sciences (2016) 283–301.

[Rouxhet, 2011] P. G. Rouxhet, M. J. Genet, XPS analysis of bio-organic systems, Surface and Interface Analysis 43 (2011) 1453–1470.

[Rubio, 2002] C. Rubio, D. Costa, M. N. Bellon-Fontaine, P. Relkin, C. M. Pradier, P. Marcus, Characterization of bovine serum albumin adsorption on chromium and AISI 304 stainless steel, consequences for the *Pseudomonas fragi* K1 adhesion, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 24 (2002) 193–205.

[Ruhal, 2015] R. Ruhal, H. Antti, O. Rzhepishevska, N. Boulanger, D. R. Barbero, S. N. Wai, B. E. Uhlin, M. Ramstedt, A multivariate approach to correlate bacterial surface properties to biofilm formation by lipopolysaccharide mutants of *Pseudomonas aeruginosa*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 127 (2015) 182–191.

[Ryan, 1994] M. P. Ryan, R. C. Newman, G. E. Thompson, Atomically resolved STM of oxide film structures on Fe-Cr alloys during passivation in sulfuric acid solution, Journal of The Electrochemical Society 141 (1994) L164–L165.

[Ryan, 2002] M. P. Ryan, D. E. Williams, R. J. Chater, B. M. Hutton, D. S. McPhail, Why stainless steel corrodes, Nature 415 (2002) 770–774.

– S –

[Sand, 2006] W. Sand, T. Gehrke, Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria, Research in Microbiology 157 (2006) 49–56.

[Sato, 1990] N. Sato, An overview on the passivity of metals, Corrosion Science 31 (1990) 1–19.

[Sauer, 2002] K. Sauer, A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton, D. G. Davies, *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm, Journal of Bacteriology 184 (2002) 1140–1154.

[Saville, 2011] R. M. Saville, S. Rakshe, J. A. J. Haagensen, S. Shukla, A. M. Spormann, Energy-dependent stability of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms, Journal of Bacteriology 193 (2011) 3257–3264.

[Schitter, 2004] G. Schitter, R. W. Stark, A. Stemmer, Fast contact-mode atomic force microscopy on biological specimen by model-based control, Ultramicroscopy 100 (2004) 253–257.

[Schmidt-Rieder, 1996] E. Schmidt-Rieder, X. Q. Tong, J. P. G. Farr, M. Aindow, *In situ* electrochemical scanning probe microscopy corrosion studies on duplex stainless steel in aqueous NaCl solutions, British Corrosion Science 31 (1996) 139–145.

[Schmidt-Rieder, 1999] E. Schmidt-Rieder, M. Ashworth, J. P. G. Farr, The effect of nitrogen on the stability of the passive film on a Zeron 100 super duplex stainless steel, Electrochemical and Solid-State Letters 2 (1999) 19–21.

[Schmidt-Rieder, 2003] E. Schmidt-Rieder, M. Ashworth, J. P. G. Farr, The effects of preparative treatment on the composition of the passive film on duplex stainless steel, Transactions of the Institute of Metal Finishing 81 (2003) 164–167.

[Schmutz, 1999] P. Schmutz, D. Landolt, In-situ microgravimetric studies of passive alloys: potential sweep and potential step experiments with Fe–25Cr and Fe–17Cr–33Mo in acid and alkaline solution, Corrosion Science 41 (1999) 2143–2163.

[Schneider, 1997] R. P. Schneider, Bacterial adhesion to solid substrata coated with conditioning films derived from chemical fractions of natural waters, Journal of Adhesion Science and Technology 18 (1997) 979–994.

[Schooling, 2006] S. R. Schooling, T. J. Beveridge, Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms, Journal of Bacteriology 188 (2006) 5945–5957.

[Schröder, 2003] I. Schröder, E. Johnson, S. de Vries, Microbial ferric iron reductases, FEMS Microbiology Reviews 27 (2003) 427–447.

[Schulze, 1964] K. L. Schulze, R. S. Lipe, Relationship between substrate concentration, growth rate, and respiration rate of *Escherichia coli* in continuous culture, Archiv für Mikrobiologie 48 (1964) 1–20.

[Schwechheimer, 2015] C. Schwechheimer, M. J. Kuehn, Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions, Nature Reviews Microbiology 13 (2015) 605–619.

[Scofield, 1976] J. H. Scofield, Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV, Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena 8 (1976) 129–137.

[Scotto, 1985] V. Scotto, R. Di Cintio, G.Marcenaro, The influence of marine aerobic microbial film on stainless steel corrosion behaviour, Corrosion Science 25 (1985) 185–194.

[Senoner, 2012] M. Senoner, W. E. S. Unger, SIMS imaging of the nanoworld: applications in science and technology, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 27 (2012) 1050–1068.

[Seyeux, 2011] A. Seyeux, G. S. Frankel, N. Missert, K. A. Unocic, L. H. Klein, A. Galtayries, P. Marcus, ToF-SIMS imaging study of the early stages of corrosion in Al-Cu thin films, Journal of The Electrochemical Society 158 (2011) C165–C171.

[Seyeux, 2013] A. Seyeux, V. Maurice, P. Marcus, Oxide film growth kinetics on metals and alloys I. Physical model, Journal of The Electrochemical Society 160 (2013) C189–C196.

[Seyeux, 2015] A. Seyeux, S. Zanna, A. Allion, P. Marcus, The fate of the protective oxide film on stainless steel upon early stage growth of a biofilm, Corrosion Science 91 (2015) 352–356.

[Sheng, 2007] X. Sheng, Y.-P. Ting, S. O. Pehkonen, The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316, Corrosion Science 49 (2007) 2159–2176.

[Sheng, 2010] G.-P. Sheng, H.-Q. Yu, X.-Y. Li, Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review, Biotechnology Advances 28 (2010) 882–894.

[Shi, 2003] X. Shi, R. Avci, M. Geiser, Z. Lewandowski, Comparative study in chemistry of microbially and electrochemically induced pitting of 316L stainless steel, Corrosion Science 45 (2003) 2577–2595.

[Shimizu, 2000] K. Shimizu, H. Habazaki, P. Skeldon, G. E. Thompson, G. C. Wood, GDOES depth profiling analysis of the air-formed oxide film on a sputter-deposited Type 304 stainless steel, Surface and Interface Analysis 29 (2000) 743–746.

[Sillankorva, 2008] S. Sillankorva, P. Neubauer, Joana Azeredo, *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A, BMC Biotechnology 8 (2008) 1–12.

[Smith, 1998] E. M. Smith, Coherence of microbial respiration rate and cell-specific bacterial activity in a coastal planktonic community, Aquatic Microbial Ecology 16 (1998) 27–35.

[Soma, 1994] M. Soma, A. Tanaka, H. Seyama, K Satake, Characterization of arsenic in lake sediments by X-ray photoelectron spectroscopy, Geochimica et Cosmochimica Acta 58 (1994) 2743–2745.

[Song, 2017] Z.-G. Song, H. Feng, S.-M. Hu, Development of Chinese duplex stainless steel in recent years, Journal of Iron and Steel Research, International 24 (2017) 121–130.

[Sreekumari, 2001] K. R. Sreekumari, K. Nandakumar, Y. Kikuchi, Bacterial attachment to stainless steel welds: significance of substratum microstructure, Biofouling 17 (2001) 303–316.

[Stadler, 2008] R. Stadler, W. Fuerbeth, K. Harneit, M. Grooters, M. Woellbrink, W. Sand, First evaluation of the applicability of microbial extracellular polymeric substances for corrosion protection of metal substrates, Electrochimica Acta 54 (2008) 91–99.

[Stadler, 2010] R. Stadler, L. Wei, W. Fürbeth, M. Grooters, A. Kuklinski, Influence of bacterial exopolymers on cell adhesion of Desulfovibrio vulgaris on high alloyed steel: Corrosion inhibition by extracellular polymeric substances (EPS), Materials and Corrosion 61 (2010) 1008–1016.

[Starosvetsky, 2008] J. Starosvetsky, D. Starosvetsky, B. Pokroy, T. Hilel, R. Armon, Electrochemical behaviour of stainless steels in media containing iron-oxidizing bacteria (IOB) by corrosion process modeling, Corrosion Science 50 (2008) 540–547.

[Stewart, 1992] J. Stewart, D. E. Williams, The initiation of pitting corrosion on austenitic stainless steel: on the role and importance of sulphide inclusions, Corrosion Science 33 (1992), 457–474.

[Stewart, 2001] P. S. Stewart, J. W. Costerton, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, The Lancet 358 (2001) 135–138.

[Stewart, 2003] P. S. Stewart, Diffusion in biofilms, Journal of Bacteriology 185 (2003) 1485–1491

[Stewart, 2008] P. S. Stewart, M. J. Franklin, Physiological heterogeneity in biofilms, Nature Reviews Microbiology 6 (2008) 199–210.

[Stoodley, 2001] P. Stoodley, S. Wilson, L. Hall-Stoodley, J. D. Boyle, H. M. Lappin-Scott, J. W. Costerton, Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms, Applied and Environmental Microbiology 37 (2001) 5608–5613.

[Stoodley, 2002] P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, J. W. Costerton, Biofilms as complex differentiated communities, Annual Review of Microbiology 56 (2002) 187–209.

[Straub, 2010] F. Straub, T. Wirth, A. Hertwig, V.-D. Hodoroaba, W. E. S. Unger, T. Böllinghaus, Imaging the microstructure of duplex stainless steel samples with TOF-SIMS, Surface and Interface Analysis 42 (2010) 739–742.

[Strehblow, 2011] H.-H. Strehblow, V. Maurice, P. Marcus, Passivity of metals, in Corrosion mechanisms in theory and practice, Third Edition, Edited by Philippe Marcus, CRC Press (2011) 235–326.

[Sudesh, 2006] T. L. Sudesh, L. Wijesinghe, D. J. Blackwood, Characterisation of passive films on 300 series stainless steels, Applied Surface Science 253 (2006) 1006–1009.

[Sugimoto, 1977] K. Sugimoto, Y. Sawada, The role of molybdenum additions to austenitic stainless steels in the inhibition of pitting in acid chloride solutions, Corrosion Science 17 (1977) 422–445.

[Suleiman, 1994] M. I. Suleiman, I. Ragault, R. C. Newman, The pitting of stainless steel under a rust membrane at very low potentials, Corrosion Science 36 (1994) 485–486.

[Symniotis, 1990] E. Symniotis, Galvanic effects on the active dissolution of duplex stainless steels, Corrosion 46 (1990) 2–12.

– T –

[Takahashi, 1964] T. Takahashi, W. A. Basset, High-pressure polymorph of iron, Science 145 (1964) 483–486.

[Tan, 1995] M.-W. Tan, E. Akiyama, A. Kawashima, K. Asami, K. Hashimoto, The effect of air exposure on the corrosion behavior of amorphous Fe–8Cr–Mo–13P–7C alloys in 1 M HCl, Corrosion Science 37 (1995) 1289–1301.

[Tanuma, 1991] S. Tanuma, C. J. Powell, D. R. Penn, Calculations of electron inelastic mean free paths. II. Data for 27 elements over the 50–2000 eV range, Surface and Interface Analysis 17 (1991) 911–926.

[Tardio, 2015] S. Tario, M.-L. Abel, R. H. Carr, J. E. Castle, J. F. Watts, Comparative study of the native oxide on 316L stainless steel by XPS and ToF-SIMS, Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films 33 (2015) 1–14.

[Thierry, 2011] D. Thierry, W. Sand, Microbially Influenced Corrosion, in Corrosion Mechanisms in Theory and Practice, Third Edition, Edited by Philippe Marcus, CRC Press (2011) 737–776.

[Thompson, 2007] N. G. Thompson, M. Yunovich, D. Dunmire, Cost of corrosion and corrosion maintenance strategies, Corrosion Reviews 25 (2007) 247–261.

[Tian, 2012] L. Tian, X. D. Chen, Q. P. Yang, J. C. Chen, L. Shi, Q. Li, Effect of calcium ions on the evolution of biofouling by *Bacillus subtilis* in plate heat exchangers simulating the heat pump system used with treated sewage in the 2008 Olympic Village, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 94 (2012) 309–316.

[Torres Bautista, 2014] B. E. Torres Bautista, M. L. Carvalho, A. Seyeux, S. Zanna, P. Cristiani, B. Tribollet, P. Marcus, I. Frateur, Effect of protein adsorption on the corrosion behavior of 70Cu–30Ni alloy in artificial seawater, Bioelectrochemistry 97 (2014) 34–42.

[Torres Bautista, 2015] B. E. Torres Bautista, A. J. Wikieł, I. Datsenko, M. Vera, W. Sand, A. Seyeux, S. Zanna, I. Frateur, P. Marcus, Influence of extracellular polymeric substances (EPS) from *Pseudomonas* NCIMB 2021 on the corrosion behaviour of 70Cu–30Ni alloy in seawater, Journal of Electroanalytical Chemistry 737 (2015) 184–197.

[Tsai, 2007] W.-T. Tsai, J.-R. Chen, Galvanic corrosion between the constituent phases in duplex stainless steel, Corrosion Science 49 (2007) 3659–3668.

[Tsuneda, 2003] S. Tsuneda, H. Aikawa, H. Hayashi, A. Yuasa, A. Hirata, Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface, FEMS Microbiology Letters 223 (2003) 287–292.

– U –

[Uhlig, 1979] H. H. Uhlig, Passivity in metals and alloys, Corrosion Science 19 (1979) 777–791.

[Usher, 2014] K. M. Usher, A. H. Kaksonen, I. Cole, D. Marney, Critical review: Microbially influenced corrosion of buried carbon steel pipes, International Biodeterioration & Biodegradation 93 (2014) 84–106.

– V –

[Vander Voort, 2011] G. F. Vander Voort, Metallographic specimen preparation for Electron Backscattered Diffraction Part I, Practical Metallography 48 (2011) 454–473.

[Vanini, 1994] A. S. Vanini, J.-P. Audouard, P. Marcus, The role of nitrogen in the passivity of austenitic stainless steels, Corrosion Science 36 (1994) 1825–1834.

[Videla, 1992] H. A.Videla, W. G. Characklis, Biofouling and microbially influenced corrosion, International Biodeterioration & Biodegradation 29 (1992) 195–212.

[Videla, 1994] H. A. Videla, Biofilms and corrosion interactions on stainless steel in seawater, International Biodeterioration & Biodegradation 34 (1994) 245–257.

[Videla, 2000] H. A. Videla, An overview of mechanisms by which sulphate-reducing bacteria influence corrosion of steel in marine environments, Biofouling 15 (2000) 37–47.

[Videla, 2001] H. A. Videla, Microbially induced corrosion: an updated overview, International Biodeterioration & Biodegradation 48 (2001) 176–201.

[Videla, 2005] H. A. Videla, L. K. Herrera, Microbiologically influenced corrosion: looking to the future, International Microbiology 8 (2005) 169–180.

[Videla, 2009] H. A. Videla, L. K. Herrera, Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview, International Biodeterioration & Biodegradation 63 (2009) 896–900.

[Vignal, 2010] V. Vignal, O. Delrue, O. Heintz, J. Peultier, Influence of the passive film properties and residual stresses on the micro-electrochemical behavior of duplex stainless steels, Electrochimica Acta 55 (2010) 7118–7125.

[Vignal, 2011] V. Vignal, H. Zhang, O. Delrue, O. Heintz, I. Popa, J. Peultier, Influence of long-term ageing in solution containing chloride ions on the passivity and the corrosion resistance of duplex stainless steels, Corrosion Science 53 (2011) 894–903.

[Vignal, 2013a] V. Vignal, H. Krawiec, O. Heintz, D. Mainy, Passive properties of lean duplex stainless steels after long-term ageing in air studied using EBSD, AES, XPS and local electrochemical impedance spectroscopy, Corrosion Science 67 (2013) 109–117.

[Vignal, 2013b] V. Vignal, D. Ba, H. Zhang, F. Herbst, S. Le Manchet, Influence of the grain orientation spread on the pitting corrosion resistance of duplex stainless steels using electron backscatter diffraction and critical pitting temperature test at the microscale, Corrosion Science 68 (2013) 275–278.

[Vignal, 2014] V. Vignal, H. Krawiec, S. Le Manchet, Influence of surface preparation and microstructure on the passivity and corrosion behaviour of duplex stainless steels, Journal of Solid State Electrochemistry 18 (2014) 2947–2954.

[Vu, 2009] B. Vu, M. Chen, R. J. Crawford, E. P. Ivanova, Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation, Molecules 14 (2009) 2535–2554.

– W –

[Wan, 2012] P. Wan, Y. Ren, B. Zhang, K. Yang, Effect of nitrogen on biocorrosion behavior of high nitrogen nickel-free stainless steel in different simulated body fluids, Materials Science & Engineering C 32 (2012) 510–516.

[Wang, 1999] J. Wang, P. J. Uggowitzer, R. Magdowski, M. O. Speidel, Nickel-free duplex stainless steels, Scripta Materialia 40 (1999) 123–129.

[Wang, 2015] Y. Wang, X. Cheng, X. Li, Electrochemical behavior and compositions of passive films formed on the constituent phases of duplex stainless steel without coupling, Electrochemistry Communications 57 (2015) 56–60.

[Wegrelius, 1999] L. Wegrelius, F. Falkenberg, I. Olefjord, Passivation of Stainless Steels in Hydrochloric Acid, Journal of The Electrochemical Society 146 (1999) 1397–1406.

[Werner, 1998] S. E. Werner, C. A. Johnson, N. J. Laycock, P. T. Wilson, B. J. Webster, Pitting of type 304 stainless steel in the presence of a biofilm containing sulphate reducing bacteria, Corrosion Science 40 (1998) 465–480.

[Whitehead, 2001] N. A. Whitehead, A. M. L. Barnard, H. Slater, N. J. L. Simpson, G. P. C. Salmond, Quorum-sensing in Gram-negative bacteria, FEMS Microbiology Reviews 25 (2001) 365–404.

[Whitehead, 2008] K. A. Whitehead, J. Verran, The effect of substratum properties on the survival of attached microorganisms on inert surfaces, in Marine and Industrial Biofouling, Edited by H.-C. Flemming, P. Sriyutha Murthy, R. Venkatesan and K. E. Cooksey, Springer Series on Biofilms, Volume 4 (2008) 13–33.

[Wieneck, 1997] K. M. Wieneck, M. Fletcher, Effects of substratum wettability and molecular topography on the initial adhesion of bacteria to chemically defined substrata, Biofouling 11 (1997) 293–311.

[Wikieł, 2014] A. J. Wikieł, I. Datsenko, M. Vera, W. Sand, Impact of *Desulfovibrio alaskensis* biofilms on corrosion behaviour of carbon steel in marine environment, Bioelectrochemistry 97 (2014) 52–60.

[Willenbruch, 1990] R. D. Willenbruch, C. R. Clayton, M. Oversluizen, D. Kim, Y. Lu, An XPS and electrochemical study of the influence of molybdenum and nitrogen on the passivity of austenitic stainless steel, Corrosion Science 31 (1990) 179–190.

[Woese, 1996] C. R. Woese, Phylogenetic trees: Whither microbiology?, Current Biology 6 (1996) 1060–1063.

– X –

[Xia, 2015] J. Xia, C. Yang, D. Xu, D. Sun, L. Nan, Z. Sun, Q. Li, T. Gu, K. Yang, Laboratory investigation of the microbiologically influenced corrosion (MIC) resistance of a novel Cu-bearing 2205 duplex stainless steel in the presence of an aerobic marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, Biofouling 31 (2015) 481–492.

[Xu, 2017a] D. Xu, J. Xia, E. Zhou, D. Zhang, H. Li, C. Yang, Q. Li, H. Lin, X. Li, K. Yang, Accelerated corrosion of 2205 duplex stainless steel caused by marine aerobic *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, Bioelectrochemistry 113 (2017) 1–8.

[Xu, 2017b] J. Xu, M. Li, Q. He, X. Sun, X. Zhou, Z. Su, H. Ai, Effect of flow rate on growth and oxygen consumption of biofilm in gravity sewer, Environmental Science and Pollution Research 24 (2017) 427–435.

– Y –

[Yang, 1984] W. Yang, R.-C. Ni, H.-Z. Hua, A. Pourbaix, The behavior of chromium and molybdenum in the propagation process of localized corrosion of steels, Corrosion Science 24 (1984) 691–707.

[Yang, 1994a] W. P. Yang, D. Costa, P. Marcus, Chemical composition, chemical states, and resistance to localized corrosion of passive Films on an Fe–17%Cr alloy, Journal of The Electrochemical Society 141 (1994) 111–116.

[Yang, 1994b] W. P. Yang, D. Costa, P. Marcus, Resistance to pitting and chemical composition of passive films of a Fe–17%Cr alloy in chloride-containing acid solution, Journal of The Electrochemical Society 141 (1994) 2669–2676.

[Yang, 2016] Y. Yang, A. J. Wikieł, L. T. Dall'Agnol, P. Eloy, M. J. Genet, J. J. G. Moura, W. Sand, C. C. Dupont-Gillain, Paul G. Rouxhet, Proteins dominate in the surface layers formed on materials exposed to extracellular polymeric substances from bacterial cultures, Biofouling 32 (2016) 95–108.

[Yin, 2015] C. Yin, F. Meng, G.-H. Chen, Spectroscopic characterization of extracellular polymeric substances from a mixed culture dominated by ammonia-oxidizing bacteria, Water Research 68 (2015) 740–749.

[Young, 2007] K. D. Young, Bacterial morphology: why have different shapes?, Current Opinion in Microbiology 10 (2007) 596–600.

[Yuan, 2007a] S. J. Yuan, S. O. Pehkonen, Microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by aerobic *Pseudomonas* NCIMB 2021 bacteria: AFM and XPS study, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 59 (2007) 87–99.

[Yuan, 2007b] S. J. Yuan, A. M. F. Choong, S. O. Pehkonen, The influence of the marine aerobic *Pseudomonas* strain on the corrosion of 70/30 Cu–Ni alloy, Corrosion Science 49 (2007) 4352–4385.

[Yuan, 2008] S. J. Yuan, S. O. Pehkonen, Y. P. Ting, E. T. Kang, K. G. Neoh, Corrosion behavior of type 304 stainless steel in a simulated seawater-based medium in the presence and absence of aerobic *Pseudomonas* NCIMB 2021 bacteria, Industrial & Engineering Chemistry Research 47 (2008) 3008–3020.

[Yuan, 2009] S. J. Yuan, AFM study of microbial colonization and its deleterious effect on 304 stainless steel by *Pseudomonas* NCIMB 2021 and *Desulfovibrio desulfuricans* in simulated seawater, Corrosion Science 51 (2009) 1372–1385.

[Yuan, 2013] S. Yuan, B. Liang, Y. Zhao, S. O. Pehkonen, Surface chemistry and corrosion behaviour of 304 stainless steel in simulated seawater containing inorganic sulphide and sulphate-reducing bacteria, Corrosion Science 74 (2013) 353–366.

– Z –

[Zhang, 2009a] L. Zhang, Y. Jiang, B. Deng, W. Zhang, J. Xu, J. Li, Effect of aging on the corrosion resistance of 2101 lean duplex stainless steel, Materials Characterization 60 (2009) 1522–1528.

[Zhang, 2009b] L. Zhang, W. Zhang, Y. Jiang, B. Deng, D. Sun, J. Li, Influence of annealing treatment on the corrosion resistance of lean duplex stainless steel 2101, Electrochimica Acta 54 (2009) 5387–5392.

[Zhang, 2012] Z. Zhang, D. Hana, Y. Jiang, C. Shia, J. Li, Microstructural evolution and pitting resistance of annealed lean duplex stainless steel UNS S32304, Nuclear Engineering and Design 243 (2012) 56– 62.

[Zhang, 2015] P. Zhang, D. Xu, Y. Li, K. Yang, T. Gu, Electron mediators accelerate the microbiologically influenced corrosion of 304 stainless steel by the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm, Bioelectrochemistry 101 (2015) 14–21.

[Zhou, 2018] E. Zhou, H. Li, C. Yang, J. Wang, D. Xu, D. Zhang, T. Gu, Accelerated corrosion of 2304 duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, International Biodeterioration & Biodegradation 127 (2018) 1–9.

[Zinkevich, 1996] V. Zinkevich, I. Bogdarina, H. Kang, M. A.W. Hill, R. Tapper, I. B. Beech, Characterisation of exopolymers produced by different isolates of marine sulphate-reducing bacteria, International Biodeterioration & Biodegradation 37 (1996) 163–172.

[Zuo, 2007] R. Zuo, Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms, Applied Microbiology and Biotechnology 76 (2007) 1245–1253.

Annexe A : Compléments bibliographiques

Tableau A-1 Compositions chimiques, exprimées en pourcentages massiques (% m), et propriétés mécaniques de différentes nuances d'aciers inoxydables. Les paramètres mécaniques ont été déterminés à 20°C, et dans le cas des nuances duplex, dans le sens transversal. Source : fiches techniques APERAM (www.aperam.com).

Famille	EN	AISI	Cr	Ni	Mo	Mn	Si	N	C	Autres	R_m (MPa)[1]	$R_{p0.2}$ (MPa)[2]	A (%)[3]
Ferritique	1.4512	409	11.30	-	-	0.30	0.45	-	0.01	Ti = 0.190	420	250	32
	1.4016	430	16.50	-	-	0.30	0.35	-	0.04	-	500	330	26
	1.4509	441	17.80	-	-	0.30	0.60	-	0.015	Ti + Nb = 0.65	480	310	30
	1.4521	444	17.70	-	1.85	0.30	0.50	-	0.015	Ti + Nb = 0.45	520	370	29
	1. 4621	445	20.20	-	-	0.25	0.25	-	0.015	Nb = 0.45 Cu = 0.45	510	360	29
Austénitique	1.4310	301	17.3	7.3	-	0.9	0.6	-	0.1	-	1000	740	30
	1.4301	304	18.20	8.05	-	1.10	0.40	-	0.05	-	650	300	54
	1.4307	304L	18.20	8.05	-	1.40	0.40	-	0.025	-	630	300	54
	1.4404	316L	16.80	10.10	2.10	1.20	0.40	-	0.025	-	620	300	52
	1.4371	201L	16.30	4.75	-	7.0	-	0.18	0.025	Cu = 0.30	720	360	55
Martensitique	1.4028	420	13.7	-	-	0.35	0.35	0.03	0.32	-	610	330	24
Duplex (austéno-ferritique)	1.4062	2202	23.00	2.50	0.30	1.30	-	0.21	0.02	-	710	530	30
	1.4362	2304	22.80	3.80	0.40	1.80	-	0.13	0.02	-	730	550	30
	1.4462	2205	22.80	5.50	3.10	1.80	-	0.17	0.02	-	800	620	30
	1.4410	2507	25.8	7.0	3.8	-	-	0.3	<0.02		900	670	30

[1] Résistance à la traction

[2] Limite d'élasticité à 0.2 %

[3] Allongement à la rupture

Tableau A-2 Exemples de caractérisation chimique par XPS du film passif formé sur différents alliages.

Réf	Alliage	Préparation de la surface	Epaisseur de l'oxyde (nm)	Composition chimique (% atomiques)	
				Oxyde	Métal sous-jacent
[Maurice, 1996]	Fe-22Cr (110)	Film d'oxyde natif (15 min d'exposition à l'air)	2.0	Fe_2O_3 : 77 Cr_2O_3 : 23	Fe : 82 Cr : 18
		Film d'oxyde natif (18 h d'exposition à l'air)	2.5	Fe_2O_3 : 80 Cr_2O_3 : 20	Fe : 75 Cr : 25
		Passivation électrochimique (0.5 M H_2SO_4 ; +500 mV/ESH ; 2 h)	Couche externe : 0.5 Couche interne : 1.1	Couche externe : $Cr(OH)_3$: 100 Couche interne : Fe_2O_3 : 10 ; Cr_2O_3 : 90	Fe : 55 Cr : 45
		Passivation électrochimique (0.5 M H_2SO_4 ; +500 mV/ESH ; 22 h)	Couche externe : 0.2 Couche interne : 1.2	Couche externe : $Cr(OH)_3$: 100 Couche interne : Fe_2O_3 : 5 ; Cr_2O_3 : 95	Fe : 50 Cr : 50
[Maurice, 1998]	Fe-18Cr-13Ni (100)	Film d'oxyde natif (3 h d'exposition à l'air)	1.8	Fe_2O_3 : 73 Cr_2O_3 : 27	Fe : 60 Cr : 8 Ni : 32
		Film d'oxyde natif (20 h d'exposition à l'air)	2.0	Fe_2O_3 : 79 Cr_2O_3 : 21	Fe : 50 Cr : 19 Ni : 31
		Passivation électrochimique (0.5 M H_2SO_4 ; +500 mV/ESH ; 2 h)	Couche externe : 1.8 Couche interne : 0.6	Couche externe : $Cr(OH)_3$: 96, $Ni(OH)_2$: 4 Couche interne : Fe_2O_3 : 38 Cr_2O_3 : 62	Fe : 20 Cr : 30 Ni : 50
		Passivation électrochimique (0.5 M H_2SO_4 ; +500 mV/ESH ; 20 h)	Couche externe : 1.3 Couche interne : 0.9	Couche externe : $Cr(OH)_3$: 97 ; $Ni(OH)_2$: 3 Couche interne : Fe_2O_3 : 17 ; Cr_2O_3 : 83	Fe : 35 Cr : 15 Ni : 50
[Maurice, 2015]	Fe-17Cr-14.5Ni-2.3Mo (100)	Film d'oxyde natif	Couche externe : 0.7 Couche interne : 1.0	Couche externe : Fe_2O_3 : 100 Couche interne : Cr_2O_3 : 96.4 ; Mo4+/Mo6+ : 3.6	Fe : 60.8 Cr : 13.1 Ni : 24.6 Mo : 1.5
		Passivation électrochimique (0.05 M H_2SO_4 ; +500 mV/ESH ; 2 h)	Couche externe : 0.6 Couche interne : 1.3	Couche externe : Fe_2O_3 : 89.1 ; Mo^{4+}/Mo^{6+} : 10.9 Couche interne : Cr_2O_3, $Cr(OH)_3$: 100	Fe : 51.0 Cr : 14.7 Ni : 32.8 Mo : 1.5
		Passivation électrochimique (0.05 M H_2SO_4 ; +500 mV/ESH ; 20 h)	Couche externe : 0.5 Couche interne : 1.3	Couche externe : Fe_2O_3 : 83.9 ; Mo^{4+}/Mo^{6+} : 16.1 Couche interne : Cr_2O_3, $Cr(OH)_3$: 100	Fe : 50.5 Cr : 15.1 Ni : 33.1 Mo : 1.3

Tableau A-3 Récapitulatif des études portant sur la caractérisation locale du film passif formé sur chaque phase des aciers inoxydables duplex.

Réf	Techniques	Alliage et préparation de la surface	Principaux résultats
[Olsson, 1995]	AES, XPS	Duplex 2205 + alliages monophasés correspondant à chaque phase Passivation électrochimique dans 1 M NaCl	Bonne corrélation concernant la composition du film passif formé sur le duplex et les monophasés mais film passif légèrement plus épais sur les monophasés que sur le duplex Enrichissement en Ni et N à l'interface oxyde/métal sur les deux phases mais plus prononcé sur l'austénite que sur la ferrite Teneur en Cr légèrement plus élevée dans le film passif formé sur la ferrite que dans celui formé sur l'austénite Proposition d'un mécanisme d'interactions entre Mo et N
[Schmidt-Rieder, 1999]	AES	Super duplex Zeron 100 Polarisation dans 0.6 M NaCl (pH = 2) dans le domaine transpassif	Teneur en Cr légèrement plus élevée dans le film formé sur la ferrite Enrichissement en Ni plus prononcé sur l'austénite que sur la ferrite Enrichissement en N dans tout le film formé sur l'austénite, pas de N détecté sur la ferrite La présence de N sur l'austénite pourrait expliquer sa meilleure résistance à la corrosion
[Femenia, 2004]	AES, XPS	Duplex UNS S31803 (AISI 2205), UNS S32750 (AISI 2507), UNS S32305 (AISI 2304) Pulvérisation du film d'oxyde natif	Cr et Mo partitionnés dans la ferrite, Ni et N partitionnés dans l'austénite, gradient de composition entre les phases sur quelques micromètres Enrichissement en Ni sur les deux phases, enrichissement en N sur l'austénite mais pas toujours sur la ferrite Enrichissement en Ni et N sur l'austénite améliore sa résistance à la corrosion Propositions de mécanismes de synergie entre Mo, Ni et N pour chaque alliage
[Kempf, 2008]	AES	Acier inoxydable duplex UNS S31803 (AISI 2205) Oxydation thermique jusque 490°C	Influence des contraintes résiduelles et de l'orientation cristalline sur l'épaisseur et/ou la composition de l'oxyde, épaississement et enrichissement en Cr de l'oxyde pour les zones sous tension Pression en oxygène de 10^{-5} mbar : oxyde plus fin sur la ferrite et composé majoritairement de Cr Pression en oxygène de 2×10^{-5} mbar : épaississement et enrichissement en fer de l'oxyde formé sur l'austénite, peu de variations sur la ferrite

[Vignal, 2010]	AES, électrochimie locale	Duplex UNS S31803 (AISI 2205) et UNS S32304 (AISI 2304) Traitement thermique pour augmenter la taille des grains Polissage mécanique + décapage électrochimique	Après polissage mécanique : UNS S31803 : présence de Mo promeut l'enrichissement en Cr du film passif, ratios Cr/Fe des deux phases proches, Ni présent à l'interface métal/oxyde, teneur en Ni plus élevée sur l'austénite que sur la ferrite ; UNS S32304 : ratio Cr/Fe plus élevé sur la ferrite que sur l'austénite, Ni présent dans tout le film passif, teneur en Ni homogène sur les deux phases Après décapage électrochimique : UNS S31803 : pas de variation de l'épaisseur du film passif, enrichissement en Cr du film passif, pas de différence significative du ratio Cr/Fe entre les phases, Ni dans la partie interne du film passif ; UNS S32304 : épaississement et enrichissement en Cr du film passif, pas de différence significative du ratio Cr/Fe entre les phases, Ni dans la partie interne du film passif Augmentation du ratio Cr/Fe lorsque les contraintes compressives augmentent Influence de la couche d'écrouissage sur le comportement électrochimique
[Vignal, 2011]	AES, SIMS, DRX, électrochimie locale	Duplex UNS S32304 (AISI 2304) Traitement thermique pour augmenter la taille des grains Polissage mécanique + électropolissage + décapage chimique + vieillissement à l'OCP dans NaCl 0.5 M à 50°C pendant 21 jours	Après polissage mécanique, électropolissage et décapage : épaisseur du film passif homogène, ratio Cr/Fe légèrement plus élevé sur la ferrite que sur l'austénite, Ni présent dans tout le film passif préférentiellement sur l'austénite, adsorption de chlorures préférentiellement sur l'austénite, possiblement du fait du plus faible ratio Cr/Fe, différences de stœchiométrie du film passif selon la phase et selon l'orientation cristallographique des grains, meilleure résistance à la piqûration de la ferrite qui pourrait liée au ratio Cr/Fe plus élevé Après vieillissement dans NaCl : épaississement du film passif, épaisseur homogène, enrichissement en Cr du film passif, ratio Cr/Fe plus élevé sur la ferrite que sur l'austénite, quantité de chlorure adsorbé plus importante mais l'effet négatif des chlorures sur la résistance à la corrosion est compensé par l'augmentation du ratio Cr/Fe
[Vignal, 2013a]	AES, XPS (global et local), EBSD, électrochimie locale	Duplex UNS S32304 (AISI 2304) Traitement thermique pour augmenter la taille des grains Polissage mécanique + polissage vibratoire + vieillissement à l'air pendant un an	Après polissage : Film passif plus épais sur l'austénite que sur la ferrite, ratio Cr/Fe légèrement plus élevé sur la ferrite que sur l'austénite, enrichissement en Ni à l'interface métal/oxyde pour l'austénite, ratio O^{2-}/OH^{-} homogène, pas d'influence de l'orientation cristallographique des grains, pas de différence du comportement électrochimique entre les phases Après vieillissement à l'air : Epaississement du film passif, différences d'épaisseur selon l'orientation cristallographique des grains, pas de variation du ratio Cr/Fe et de la teneur en Ni, teneur en eau adsorbée diminue, ratio O^{2-}/OH^{-} inchangé globalement, mais plus élevé sur l'austénite que sur la ferrite, comportements électrochimiques différents pour chaque phase
[Vignal, 2014]	AES, électrochimie locale	Acier inoxydable duplex UNS S32202 (AISI 2202) Traitement thermique ? Polissage mécanique + électropolissage + décapage chimique	Dans tous les cas, ratio Cr/Fe légèrement plus élevé sur la ferrite que sur l'austénite, ces différences sont néanmoins supposées insuffisantes pour induire une différence de résistance à la corrosion entre les phases Détection de N à l'interface métal/oxyde seulement sur l'austénite Après polissage mécanique : film passif plus épais sur la ferrite que sur l'austénite du fait de la présence d'une couche d'écrouissage plus épaisse sur l'austénite que sur la ferrite Après électropolissage: pas de différence d'épaisseur entre les phases, enrichissement en Cr du film passif, teneur en N plus élevée Après décapage chimique : film passif plus fin après décapage, pas de différence d'épaisseur entre les phases, enrichissement en Cr du film passif Pas de différence de comportement électrochimique entre les phases
[Wang, 2015]	Electrochimie, XPS	Echantillons monophasés préparés par dissolution sélective des phases de d'un acier inoxydable duplex 2205 Immersion à l'OCP dans NaCl 3.5 % pendant 12 h	L'austénite a un domaine passif plus étendu et un courant plus bas à la fin du domaine passif que la ferrite Voltammétries cycliques indiquent que le fer est plus riche sur la ferrite Le pic transpassif est plus élevé sur la ferrite que sur l'austénite, ce qui suggère une moins bonne stabilité du chrome sur la ferrite Analyses XPS indiquent que les espèces Cr(III) sont moins stables sur la ferrite que sur l'austénite Ni détecté sur l'austénite mais pas sur la ferrite, pourrait contribuer à la stabilité des espèces Cr(III) sur l'austénite

Annexe B : Conditions utilisées pour la passivation électrochimique

Le domaine passif de l'acier inoxydable duplex 2304 dans H_2SO_4 0.05 M est situé entre environ −500 et +400 mV/ESS (**Figure B-1**). Un potentiel de −100 mV/ESS a été choisi pour la passivation électrochimique.

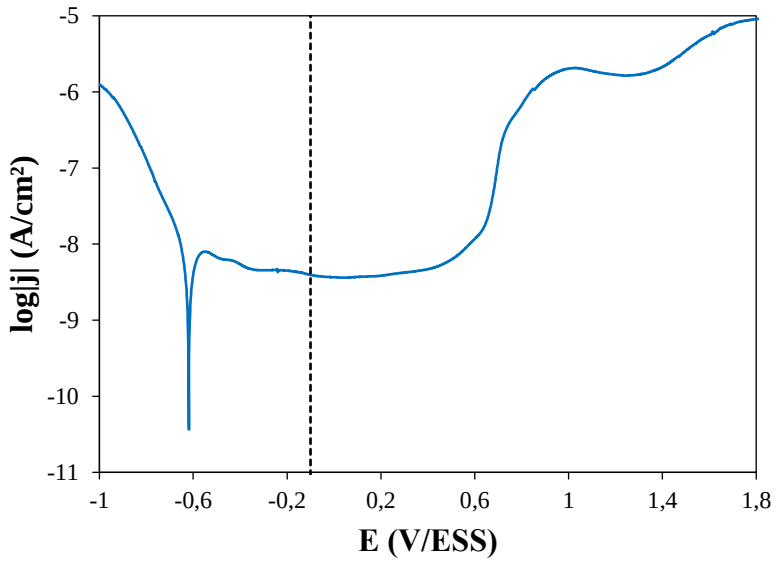


Figure B-1 Courbe de polarisation de l'acier inoxydable duplex 2304 dans H_2SO_4 0.05 M (après 15 min à l'OCP). Vitesse de balayage : 1 mV/s.

Lorsqu'un potentiel de −100 mV/ESS est appliqué à l'acier inoxydable duplex 2304 dans H_2SO_4 0.05 M, une chute du courant est observée, qui correspond à la formation du film passif (**Figure B-2**). Après 30 min, la baisse du courant est peu significative. Par conséquent, un temps de passivation de 30 min a été choisi.

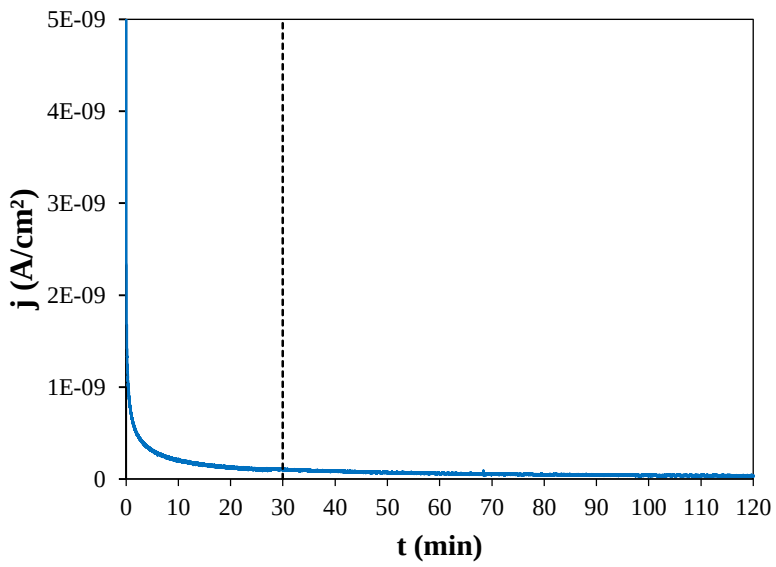


Figure B-2 Evolution du courant au cours du temps lorsqu'un potentiel de −100 mV/ESS est appliqué à l'acier inoxydable duplex 2304 dans H_2SO_4 0.05 M (après 15 min à l'OCP).

Annexe C : Composition des milieux de culture

Tableau C-1 Composition (en g/L) des milieux de culture Marine Agar 2216 et Marine Broth 2216 (BD Difco), pH = 7.6 ± 0.2 at 25°C.

g/L	Marine Agar 2216	Marine Broth 2216
Peptone	5.0	5.0
Extrait de levure	1.0	1.0
Citrate de fer	0.1	0.1
Chlorure de sodium	19.4	19.45
Chlorure de magnésium	8.8	5.9
Sulfate de sodium	3.24	-
Sulfate de magnésium	-	3.24
Chlorure de calcium	1.8	1.8
Chlorure de potassium	0.5	0.55
Bicarbonate de sodium	0.16	0.16
Bromure de potassium	0.08	0.08
Chlorure de strontium	34.0×10^{-3}	34.0×10^{-3}
Acide borique	22.0×10^{-3}	22.0×10^{-3}
Silicate de sodium	4.0×10^{-3}	4.0×10^{-3}
Fluorure de sodium	2.4×10^{-3}	2.4×10^{-3}
Nitrate d'ammonium	1.6×10^{-3}	1.6×10^{-3}
Phosphate disodique	8.0×10^{-3}	8.0×10^{-3}
Agar	15.0	-

Préparation des milieux de culture :

Suspendre la poudre dans de l'eau distillée. Agiter et faire bouillir pendant 1 min pour totalement dissoudre la poudre. Autoclaver à 121°C pendant 15 min.

Annexe D : Détail des paramètres XPS utilisés

Tableau D-1 Paramètres utilisés dans le logiciel Avantage pour introduire l'asymétrie des pics XPS associés aux éléments métalliques.

Pic XPS	L/G mix (%)	*Tail mix* (%)	*Tail exponent* (%)
$Fe_{mét}$ (Fe $2p_{3/2}$)	94.30	9.51	0.0718
$Cr_{mét}$ (Cr $2p_{3/2}$)	35.00	0.66	0.0867
$Ni_{mét}$ (Ni $2p_{3/2}$)	35.00	59.41	0.1040
$Mo_{mét}$ (Mo $3d_{5/2}$ et Mo $3d_{3/2}$)	34.72	64.67	0.0851

Tableau D-2 Valeurs des facteurs de transmission (T_X), des sections efficaces (σ_X) et des libres parcours moyens (λ_X^M) utilisés dans ces travaux.

Niveau de cœur	C 1s	N 1s	Fe $2p_{3/2}$	Cr $2p_{3/2}$	Ni $2p_{3/2}$	Mo $3d_{5/2}$
$\boldsymbol{T_X}$	3079	3233	3753	3502	4062	3008
$\boldsymbol{\sigma_X}$	1.00	1.80	10.82	7.69	14.61	5.62
$\boldsymbol{\lambda_X^{polyethylene}}$ **(nm)**	3.96	-	-	3.17	-	-
$\boldsymbol{\lambda_X^{BSA}}$ **(nm)**	3.24	2.99	-	2.60	-	-
$\boldsymbol{\lambda_X^{glucose}}$ **(nm)**	-	3.06	-	2.67	-	-
$\boldsymbol{\lambda_X^{oxide}}$ **(nm)**	-	2.10	1.63	1.83	1.40	2.34
$\boldsymbol{\lambda_X^{metal}}$ **(nm)**	-	1.74	1.35	1.52	1.17	1.94

Annexe E : Influence de la vitesse de balayage

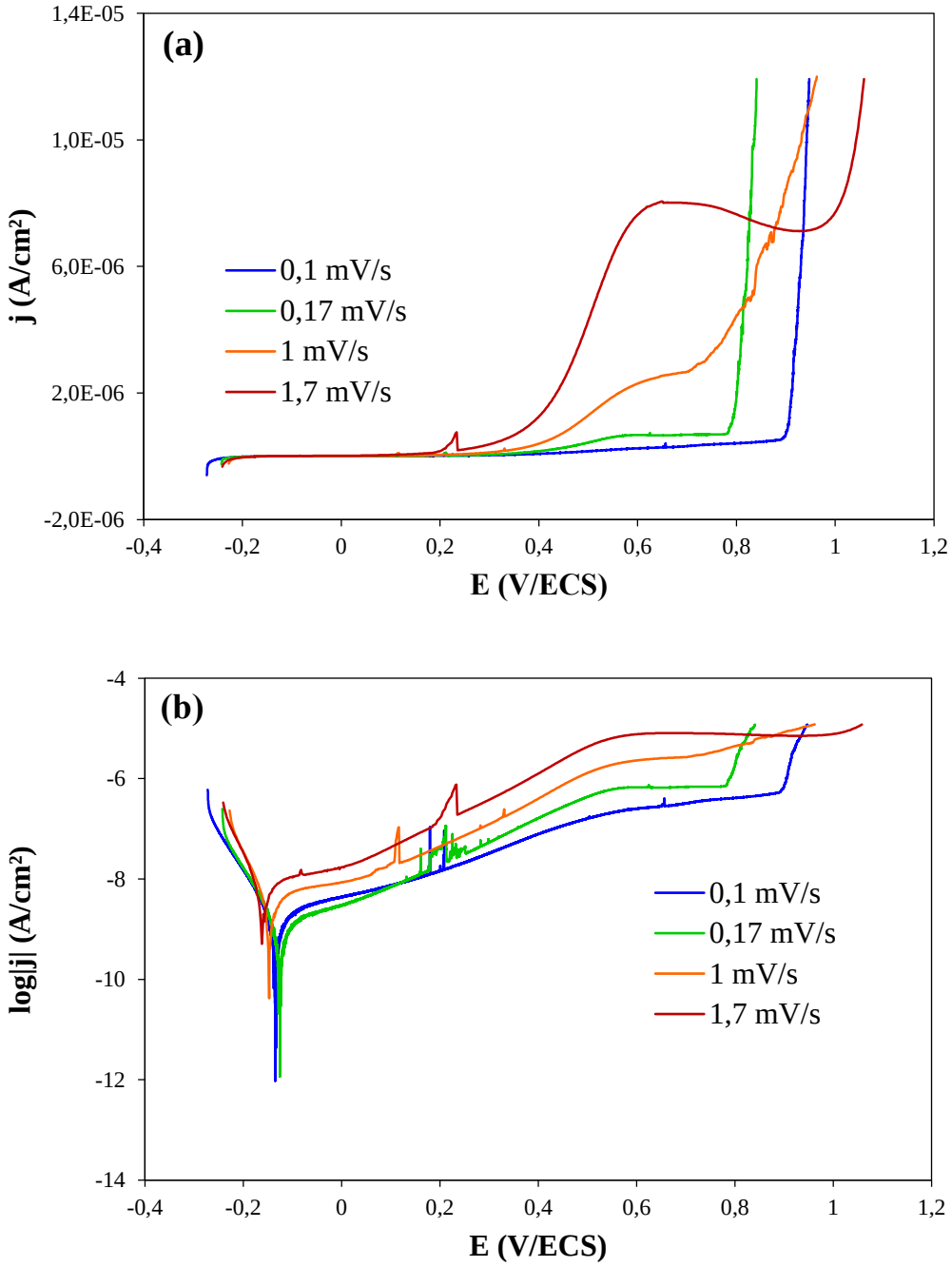


Figure E-1 Courbes de polarisation anodiques en représentation (a) linéaire et (b) logarithmique pour l'acier inoxydable duplex 2304 après 1 heure d'OCP en ASW+N stérile. Potentiel initial : −200 mV/OCP. Vitesse de balayage : 0,1 ; 0,17 ; 1,0 ; 1,7 mV/s.

Les courbes de polarisation anodiques en représentation linéaire (**Figure E-1-a**) et en représentation logarithmique (**Figure E-1-b**) obtenues pour l'acier inoxydable duplex 2304 après 1 heure d'OCP en ASW+N stérile montrent un effet de la vitesse de balayage. Dans le domaine passif, on ne distingue pas de plateau passif, mais une augmentation continue de la densité de courant. L'absence de plateau passif peut être expliquée par des conditions non stationnaires, quelle que soit la vitesse de balayage utilisée. Toutefois, la densité de courant diminue lorsque la vitesse de balayage diminue, ce qui suggère qu'on se rapproche des conditions stationnaires. Au vu de ces résultats, nous avons choisi dans ce travail une vitesse de balayage de 0,17 mV/s.

Annexe F : Résumé des travaux présentés dans la thèse

Cette thèse est structurée en 6 chapitres. Le Chapitre I est une synthèse bibliographique (en français) et le Chapitre II présente les techniques expérimentales (en français). Le Chapitre III, le Chapitre IV, le Chapitre V et le Chapitre VI présentent les résultats des travaux de thèse et sont chacun rédigés en anglais dans un format de type publication. Ainsi, les chapitres de résultats sont constitués de différentes parties :

- Une introduction qui présente le contexte de l'étude et son positionnement par rapport aux travaux de la littérature ;
- Une partie présentant les matériaux et les méthodes ;
- Une partie résultats et/ou discussion ;
- Une conclusion.

Ces travaux feront l'objet de publications. Dans ce document, nous présenterons un résumé en français des principaux résultats présentés dans la thèse.

Résumé du Chapitre III

Titre en anglais :

« Comparative study of the surface oxide films on lean duplex and corresponding single phase stainless steels by XPS and ToF-SIMS »

Titre en français :

« Etude comparative des films d'oxyde formés à la surface d'un acier inoxydable lean duplex et des alliages monophasés correspondants par XPS et ToF-SIMS »

L'objectif de ce chapitre est de caractériser le film d'oxyde natif formé après polissage mécanique à la surface de l'acier inoxydable « lean » duplex 2304 ainsi que sur les alliages monophasés (austénitique et ferritique) correspondant à chacune des phases de l'alliage duplex. Ce travail propose une première approche pour caractériser la couche d'oxyde formée à la surface des aciers inoxydables duplex grâce à un couplage XPS/ToF-SIMS.

Pour chaque alliage, le film d'oxyde natif formé après polissage mécanique peut être décrit par une couche d'oxydes et d'hydroxydes composée majoritairement d'espèces Fe(III) et Cr(III) avec une faible quantité d'espèces Mo(IV) et Mo(VI). Le nickel n'est pas détecté sous forme oxydée. Sur les profils ToF-SIMS, l'évolution des signaux caractéristiques des oxydes de fer (FeO_2^-), de chrome (CrO_2^-) et de molybdène (MoO_3^-) suggère que le fer et le molybdène sont concentrés dans la partie externe de la couche d'oxyde alors que le chrome est concentré dans la partie interne, ce qui suggère que la couche d'oxyde a une structure « bicouche ». En revanche, les signaux associés aux oxydes (O_2^-) et aux hydroxydes (OH^-) ne révèlent aucune stratification de ces espèces.

La présence de composantes métalliques dans les spectres XPS des niveaux de cœur Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ et Mo 3d indique que l'épaisseur de la couche d'oxyde est de l'ordre de quelques nanomètres. Afin de calculer l'épaisseur et la composition de la couche d'oxyde ainsi que la composition du métal sous-jacent à partir des données XPS, un modèle a été proposé. Ce modèle consiste en une couche d'oxyde homogène et continue composée d'oxydes et/ou d'hydroxydes de Fe(III), Cr(III), Mo(IV) et Mo(VI) au-dessus du substrat métallique (alliage duplex, austénitique ou ferritique) composé de Fe, Cr, Ni, Mo et N. Le système d'équations associé à ce modèle a été détaillé.

L'épaisseur de la couche d'oxyde déterminée par XPS est de :

- Pour l'alliage duplex : 2.1 $\pm$ 0.1 nm après 24 heures de vieillissement à l'air et 2.4 $\pm$ 0.1 nm après 3 semaines de vieillissement à l'air ;
- Pour l'alliage austénitique : 2.8 $\pm$ 0.1 nm après 3 semaines de vieillissement à l'air ;
- Pour l'alliage ferritique : 2.4 $\pm$ 0.1 nm après 3 semaines de vieillissement à l'air.

Les épaisseurs équivalentes obtenues à partir des profils ToF-SIMS sont légèrement inférieures mais du même ordre de grandeur que les épaisseurs obtenues par XPS. Ces

résultats indiquent qu'après 3 semaines de vieillissement à l'air, l'épaisseur de la couche d'oxyde est similaire pour l'alliage duplex et l'alliage ferritique alors qu'elle est légèrement plus élevée pour l'alliage austénitique. Pour l'alliage duplex, l'épaisseur du film d'oxyde natif augmente légèrement lorsque le temps de vieillissement à l'air augmente de 24 heures à 3 semaines, ce qui suggère une croissance continue de la couche d'oxyde.

Les données XPS indiquent que, pour chaque alliage, le film d'oxyde natif est enrichi en chrome et en molybdène alors que le métal sous-jacent est enrichi en nickel, en molybdène et en azote par rapport à la composition à cœur de l'alliage. La présence d'un enrichissement en nickel et en azote dans le métal proche de l'interface métal/oxyde est confirmée sur les profils ToF-SIMS par les signaux caractéristiques de l'azote (CN^-) et du nickel métallique (Ni_2^-). Des différences de composition chimique de la couche d'oxyde et du métal sous-jacent entre les trois alliages sont mises en évidence. Les résultats obtenus indiquent que la teneur en éléments d'alliage (Fe, Cr, Ni, Mo et N) dans le film d'oxyde natif et/ou dans le métal sous-jacent est directement liée à la teneur à cœur des alliages.

Etant donnés ces résultats, des différences de composition peuvent être attendues à l'échelle des phases austénite et ferrite de l'alliage duplex. L'analyse locale de la couche d'oxyde formée localement sur les phases de l'acier inoxydable duplex 2304 par un couplage XPS/ToF-SIMS fait l'objet du chapitre suivant **[CHAPITRE IV]**.

Résumé du Chapitre IV

Titre en anglais :
« XPS and ToF-SIMS characterization of the surface oxides on duplex stainless steel – Global and local approaches »

Titre en français :
« Caractérisation XPS et ToF-SIMS des oxydes formés à la surface d'un acier inoxydable duplex – Approches globale et locale »

L'objectif de ce chapitre est de caractériser le film d'oxyde natif formé après polissage mécanique et le film passif formé par passivation électrochimique dans H_2SO_4 0.05 M à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 par un couplage XPS/ToF-SIMS. A notre connaissance, ce travail propose la première comparaison des surfaces native et passive dans le cas d'un acier inoxydable duplex. Une méthodologie innovante permettant de caractériser localement la couche d'oxyde formée sur les phases austénite et ferrite sera présentée. Une attention particulière sera portée à la distribution des éléments d'alliage (Cr, Mo, Ni et N) dans la couche d'oxyde et le métal sous-jacent au niveau de chaque phase.

Le film d'oxyde natif ainsi que le film passif formé à la surface de l'alliage duplex peuvent être décrit, comme précédemment, par une couche d'oxydes et d'hydroxydes composée majoritairement d'espèces Fe(III) et Cr(III) avec une faible quantité d'espèces Mo(IV) et Mo(VI). Le nickel n'est pas détecté sous forme oxydée. Sur les profils ToF-SIMS, l'évolution des signaux caractéristiques des oxydes de fer (FeO_2^-), de chrome (CrO_2^-) et de molybdène (MoO_3^-) suggère que le fer et le molybdène sont concentrés dans la partie externe de la couche d'oxyde alors que le chrome est concentré dans la partie interne, ce qui suggère que la couche d'oxyde a une structure « bicouche ». Au vu des analyses XPS angulaires, la stratification du fer et du chrome dans la couche d'oxyde est beaucoup plus prononcée pour le film passif que pour le film d'oxyde natif. La quantité d'hydroxydes augmente après la passivation. Les analyses XPS angulaires suggèrent que les espèces oxydées et hydroxydées, qui ne sont pas stratifiées pour film d'oxyde natif, sont stratifiées pour le film passif, avec une concentration des espèces hydroxydées dans la partie externe de la couche d'oxyde.

La présence de composantes métalliques dans les spectres XPS des niveaux de cœur Fe $2p_{3/2}$, Cr $2p_{3/2}$, Ni $2p_{3/2}$ et Mo 3d indique que l'épaisseur de la couche d'oxyde est de l'ordre de quelques nanomètres. L'épaisseur de la couche d'oxyde déterminée par XPS est de :

- Pour le film d'oxyde natif : 2.4 ± 0.1 nm
- Pour le film passif : 2.0 ± 0.2 nm

Les épaisseurs équivalentes obtenues à partir des profils ToF-SIMS sont légèrement inférieures mais du même ordre de grandeur que les épaisseurs obtenues par XPS. Ces résultats suggèrent que le film passif est légèrement plus fin que le film d'oxyde natif. Cette différence peut être expliquée par la dissolution d'une partie de la couche d'oxyde au cours de

la passivation électrochimique ou par une migration plus lente des espèces dans les couches d'oxydes riches en chrome entraînant une vitesse de croissance plus faible pour le film passif que pour le film d'oxyde natif.

A l'échelle globale, les données XPS et ToF-SIMS indiquent que la couche d'oxyde est enrichie en chrome et en molybdène par rapport au cœur de l'alliage. Ces enrichissements sont plus prononcés pour le film passif que pour le film d'oxyde natif, en conséquence de la dissolution préférentielle de l'oxyde de fer en milieu acide. Un enrichissement en nickel et en azote dans le métal proche de l'interface métal/oxyde est mis en évidence par XPS et confirmé sur les profils ToF-SIMS par l'évolution des signaux caractéristiques de l'azote (CN^-) et du nickel métallique (Ni_2^-). L'enrichissement en nickel est plus prononcé pour le film passif que pour le film natif alors que l'enrichissement en azote est similaire pour les deux surfaces.

Une relation linéaire est mise en évidence entre le ratio d'aires CrO_2^- / FeO_2^- calculé par ToF-SIMS et la concentration en Cr(III) de la couche d'oxyde calculée par XPS, permettant une approche quantitative des données ToF-SIMS.

Les cartographies ToF-SIMS des ions CN^- et Ni^- permettent de visualiser les phases austénite et ferrite, qui présentent des teneurs différentes en azote et en nickel. A partir de ces cartographies, des profils ToF-SIMS correspondant à chacune des phases de l'alliage duplex ont été extraits, ce qui a permis une caractérisation à l'échelle locale. Les profils ToF-SIMS locaux montrent que pour le film d'oxyde natif, l'épaisseur de la couche d'oxyde est légèrement plus élevée sur la phase austénite que sur la phase ferrite (différence d'épaisseur d'environ 0.2 nm), en accord avec les résultats obtenus pour les alliages monophasés **[CHAPITRE III]**. Pour le film passif, l'épaisseur de la couche d'oxyde est similaire sur chaque phase. La stratification des espèces Fe, Cr et Mo qui a été démontrée à l'échelle globale (couche externe riche en Fe et en Mo et couche interne riche en Cr) est observée sur chacune des phases. Les ratios d'aires CrO_2^- / FeO_2^- et MoO_3^- / FeO_2^- calculés sur chaque phase permettent de mettre en évidence des différences de composition chimique de la couche d'oxyde : les teneurs en chrome et en molybdène dans la couche d'oxyde sont plus élevées sur la ferrite que sur l'austénite, aussi bien pour le film d'oxyde natif que pour le film passif. Grâce à la corrélation des résultats XPS et ToF-SIMS, les valeurs des concentrations en Cr(III) de la couche d'oxyde formée sur chaque phase sont estimées. Pour le film natif, ces

valeurs sont en bon accord avec les résultats obtenus pour les alliages monophasés **[CHAPITRE III]**. Les profils ToF-SIMS indiquent qu'un enrichissement en nickel et en azote est présent à l'interface métal/oxyde pour les deux phases, mais il est plus prononcé pour l'austénite que pour la ferrite.

Ainsi, le Chapitre III et le Chapitre IV proposent deux méthodologies permettant de caractériser la couche d'oxyde formée à la surface d'un acier inoxydable duplex. Le Chapitre III s'appuie sur la caractérisation d'alliages monophasés, élaborés de manière à avoir la composition chimique la plus proche possible de celle des phases de l'alliage duplex. Le Chapitre IV s'appuie sur la caractérisation de la couche d'oxyde localement sur les phases de l'alliage duplex. Les conclusions de ces deux chapitres sont en bon accord.

Résumé du Chapitre V

Titre en anglais :
« Adhesion of marine bacteria on duplex stainless steel in artificial seawater – Early stage of biofilm formation »

Titre en français :
« Adhésion de bactéries marines sur un acier inoxydable duplex en eau de mer artificielle – Premiers stades de la formation du biofilm »

L'objectif de ce chapitre est de caractériser les interactions bactéries-surface qui ont lieu au cours de l'adhésion des bactéries marines aérobies *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 et la formation d'un biofilm à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 en eau de mer artificielle, sans (ASW) et avec (ASW+N) addition de nutriments. Les premiers stades du biofilms sont considérés ici (1 heure d'adhésion). Différentes techniques sont couplées : des techniques microscopiques (microscopie à épifluorescence, MEB et AFM), un dénombrement des bactéries viables cultivables planctoniques et adhérentes, des techniques d'analyse de surface (XPS et ToF-SIMS) et des techniques électrochimiques (évolution du potentiel à l'abandon, courbes de polarisation anodiques et cathodiques).

Les techniques de caractérisation microscopiques (microscopie à épifluorescence, MEB et AFM) ont permis de caractériser la morphologie des bactéries adhérant à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304. Les bactéries adhérentes sont en forme de bacille (bâtonnet) et forment des chaînes suite au processus de fission binaire **[Yuan, 2007a]**. Après 1 heure d'adhésion, les taux de recouvrement bactériens (obtenus par microscopie à épifluorescence) sont faibles en ASW (3.3 ± 1.3 %) ainsi qu'en ASW+N (2.8 ± 0.7 %). Sur les images MEB, la longueur des bactéries est comprise entre 1 et 2 µm en ASW et entre 1 et 3 µm en ASW+N alors que leur largeur est comprise entre 0.4 et 0.6 µm en ASW ainsi qu'en ASW+N. Sur les images AFM, les dimensions latérales des bactéries sont plus élevées, ce qui peut être dû à la préparation de l'échantillon (pas de procédure de fixation et de déshydratation) ou à des artefacts de mesure par AFM **[Osiro, 2012]**. Les profils réalisés sur la section transverse des bactéries montrent que la hauteur des bactéries est de 435 ± 97 nm. Cette valeur est proche de la largeur des bactéries mesurée sur les images MEB. La présence de « *Loosely Bound* » EPS (EPS faiblement attachés) sur la surface à côté des bactéries n'est pas identifiée. Il est suggéré qu'un temps d'adhésion de 1 heure est trop court pour permettre aux bactéries de produire des LB EPS.

Après 1 heure d'adhésion bactérienne sur l'alliage duplex, le nombre de bactéries viables cultivables, aussi bien planctoniques qu'adhérentes, est plus élevé en ASW+N qu'en ASW. Ceci indique que la présence de nutriments induit une augmentation du nombre de bactéries viables cultivables.

Les analyses XPS quantitatives montrent, en accord avec les chapitres précédents, que le film d'oxyde formé à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 a une épaisseur comprise entre 2.3 et 2.4 nm et est composé majoritairement d'espèces Fe(III) et Cr(III) avec une faible quantité d'espèces Mo(IV) et Mo(VI). Par rapport à la composition à cœur de l'alliage, la couche d'oxyde est enrichie en chrome et en molybdène alors que le métal sous-jacent est enrichi en nickel, en molybdène et en azote. Aucune modification significative du film d'oxyde suite à l'immersion en ASW et ASW+N sans et avec inoculation de *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 n'est identifiée par XPS. Néanmoins, étant donnée l'épaisseur analysée par XPS (de l'ordre de 10 nm) et la hauteur des bactéries mesurée par AFM (435 ± 97 nm), seulement l'oxyde et le métal sous-jacent non couverts par les bactéries sont analysés par XPS alors qu'aucune information n'est obtenue par cette technique sur la surface directement sous les bactéries.

Les profils ToF-SIMS montrent la présence d'un film d'oxyde sous les bactéries. Une conclusion similaire avait été obtenue par ToF-SIMS par Seyeux *et al.* **[Seyeux, 2015]** dans le cas d'*Escherichia coli* adhérant à la surface de l'acier inoxydable 316L. Cependant, du fait de la non-uniformité de la hauteur des bactéries, l'interface bactéries/film d'oxyde n'est pas clairement définie sur les profils ToF-SIMS. L'épaisseur et la composition du film d'oxyde présent sous les bactéries ne peuvent donc pas être discutées ici.

Les profils ToF-SIMS mettent en évidence la présence du film d'oxyde non couvert par les bactéries. Les épaisseurs équivalentes obtenues à partir des profils ToF-SIMS sont légèrement inférieures mais du même ordre de grandeur que les épaisseurs obtenues par XPS. La méthodologie permettant une exploitation quantitative des données ToF-SIMS, développée dans le Chapitre IV, a été utilisée pour comparer les teneurs en Cr(III) de la couche d'oxyde en présence de bactéries. En ASW, des résultats similaires sont obtenus par XPS et ToF-SIMS. En ASW+N, la teneur en Cr(III) est plus élevée par ToF-SIMS que par XPS. Ce résultat peut être expliqué par le fait que la zone analysée par XPS (disque de 500 µm de diamètre) est beaucoup plus élevée que la zone analysée par ToF-SIMS (30×30 µm²). Ainsi, la surface analysée par XPS comprend plus de zones éloignées des bactéries que la zone analysée par ToF-SIMS. Nous pouvons faire l'hypothèse que des interactions bactéries/oxyde sur de faibles distances (quelques µm) conduisent à un enrichissement de la couche d'oxyde (en présence de nutriments dans le milieu). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Seyeux *et al.* **[Seyeux, 2015]** qui montrent par ToF-SIMS un enrichissement en chrome de la couche d'oxyde sous et à côté des cellules d'*Escherichia coli* adhérant à la surface de l'acier inoxydable 316L.

La nature chimique du biofilm a été étudiée par XPS et ToF-SIMS. Un modèle a été proposé afin d'interpréter de manière quantitative les données XPS, en considérant que le biofilm est composé de protéines (modélisées par la BSA) et de polysaccharides (modélisés par le glucose). Des compositions chimiques similaires sont trouvées en ASW (63 % de protéines et 37 % de polysaccharides) et en ASW+N (62 % de protéines et 38 % de polysaccharides). Les résultats ToF-SIMS indiquent que différents fragments ioniques peuvent être associés aux bactéries : des ions hydrocarbures, des ions contenant de l'oxygène, de l'azote, du phosphore et du soufre. Ces résultats illustrent la complexité de la composition chimique des bactéries et des EPS adhérant à la surface.

Une caractérisation électrochimique a été réalisée après 1 heure d'adhésion en ASW+N. Les courbes de polarisation anodiques suggèrent que l'adhésion bactérienne inhibe la propagation des piqûres stables, ce qui pourrait être lié à la présence d'un film passif plus protecteur. Les courbes de polarisation cathodiques suggèrent que la respiration bactérienne en présence d'une grande quantité de nutriments induit une baisse de la concentration en oxygène dissous. Une vitesse de respiration bactérienne a été proposée à partir de ces résultats.

Résumé du Chapitre VI

Titre en anglais :
« Adhesion of marine bacteria on duplex stainless steel in artificial seawater – Later stages of biofilm formation »

Titre en français :
« Adhésion de bactéries marines sur un acier inoxydable duplex en eau de mer artificielle – Stades avancés de la formation du biofilm »

L'objectif de ce chapitre est, dans la continuité du chapitre précédent, de caractériser les interactions bactéries-surface qui ont lieu au cours de l'adhésion des bactéries marines aérobies *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 et la formation d'un biofilm à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 en eau de mer artificielle, sans (ASW) et avec (ASW+N) addition de nutriments. Alors que le chapitre précédent portait sur les premiers stades de la formation du biofilm (1 heure d'adhésion), des stades plus avancés sont considérés ici (24 heures et 1 semaine d'adhésion). Différentes techniques sont couplées : des techniques microscopiques (microscopie à épifluorescence, MEB et AFM), un dénombrement des bactéries viables cultivables planctoniques et adhérentes, des analyses de surface (XPS) et des techniques électrochimiques (évolution du potentiel à l'abandon, courbes de polarisation anodiques et cathodiques).

Les techniques microscopiques utilisées (microscopie à épifluorescence, MEB et AFM) ont permis de caractériser la morphologie du biofilm présent à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304. Par rapport au taux de recouvrement bactérien déterminé par microscopie à épifluorescence après 1 heure d'adhésion en ASW (3.3 $\pm$ 1.3 %) et en ASW+N (3.3 $\pm$ 1.3

%), une augmentation du taux de recouvrement est constatée après 24 heures d'adhésion en ASW (27.4 ± 5.1 %) et en ASW+N (28.8 ± 4.2 %). Après 1 semaine d'adhésion, le taux de recouvrement diminue en ASW (12.7 ± 8.0 %), mais surtout en ASW+N (2.8 ± 0.9 %). L'effet de la présence des nutriments sur la taille des bactéries a été discuté. En ASW, la taille des bactéries ne varie pas significativement tout au long de l'adhésion. En ASW+N, la taille des bactéries augmente après 24 heures puis diminue après 1 semaine. Des agrégats cellulaires sont visibles à la surface. Après 24 heures, des filaments sont visibles sur les images MEB au sein de ces agrégats, qui pourraient correspondre à des « *Loosely Bound* » EPS. Après 1 semaine, la structure des bactéries est endommagée et du contenu bactérien semble être répandu sur la surface, probablement en conséquence de la lyse cellulaire. En ASW+N, les profils en hauteur AFM indiquent que la hauteur des bactéries est de 252 ± 48 nm après 24 heures alors que la hauteur des agrégats est comprise entre 100 et 300 nm après 1 semaine. Aucune piqûre n'est identifiée à la surface de l'alliage duplex.

Ainsi, alors qu'un temps d'adhésion de 1 heure correspond aux premiers stades de la formation du biofilm (taux de recouvrement faible), le biofilm formé après 24 heures peut être considéré comme mature (taux de recouvrement élevé) alors qu'un biofilm en déclin est observé après 1 semaine (baisse du taux de recouvrement et structure endommagée), particulièrement en présence de nutriments dans le milieu.

En ASW, le nombre de bactéries viables cultivables planctoniques reste approximativement constant tout au long de l'adhésion, alors qu'en ASW+N, une augmentation continue du nombre de bactéries cultivables planctoniques est observée. Pour des temps d'adhésion de 1 heure et de 24 heures, la présence de nutriments cause une augmentation du nombre de bactéries viables cultivables adhérentes, alors que pour un temps d'adhésion de 1 semaine, la présence de nutriments semble causer une baisse du nombre de bactéries viables cultivables adhérentes.

Les analyses XPS permettent de caractériser quantitativement la couche d'oxyde (épaisseur et composition) non couverte par les bactéries. Après 24 heures d'adhésion en présence de bactéries, la couche d'oxyde n'est pas modifiée par rapport aux échantillons témoins. Après 1 semaine d'adhésion en présence de bactéries, la couche d'oxyde est légèrement plus fine par rapport aux échantillons témoins, ce qui suggère que la formation du biofilm inhibe la croissance de la couche d'oxyde. Des espèces Fe(II) sont détectées en présence de nutriments,

et un enrichissement supplémentaire en Cr(III) est noté, probablement lié à la formation d'hydroxydes de chrome. Ces modifications peuvent être liées à des modifications physico-chimiques du milieu (baisse de la teneur en oxygène dissous) ou à des processus métaboliques. La couche d'oxyde présente sous les bactéries ne peut pas être analysée par XPS, mais elle pourrait être déjà affectée par la présence du biofilm pour des temps d'adhésion plus courts.

Le couplage des informations obtenues par microscopie à épifluorescence et par XPS a permis de développer un modèle afin de mettre en évidence et de quantifier la présence des « *Loosely Bound* » EPS produits par les bactéries à la surface de l'alliage duplex 2304. Après 24 heures d'adhésion, les LB EPS représentent une part significative du biofilm, particulièrement en l'absence de nutriments. Après une semaine d'adhésion, le biofilm formé en l'absence de nutriments comprend également une part significative de LB EPS, alors qu'en présence de nutriments, le biofilm ne comprend pas de LB EPS. Ainsi, l'absence de nutriments dans le milieu semble favoriser la production de LB EPS, ce qui pourrait contribuer à la croissance du biofilm et à la survie des bactéries au sein du biofilm (en lien avec la baisse du taux de recouvrement et du nombre de bactéries viables cultivables après 1 semaine en présence de nutriments).

Les mesures électrochimiques réalisées en ASW+N montrent que la présence de bactéries cause une baisse prononcée du potentiel à l'abandon (OCP) et du potentiel de corrosion (E_{corr}) au cours de l'adhésion, ainsi qu'une baisse de la densité de courant du plateau correspondant à la réduction de l'oxygène dissous sur les courbes de polarisation cathodiques. Ces observations sont attribuées à une diminution de la concentration en oxygène dissous liée à la respiration bactérienne. En présence de bactéries, une augmentation de la densité de courant anodique par rapport aux échantillons témoins est observée. Ceci indique que la formation du biofilm sur des temps longs (24 heures et 1 semaine) pourrait favoriser la corrosion de l'alliage duplex 2304, ce qui pourrait dans ce cas être lié à la présence d'un film passif moins protecteur.

Ainsi, dans le Chapitre V et le Chapitre VI, nous avons caractérisé l'évolution de la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 au cours de l'adhésion de bactéries et la formation d'un biofilm. Nous avons observé que la formation du biofilm s'accompagne de modifications de la couche d'oxyde (à côté des bactéries). La nature chimique du biofilm a également été

discutée et un modèle a été proposé, permettant, à partir des données XPS, de calculer le taux de recouvrement du biofilm. Enfin, les mesures électrochimiques ont montré que la présence du biofilm a une influence sur le comportement électrochimique de l'alliage duplex (processus anodiques et cathodiques).

Résumé

Les aciers inoxydables doivent leur résistance à la corrosion à la formation d'une couche d'oxyde à leur surface, communément qualifiée de film passif, qui a une épaisseur de quelques nanomètres et se compose majoritairement d'oxydes et/ou d'hydroxydes de Fe(III) et de Cr(III). Cependant, dans des milieux agressifs, la stabilité de la couche d'oxyde peut être compromise, ce qui peut déclencher des phénomènes de corrosion (localisée ou généralisée). Par exemple, en présence de microorganismes, et plus particulièrement de bactéries, l'adhésion bactérienne et la formation d'un biofilm à la surface peut conduire à l'initiation et/ou à l'accélération des processus de corrosion : on parle alors de biocorrosion. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la couche d'oxyde formée à la surface de l'acier inoxydable duplex 2304 par un couplage de techniques fines d'analyse des surfaces (XPS et ToF-SIMS). Nous avons notamment mis en évidence des différences concernant la composition chimique de la surface sur chacune des phases de l'alliage duplex. Dans un second temps, nous avons caractérisé la surface de l'alliage duplex au cours de l'adhésion de bactéries marines aérobies *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 en milieu marin par un couplage de techniques de caractérisation microscopiques (microscopie à épifluorescence, MEB et AFM), de techniques fines d'analyse des surfaces (XPS et ToF-SIMS) et de techniques électro-chimiques (suivi du potentiel à l'abandon, courbes de polarisation anodiques et cathodiques). Nous avons notamment montré que la formation du biofilm s'accompagne de modifications de la couche d'oxyde.

Mots Clés

Acier inoxydable, duplex, passivation, biofilm, biocorrosion

Abstract

Stainless steels have a high corrosion resistance thanks to the formation of an oxide layer at their surface, commonly referred to as the passive film, which is a few nanometers thick and composed mainly of Fe(III) and Cr(III) oxides and/or hydroxides. However, in aggressive environments, the stability of the oxide layer can be compromised, which can initiate corrosion phenomena (localized or general). For example, in presence of microorganisms, and more particularly of bacteria, bacterial adhesion and biofilm formation at the surface can lead to the initiation and/or the acceleration of corrosion processes: this is referred to as biocorrosion. In this work, we first characterized the oxide layer formed at the surface of 2304 duplex stainless steel by a coupling of fine surface analysis techniques (XPS and ToF-SIMS). We showed differences in the chemical composition of the surface on each phase of the duplex alloy. We then characterized the surface of the duplex alloy during the adhesion of marine aerobic bacteria *Pseudoalteromonas* NCIMB 2021 in marine medium by a coupling of microscopic characterization techniques (epifluorescence microscopy, SEM and AFM), fine surface analysis techniques (XPS and ToF-SIMS) and electrochemical techniques (open circuit potential monitoring, anodic and cathodic polarization curves). In particular, we showed that biofilm formation is accompanied by modifications of the oxide layer.

Keywords

Stainless steel, duplex, passivation, biofilm, biocorrosion