

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERRI TIZI-OUZOU



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master
Spécialité : Chimie de l'environnement

THEME

Corrosion bactérienne :
« Influences des milieux de cultures spécifiques sur des bactéries sulfato-réductrices de la croissance »

Présenté par : M^{elle} AMIROU Siham
M^{elle} HADDADOU Imane

Soutenu le 03/07/2011 devant le jury composé de :

Président : M ^{me} DJABRI ADOUR Lydia	Professeur	(UMMTO)
Promoteurs: Mr. GANA Med Lamine	Maitre de recherche	(CRD-Boumerdes)
Mr. LOUNICI Hakim	Professeur	(UMMTO)
Examineurs: M ^{me} KEBBOUCHE Salima	Maitre de conférences	(UMBB)
Mr. DELLAH Mohamed	Chargé de cours	(UMMTO)

Promotion: 2010-2011

REMERCIEMENTS

On tient dans un premier temps à remercier notre promoteur Mr. LOUNICI. H Professeur à l'UMMTO pour sa sympathie, sa disponibilité, sa bonne humeur et sa générosité, ses idées innovantes et conseils, ainsi que pour son aide précieuse de tous les jours et le temps qu'il nous a consacré pour la réalisation de ce travail

On ne manquerait pas non plus de dire un grand merci à Mr. GANA M.L chef de laboratoire de corrosion (maitre de conférences) qui nous a fait confiance et a accepté de diriger cette étude. Nous le remercions de même pour son encadrement scientifique très formateur et de qualité, ainsi que pour ses conseils et ses encouragements qui nous ont été bénéfiques pour accomplir ce laborieux travail.

On remercie également tous les membres du département de chimie qui ont contribué à rendre agréable l'année de Master et notamment le chef de département Mr. MOUSSAOUI. R

On tient à remercier toute l'équipe enseignante pour la richesse des enseignements et des échanges tout au long de notre formation.

On remercie les membres du jury Madame DJABERI, Mr DELAH, Madame KEBBOUCHE qui ont accepté d'examiner ce travail à sa juste valeur, et de nous faire part de leurs remarques qui contribueront, sans doute à son perfectionnement.

Nos vifs remerciements vont, également à l'ensemble du personnel du centre de recherche et développement CRD Boumerdes plus précisément au personnel de la direction de traitement des hydrocarbure (TRH) , en commençant par Mr ADJEB directeur de la direction ainsi que Mr. MALKI.M.

Enfin il serait difficile d'oublier toutes les personnes qui auront contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire !"

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé et donner le courage pour terminer cet ouvrage

*Ce mémoire est dédié
à mes très chers parents,
qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études. Sans eux, je n'aurais certainement pas fait d'études longues. Ce mémoire représente donc l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'ils m'ont prodigués tout au long de ma scolarité. Qu'ils en soient remerciés par cette trop modeste dédicace.*

A mon grand père et ma grande mère

Que dieu vous accorde santé et longue vie

*A mes chères sœurs leyla et souad et à mon cher frère mohamed
En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.*

A mes chères nièces katia et ryma

qui ont rempli ma vie de joie et de bonheur

A mes tantes et à mes oncles.

A toute la famille Amirou et Saibi

A mes meilleures amies : Imane et Amina

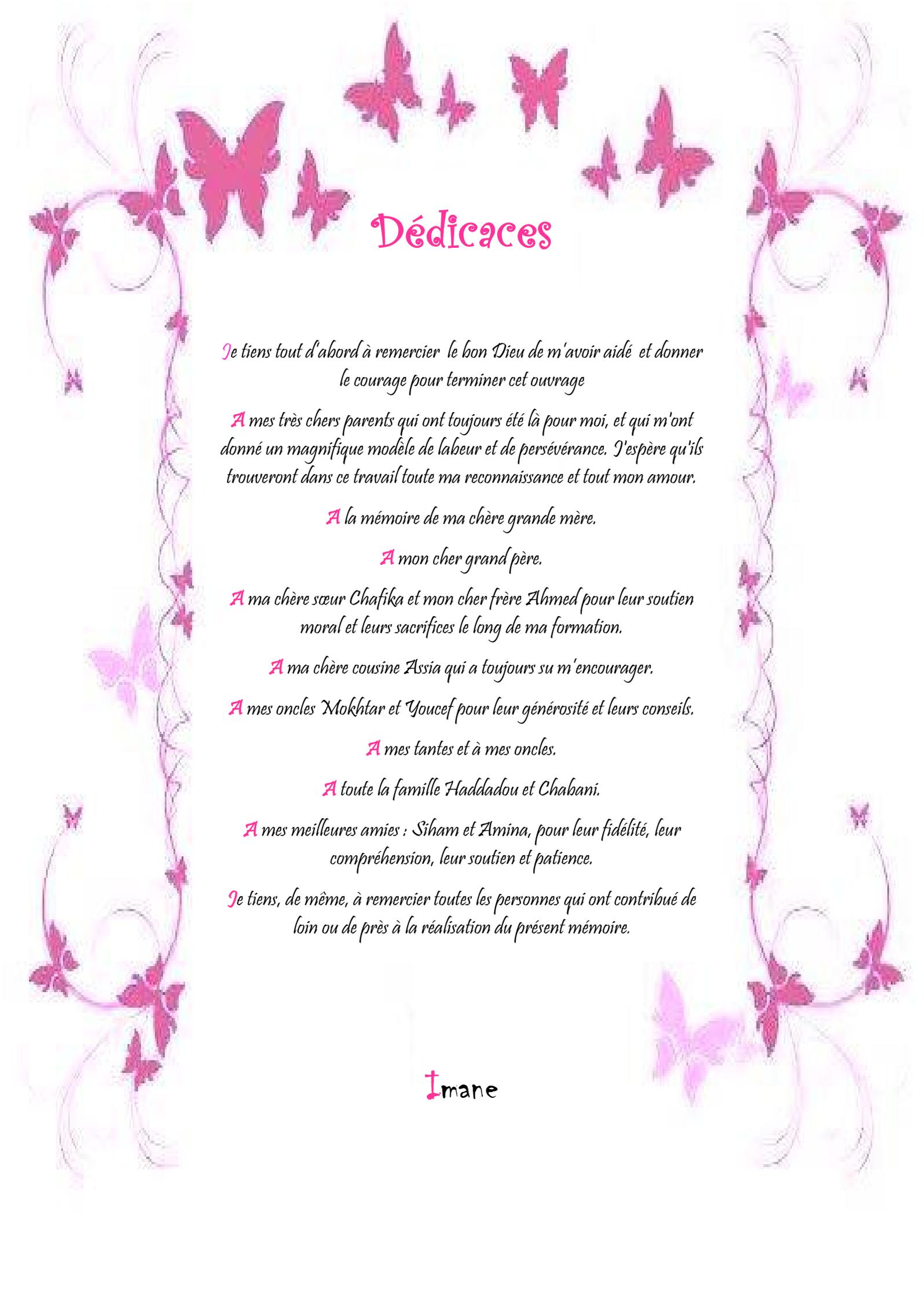
A salma et sabrina

Je vous remercie pour votre affection si sincère.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de

bonheur, de sante et de réussite

Siham



Dédicaces

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé et donner le courage pour terminer cet ouvrage

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A la mémoire de ma chère grande mère.

A mon cher grand père.

A ma chère sœur Chafika et mon cher frère Ahmed pour leur soutien moral et leurs sacrifices le long de ma formation.

A ma chère cousine Assia qui a toujours su m'encourager.

A mes oncles Mokhtar et Youcef pour leur générosité et leurs conseils.

A mes tantes et à mes oncles.

A toute la famille Haddadou et Chabani.

A mes meilleures amies : Siham et Amina, pour leur fidélité, leur compréhension, leur soutien et patience.

Je tiens, de même, à remercier toutes les personnes qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation du présent mémoire.

Imane

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : GENERALITE

I. Généralités et définitions	2
I.1. Le pétrole et l'eau de gisement	2
I.2. La récupération de pétrole	2
I.3. L'eau d'injection	2
I.4. Conséquences d'une détérioration biologique	3
I.5. Origine de la contamination du pétrole	3
II. La corrosion	4
II.1. Notions de corrosion	4
II.2. Types de corrosion d'un métal	5
II.3. Facteurs de la corrosion	5
II.4. La corrosion : enjeux socio-économiques	6
III. La biocorrosion	6
III.1. Les facteurs influençant la biocorrosion	7
III.1.1. Le milieu aqueux	8
III.1.2. Le matériau	8
III.1.3. Les micro-organismes	8
III.2. Mécanismes de la biocorrosion	8
III.2.1. La production des substances corrosives	8
III.2.2. La dépolarisation cathodique et anodique	9
III.2.3. Aération différentielle	9
III.3. Rôles des bactéries dans la corrosion anaérobie des aciers	9
III.3.1. Relation entre bactéries sulfurogènes et corrosion	9
III.3.2. Mécanismes de corrosion induite par les bactéries sulfurogènes	10
III.3.3. Rôles d'autres types de bactéries dans la corrosion des aciers	10
III.3.4. Les bactéries impliquées dans la biocorrosion	11
III.3.4.1. Les bactéries aérobies	11

III.3.4.2. Les bactéries anaérobies	13
III.4. Les biofilms	18
III.4.1. Composition	18
III.4.2. Formation d'un biofilm	19
III.4.3. Rôle du biofilm	20

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. L'Origine de l'échantillon	21
2. Échantillonnage et analyse chimique de l'eau	21
3. Étude de la croissance des BSR	21
3.1. Les milieux de cultures utilisés	21
4.1.1. Les milieux de culture des BSR	21
4.1.2. préparation des milieux de culture	23
3.2. Prélèvement de l'échantillon et réactivation des BSR	23
3.3. Préculture	25
3.4. Culture des BSR	25
3.5. Étude du biofilm par les bactéries sulfurogènes	26
1. Préparation de l'échantillon métallique	26
2. Étude sur milieu liquide	27
3. Caractérisation du cosortium sulfurogène	27
4.5.3.1. Observation microscope après coloration au bleu de méthylène	27
4.5.3.2. Examen à l'état frais (mobilité)	27
3.6. Observation du biofilm au microscope électronique à balayage	28
4.6.1. Principe de la fonction de MEB	28
4.6.2. Préparation pour l'analyse au MEB	28

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Analyse physicochimique de l'eau d'injection	29
III.1.1. Composition chimique de l'eau d'injection	29
III.1.2. Influence de la composition chimique de l'eau d'injection échantillonnée sur la croissance de la flore sulfurogène	29
III.2. Réactivation des bactéries corrosives	31
III.3. Études de croissance des BSR sur les différents milieux de culture	33
III.3.1. Influence de la composition chimique	33
III.3.2. Mesure de l'activité biologique de la culture mixte de BSR dans les différents milieux utilisés	35
III.3.3. Comparaison entre les différents milieux de culture utilisés	37
III.4. Caractérisation du consortium sulfurogène	37
III.4.1. Observation microscopique du consortium sulfurogène après coloration au bleu de méthylène	37
III.4.2. Observation à l'état frais (mobilité)	38
III.5. Études de biofilm	39
III.5. 1. Résultats des analyses de surface	39
III.5.2. L'observation au MEB	40
CONCLUSION	48
PERSPECTIVES	49

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GLOSSAIRE

ANNEXES

Liste des abréviations

BSR Bactérie Sulfato-Réductrice (*Sulphate-reducing bacteria*)

BTR : Bactérie Thiosulfato-Réductrice (*Thiosulphate-reducing bacteria*)

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EPS : Substance Polymère Extracellulaire (*Extracellular Polymeric Substance*)

CaCl₂ : chlorure de calcium

KCl: chlorure de potassium

KH₂PO₄: potassium dihydrogénophosphate

K₂SO₄ : sulfate de potassium

MEB : Microscope Electronique à Balayage (*Scanning Electronic Microscopy (SEM)*)

M : molarité

MgCl₂ : chlorure de magnésium

NaCl: chlorure de sodium

NH₄Cl : chlorure d'ammonium

PC : Protection Cathodique (*Cathodic Protection*)

Glossaire

Autotrophe : capacité d'organismes à produire de la matière organique à partir de composés inorganiques (dioxyde de carbone atmosphérique ou dissous, sels minéraux...) ; s'oppose à hétérotrophe.

Bacteria (Bacteria) L'un des trois domaines du vivant. Procaryotes phylogénétiquement distincts des *Archaea*.

Biofilm : ensemble d'une communauté de micro-organismes immobilisés sur une surface et des sécrétions associées à leur développement.

Chimolithotrophe (chemolithotroph) Organisme tirant son énergie de l'oxydation de substrats inorganiques.

chimio-organotrophe (chemoorganotroph) Organisme tirant son énergie de l'oxydation de substrats organiques.

Chromosome (chromosome) Élément génétique comportant les gènes essentiels au fonctionnement cellulaire.

Cytoplasme (cytoplasm) Contenu d'une cellule vivante, entouré par la membrane plasmique à l'exception du noyau, s'il est présent.

Enzyme : catalyseur biologique de nature protéique qui accélère le déroulement des réactions chimiques du métabolisme.

Éprouvette : échantillon d'un matériau quelconque, prélevé sur un lot ou moulé dans un format normalisé, et destiné à subir des essais de résistance ou diverses mesures de caractéristiques.

Domaine (domain) Rang le plus élevé dans la classification biologique (il existe trois domaines).

Endosymbiose (endosymbiosis) Processus ayant permis l'apparition des mitochondries et des chloroplastes dans les cellules eucaryotes à la suite de la colonisation de celles-ci par des procaryotes du domaine des *Bacteria*.

Eucaryote (Eukaryote) Cellule dont le noyau est séparé du cytoplasme par une membrane et qui possède généralement des organelles.

Hétérotrophe : se dit d'organismes qui ont besoin de matière organique préexistante dans le monde animal ou végétal pour fabriquer leur propre matière organique ; s'oppose à autotrophe.

Extrémophile (extremophile) Organisme dont la croissance optimale se réalise à des valeurs extrêmes pour certains paramètres physiques ou chimiques tels que la température ou le pH.

Génome (*genome*) Ensemble des gènes contenus dans une cellule ou un virus

Métabolisme : ensemble des réactions se produisant dans les cellules d'un organisme, permettant d'extraire l'énergie des nutriments et de synthétiser les constituants nécessaires à la structure et au bon fonctionnement des cellules.

Mise en oeuvre de matériaux : désigne au sens large à la fois la préparation sur chantier et la mise en place définitive de matériaux.

Paroi : structure recouvrant la membrane plasmique et conférant rigidité et protection à la cellule ; elle est parfois recouverte d'une gaine.

Phénotype : ensemble des caractères anatomiques, morphologiques et physiologiques caractérisant un individu.

Phylogénie : science qui s'intéresse aux liens de parenté entre les organismes, à leur généalogie (classification, méthode de reconstruction phylogénétique), ou au cours de l'évolution d'un groupe.

Physiologie : étude du fonctionnement des êtres vivants et de leurs organes. et plus fin que des flagelles et n'intervenant pas dans la mobilité.

Pissette : tuyau permettant l'évacuation des eaux pluviales d'un balcon.

Porosité : volume occupé par les pores, en pourcentage du volume total du matériau.

Procaryote : se dit d'un organisme dont la structure cellulaire ne possède ni noyau défini par une membrane ni organite ; s'oppose à eucaryote.

Souche : en biologie, origine d'une lignée de micro-organismes.

Substrat : surface sur laquelle se développent des organismes.

Ultra-structure : structure fine de cellules, observable en microscopie électronique.

Liste des figures

LISTE DES FIGURES

Fig. 1 : Schéma d'un gisement	2
Fig. 2 : Interactions matériau-milieu-micro-organisme en biocorrosion	7
Fig. 3 : Métabolisme des BSR	9
Fig. 4 : Mécanisme de corrosion par précipitation des sulfures de fer par les BSR.	10
Fig. 5 : Action des ferrobactéries	11
Fig. 6 : Différentes étapes de la formation d'un biofilm	20
Fig. 7 : Méthode de réactivation du consortium sulfurogène.	25
Fig. 8 : Préparation des précultures	26
Fig. 9 : Culture du consortium de BSR en présence d'un coupon d'acier dans les différents milieux	27
Fig. 10 : Visualisation de la production du FeS dans les milieux de culture liquides (Postgate, API et MASTR) après 21 jours d'incubation.	33
Fig. 11 : Variation de la densité optique de milieu API-Lac inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation des cultures	34
Fig. 12 : Variation de la densité optique de milieu API- Act inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation des cultures	35
Fig. 13 : Variation de la densité optique de milieu API- Lac/Act inoculée par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation des cultures	35
Fig. 14 : Variation de la densité optique de milieu MSTR inoculée par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation des cultures	36
Fig. 15 : Variation de la densité optique de milieu postgate inoculée par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation des cultures	36
Fig. 16 : Évolution du pH de milieu de culture API- Lac inoculé par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation	38
Fig. 17 : Évolution du pH de milieu de culture API- Act inoculé par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation	39
Fig. 18 : Évolution du pH de milieu de culture API- Lac/Act inoculé par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation	39
Fig. 19 : Évolution du pH de milieu de culture MSTR inoculé par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation	40
Fig. 20 : Évolution du pH de milieu de culture Postgate inoculé par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation	40

Fig. 21 : Comparaison de la variation de la densité optique des cinq milieux de culture inoculés par une culture mixte de BSR en fonction de temps d'incubation des cultures.	42
Fig. 22 : Comparaison de la variation de l'évolution de pH des cinq milieux de culture inoculés par une culture mixte de BSR en fonction de temps d'incubation des cultures.	42
Fig. 23 : photographies prises de la surface des coupons après 6 semaines.	46
Fig. 24 : Photographies prises de la surface des coupons après 6 semaines.	47
Fig. 25 : Illustration photographique au MEB à différents grossissement de biofilm formé dans le milieu API-Act.	48
Fig. 26 : Illustration photographique au MEB à différents grossissement de biofilm formé dans le milieu API-Lac.	49
Fig. 27 : Illustration photographique au MEB à différents grossissement de biofilm formé dans le milieu API-Lac /Act	50
Fig. 28 : Illustration photographique au MEB à différents grossissement de biofilm formé dans le milieu MSTR	50
Fig. 29 : Illustration photographique au MEB à différents grossissement de biofilm formé dans le milieu Postgate	51
Fig. 23 : Illustration photographique au MEB à différents grossissement de biofilm formé dans le milieu témoin	52
Fig. 31 : Représentation schématique des différents modes respiratoires dans le monde bactérien.	
Fig. 32 : Bactérie en cours de division (la flèche représente la zone de future séparation des deux bactéries néo-formées).	
Fig. 33 : Représentation schématique de la division bactérienne par scissiparité.	
Fig. 34 : Courbe de croissance bactérienne en milieu liquide adapté non renouvelé	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition chimique du milieu API (API RP-38, 1982)	23
Tableau 2 : Composition chimique du milieu Postgate (1966)	23
Tableau 3 : Composition chimique du milieu MSTR	24
Tableau 4 : Paramètre physico-chimique de culture en batch des BSR dans un Erlenmeyer	26
Tableau 5 : L'analyse chimique de l'acier	28
Tableau 6 : Résultats de l'analyse physico-chimique de l'eau de STAH	30
Tableau 7 : Observation l'œil nu de la croissance des BSR dans les différents milieux de culture	32
Tableau 8 : Résultat du test de mobilité	45
Tableau 9 : Classification morphologique des bactéries Sulfatoréductrices	
Tableau 10 : Classification Physiologique des Bactéries Sulfatoréductrices	

INTRODUCTION

Tous les matériaux employés en construction, en particuliers les métalliques, sont utilisés dans des environnements plus ou moins agressifs. Il en résulte des altérations par corrosion qui nuisent tant à l'intégrité des structures qu'à leur durabilité (Dupont-Morral, 2005).

Les problèmes de corrosion ayant pour origine la présence de micro-organismes touchent des secteurs d'activité divers, notamment l'industrie pétrolière. Cette dernière utilise un procédé artificiel permettant d'améliorer le drainage naturel du pétrole. Il s'agit de l'injection de l'eau sous pression dans la formation géologique pour la récupération secondaire du pétrole. Cette eau véhicule une microflore sulfurogène diversifiée tels que bactéries sulfato-réductrices et les bactéries thiosulfatoréductrices qui jouent le rôle principal dans le mécanisme de la corrosion anaérobie.

La prolifération de ces micro-organismes de corrosion nécessite la présence d'un environnement contenant toutes les substances utiles pour la synthèse du matériel cellulaire et la génération de l'énergie cellulaire. En effet, la croissance des BSR dans les canalisations en acier a des conséquences nuisibles à plusieurs niveaux ce qui entraîne des coûts supplémentaires.

Ainsi, la participation des bactéries productrices d' H_2S à la constitution de biofilms est une condition importante à la manifestation des phénomènes de biocorrosion (Marchal, 1999). Cette dernière présente une importance loin d'être négligeable puisque elle pourrait être responsable de 20% de toutes les formes observées de la corrosion. Les coûts infligés à nos sociétés pétrolières seraient énormes (Margot, 1999).

La compréhension et la résolution des cas concrets est liée à la biocorrosion est l'objectif principal du laboratoire de corrosion bactérienne au CRD de SONATRACH, où les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés.

Dans le cadre de ce travail, l'axe de recherche retenu concerne l'acier carbone et la flore sulfurogène de l'eau d'injection du champ de STA. Ce choix est motivé par l'influence reconnue de cette flore, comprenant les Bactéries Sulfato-Réductrices (BSR), en terme de corrosion induite par les micro-organismes communément appelée "biocorrosion".

Nous insisterons dans notre travail sur l'optimisation des milieux de cultures spécifiques aux bactéries sulfurogènes isolées à partir de l'eau d'injection provenant du champ STA dans la région de AIN-Amenas dans le Sud- Est Algérien .

Pour cela un plan expérimental a été établi et suivi. En première partie, nous allons effectuer l'analyse chimique de l'échantillon de l'eau d'injection, la caractérisation du consortium sulfurogène réactivé. Dans la deuxième partie, une optimisation des milieux de cultures sera lancée. Nous allons, évaluer les cinétiques biologiques, par la mesure de la croissance bactérienne de la variation du pH et de la densité optique. Nous terminons notre travail par des observations microscopiques au MEB des échantillons d'acier sur l'influence de la corrosion bactérienne.

I. GENERALITES ET DEFINITIONS

I.1. Le pétrole et l'eau de gisement

Le pétrole est un liquide visqueux d'origine naturelle, formé de plusieurs composés chimiques et organiques. On le trouve en grande quantité sous la surface de la terre. Il est utilisé comme carburant et comme matière première dans les industries.

Un gisement de pétrole ne produit pas que l'huile. Il produit, également, de l'eau et du gaz (Crolet, 1998) (Fig. 1). Les nappes de pétrole se mêlent à la phase aqueuse souterraine appelée: eau de gisement ou eau de formation. Cette eau salée contient jusqu'au 350g/l de NaCl, et d'autres composés tel que : Calcium, magnésium, bicarbonate, chlorure, iodures, bromures et le sulfate (Claude, 1992).

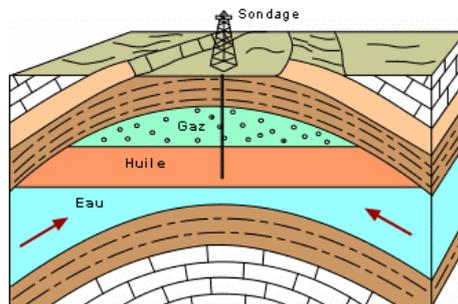


Fig. 1: Schéma d'un gisement

I.2. La récupération de pétrole

Le pétrole est un liquide visqueux, ce qui signifie qu'il s'écoule difficilement. En générale, la récupération du pétrole se fait en 2 ou 3 étapes (Fratesi et Elisabeth, 2002)

1ère Etape : la récupération primaire : consiste à récupérer de 12 à 15% du pétrole sans ajouter aucune substance dans les puits.

2ème Etape : la récupération secondaire : on inonde le puit par de l'eau ou d'autre substance (gaz) pour propulser le pétrole hors du puit et on extrait une quantité additionnelle variant entre 15 à 20% .

3ème Etape : la récupération tertiaire : cette étape est réalisée de différentes façons notamment avec l'assistance de micro-organismes qui se développent entre la couche de pétrole et la surface rocheuse des puits pour améliorer la récupération du pétrole par :

- Production du gaz carbonique, qui s'accumule petit à petit et fait remonter le pétrole à la surface.
- Production des biosurfactants : se sont des substances fluidifiantes, ils agissent comme des détergents glissants en aidant le pétrole à se détacher du roc et des crevasses.

I.3. L'eau d'injection

L'eau d'injection est une eau utilisée pour la récupération secondaire de pétrole. Elle peut être de diverses sources : les rivières, les lacs...etc (Sidorv, 1986).

L'eau d'injection est le plus souvent l'eau de mer. Elle est désaérée artificiellement dans le but de limiter la corrosion des équipements des puits en acier ordinaire (Crolet, 1998). L'eau d'injection est utilisée pour les buts suivants :

- Lavage des puits, en envoyant une quantité d'eau pour dissoudre les sels (NaCl) sur les parois du tubing jusqu'à bouchage et réduction de la production (Claude, 1992-Sidorov, 1986).
- Maintenir la pression de gisement par poussée radicale à partir des puits d'injection vers les puits de production : pour favoriser une récupération suffisante de pétrole (Chambre, 1973).

1.4. Conséquences d'une détérioration biologique

Les conséquences d'une détérioration biologique dans l'industrie pétrolière peuvent être scindées en 3 groupes :

- Les microorganismes attaquent les molécules hydrocarbonées et non hydrocarbonées entraînant un changement des caractéristiques et propriétés chimiques du pétrole brut
- Les microorganismes se développent à l'interface du pétrole et de l'eau ou dans le biofilm en produisant des biosulfates, molécules détergentes et des molécules de H₂S.
- Les sécrétions de microorganismes, de poids moléculaire faible, réagissent avec le pétrole brut et accélèrent la formation de particules. Ce qui rend le fuel plus corrosif.

Les principaux dérèglements causés par une prolifération bactérienne se traduisent par :

- Le colmatage : occasionné par les vases produites par les bactéries, les levures et les moisissures. Elles peuvent générer d'importants blocages des filtres, des lignes des carburants et des injecteurs.
 - ➔ La corrosion : la croissance microbienne dans les réservoirs à carburants ou dans les systèmes d'alimentation du fuel peut conduire à une corrosion rapide et lourde.
 - ➔ Au fond des réservoirs en acier, la croissance de bactéries sulfato-réductrices (BSR), dans l'eau et la boue, provoque des corrosions de type pitting. Il y a la création de piqûres dans le métal.
 - ➔ Dans les réservoirs à carburants, la croissance des BSR rend le carburant corrosif et entraîne sa non-conformité en seuil de soufre
- Les surfactants microbiens induisent la suspension de l'eau dans le carburant. Ce qui le rend trouble et provoque les problèmes de séparation entre l'eau et le pétrole.
- Lorsqu'un réservoir est, à nouveau, rempli, les microorganismes deviennent suspendus dans le carburant, provoquant l'encrassement des chaînes de distributions pour contaminer par la suite les équipements en aval (moteurs...).

1.5. Origine de la contamination du pétrole

Les microorganismes, responsables de la contamination du pétrole, proviennent soit par :

- Entrée d'air-réservoir lors de l'étape d'équilibrage de la pression d'air car l'atmosphère contient une multitude de gouttelettes d'eau transportant des microorganismes « Upstream ».
- Transport des réservoirs de raffineries, des barges en eau douce, à travers les oléoducs, réservoir terminaux « Midstream ».
- Injection d'eau via les puits qui contiennent une forte contamination d'eau et de bactéries.

II. LA CORROSION

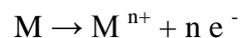
D'après Bréanger et Mazille (2002) la corrosion est définie comme étant une interaction physico-chimique entre un métal et son milieu environnant entraînant des modifications dans les propriétés du métal et souvent une dégradation fonctionnelle du métal lui-même, de son environnement ou du système constitué par les deux facteurs. Du point de vue étymologique, le terme corrosion vient du mot latin corroder qui signifie ronger, attaquer.

II.1. Notions de corrosion

Tous les matériaux employés en construction, en particuliers les métalliques, sont utilisés dans des environnements plus ou moins agressifs. Il en résulte des altérations par corrosion qui nuisent à l'intégrité des structures et aussi à leur durabilité (Dupont-morral, 2005).

La corrosion aqueuse des métaux est de nature électrochimique. Cette nature est liée à la structure atomique et électrique de la matière. En effet, cette dernière est constituée de particules élémentaires porteuses de charges électriques (ions et électrons) et de particules neutres (atomes et molécules) (Crolet, 1998).

La corrosion des métaux est un processus électrochimique caractérisé par la dissolution d'un métal de valence zéro (M^0). La réaction électrochimique impliquée est une réaction d'oxydation où le métal perd des électrons et passe de son état de valence zéro à une forme ionique M^{n+} :



Pour que cette réaction puisse se produire sur le matériau, il faut qu'une réaction de réduction se déroule simultanément: les électrons issus de l'oxydation sont utilisés pour transformer des espèces présentes dans le milieu (Dupont-morral, 2005).

La phase métallique solide comprend ainsi :

- Des ions métalliques M^{n+} , disposés suivant un empilement compact rigide ; c'est le réseau cristallin.
- Des électrons de conduction, libres de se déplacer n'importe où dans le volume du métal.
- La phase aqueuse est un empilement compact déformable et compressible comprenant :
 - Des molécules neutres, eau et composés divers non dissociés.

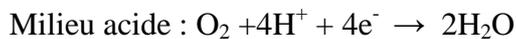
➤ Des ions positifs (cations) ou négatifs (anions)

Les ions métalliques sont des constituants à la fois de la phase métallique et de la phase aqueuse. Par contre, les électrons libres ne sont pas des constituants de la phase aqueuse. Un électron libre ne peut passer que s'il est fixé sur une des particules élémentaires de la phase aqueuse. En terme de chimie, cette opération correspond à une réduction de l'espèce chimique correspondante (Crolet, 1998).

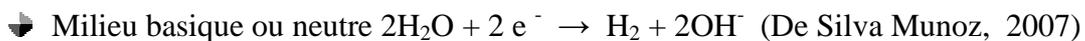
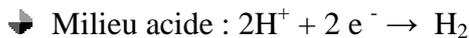
La corrosion d'une phase métallique fait donc intervenir deux réactions électrochimiques différentes :

- La réaction partielle anodique qui est l'oxydation de métal : $M \rightarrow M^{n+} + n e^{-}$
- La réaction partielle cathodique qui implique la réduction d'un composant de milieu aqueux :

En milieu aéré, l'accepteur d'électrons est normalement l'oxygène dissous dans la solution :



En milieu désaéré, l'accepteur d'électrons peut être des protons en solution ou de l'eau.



II.2. Types de corrosion d'un métal

Il existe trois types de corrosion :

- **La corrosion chimique** : qui est l'attaque d'un métal par un milieu corrosif non électriquement conducteur.
- **La corrosion électrochimique** : est plus fréquente que les autres types d'attaque corrosive et la plus dangereuse ; on la rencontre dans les milieux corrosifs électrochimiquement conducteurs.
- **La corrosion bactérienne** : elle est due à un métabolisme bactérien dont le mécanisme est analogue à celui de la corrosion électrochimiquement. Ce type de corrosion est essentiellement rencontré dans les installations d'injection d'eau .

II.3. Facteurs de la corrosion

Les principaux facteurs de corrosion sont, l'humidité au contact des parois métalliques, les espèces chimiques réductibles dissoutes dans le milieu corrosif comme les protons et l'oxygène dissous, les chlorures dans l'eau, la présence des chlorures augmente la corrosivité du milieu et diminue le pouvoir protecteur des dépôts de surface et conduit à des attaques localisées.

Les paramètres physiques comme la température et la pression du milieu influent sur la vitesse de corrosion.

La nature des régimes hydrodynamiques de l'écoulement du fluide transporté ou du milieu corrosif.

La présence dans le milieu corrosif de certaines bactéries comme les bactéries sulfaturo-réductrices qui peuvent augmenter la vitesse de corrosion .

II.4. La corrosion : enjeux socio-économiques

La corrosion présente un enjeu économique considérable estimé entre 1 et 4 % du produit national brut (PNB) des pays industrialisés (Koch et al., 2002). Ainsi, par exemple, le Centre Français de l'Anticorrosion, CEFRACOR évalue à 28 milliards d'euros les pertes économiques générés par la corrosion en France chaque année (Koch et al., 2002).

Aux Etats-Unis, un rapport publié par le NACE (National Association of Corrosion Engineers) en 2002, évalue les coûts directs de la corrosion c'est-à-dire les coûts engendrés par les dégâts directs tels que le remplacement de tuyaux, l'utilisation d'inhibiteurs et les services de maintenance des installations, etc... à 276 milliards de dollars américains par an, soit 3,1% du PNB du pays. Les coûts indirects de la corrosion, comme les pertes occasionnées par l'arrêt des installations et les pertes de production, les délais de livraisons prolongés, les consommations de gazole élevées dues aux déviations ou le temps d'attente dans un bouchon lors de la réparation d'un pont, sont plus difficiles à déterminer (Koch et al. 2002) .

De nombreux secteurs sont concernés par ces phénomènes de dégradation induite par les micro-organismes. Citons, les cas de l'industrie pétrolière affectée au niveau des puits d'extraction, des oléoducs, des plates-formes en mer le cas des installations portuaires maritimes et fluviales : palplanches, portes d'écluses le cas des centrales nucléaires (échangeurs, circuits de refroidissement, circuits incendies, ...) ainsi que toutes les installations qui utilisent les eaux naturelles (systèmes de climatisation, ...), les ossatures métalliques des ouvrages d'art : ponts, pontons, passerelles, l'industrie navale, la pêche, mais aussi, la géothermie; l'aérospatial (exemple de corrosion microbienne dans des réservoirs de kérosène) ; l'industrie nucléaire pour le stockage des déchets que ce soit en surface ou en site profond ; l'industrie agroalimentaire et le secteur médical (Dupont-morral, 2005).

Les conséquences de la corrosion ne se limitent pas aux coûts économiques, mais elles concernent également la santé (corrosion des alliages dentaires et des implants métalliques dans le corps), la sécurité (pannes de véhicules, rupture de structures, contamination des canettes de produits alimentaires), l'environnement (pollution des ports par les biocides, utilisation de peintures qui seront interdites par les nouvelles normes), etc (Mehanna, 2009).

III . LA BIOCORROSION

Les micro-organismes présents, dans les différents milieux environnants jouent, souvent, un rôle décisif dans les phénomènes de détérioration. Pour définir cette altération particulière, historiquement le premier en France, a proposé : "la corrosion bactérienne rassemble tous les phénomènes de corrosion où les bactéries agissent directement, ou par l'intermédiaire de leur métabolisme, en créant les conditions favorables à son établissement" (Chanterau , 1980).

Il s'agit, en fait, d'interactions entre le monde du vivant et les matériaux. Tout matériau en contact avec un milieu biologiquement actif est susceptible d'être touché par la biocorrosion. (Dupont-Morrall, 2005). En fait, les micro-organismes modifient par leur métabolisme (pH, concentration en oxygène, concentration chimique ...) la physicochimie à l'interface matériau, créant les conditions à l'origine de la corrosion. Les micro-organismes sont les catalyseurs d'un phénomène de nature électrochimique (Baena et al., 2006).

De nombreux termes sont employés pour décrire cette corrosion : biodétérioration des matériaux métalliques, corrosion biochimique, corrosion influencée ou induite par les micro-organismes (CIM), corrosion microbienne, corrosion bactérienne (seuls ces deux derniers termes étant retenus dans la norme ISO 8044 (1999) (Beech et al., 2004).

Les bactéries les plus souvent incriminées dans les phénomènes de bio-corrosion sont celles qui produisent par leur métabolisme des sulfures. On parle le plus souvent de bactéries sulfurogènes, les plus connues sont les bactéries sulfatoréductrices (BSR).

III.1. Les facteurs influençant la biocorrosion

La biocorrosion résulte de la conjonction défavorable de trois facteurs (Mehanna, 2009) (Fig. 2) :

- un milieu aqueux généralement jugé peu agressif,
- un matériau réputé compatible avec les conditions d'exposition,
- des micro-organismes dont la présence est le plus souvent inattendue.

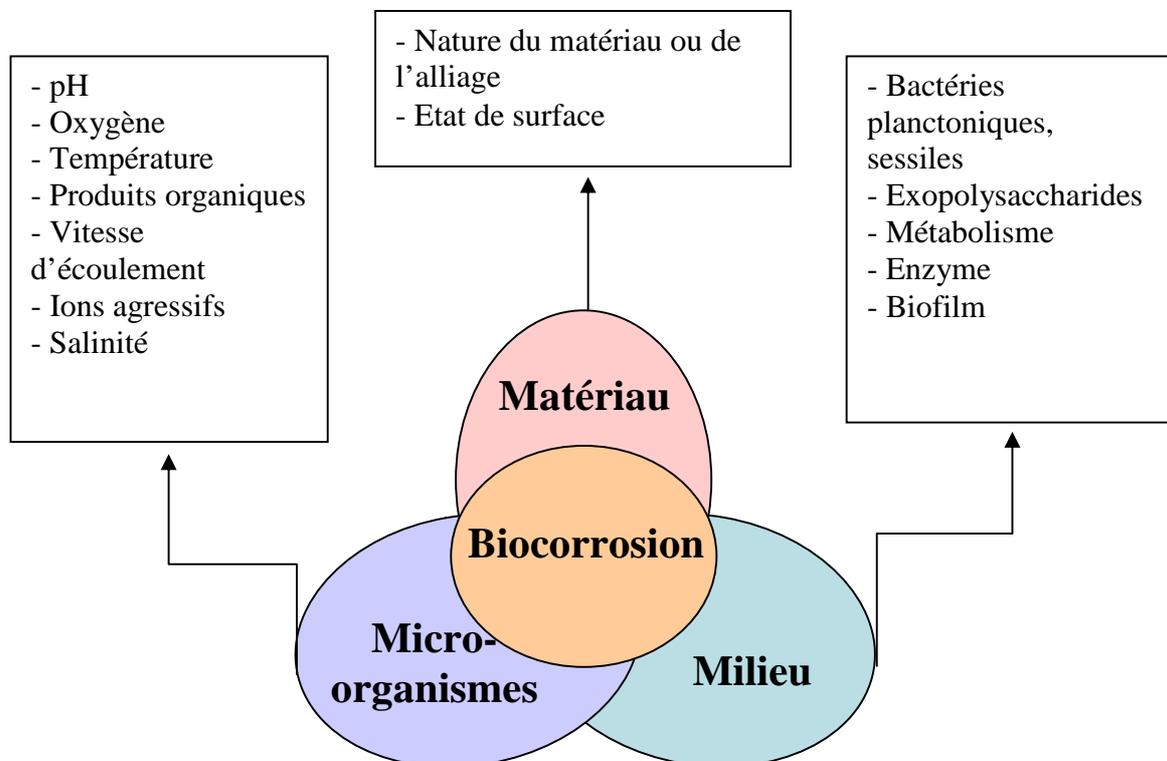


Fig. 2 : Interactions matériau-milieu-micro-organisme en biocorrosion (Branger et mazille, 2002)

III.1.1. Le milieu aqueux

Les paramètres physico-chimiques du milieu jouent un rôle important : la température, le pH, la vitesse d'écoulement et la présence d'oxygène ou des ions agressifs sont à considérer, ainsi que les éléments organiques présents qui sont souvent utilisés comme source de carbone par les bactéries.

III.1.2. le matériau

La plus part des métaux et alliages sont sensible à la présence des micro-organismes. C'est le cas du fer, des aciers peu ou non alliés, les aciers inoxydables, le cuivre et ses alliages.

Il faut noter que les altérations de la surface métallique, les zones de stagnation et des dépôts sont favorable au développement des colonies bactériennes.

III.1.3. Les micro-organismes

Les mécanismes de la biocorrosion sont variés reflétant la diversité des différents types de micro-organismes (Mehanna . M ,2009).

La nature des bactéries présentes : planctoniques (au sein du milieu aqueux) ; et surtout celles présentes dans le biofilm (bactéries sessiles) joue un rôle spécifique dans les phénomènes de la biocorrosion (Féron et al, 2002).

Actuellement, il est admis que les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et thiosulfato-réductrices (BTR) jouent un rôle prépondérant dans la biocorrosion anaérobie (Beech et al., 2004 ; Lee et al., 1995 ; Javaherdashti et al., 2006 ; Xu et al., 2007)

III.2. Mécanismes de la biocorrosion

Le mécanisme d'attaque microbienne des métaux fait intervenir trois actions (Neveux, 1968). La première est chimique, par production des substances corrosives tel que le gaz carbonique, acide sulfurique ou des acides organiques ...

La seconde correspond à la dépolarisation d'un système électrochimique, ou encore déplacement d'un équilibre d'oxydo-réduction.

La troisième implique une réaction de dépôt responsable physiquement d'une pile électrochimique d'aération différentielle.

III.2.1. La production des substances corrosives

Les micro-organismes constituent une réelle menace pour l'intégrité des matériaux métalliques. Cependant, il n'y a pas forcément de corrélation directe entre l'ampleur de cette corrosion et le nombre de micro-organismes (Videla, 1996).

A cet égard, le paramètre le plus significatif serait plutôt leur comportement métaboliques (Videla, 1996).

De nombreuses bactéries et champignons peuvent produire d'importantes quantités d'acide organique (acide formique, acide acétique ...) et des acides minéraux (H_2S , H_2SO_4 , NO_2^- , NH_3^+ , HCO_3^-) intervenant dans la modification du pH en provoquant la corrosion du fer et de ses alliages (Lee et Debeer, 1995).

III.2.2. La dépolarisation cathodique et anodique

La corrosion ne pourra s'établir que par la dépolarisation des deux électrodes de la pile (Chantereau, 1980). La réaction globale se ramène aux deux équations suivantes (Chantereau, 1980).



III.2.3. Aération différentielle

Tout matériau métallique immergé en milieu non stérile se recouvre d'un film biologique appelé le biofilm.

Ce biofilm est hétérogène que ce soit du point de vue microbiologique et chimique. Différentes espèces de bactéries coexistent dans le biofilm et créent des zones où les concentrations des éléments chimiques sont modifiées. La consommation d'oxygène par les bactéries aérobies va conduire à des zones anaérobies où vont proliférer les bactéries anaérobies (Beranger et Mazille, 2002).

Par conséquent il y a formation d'une zone hétérogène avec oxygénation, différente entre la périphérie du dépôt et son centre. Il y a formation d'une pile d'aération différentielle. Il se crée en effet une différence de potentiel entre la zone périphérique considérée comme cathode et le centre du biofilm considéré comme anode (Feron et thierry, 1998).

III.3. Rôles des bactéries dans la corrosion anaérobie des aciers

III.3.1. Relation entre bactéries sulfurogènes et corrosion

Étymologiquement, une bactérie sulfurogène est une bactérie qui produit des ions sulfures. Ces ions peuvent provenir de la réduction de composés oxydés comme le soufre, le thiosulfate ou le sulfate. Certaines bactéries utilisent des composés minéraux soufrés comme accepteur d'électrons dans leur métabolisme énergétique et secrètent des sulfures. On y trouve les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et/ou thiosulfato-réductrices (BTR) que nous appellerons aussi génériquement bactéries sulfurogènes. Le métabolisme de ces bactéries se caractérise par la réduction d'un accepteur terminal d'électrons : le sulfate, couplé à l'oxydation d'un donneur d'électrons, qui est le plus souvent, une substance organique (lactate ou acétate) ou l'hydrogène (Fig. 3) (Dupont-Morrall, 2004).

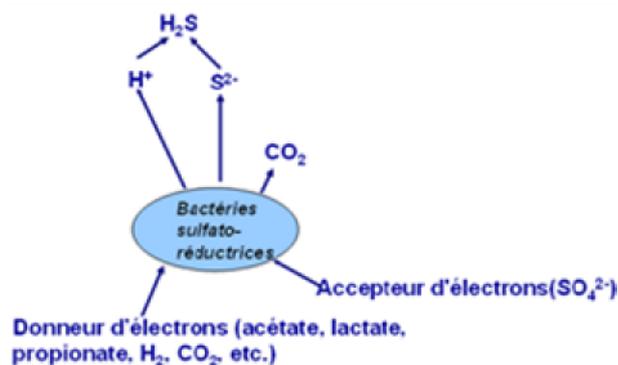


Fig. 3 : Métabolisme des BSR. (Mehanna, 2009)

III.3.2. Mécanismes de corrosion induite par les bactéries sulfurogènes

Le mécanisme le plus connu pour expliquer la corrosion anaérobie impliquant les bactéries sulfurogènes (BSR et BTR) est la précipitation du sulfure de fer (FeS), qui catalyse ensuite la réduction du proton en hydrogène moléculaire (Fig. 4).

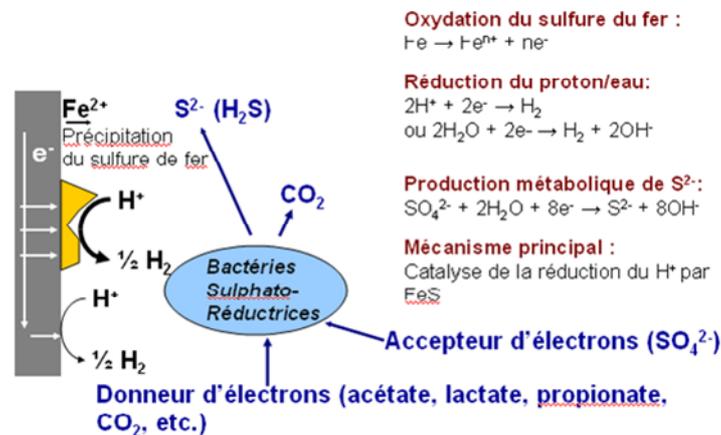


Fig. 4 : Mécanisme de corrosion par précipitation des sulfures de fer par les BSR

(Mehanna, 2009)

Localement, le sulfure d'hydrogène produit par les BSR entraîne la formation de FeS et engendre l'augmentation de l'acidité (plus de protons libres). Sur les zones entourant le dépôt de FeS, le pH reste stable et neutre.

III.3.3. Rôles d'autres types de bactéries dans la corrosion des aciers

Bien que de nombreuses études démontrent la présence souvent dominante des BSR dans les biofilms prélevés sur des pipelines corrodés (entre 11% et 73% de la totalité de la communauté bactérienne ; une étude récente réalisée sur des pipelines mexicains montre que la proportion des BSR est parfois faible bien que la corrosion soit présente (Lopez et al., 2006).

L'analyse de la diversité microbienne dénote la présence de trois groupes physiologiques : anaérobies facultatifs (membres de *Enterobacteriaceae*), halophiliques anaérobies carbohydrate fermentatives (membres de *Halanaerobiaceae*) et réductrices de sulfates (membres de *Desulfovibrionales*). Les espèces *Citrobacter spp.*, *Entrobacter spp.* et *Halanaerobium spp.* sont prédominantes. La proportion de BSR est très faible, *Desulfovibrio spp.* étant majoritaires (Neria-González et al., 2006).

Les bactéries méthanogènes (anaérobies strictes) utilisent comme source d'électrons soit du fer pur, soit le fer de l'acier doux pour la réduction du CO_2 en CH_4 . Les analyses phylogénétiques des espèces responsables de la corrosion ont démontré l'implication des bactéries *Methanococcus thermolithotrophicum*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanospirillum hungatei* ainsi que les espèces bactériennes hydrogénotrophiques *Methanogenium*, *Methanoplanus* et *Methanocalculus* (Zhang et al., 2003).

Des espèces acétotrophiques de la famille de *Methanosaetaceae* peuvent aussi accélérer la corrosion via la croissance syntrophique avec les BSR.

La bactérie clostridiale *Clostridium acetobutylicum* (Ford et al., 1989 ; Walch et al., 1989) accélère également la corrosion anaérobie des aciers.

En conclusion, tous ces résultats doivent être interprétés avec précaution car plusieurs facteurs, tels que la maturité et l'âge du biofilm, le nombre d'échantillons ou même les techniques d'analyse influencent la description de la communauté bactérienne. Il faut certainement en retirer la nécessité d'effectuer plus d'études consacrées à l'identification des micro-organismes réellement impliqués dans la MIC.

III.3.4. Les bactéries impliquées dans la biocorrosion

Il convient de distinguer trois cas principaux dans lesquels une dégradation peut se produire, et qui se différencient par la présence d'oxygène :

- Conditions aérobies strictes, donc le milieu est totalement aéré.
- Conditions anaérobies strictes, donc le milieu est totalement désaéré (sans oxygène).
- Conditions mixtes d'aérobiose et d'anaérobiose, le plus souvent rencontrées lorsqu'il y a formation d'un biofilm (Féron et Thierry, 1998).

III.3.4.1. Les bactéries aérobies

i. Les bactéries de fer (ferro-oxydantes ou ferrobactéries)

Les bactéries de fer ont été classées dans trois grands groupes suivant qu'elles sont filamenteuses, pédiculées ou unicellulaires, elles appartiennent à de nombreux genres et provoquent des corrosions particulières, en aérobiose (Rivière, 1981).

Les ferrobactéries (*Gallionella ferruginana*, *Grenothrix*, *Leptothrix sp*) se trouvent dans des solutions contenant du fer et y accélèrent le processus de l'oxydation des ions ferreux (Fe^{2+}) en ions ferriques (Fe^{3+}) afin de tirer leur énergie:



Cela se traduit par la formation d'un dépôt plus ou moins gélatineux d'hydroxyde ferrique sous lequel peut se former une zone d'anaérobiose (Chantereau, 1980).

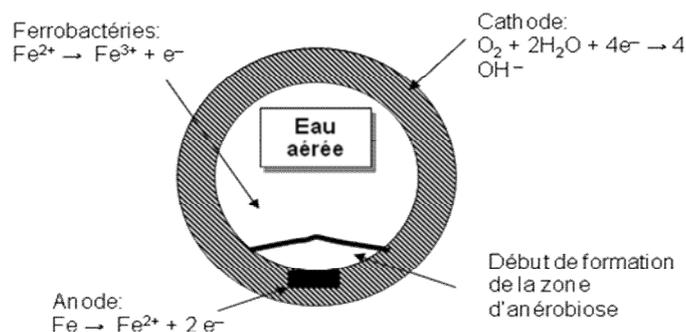


Fig. 5 : Action des ferrobactéries (Féron et THIERRY, 1998)

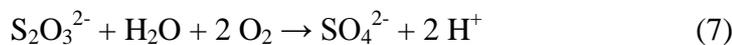
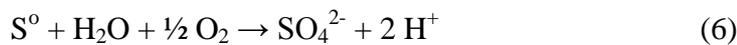
ii. Les bactéries oxydantes le soufre (sulfo-oxydantes ou sulbatobactéries)

Les bactéries sulfo-oxydantes tirent leur énergie de l'oxydation des formes réduites du soufre comme les sulfures (S^-) et le soufre élémentaire (S^0) en sulfate (SO_4^-)

Avec formation d'acide sulfurique corrosif (H_2SO_4), c'est le cas de *Thiobacillus* et *Thiomicrospira*.

Les bactéries sulfo-oxydantes tirent leur énergie de l'oxydation de composés sulfurés réduits comme l'hydrogène sulfuré (H_2S) ou l'hydrogène polysulfuré (H_2S_n) et thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$) vers du sulfate (SO_4^{2-}) ou du soufre moléculaire (S^0) (Schmidt, 1999).

Leurs réactions métaboliques correspondent à la suite :



Les bactéries aérobies sont bien souvent les premières à influencer la cinétique de corrosion, mais la construction de biofilm mélangé au produit de corrosion forme une barrière de diffusion des éléments ioniques et moléculaires. Ainsi, un gradient en oxygène dissout va apparaître pour rendre le milieu plutôt favorable à la croissance des bactéries anaérobies.

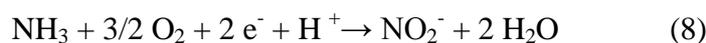
Il existe trois genres principaux de bactéries oxydatrices du soufre : *Thiomicrospira* (vibron de petite taille, à flagelles polaires, commun dans les habitats marins), *Thermothrix* (bacille à flagelles polaires, croît à des températures de 40 à 80°C sous forme d'un organisme filamenteux) et *Thiobacillus* (bacille flagellé, à gram négatif).

iii. Les bactéries nitrifiantes

Elles ont une grande importance écologique et sont isolées du sol, des systèmes d'égouttage, des eaux douces et marines. Les bactéries nitrifiantes constituent un ensemble de bactéries très diversifié. La seconde édition du Bergey les répartit en trois classes et plusieurs familles. Bien que toutes soient des organismes aérobies, Gram négatif, elles ont une forme de bâtonnet, ellipsoïdales, sphérique, spirillaires ou lobées et elles peuvent être munies de flagelles polaires ou péritriche (Prescott et al, 2003).

Ces bactéries tirent leur énergie de la nitrification (Singleton, 2005). Ce processus est réalisé en deux étapes distinctes par deux groupes distincts de micro-organismes (Gargaud et al, 2003).

- Les bactéries nitrosantes effectuent l'oxydation de l'ammonium en nitrites selon la réaction :



- Les bactéries nitratantes effectuent l'oxydation selon la réaction :



Les bactéries nitrifiantes contribuent à la corrosion par l'acidification du milieu liée à la conversion de l'ammoniaque en acide nitrique (Degremont, 2005).

III.3.4.2. Les bactéries anaérobies

i. Les bactéries méthanogènes

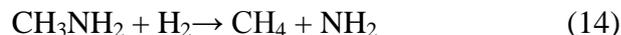
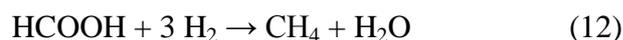
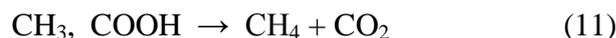
Les bactéries méthanogènes utilisent le fer élémentaire comme donneur d'électrons au cours de la réduction du CO₂ dans la méthanogénèse. Les taux d'élimination du fer par ces bactéries, pour une période de 24 heures, sont proches de 79 mg /1000cm².

Cela paraît faible, mais en fonction de la durée d'utilisation prévue des structures métalliques, cette corrosion constitue un problème important (Prescott et al, 2003).

La synthèse biologique du méthane est la propriété exclusive de microorganismes strictement anaérobies qui sont tous des Archaeobactéries. Les méthanogènes tirent leur énergie de la synthèse du méthane qui se fait par réduction du gaz carbonique (Pelmont, 2005), selon la réaction :



D'autres réactions conduisent également à la synthèse du méthane à partir de l'acide acétique, de l'acide formique, du méthanol et de la méthylanine selon les réactions suivantes :



ii. Les bactéries productrices d'acides organiques

Ce sont des bactéries fermentaires dans la corrosion du Fer et de ses alliages. Elles transforment la matière organique en acides faibles (Acétate, Lactate, Formate) en créant ainsi une acidité locale extrêmement importante à l'interface métal-biofilm. Ce qui engendre une création de micropiqûres persistantes. Elles se développent dans une zone d'anaérobiose sous le biofilm d'où le métabolisme stricte de ces bactéries (Beech, 1999)

iii. Les bactéries sulfato-réductrices (BSR)

La réduction microbienne des sulfates est un processus ancien datant de 3.4 Giga-années (Abada et al., 2006). C'est en 1895 que la première espèce sulfato-réductrice a été isolée d'un canal hollandais et décrite par W.M. Beijerinck (Gibson et al, 1988).

Les bactéries sulfato-réductrices se distinguent de tous les autres organismes vivants par leur capacité à utiliser les composés minéraux du soufre comme accepteurs d'électrons pour l'oxydation des composés carbonés. Le sulfate ou le soufre élémentaire sont alors réduits en sulfure, dont la plus grande part est excrétée dans le milieu extérieur. On estime qu'environ la moitié de la matière organique décomposée dans ces biotopes est oxydée anaérobiquement par sulfatoréduction, avec une forte production de sulfure (Garcia., 2000).

La corrosion influencée par les bactéries sulfato-réductrices (BSR) est référée depuis 1934 mais, c'est surtout à partir des années 1980 que l'action indirecte des BSR sur l'accélération

de la corrosion est reconnue.

iii.1. caractéristiques principales des BSR

les BSR sont fréquemment isolées dans la plupart des gisements pétroliers dans une gamme assez large de température et de salinité. Elles représentent les bactéries les plus étudiées dans les systèmes pétroliers en relation avec les problèmes de corrosion. Cependant, dans des conditions extrêmes de température (supérieures à 80°C) ou de salinité (au-delà de 100g/l) l'accroissement de BSR semble plus délicat (Blanchet et al, 2005)

La plupart des BSR sont de Gram négatif, de taille et de formes variantes, elles peuvent être flagellées ou non, mésophiles ou modérément thermophiles (voir annexe n°1). Elles présentent une meilleure croissance dans un domaine de pH allant de 6 à 8 (Madigan et martinko, 2007). Les BSR font partie intégrante d'un cycle appelé le cycle biologique de soufre.

Dans la biosphère oxygénée, la source de soufre la plus abondante et la plus stable du point de vue énergétique est le sulfate, son niveau d'oxydation est alors le plus élevé (+6) (Benbouzid-Rollet, 1993)..

Au cours de la minéralisation de la biomasse morte, le soufre, comme les autres éléments essentiels (carbone, oxygène, azote), se trouve sous différentes formes : soit lié à des molécules organiques, soit libre sous forme inorganique, avec des passages de l'état réduit à l'état oxydé.

En conditions anaérobies, le sulfure est la forme réduite (-2) finale et énergétiquement stable du cycle du soufre. En milieu acide, ce dernier est transformé en H₂S qui peut alors être oxydé par différentes bactéries aérobies, telles que les bactéries du soufre, comme les espèces du genre *Thiobacillus* et les espèces filamenteuses de *Beggiatoa*. Le produit principal de cette oxydation est le sulfate.

Les espèces bactériennes aérobies oxydant le sulfure (appelées bactéries sulfo-oxydantes) doivent vivre dans des zones où oxygène et sulfure coexistent et entrent donc en compétition avec l'oxydation chimique du sulfure. (Pineau et al, 2002 ; Widdel F., 1988).

Les stades intermédiaires d'oxydation du soufre, tels que le soufre élémentaire, le sulfite et le thiosulfate, peuvent être formés naturellement par une oxydation chimique ou biologique complète ou introduite dans la biosphère par l'activité volcanique et la technologie humaine.

Dans un environnement anaérobie, ces composés soufrés peuvent également être utilisés par des bactéries. Les principaux organismes réduisant le soufre élémentaire sont les anaérobies spécialisés considérés comme de vraies bactéries soufre-réductrices. Ces espèces ne réduisent pas le sulfate mais utilisent la réduction dissimilatrice du soufre comme réaction métabolique principale voire obligatoire.

En milieu acide le sulfure d'hydrogène généré par le métabolisme des bactéries sulfato-réductrices peut être oxydé par les bactéries aérobies du soufre. Le produit principal de cette oxydation est le sulfate (SO₄²⁻).

La production biologique du thiosulfate dans le milieu peut être réalisée par l'activité de

micro-organismes en présence ou non d'oxygène à partir du sulfure d'hydrogène produit par les bactéries sulfato-réductrices (Le Faou A et al., 1990).

Au regard du diagramme de Pourbaix présentant les différents équilibres stables (tension/pH) du système soufre-eau à 25°C (Pourbaix, 1963), la transformation du sulfure d'hydrogène en thiosulfate est aussi possible en eau de mer aérée par oxydation chimique. Ainsi, dans un circuit d'eau de mer ouvert, en acier au carbone, les bactéries sulfato-réductrices présentes dans le biofilm produisent du sulfure qui en milieu acide se transforme très rapidement en H₂S.

Ce dernier diffuse dans le biofilm selon son gradient de concentration (du biofilm vers l'eau de mer) ; cette diffusion s'oppose à un gradient d'oxygène dissous (de l'eau de mer vers le biofilm). Le sulfure d'hydrogène peut alors être, par voie chimique, partiellement oxydé en thiosulfate ou complètement oxydé en sulfate (Dupont-Morrall, 2005).

iii.2. Métabolisme des BSR

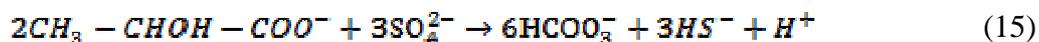
La multiplication des bactéries sulfato-réductrices ne survient que quand sont réalisées simultanément trois conditions :

- 1) la présence de quantités suffisantes de sulfates ;
- 2) l'absence d'oxygène (l'anaérobiose est, en général, la conséquence de l'engorgement du sol, soit après des pluies violentes, soit parce que la submersion a été provoquée: cas des rizières) ;
- 3) la présence de substrats organiques convenables.

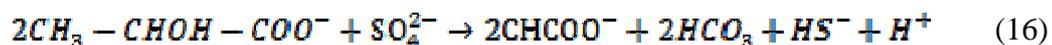
Le métabolisme énergétique est assuré par le couplage de l'oxydation d'un substrat généralement organique (chimio organotrophe) avec la réduction du sulfate. Non seulement que les BSR utilisent différents accepteurs d'électron (sulfate, sulfite, thiosulfate, soufre élémentaire... etc.), certains respirent les nitrates en absence des composés soufrés, exemple : *Desulfovibrio* (Magot, 1998).

On distingue deux grandes classes métaboliques de BSR (Margot, 1998) :

* les oxydants complets qui oxydent totalement leur donneur d'électrons, comme le lactate dans l'équation ci-dessous :



* les oxydants incomplets produisant de l'acétate et du CO₂, équation suivante :

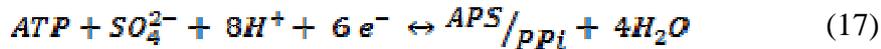


Les BSR utilisent divers acides organiques comme donneurs d'hydrogène, mais comme elles possèdent une hydrogénase, elles peuvent aussi utiliser l'hydrogène cathodique et être la cause de phénomènes de corrosion dans le cas de structures métalliques (Fer, aluminium) enfouies ou immergées. En effet, elles sont responsables de la dépolarisation des électrodes, en utilisant l'hydrogène cathodique, et en précipitant les ions ferreux de l'anode sous forme de sulfure de Fer (Riviere, 1981).

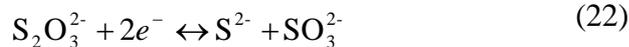
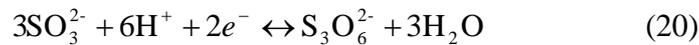
iii.2.1. Croissance en présence d'un composé organique et de sulfates

L'appellation "bactéries sulfato-réductrices" provient de la voie principale de production de l'énergie chez ces microorganismes. La réduction des sulfates, ou d'autres composés soufrés (sulfites, thiosulfates), est effectuée grâce à la production d'électrons du fait de l'oxydation d'un composé organique (lactate par exemple). C'est un processus dissimilatif, et la majeure partie du soufre est rejetée dans l'environnement extérieur sous forme de sulfures (Loubinoux., 2001).

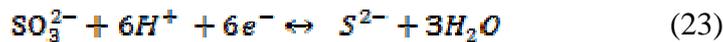
L'ion sulfate n'est pas un bon accepteur d'électrons en raison du très faible potentiel redox du couple SO_4^{2-}/HSO_3^- (< -500 mV). Avant d'être réduit, l'ion sulfate doit donc être activé (Liu et al., 1990).



La formation de sulfures à partir de sulfites fait intervenir une sulfite réductase. La réduction des sulfites pourrait être effectuée soit en 1 étape grâce à 1 sulfite réductase, soit en 3 étapes. *In vitro*, les produits de cette réduction sont le trithionate ($S_3O_6^{2-}$), le thiosulfate ($S_2O_3^-$) et le sulfure (S^{2-}) (Hansen TA., 1994 ; Pereira et al., 1998 ; Postgate, 1984)

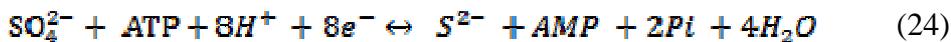


Le bilan de la réduction des sulfites en sulfures est:



En présence de protons, les sulfures sont éliminés dans l'atmosphère sous forme d' H_2S .

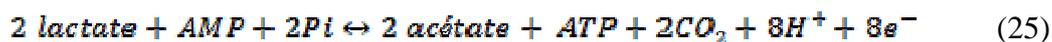
*** Bilan de la réduction des sulfates en sulfures (Loubinoux., 2001)**



Conclusion

Le métabolisme énergétique peut être décomposé en 3 parties:

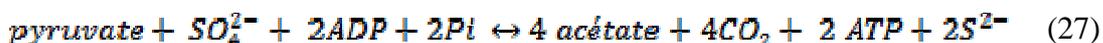
1 - catabolisme d'un composé organique (source de carbone) avec génération d'ATP et d'électrons :



*** En présence de lactate (Loubinoux., 2001)**



*** En présence de pyruvate (Loubinoux., 2001)**



2 - transport des électrons dans la chaîne respiratoire de la membrane cytoplasmique avec génération d'ATP

3 - réduction intracellulaire des sulfates en sulfures avec consommation d'ATP et d'électrons (Postgate JR., 1984).

Quelques souches de BSR (*Desulfovibrio desulfuricans sub sp.*) sont capables de croissance en présence d'un composé organique et d'ions nitrates en tant qu'accepteurs des électrons générés par le catabolisme organique (Pereira et al., 1998).

Les BSR possèdent une ou plusieurs hydrogénase(s) dont la localisation varie en fonction des espèces et des souches. Les BSR peuvent donc utiliser l'hydrogène gazeux issu des fer (Hansen TA., 1994).

iii.3. Les conditions de culture

Les milieux de culture contiennent habituellement un composé organique donneur d'électrons (lactate) et des ions ferreux. La croissance des BSR est alors détectée du fait de la formation d'un précipité noir de sulfure de fer dans le milieu. En l'absence de composés sulfatés et en présence de sources organiques appropriées (pyruvate), une croissance peut être observée.

Les milieux de culture doivent contenir un agent réducteur (Na_2S , thioglycollate, ascorbate) car le pré-requis à leur croissance est un bas potentiel redox (- 100 mV). La simple exclusion de l'air n'est donc pas suffisante pour assurer la croissance.

Le pH des milieux de culture doit être compris entre 7 et 7, 5. La salinité du milieu de culture et la température optimale de croissance sont fonction de l'environnement naturel de la souche à isoler. Les souches halophiles requièrent l'adjonction de 2, 5% de NaCl (p/vol) dans le milieu. Les souches thermophiles requièrent une incubation des milieux à une température comprise entre 40 et 80°C.

La croissance des BSR est lente (temps de génération de 3 à 6 heures), notamment lors du primo-isolement. Les milieux de culture doivent donc être incubés pendant 1 mois. Une des raisons expliquant cette croissance lente est que la concentration en H_2S influence le taux de croissance et pourrait, à forte concentration, arrêter la croissance (Postgate JR., 1984 ; Reis et al., 1992). Ce phénomène est lié à la toxicité intrinsèque de l' H_2S et au fait que les sulfures rendent le fer peu soluble, donc non disponible pour la bactérie, en formant un précipité de sulfure de fer. La croissance de ces bactéries est ainsi fréquemment plutôt linéaire qu'exponentielle.

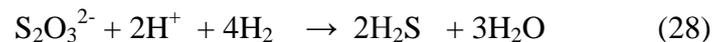
iii.4. Les bactéries thiosulfatoreductrice

Le nom des bactéries thiosulfatoreductrice est conventionnellement réservé aux bactéries qui effectuent la réduction des ions thiosulfates ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) sans la capacité de réduire les sulfates (SO_4^{2-}) ou sulfites (SO_3^{2-}), c'est le cas par exemple de *Dethiosulfovibrio peptidovorans*,¹ bactérie mésophile isolée d'une eau de gisement pétrolier, présente une activité corrosive égale, voire plus importante que celle reportée pour les bactéries sulfato-réductrices dans des expériences similaires. Il a été montré que les BTR sont 3 à 4 fois plus corrosives et 10 fois plus rapide que les BSR testées dans les mêmes conditions (Beech, 1999).

La nouvelle classification des BTR et proposée par (Garcia et al.,2000 ; Garrity,2001) (annexe1).

Ces bactéries sont polymorphes, les formes rencontrées sont généralement des bâtonnets incurvés, cellules uniques, en pair ou en chaînettes (Magot et al. 1997). Elles sont anaérobies et thermophiles (Ollivier, 1996).

Les BTR ont en commun un métabolisme purment fermentaire, elles croissent sur des carbohydrates tel que les sucres élémentaires (Ravot et al. 1999 ; Fardeau., 1996) et produisent de l'hydrogène qui est hautement toxique pour elles. A fin de neutraliser cette toxicité les BTR profitent de la présence des thiosulfates (accepteur d'électrons) pour les oxyder en hydrogène sulfuré (H₂S) corrosif selon la réaction suivante :



Les premières études portant sur les thiosulfato-réducteurs thermophiles ont révélés les propriétés métaboliques suivantes en présence de thiosulfate:

- oxydation de H₂, des peptides, acides aminés et hydrates de carbone
- production de L-alanine lors de la fermentation du glucose

La présence de réductases caractéristiques des bactéries sulfurogènes notamment les BTR et les BSR, soulève la possibilité de l'existence d'une thiosulfate réductase chez les BTR qui entreprend cette réaction (Garcia et al., 2000).

III.4. les biofilms

Pour comprendre la bio-corrosion, il est essentiel d'introduire la notion de bio-film. Un biofilm peut être défini comme l'ensemble des microorganismes adhérant à une surface. Le biofilm crée une zone physicochimique très différente du milieu environnant à l'interface matériau (Mehanna., 2009).

Le biofilm peut être considéré comme un ensemble complexe vivant qui crée, à l'interface matériau-environnement, des zones chimiquement et physiquement très hétérogènes. Le biofilm est un système dynamique en constante évolution dans lequel le milieu circule avec difficulté (Dupont-Morrall, 2005).

En 1978, John William Costerton a proposé le terme de biofilm en suggérant que ce serait le mode de vie naturel de substances extrapolymeriques (Costerton, 1999).

III.4.1. Composition

Le biofilm est une accumulation en surface, qui n'est pas spatialement ou temporellement uniforme. Un biofilm est composé de 80-95% d'eau, de polymères extracellulaires (EPS, ExoPolySacharides) constituant 85-98% de la matière organique, de micro-organismes : bactéries, champignons, levures, micro-algues... (Dupont-Morrall, 2005).

Les biofilms peuvent être considérés comme des tissus vivants principalement constitués de micro-organismes, de minéraux et de substances chimiques (fer, magnésium, etc). Le biofilm peut comprendre aussi les produits de corrosion du substrat sur lequel il a adhéré (Mehanna., 2009).

Le biofilm n'est pas une couche compacte et homogène. C'est au contraire un milieu poreux, très hétérogène dans les trois directions et dans le temps, pouvant présenter des zones plus épaisses que d'autres. Généralement, un biofilm a une épaisseur comprise entre 50 et 500 μm . L'hétérogénéité du biofilm est à la fois structurale, microbiologique et chimique (Marconnet, 2007).

III.4.2. Formation d'un biofilm

Les biofilms bactériens peuvent se développer à des températures allant de -12°C à $+115^{\circ}\text{C}$, à des pH de 0 à 13, dans des milieux aqueux de salinités 0 à saturation, sous des pressions de 0, 01 bar à 1400 bars, à la surface de tous les matériaux, en présence de biocides, à la surface de lampes à ultraviolets ou de sources radioactives (Flemming, 1996). En effet, les bactéries contenues dans un biofilm présentent des caractéristiques très différentes de leurs homologues planctoniques (bactéries libres en suspension) parmi lesquelles :

- la production d'exopolymères
- des modifications structurales, par exemple la disparition des flagelles (Flemming, 1990 ; Costerton et al., 1995),
- la mise en place d'un système de communication chimique, appelé «quorum sensing» (Parsek et al., 2000),
- une augmentation significative de leur résistance aux agents antimicrobiens (désinfectants, antibiotiques, inhibiteurs de corrosion) et aux stress environnementaux (déshydratation, privation nutritionnelle, rayonnements ultraviolets...) (Frank et al., 1990; Morton et al., 1998 ; Mah et al., 2001 ; Campanac et al., 2000) ce qui rend le biofilm plus tenace et par suite la lutte pour l'éliminer plus difficile.

Bien que la composition des biofilms soit fonction des écosystèmes où ils se développent, leur formation suit toujours le même processus, le développement d'un biofilm se déroule en plusieurs étapes (Fig. 6).

La première consiste à l'adhésion réversible des bactéries sur une surface inerte (A) par adsorption d'ions et de molécules organiques sur la surface par des liaisons chimiques non covalentes (Mehanna., 2009).

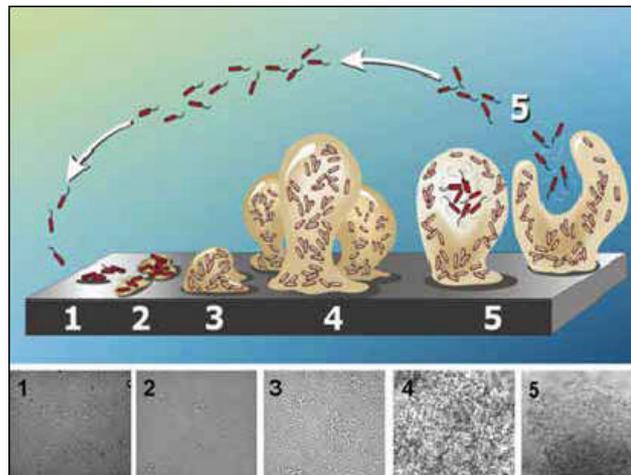
Lors de la deuxième étape d'accumulation, les bactéries sécrètent des polymères extracellulaires. Ces exopolymères représentent 85 à 98% de la matière organique du biofilm, les bactéries ne constituent qu'une faible portion du volume total. Les exopolymères comprennent des polysaccharides, des protéines, des glycoprotéines et des lipoprotéines et forment une matrice qui renforce la structure du biofilm tout en lui conservant une grande plasticité (Mehanna., 2009).

Ce type de matière est plus ou moins imperméable à un certain nombre de biocides, perméable aux éléments nutritifs solubles tels que K, Na, SO_4^{-2} , PO_4 , etc (MD-Média, 2001). Cette sécrétion saccharidique possède un pouvoir adhésif qui favorisera la phase 4, à savoir :

Au cours de la troisième étape, les micro-organismes se divisent et forment des micro-colonies dont la structuration implique l'expression de gènes liés au « quorum sensing ».

La quatrième étape consiste en la maturation du biofilm qui devient épais.

La dernière étape est la phase de dispersion : sous l'effet des forces hydrodynamiques, les bactéries se détachent de la matrice, retournent à l'état planctonique, et peuvent ainsi coloniser d'autres surfaces (Characklis et al., 1990 ; Lappin-Scott et al., 1995 ; Prigent-Combaret et al., 2005).



- (1) adhésion réversible de bactéries
- (2) accumulation
- (3) division ds microorganismes
- (4) maturation du biofilm
- (5) dispersion

Fig. 6 : Différentes étapes de la formation d'un biofilm (Stoodley et al., 2002).

Le biofilm peut accumuler les substances issues de l'environnement, de la détérioration du support ou de l'activité microbienne. Parmi ces substances, il peut y avoir des acides aminés, des acides organiques, des enzymes, des sucres, des alcools, etc. Certaines de ces substances peuvent être à l'origine des problèmes de corrosion (Flemming et al., 1996).

Le biofilm bactérien se développe selon une cinétique de type sigmoïdal à trois phases : phase d'initiation, phase exponentielle et phase d'équilibre.

III.4.3. Role du biofilm

Au moins trois raisons sont à la base de formation du biofilm :

En premier, les biofilms constituent une sorte de défense. Ils résistent aux forces hydrodynamiques comme ils empêchent la pénétration des molécules toxiques.

En second lieu, la formation de biofilms permet aux cellules de rester dans une niche favorable riche en nutriments.

1. L'Origine de l'échantillon

Dans le cadre de notre travail, le consortium sulfurogène utilisé a été prélevé d'une eau d'injection provenant du champ de STA H (Sud-Est d'Algérie). La température *in situ* de cet échantillon est de 38°C le pH est de 8.02

2. Echantillonnage et analyse chimique de l'eau

Pour connaître en éléments chimiques et en oligoéléments de l'eau d'injection, une analyse chimique a été réalisée au niveau du laboratoire de traitement des eaux du CRD, avec les méthodes classiques, à savoir :

- Compléxométrie : pour le dosage simultané du calcium (Ca^{++}) et magnésium (Mg^{2+})
- Volumétrie : pour le dosage des chlorures (Cl^-)
- Acidimétrie : pour le dosage des carbonates (CO_3^{2-}) et des bicarbonates (HCO_3^{2-})
- Gravimétrie : pour le dosage des sulfates (SO_4^{2-}) et du barium (Ba^{2+})
- Calorimétrie : pour le dosage des nitrates (NO_3^{2-})
- Absorption atomique : pour le dosage du potassium (K^+) et du sodium (Na^+)
- Spectrophotométrie : pour le dosage du fer total (Fe^{2+}) et du phosphate (PO_4^{3-})

3. Etude de la croissance des BSR

3.1. Les milieux de cultures utilisés

Pour mettre en évidence les bactéries corrosives présentes dans l'eau d'injection, nous avons utilisé 3 compositions chimiques de milieux de culture : le milieu API (API RP-38, 1982), le milieu Postgate (1966) et le milieu MSTR (Stilinovic et Hrenovic, 2004)

Les milieux procurent aux bactéries des sources de : carbone, d'azotes, des sels minéraux et des facteurs de croissance. La composition des milieux appelés respectivement MC1(API-Lac⁺⁺) , MC2(API-Act⁺), MC3(API-Lac⁺⁺/Act⁺), MC4 (Postgate (Lac⁺⁺⁺)) et MC5(MSTR (Lac⁺)).

4.1.1. Les milieux de culture des BSR :

Les milieux de culture spécifiques des BSR contiennent des sulfates, des ions ferreux et un composé organique donneur d'électrons et source de carbone, en général, du lactate. Les milieux spécifiques peuvent être liquides ou solides. Il n'existe pas de milieu sélectif pour l'isolement des BSR (Loubinoux., 2001).

La culture des BSR a été réalisée sur un milieu sélectif « API » recommandé par la norme (API RP-38, 1982) en modifiant la source de carbone : API-Lactate, API-Acétate et API-Lactate/Acétate. Ceci permet de couvrir un spectre métabolique plus large, permettant la

détéction de maximum de genres sulfurogènes. La composition chimique des trois milieux utilisés est présente dans le tableau 1.

La composition chimique de milieu Postgate (1966), est donnée dans le tableau 2.

Le milieu MSTR selon Stilinovic et Hrenovic (2004), est un milieu commun qui permet le développement des BSR et BTR. Sa composition chimique est donnée dans le tableau 3.

Tableau 1 : Composition chimique du milieu API (API RP-38, 1982)

Composition chimique des milieux de culture	MC1 (API-Lac⁺⁺)	MC2 (API-Act⁺)	MC3 (API-Lac⁺⁺/Act⁺)
Lactate de sodium 60% (C ₃ H ₅ NaO ₃)	4 ml	-	4 ml
Acétate de sodium (CH ₃ CONa)	-	4 ml	4 ml
Phosphate bi-potassique (K ₂ HPO ₄)	0.01 g	0.01 g	0.01 g
Acide ascorbique (C ₆ H ₈ O ₆)	1 g	1 g	1 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g	5 g	5 g
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.2 g	0.2 g	0.2 g
Sulfate d'ammonium et fer (Fe(SO ₄)2NH ₄ .6H ₂ O)	0.2 g	0.2 g	0.2 g
Extrait de levure	1 g	1 g	1 g
eau distillée		1000 ml	
<i>pH</i>		7-7.5	

Tableau 2 : Composition chimique du milieu Postgate (1966)

Composition chimique des milieux de culture	MC4 Postgate (Lac⁺⁺⁺)
NH ₄ CL	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.06g
Na ₂ SO ₄	4.5g
Extrait de levures	1g
Lactate de sodium	6g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.06g
Citrate de sodium.2H ₂ O	0.3g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.004g

CaSO ₄	1g
KH ₂ PO ₄	0.5g
eau distillée	1000 ml
<i>pH</i>	7-7.5

Tableau 3 : Composition chimique du milieu MSTR (Stilinovic et Hrenovic, 2004)

Composition chimique des milieux de culture	MC5 MSTR (Lac ⁺)
Lactate de sodium 60% (C ₃ H ₅ NaO ₃)	2.5 ml
Thiosulfate de sodium (Na ₂ S ₂ O ₃)	0.2 g
Sodium sulfate ammonium chlorure (K ₂ HPO ₄)	3 g
Phosphate bi-potassique (K ₂ HPO ₄)	0.5 g
Tartrates Sodium-Potacium (C ₄ H ₄ K NO ₆ 4H ₂ O)	1 g
Sulfate de magnésium (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.5 g
Sulfate de fer (Fe SO ₄ 7H ₂ O)	0.4 g
Extrait de levure	0.5 g
Sulfate de calcium (Ca SO ₄ 2H ₂ O)	0.2 g
Citrate NH ₄ Fe III	0.2 g
Acide thioglycolique pure	2 ml
eau distillée	1000 ml
<i>pH</i>	7-7.5

4.1.2. préparation des milieux de culture

Ces milieux sont préparés dans les fioles de 1000 ml. Les milieux ainsi obtenus sont agités. Leur pH est ajusté à une valeur comprise entre 7 et 7.5 avec une solution de NaOH à 20%.

3.2. Prélèvement de l'échantillon et réactivation des BSR

L'échantillonnage a été effectué par le CRD/ Boumerdes en suivant les spécificités de la Norme internationale la NACE (2004) et la Norme API Recommended Practice RP-38 (1982).

Les étapes de préparation sont les suivantes :

1. Les milieux préparés auparavant sont répartis dans des flacon de type pénicilline à raison de 9 ml. Chaque flacon contient un clou d'acier carboné rincé à l'acétone, ce dernier servira comme source de fer.
2. Les flacons sont bouchés et barbotés à l'azote pendant 10 min , pour créer les conditions d'anaérobiose.

3. Ils sont ensuite stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C et sous une pression de 1 bar.
4. Après autoclavage, on regroupe les flacons en deux séries de cinq, pour chaque milieu.
5. A l'aide d'une seringue stérile et au près du bec bensen, 1 ml de l'échantillon mère est prélevé et introduit dans les deux série de flacons .
6. Les premières séries sont incubées à 37°C, alors que les deuxièmes sont incubées à 40°C, a fin de savoir quelle est la température adéquate au développement de notre consortium sulfurogène.

Une culture positive se traduit par noircissement du milieu (l'hydrogène sulfuré dégagé précipitant sous forme de sulfure de fer) (Plessis et Gatellier, 1974).

Il faut signaler que la réactivation doit être refaite chaque semaine pour avoir des cellules jeunes (Normes API RP-38, 1982).

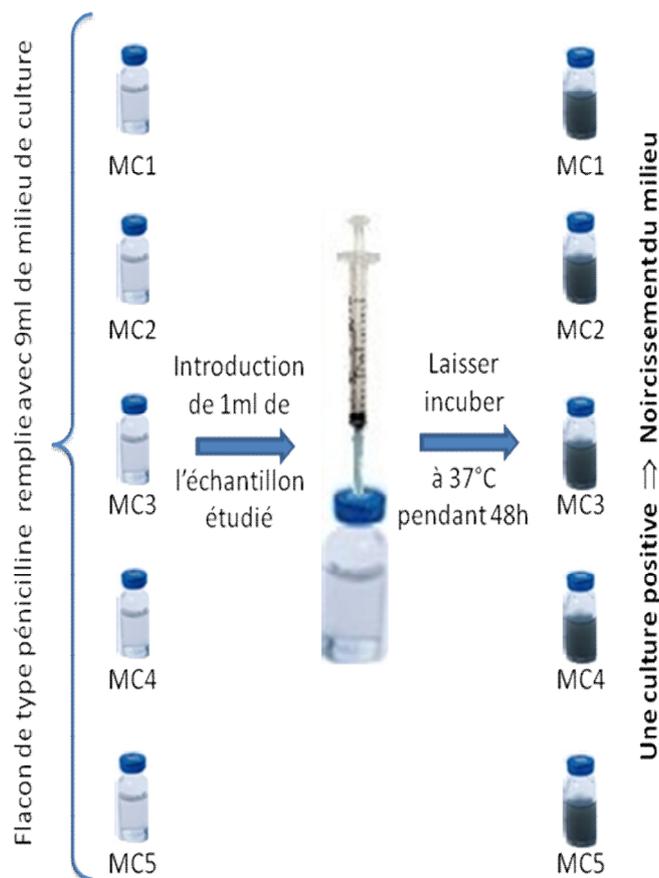


Fig. 7 : Méthode de réactivation du consortium bactérien sulfurogène (BSR).

3.3. Préculture

Les BSR sont cultivés dans des Erlenmeyers 100 ml remplis avec 100 ml de différents milieux de culture stériles et enrichis préparés (MC1, MC2, MC3, MC4, MC5). Chaque Erlen contient un clou d'acier carboné rincé à l'acétone, ce dernier servira comme source de fer. Après barbotage à l'azote, les Erlenmeyers sont stérilisés à l'autoclave. Au voisinage du bec Bensen, on inocule les milieux de cultures avec 1 ml (1% à 2%) de souches mixtes réactivées de BSR. Ces précultures sont incubées à 37°C pendant 48 heures, temps nécessaire pour atteindre la phase exponentielle. Elles vont permettre, lors de l'ensemencement à partir du milieu de culture et dans les mêmes conditions de culture, de maintenir la croissance en pleine phase exponentielle. Elles serviront d'inoculum pour les essais de culture en Erlenmeyers.

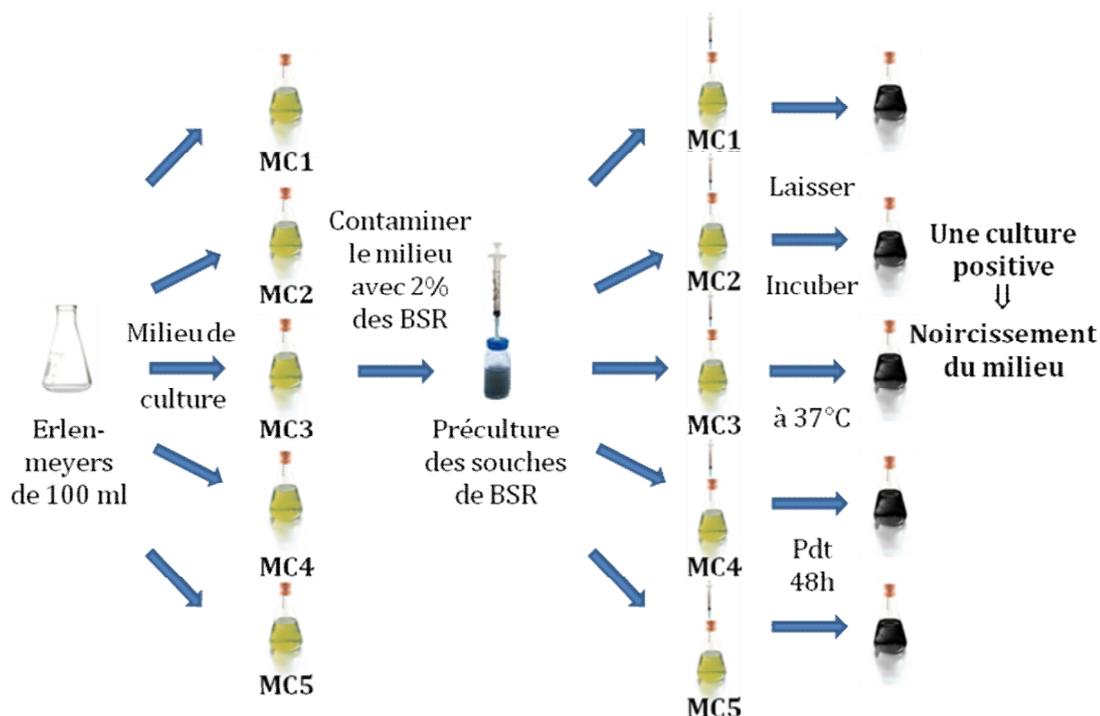


Fig. 8 : préparation des précultures

3.4. Culture des BSR

L'étude se déroule dans dix Erlenmeyers de 250 ml remplis avec les milieux de culture (MC1, MC2, MC3, MC4 et MC5).

Après barbotage et autoclavage, on regroupe les erlenmeyers en série de deux pour chaque milieu. Une série d'Erlenmeyer est inoculée avec 1% à 2% (API-1965) de la préculture de BSR, tandis que l'autre série n'est pas contaminée (temoin).

Ensuite, l'incubation se fait à une température de 37°C.

Une culture positive se traduit par noircissement du milieu (l'hydrogène sulfuré dégage un précipitant sous forme de sulfure de fer) (Plessis et Gatellier, 1974).

La croissance bactérienne des souches isolées est donnée par la densité optique à 630 nm. Elle traduit la concentration cellulaire (pelment-1993).

La variation de pH est mesurée par un pH-mètre préalablement étalonné.

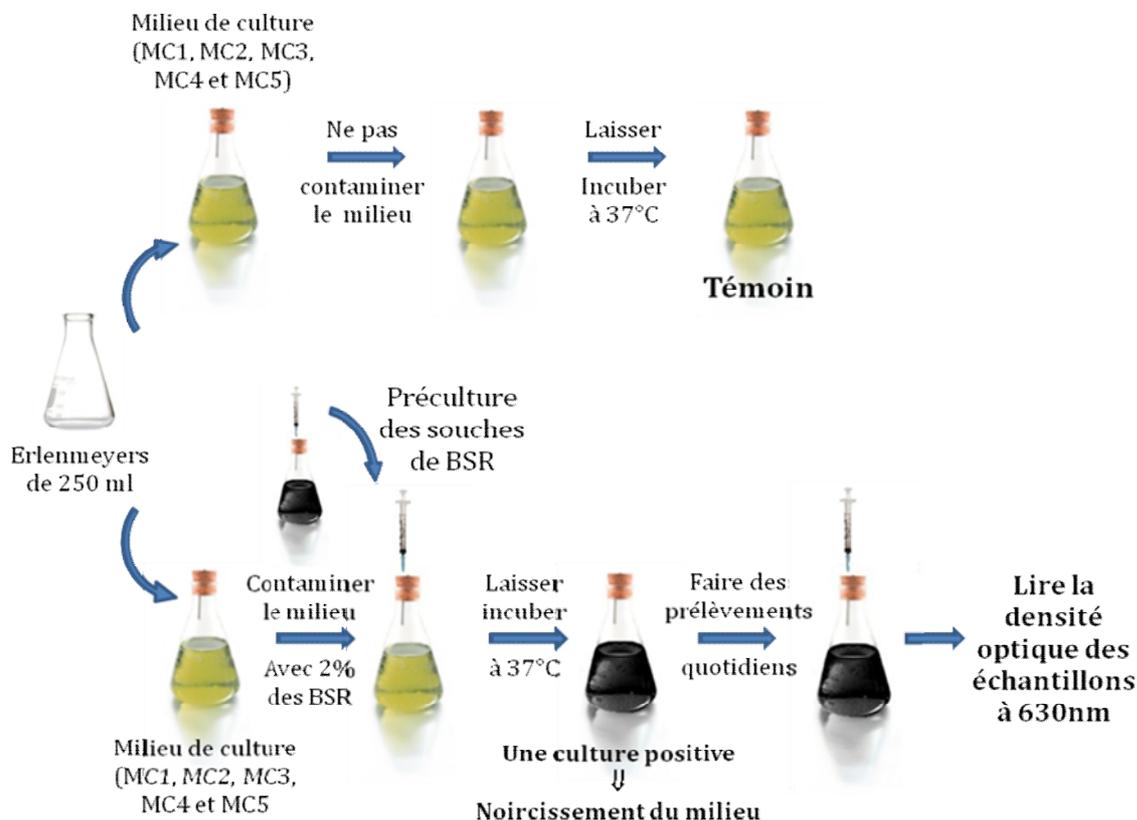


Figure N° 9 : Culture du consortium de BSR en présence d'un coupon d'acier dans les différents milieux

3.5. Etude du biofilm par les bactéries sulfurogènes

Selon la bibliographie, la première étape de la corrosion bactérienne consiste obligatoirement à la formation d'un biofilm sur la surface métallique (Feugas et al., 1997).

3.5.1. Préparation de l'échantillon métallique

Le métal utilisé au cours de cette étude est un acier au carbone de nuance API 5LX52, matériau habituellement utilisé pour la conception des canalisations servant au transport de l'eau et des hydrocarbures au niveau des champs pétroliers. La surface à étudier est mise à nu par polissage à l'eau jusqu'au grade 1000, dégraissée, puis séchée.

L'analyse chimique donnée en pourcentage de masse de cet acier est représentée dans le tableau 5.

L'échantillon d'acier a été coupé en petits morceaux ayant chacun 1 cm² de surface et 1 cm d'épaisseur.

Tableau 4 : L'analyse chimique de l'acier

Eléments	C	Mn	Si	P	S	Cr	Mo	Ni	Cu
[%]	0.25	1.31	0.23	0.013	0.01	0.05	0.016	0.044	0.06

3.5.2. Etude sur milieu liquide

Les coupons métalliques sont suspendus à l'aide d'un fil et plongés dans les Erlenmeyers de 250 ml contenant les milieux de culture précédemment cités. Les Erlenmeyers sont ensuite barbotés à l'azote puis autoclavés à 120°C pendant 20 minutes.

A l'aide d'une seringue stérile, 1% du consortium sulfurogène de la troisième génération est injecté dans la première série des Erlenmeyers (recommandé par la norme API-RP-38, 1982-la NACE, 2004). L'autre série n'est pas contaminée. Ces dernières sont incubées à 37°C pendant six semaines.

3.5.3. Caractérisation du consortium sulfurogène

A fin de réaliser une caractérisation morphologique du consortium sulfurogène de la troisième génération présent dans chaque milieu de culture, nous avons procédé aux étapes suivantes :

4.5.3.1. Observation microscope après coloration au bleu de méthylène

La coloration s'effectue sur des frottis séchés et fixés (Marchal et Bourdron, 1973).

- **Principe :**

La coloration au bleu de méthylène est une simple coloration qui permet l'observation de la morphologie cellulaire des bactéries ainsi que leur mode de regroupement.

- **Préparation des frottis**

Au centre d'une lame, 1ml de l'échantillon à examiner est déposé et étalé à l'aide d'une pipette Pasteur de façon à réaliser un étalement mince homogène, la lame est ensuite séchée et fixée à la chaleur.

- **Technique**

La coloration simple consiste à recouvrir le frottis par une solution de bleu de méthylène pendant une minute, puis rincer à l'eau distillée, sécher et observer au microscope photonique au grossissement $\times 100$.

4.5.3.2. Examen à l'état frais (mobilité)

L'examen à l'état frais permet l'observation des bactéries vivantes en l'absence de toute fixation ou coloration. Cette méthode permet d'observer la morphologie des bactéries, leur mode de regroupement et leur mobilité.

Le mode opératoire consiste à prélever une goutte de culture avec une pipette pasteur stérile qui est déposé au milieu d'une lame propre, si la culture est en milieu liquide. On pose, ensuite, délicatement la lamelle (Marchal et Bourdon, 1973).

3.6. Observation du biofilm au microscope électronique à balayage

4.6.1. Principe de la fonction de MEB

Le microscope électronique à balayage (MEB) est un appareil qui trouve actuellement son emploi dans tous les domaines de la recherche, particulièrement dans l'industrie pétrolière. Son principe consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface.

Principe de la fonction de MEB est basé sur la différence d'absorption des échantillons émis par une lampe tungstène balayant point par point la surface de la préparation.

Le faisceau d'électrons émis par la lampe est concentré et dirigé sur un point minuscule de l'objet, ces électrons sont des électrons primaires. Quand ils entrent en collision avec la surface, ils rejaillissent dans toutes les directions et forment une gerbe d'électrons secondaires recueillies par un collecteur d'électron qui les transforme en signaux électriques. Ces signaux sont amplifiés et forment un point lumineux sur un écran cathodique correspondant à la petite zone de la préparation qui était bombardé par les électrons primaires selon le même.

4.6.2. Préparation pour l'analyse au MEB

Les échantillons coupés sont collés sur le plot ou le porte-échantillon par de la laque d'argent.

Les objets dont on veut observer les surfaces au MEB doivent être électriquement conducteurs pour éviter les charges électriques à la surface d'échantillon, en plus, la conductibilité électrique fait augmenter l'émission d'électron ce qui améliore la qualité de l'image.

Le dépôt de couche mince métallique se fait par la méthode de pulvérisation qui est particulièrement appropriée pour le traitement des objets à surface structurée. La métallisation se fait avec du platine sous vide d'argent (John Lynch., 2001).

Cette observation permet de visualiser l'attaque des bactéries sulfurogènes sur une surface métallique qui se traduit par la formation d'un biofilm bactérien. Elle permet également de distinguer la morphologie de ces bactéries, leur distribution dans l'espace, la qualité des produits de corrosion, et la présence des polymères extra cellulaires.

Après six semaines d'incubation, les coupons métalliques sont récupérés à partir des milieux liquides d'une manière attentive et aseptique afin de préserver les biofilms formés à la surface. Ils doivent ensuite subir une métallisation à la laque d'argent avant d'être observés au MEB.

III.1. Analyse physicochimique de l'eau d'injection

III.1.1. Composition chimique de l'eau d'injection

L'analyse chimique effectuée sur l'eau d'injection qui a fait l'objet de notre travail montre qu'elle est riche en éléments nutritifs qui représentent les différentes sources d'énergie, de carbone, d'azote et des oligo-éléments, permettant le développement d'une large variété de microflore sulfurogène. Les résultats sont représentés dans le tableau 6.

Tableau 5 : Résultats de l'analyse physico-chimique de l'eau de STAII

Éléments dosés		Méthodes utilisées	Concentrations (mg/l)
Cations	Calcium (Ca ²⁺)	Volumétrie (Complexométrie)	41.88 mg/l
	Magnésium (Mg ²⁺)		13.62 mg/l
	Fer (Fe ²⁺)		2.35 mg/l
	Sodium (Na ⁺)	Photométrie	205.10 mg/l
	Potassium (K ⁺)		20.21 mg/l
Anions	Chlorures (Cl ⁻)	Volumétrie (Argentimétrie)	354.57 mg/l
	Bicarbonates (HCO ₃ ⁻)	Acidimétrie	151.89 mg/l
	Carbonates (CO ₃ ⁻)		0
	Sulfates (SO ₄ ²⁻)	Gravimétrie	224 mg/l
Extrait sec		Gravimétrie	50 mg/l
Autres paramètre physicochimique		La salinité	590 g/l

III.1.2. Influence de la composition chimique de l'eau d'injection échantillonnée sur la croissance de la flore sulfurogène

D'après la bibliographie, les micro-organismes vivent dans pratiquement toutes les niches environnementales de la terre. Les populations microbiennes peuvent utiliser comme source de carbone et/ou d'énergie les composés organiques présents naturellement dans ces niches (Perry et al. 2004).

D'après Leclerc(1995),la croissance ou le développement des bactéries est fonction d'une part de la composition du milieu et des conditions physico-chimiques, et d'autre part des éléments nutritifs spécifiques.

Le pH et la salinité de l'eau de STAH sont favorables au développement de la majorité des bactéries sulfurogènes.

L'analyse chimique effectuée sur l'eau d'injection montre qu'elle est riche en éléments nutritifs qui représentent les différentes sources d'énergie de carbone, d'azote et des oligo-éléments (Fe^{+2} , Ca^{+2} , ...) permettant le développement de la microflore présente dans les eaux.

Nous remarquons que cette eau est sulfatée, puisque la concentration de l'ion sulfate est de l'ordre de 224 mg/l. Le sulfate joue un rôle essentiel dans le cycle biogéochimique de soufre, favorisant ainsi le développement de groupe des bactéries sulfatoréductrices. Elles l'utilisent comme accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire anaérobie (Magot, 1999).

Les ions sulfates présentent aussi une source de soufre aux BSR, et entrent dans la biosynthèse des acides aminés (la cystéine et la méthionine).Ces deux acide aminés participent à la structure des protéines (Prescott et *al.*, 2003).

Nous avons remarqué aussi la présence d'oligo-éléments en concentration considérable. Ces derniers sont nécessaires au métabolisme bactérien.

Les résultats indiquent que cette eau contient une quantité très importante d'ions Cl^- , Na^+ . D'après Singleton (1996), ils sont essentiels pour réguler la pression osmotique.

La présence d'une concentration considérable de Mg^{+2} est observée. Cet élément joue un rôle majeur car, il catalyse la réduction des sulfates en utilisant l'hydrogène moléculaire issu de la dissolution électrolytique de l'eau ou des sites cathodique, ce qui provoque l'accumulation des sulfures, ainsi qu'il assure le rôle de cofacteur ou d'activateur enzymatique pour de nombreuses réactions de biosynthèse, comme par exemple le métabolisme de l'ATP et participe dans l'équilibre physico-chimique de la cellule.

Cette eau est aussi très riche en calcium, qui intervient comme cofacteur ou activateur enzymatique et il est incorporé dans les parois et les membranes cytoplasmiques, ce qui favorise le maintien de l'intégrité cellulaire dans un milieu naturel donné.

Nous avons, également, constaté que cette eau est riche en bicarbonates (HCO_3^-) qui sont utilisés comme source de carbone par les bactéries autotrophes (Haslay et Leclerc., 1993). Cependant les HCO_3^- sont considérés comme des acides minéraux corrosifs (Lee et Debber, 1995). Par contre le fer a été présenté en faible quantité. A ce sujet, Leclerc (1995) a prouvé que le fer, fait partie de la structure de nombreux cytochromes, en sachant que l'hydrogénase, enzyme clé de la réduction des sulfates, est constitué d'un cœur soufre-fer, nous comprenons

l'importance de cet élément pour les bactéries sulfatoréductrices. Cet ion est considéré aussi comme un facteur enzymatique (Singleton, 1996).

Il est à noter que la réduction du sulfate abouti à la formation d'hydrogène sulfuré (H_2S) qui réagit avec les ions ferreux (Fe^{+2}) du milieu de culture pour l'obtention d'un précipité noir de sulfure de fer (FeS).

Concernant le K^+ , il représente un cofacteur ou un activateurs de nombreuses réactions enzymatiques et participe dans l'équilibre physico-chimique de la cellule (Leclerc., 1995 ; Regnault, 1990).

Il est à remarquer que la présence du Ba^{+2} dans les eaux de gisement provoque avec les SO_4^{2-} apportées par l'eau d'injection des dépôts durs ou des précipités extrêmement insolubles, c'est le sulfate de baryum ($BaSO_4^{2-}$). Ce phénomène est appelé l'incompatibilité des eaux (Claude, 1992).

III.2. Réactivation des bactéries corrosives

Le tableau 7 montre les résultats de l'observation à l'œil nu de la croissance des BSR dans les différents milieux de culture utilisée pendant 7 jours d'incubation à 37°C.

Tableau 6 : Observation l'œil nu de la croissance des BSR dans les différents milieux de culture

Temps (jours)	Postgate	API -Lac/ Act	API -Lac	API -Act	MSTR
Temps zéro	-	-	-	-	-
1	+	-	-	-	±
2	++	±	-	-	+
3	+++	+	+	±	++
4	+++	++	+	+	+++
5	+++	+++	++	+	+++
6	+++	+++	+++	++	+++
7	+++	+++	+++	++	+++

- Pas de croissance, ± Faible croissance, + Croissance modérée,
++ Bonne croissance, +++ Croissance importante

La réduction de sulfate et de thiosulfate se traduit par un dégagement d' H_2S . Comme les milieux de culture contiennent des sels de fer, la production d' H_2S est révélées par la formation de sulfure métallique de couleur noir (Marchal et al., 1987).

L'apparition du pigment de couleur noir dans les milieux API , MSTR et le milieu postgate après 21 jours d'incubation, permet de confirmer qu'il existe au sein du consortium caractéristique de l'échantillon prélevé du champ de STAH des souches bactérienne réductrices de sulfate (BSR), et il semblerait que ce même consortium pourrait contenir des BSR qui réduisent le thiosulfate et/ou alors des BTR.

Concernant les milieux Postgate et MSTR, le noircissement des milieux apparaissent après 24h d'incubation à 37°C. Alors que pour les milieux API aux différentes sources de carbone, le noircissement apparait après 72h d'incubation à la même température (Fig. 9)

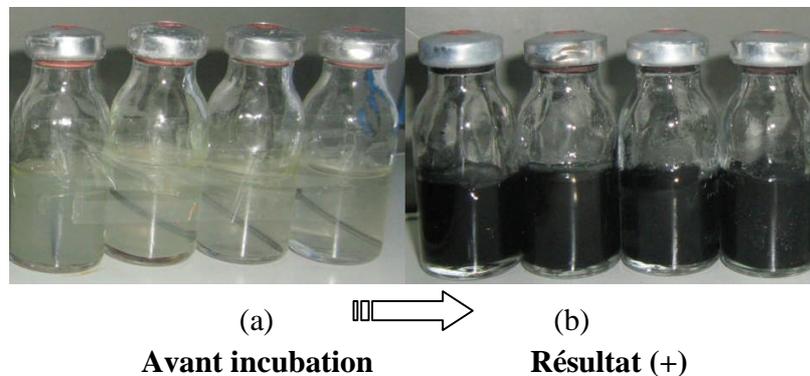


Fig. 10 : Visualisation de la production du FeS dans les milieux de culture liquides (Postgate, API et MASTR) après 21 jours d'incubation.

Ceci indique que la flore sulfurogène présente dans l'eau d'injection est bien adaptée, plus active et plus réactive aux constituant du MSTR et postgate que pour les constituant des milieux API. Ceci impliquerait une phase de latence très courte pour la flore sulfurogène qui s'est développé dans les milieux postgate et MSTR, que celle présentée par les bactéries isolées sur les milieux API

Concernant la température de croissance, bien qu'il n'existe pas un grand intervalle entre 37°C et 40°C, nous avons remarqué une réactivité rapide du consortium sulfurogène à 37°C, et comme il a été recommandé par NACE (2004) et la norme API RP-38 (1982), nous avons retenu cette température pour la suite de notre travail.

III.3. Études de croissance des BSR sur les différents milieux de culture

III.3.1. Influence de la composition chimique

La mise au point d'une procédure ayant pour but l'étude de la cinétique de croissance des BSR, nécessite une optimisation des conditions de culture et particulièrement la composition chimique du milieu de culture ceci permet d'obtenir le maximum de croissance.

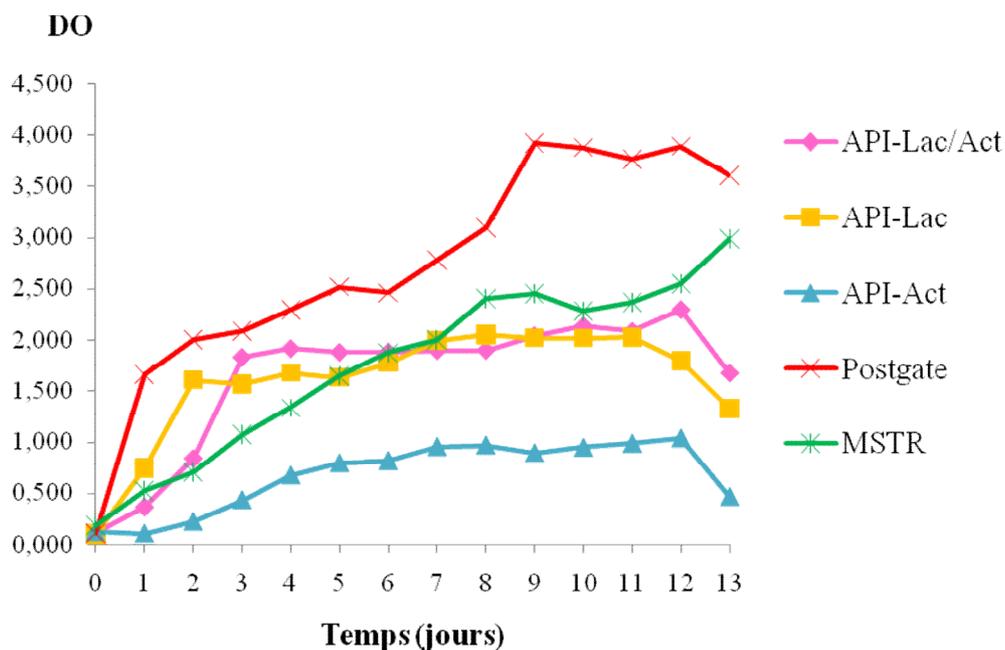


Figure N° 11: Comparaison de la variation de la densité optique des cinq milieux de culture inoculés par une culture mixte de BSR en fonction de temps d'incubation des cultures.

Dans la plus part des études effectuées sur la croissance des BSR, les milieux synthétiques renferment des composés nutritifs représentant les sources d'énergie, de carbone, d'azote, de soufre et d'oligo-éléments (Rivière., 1981 ; Bergey., 1984) ; d'autres études ont démontré que les milieux de culture doivent contenir des sulfates comme source de soufre et comme donneur d'électron (Pfennig et *al.*, 1981)

Les chercheurs ont constaté que les bactéries ne peuvent coloniser le milieu de culture que s'il existe un facteur de croissance indispensable à leur multiplication. L'addition de l'acide ascorbique (vitamine C) en quantité suffisante (0.1 g /l) stimule la formation de colonie de BSR

(Zobell-1943 et Bergey-1984). Concernant l'étude de la croissance des BSR, les publications décrivent un grand nombre de milieu de culture.

Ces milieux se caractérisent par la présence d'ions phosphatés. Selon Beerstecher (1954), ces ions stimulent la multiplication cellulaire.

En plus des phosphates, les milieux contiennent, aussi l'ammonium comme source d'azote, des facteurs de croissance, une ou deux sources de carbone, une source de soufre et d'oligo-éléments.

Il a été montré, également, que l'activité des enzymes catalysant les réactions biochimiques de la réduction des sulfates en sulfures faisant intervenir des ions de magnésium (Mg^{+}). ces derniers ont été fournis par le sulfate de magnésium (Akashi *et al.*, 1962).

De même, le phosphate dipotassique (K_2HPO_4) contribue à stabiliser le pH au cours de la croissance bactérienne. Le citrate d'ammonium et l'acétate de sodium constituent les substances inhibitrices du développement de la plupart des contaminants tels que les streptocoques et les moisissures.

Le milieu de culture contenant l'acide thioglycolique ou le thioglycolate, un agent réducteur, qui complexe l'oxygène et le rend inutilisable par les bactéries. Il est essentiellement destiné à la culture des bactéries anaérobies.

Au début de l'incubation, les milieux sont inoculés avec un même volume de culture mixte de BSR estimé à 1% à 2%. En analysant la cinétique de croissance obtenue dans les différents milieux, on constate que l'évolution de la concentration en BSR, en fonction du temps, est différente.

Dans les milieux Postgate et MSTR, les cellules se divisent plusieurs fois et synthétisent plus d'enzymes pour le métabolisme des constituants du milieu extracellulaire (Duga, 1973 et Leclerc, 1995).

L'addition au milieu de culture de vitamine, d'oligoéléments et d'extrait de levure augmente considérablement la croissance des BSR (Bergey -1984). Sur les mêmes courbes de croissance (Fig.11) la phase de croissance est suivie de l'apparition des phases stationnaires et de décroissance dans les différents milieux de culture.

La décroissance est plus importante dans les milieux (API-Lac/Act, API-Lac, API-Act) que dans les milieux (Postgate, MSTR). Ceci s'explique par une consommation plus importante des constituants des milieux API. Toutefois, la croissance bactérienne est liée à l'activité bactérienne. La figures 11 illustrent les résultats de l'activité des BSR dans les milieux de culture API-Lac/Act, API-Lac, Postgate et MSTR. On a constaté, que les BSR pouvaient réduire les sulfates en sulfures, quand elles sont cultivées sur un milieu à base de lactate et de sulfate.

D'autre part, la culture discontinue (en batch) des BSR, nous a permis de faire une relation directe entre l'activité hydrogénase et la dépolarisation cathodique (Booth et *al.*, 1983)

La mesure de la densité optique (DO) avec des spectrophotomètres automatiques permet de suivre en temps réel la croissance de la biomasse bactérienne dans les milieux de culture translucides et ceci pour un coût modéré.

L'étude du choix du milieu spécifique aux BSR a été entamée pour aborder l'étude de l'optimisation des milieux spécifiques. La croissance des BSR a été suivie dans les cinq milieux différents par la compositions chimiques, et aussi par la source de carbone, pendant une durée de 21 jours, parmi lesquels, nous retiendrons qui donne la concentration la plus élevée en BSR.

Différents milieux de culture ont été utilisés pour évaluer la croissance des BSR et établir les courbes de croissance en fonction du temps. La figure 11 représente la comparaison entre les courbes de croissance cellulaire sur les milieux postgate, MSTR et API en fonction du temps.

Ces courbes font apparaître les temps des différentes étapes de la croissance ainsi que la densité optique qui est proportionnelle à la concentration cellulaire des BSR dans chaque milieu de culture.

Pour milieux postgate et MSTR, la flore sulfurogène commence sa phase de croissance rapide après 24 heures. Sur le milieu Postgate une accélération rapide de la croissance est observée, après un temps minime, les bactéries atteignent rapidement sa phase de croissance. Les milieux API passent par une phase d'adaptation.

III.3.2. Mesure de l'activité biologique de la culture mixte de BSR dans les différents milieux utilisés

Les transformations catalysées par des enzymes s'effectuent dans des conditions de température et de pH donnés. La figure (12) illustre l'évolution du pH, des milieux de culture inoculés par une culture mixte de BSR isolée à partir de l'eau d'injection de la région de STAH en fonction du temps d'incubation.

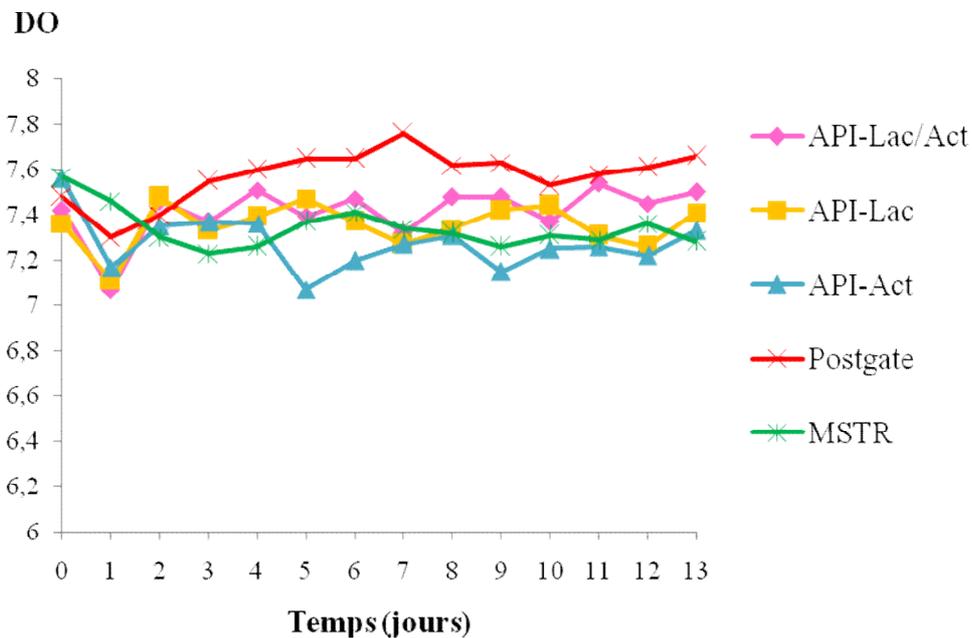


Fig. 12 : Comparaison de la variation de l'évolution de pH des cinq milieux de culture inoculés par une culture mixte de BSR en fonction de temps d'incubation des cultures.

Durant la période d'incubation des bactéries le pH des milieux de culture se situe entre 8 et 6. Dans ce domaine les BSR ont tendance à tolérer et/ou à métaboliser les acides organiques ou minéraux présents dans le milieu (Scriban-1993).

Les résultats qu'on a obtenus sont en accord avec ceux obtenus par certains auteurs. Ces derniers ont constaté la présence des BSR dans une eau où le pH est compris entre 6.5 à 8.5 et riche en sulfate et en produits carbonatés (Kroder et *al.*, 1991, Cordonnier et *al.*, 1995).

Un pH compris entre 5.5 et 8.5 favorise l'activité métabolique des bactéries réductrices des sulfates. Au-delà de ces limites, elles deviennent inactives (Basalo et *al.*, 1987). Il est évident que l'augmentation de la vitesse de croissance (dx/dt) des bactéries est en relation avec le pH du milieu qui augmente durant la croissance de la culture à la suite de la libération de H_2S (Dupont, 2005).

Les différentes réactions biochimiques effectuées dans le cytoplasme cellulaire entraînent la synthèse de composés organiques acides. Durant les 1^{er} jours de croissance, le pH tend à diminuer. Les bactéries entament les réactions d'oxydation des facteurs nutritifs présents dans le milieu.

III.3.3. Comparaison entre les différents milieux de culture utilisés

Durant cette phase on assiste au démarrage de la croissance des BSR, la biocorrosion n'est pas importante.

La flore sulfurogène atteint sa phase stationnaire après 48 heures sur le milieu API-Lac, 70 heures sur le milieu API-Lac/Act, 118 heures sur le milieu API-Act, après 170h pour le milieu MSTR et pour le milieu postgate la phase stationnaire débute au 9eme jour d'incubation.

Le changement de la source de carbone a montré l'affinité des BSR pour la dégradation des substrats organiques, tels que l'acétate et le lactate. Cependant l'utilisation de l'acétate était faible, Le nombre de bactéries sulfatoréductrices sur acétate est largement inférieur à celui des méthanogènes. Il est possible que la différence d'activité observée sur acétate peut provenir d'une différence d'affinité de ces deux groupes pour l'acétate, due à la température d'incubation (37°C); en effet, la plupart des bactéries sulfatoréductrices utilisatrices d'acétate connues ont des températures optimales de croissance situées entre 28 et 32°C (Widdel, 1988).

Cette étude montre que la croissance des BSR par milieu API méthode classique est très lente (Iverson, 1987 ; Taylor et Parkes, 1983).

Dans le milieu synthétique contenant un mélange de deux substrats carbonés (lactate et acétate), on peut observer une courbe anormale diphasique. Ce phénomène a été décrit par Monod sous le nom de diauxie.

III.4. Caractérisation du consortium sulfurogène

III.4.1. Observation microscopique du consortium sulfurogène après coloration au bleu de méthylène

La caractérisation du consortium sulfurogène, par la coloration au bleu de méthylène, dans les cinq milieux de cultures liquides, a permis de déceler un polymorphisme des souches différent dans les cinq milieux. Ceci nous a orienté vers une supposition que cette différence de forme est due essentiellement au spectre métabolique que peut couvrir chaque milieu de culture.

Concernant le milieu MSTR, l'observation microscopique des frottis a montré une prédominance de la forme cocci et quelque forme vibrio, cela est probablement du à la présence e l'acide thioglycolique qui favorise la croissance des anaérobies.

Alors que, le milieu postgate favorise le développement de cocci avec différents arrangements : isolée, dipocoques, en amas en chaînette.

Dans les milieux API, une large diversité des formes bactériennes est observée, nous avons constaté une prédominance des formes cocci avec différents arrangements : isolée, diplocoque, en tétrade, en amas ainsi que des cocci en chaînette.

D'autre part des formes bâtonnets isolés, en doublets et triplets sont repérées. Avec toute fois quelques formes coccobacilles et vibrio.

Ces observations prouvent que les milieux API favorisent le développement d'un large spectre des genres sulfatoréductrices.

Dans un milieu contenant KH_2PO_4 , NH_4Cl , CaSO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, de l'extrait de levure et enrichi avec du sulfate de fer ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), les colonies de *Desulfovibrio* observées au microscope optique sont des bacilles droits, mobiles, Gram négatif et anaérobie stricte (Bergey., 1984 ; Postgate., 1973).

L'extrait de levure a été ajouté en tant que source de vitamines, Na_2SO_4 comme un accepteur d'électron.

Ces souches oxydant le lactate en acétate et en dioxyde de carbone CO_2 . Dans certains cas, l'acétate est oxydé complètement en dioxyde de carbone et leur isolement s'effectue à partir d'une eau salée.

Les bactéries sulfatoréductrices jouent un rôle important dans la dégradation du lactate. Leur concentration est, en effet, supérieure à celles des autres organismes fermentaires, utilisant le lactate. En présence de sulfate, les espèces du genre *Desulfovibrio* ont été reconnues comme les principaux utilisateurs de lactate, par leur morphologie et les produits de fermentation : acétate et sulfures (Dupont, 2005).

D'autres références bibliographiques sur la caractérisation de BSR ont confirmé les résultats obtenus (Zobell., 1957). En outre, Rubent schik (1928) obtient des cultures de BSR oxydants d'acétate en dioxyde de carbone. Widdel (1980) a mis en évidence des bactéries sulfatoréductrices présentant des morphologies sous forme de vibrio, de cocci, de sarcine, de bacilles ou de petits bacilles. La synthèse des sulfures, révélée par l'apparition de la coloration noir due à la formation de sulfure de fer (FeS) est plus rapide dans le milieu postgate inoculé avec des souches. La composition du milieu choisi par l'isolement des BSR est sélective pour la culture de ces souches.

Concernant la dégradation de la source de carbone, la prolifération de BSR sur des substrats organiques (lactate et acétate) est positive. Souvent, la culture du genre *Desulfovibrio* montre des colonies à chromogénèse marron. Dans ce cas, ces souches ne présentent pas de précipite de FeS (Bergey., 1984)

III.4.2. Observation à l'état frais (mobilité)

Les résultats obtenus pour le consortium sulfurogène de chaque milieu de culture sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 7 : Résultat du test de mobilité

Milieu de culture	Mobilité
API-Act	-
API-Lac	+
API-Lac/Act	+
MSTR	+
Postgate	+

(-) absence de bactéries mobiles

(+) présence de bactéries mobiles

III.5. Études de biofilm

III.5. 1. Résultats des analyses de surface

La figure 13 regroupe les photographies prises des coupons récupérés des milieux de cultures contenant ou non de la flore sulfurogène naturelle.

On remarque des traces d'oxydation observables sur les photographies, qui sont apparues lors du séchage des échantillons.

Dans le milieu sans flore sulfurogène, on observe la formation d'une couche d'oxydation épaisse, homogène et friable.

Dans le milieu avec flore sulfurogène naturelle, après 6 semaines d'immersion une croûte épaisse (l'épaisseur varie d'un milieu à un autre), noire et compacte s'est développée à la surface.

Après décollement de cette croûte, la surface métallique sous-jacente présente des aspects de corrosion localisée (Fig. 13). Ainsi les piqûres formées sont assez larges et peu profondes (largeur $L \approx 30 \mu\text{m}$, hauteur : non estimée).

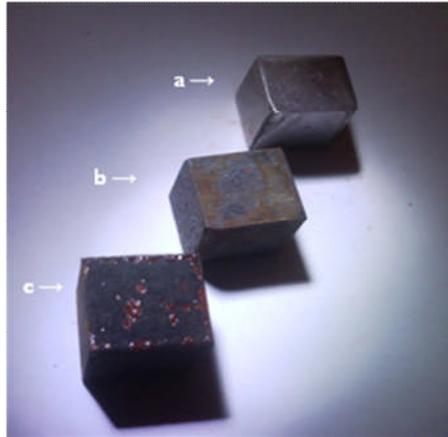


Fig. 13 : photographies prises de la surface des coupons après 6 semaines.

a- coupon à l'état initial, b- coupon immergé dans un milieu de culture sans flore naturelle, c- coupon immergé dans une culture mixte de BSR.

III.5. 1.1. Essais en cultures pures

La figure 14 regroupe les photographies prises des coupons à leur sortie des cultures après les essais réalisés en cultures pures de bactéries sulfurogènes.

En présence d'une flore sulfurogène, l'acier est recouvert d'une couche noire, les images MEB des surfaces des coupons montrent de différences significatives entre ces derniers qui sont immergées dans différents milieux de culture.

III.5.2. L'observation au MEB

L'examen au MEB, des coupons d'acier plongé pendant six semaines dans les cinq milieux liquide contaminés par consortium sulfurogène provenant de l'eau de STAH, montre qu'en plus des éléments non vivant fixés à la surface métallique (ions, éléments organiques, et inorganiques et exopolymères, etc). Une nette colonisation bactérienne a été observée sur la surface métallique.

Selon Leclerc (1995) les bactéries ont tendance à s'attacher à des surfaces métalliques et s'associer en communauté pour y former un biofilm.

L'observation des coupons plongés dans le milieu MSTR, a montré un dépôt poreux homogène (Fig. 18). Tandis que pour les milieux API-Act⁺, API-Lac⁺⁺/Act⁺, API-Lac⁺⁺ et Postgate, la surface des coupons semblait hétérogène, poreuse et des cristaux intégrés dans le biofilm sont visibles sur la surface (Fig. N°15, 16, 17 et 19).

La figure 20 montre l'aspect de la surface d'un coupon plongé dans le milieu de culture non contaminé.

Nous avons pu observer les cas suivant :

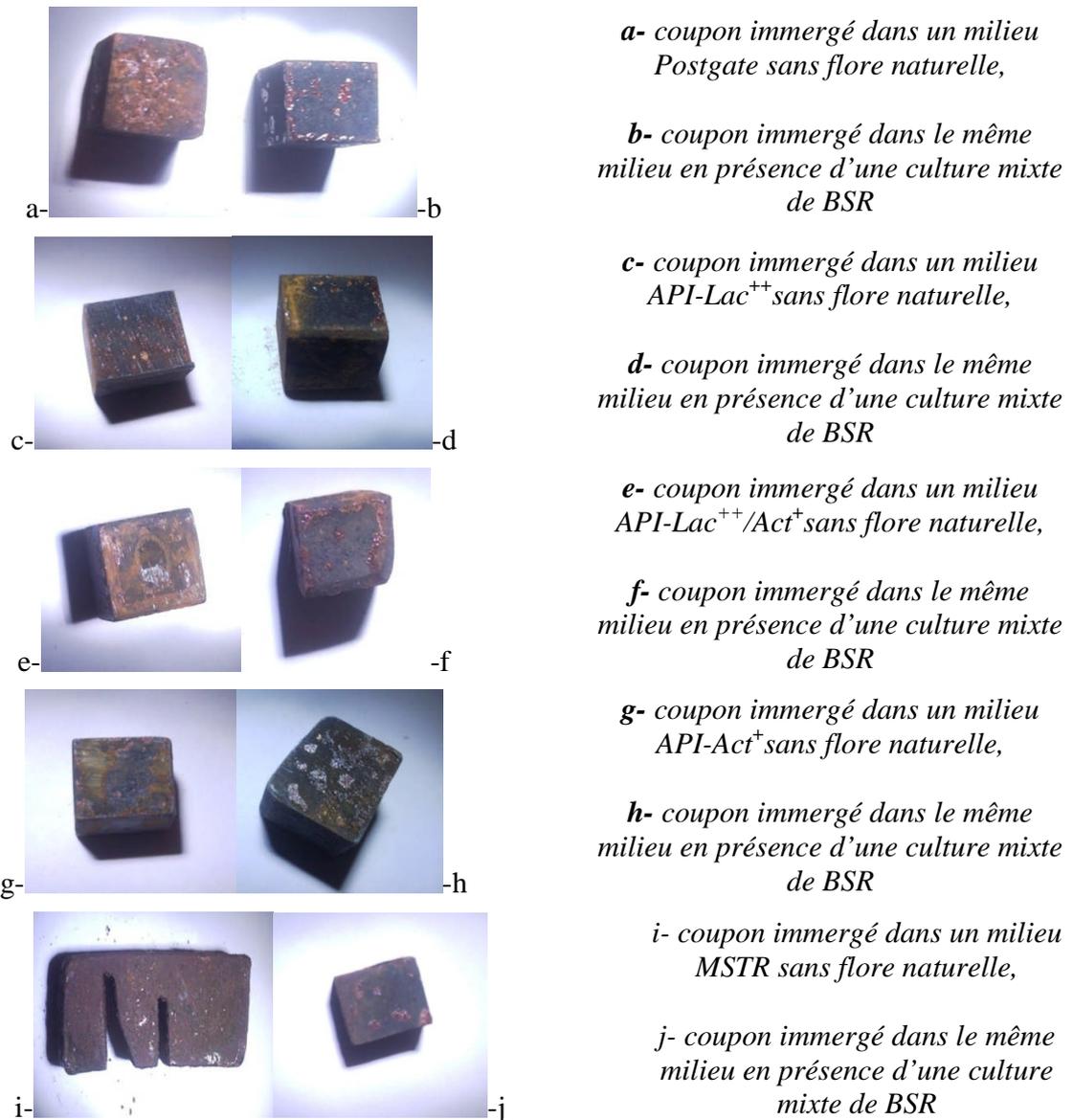


Fig. 14 : Photographies prises de la surface des coupons après 6 semaines.

1- Concernant le milieu API-Act, nous avons observé un biofilm de faible consistance bactérienne, dans le milieu (Fig. 15). Ceci est du à la présence d'une flore sulfurogène immobile d'après les résultats obtenue par l'examen à l'état frais.

2. L'apparition d'un biofilm hétérogène sur la surface des coupons immergés sur le milieu API-Lac liquide. Il a présenté un polymorphisme cellulaire très riche : cocci isolés, en tétrades, diplocoques, en amas, coccobacille isolées, en chainettes, vibrions et spiral (Fig. 16).

3. Le biofilm caractéristique pour le milieu API-Lac/Act, a été vu orienté dans certaine partie du métal et constitué de bactéries en forme de cocci isolées, en amas, bacille en amas et vibron (Fig. 17).

4. L'observation du biofilm formé à la surface des coupons d'acier immergés dans le milieu MSTR, a montré qu'il est homogène avec une épaisseur d'environ $37\mu\text{m}$ (l'épaisseur est évaluée par la distance entre le point focal haut du biofilm et le point focal bas) et formé essentiellement de bactéries en forme de cocci à différent taille. Associer en amas, en diplocoques et isolées (Fig. 18)

5. Le biofilm formé à la surface des coupons d'acier immergés dans le milieu Postgate, est constitué d'agrégats, plus ou moins gros, répartis sur toute la surface avec une épaisseur d'environ $66.7\mu\text{m}$, et formé essentiellement de bactéries en forme de cocci à différent taille isolés, en tétrades, diplocoques, en amas, de coccobacilles isolées, en chainettes, et de vibrions (Fig. 19).

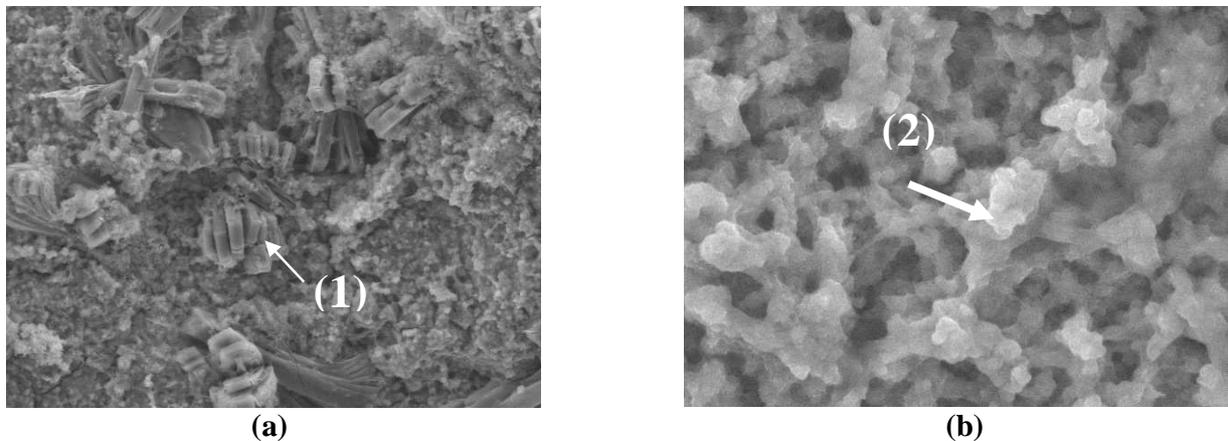


Fig. 15: Illustration photographique au MEB à différents grossissements de biofilm formé dans le milieu API-Act.

a- Structure hétérogène de biofilm avec la présence des cristaux intégrés (1) dans l'EPS (Gr x500)

b- Cocci enveloppés dans les EPS (2) (Gr x 1000)

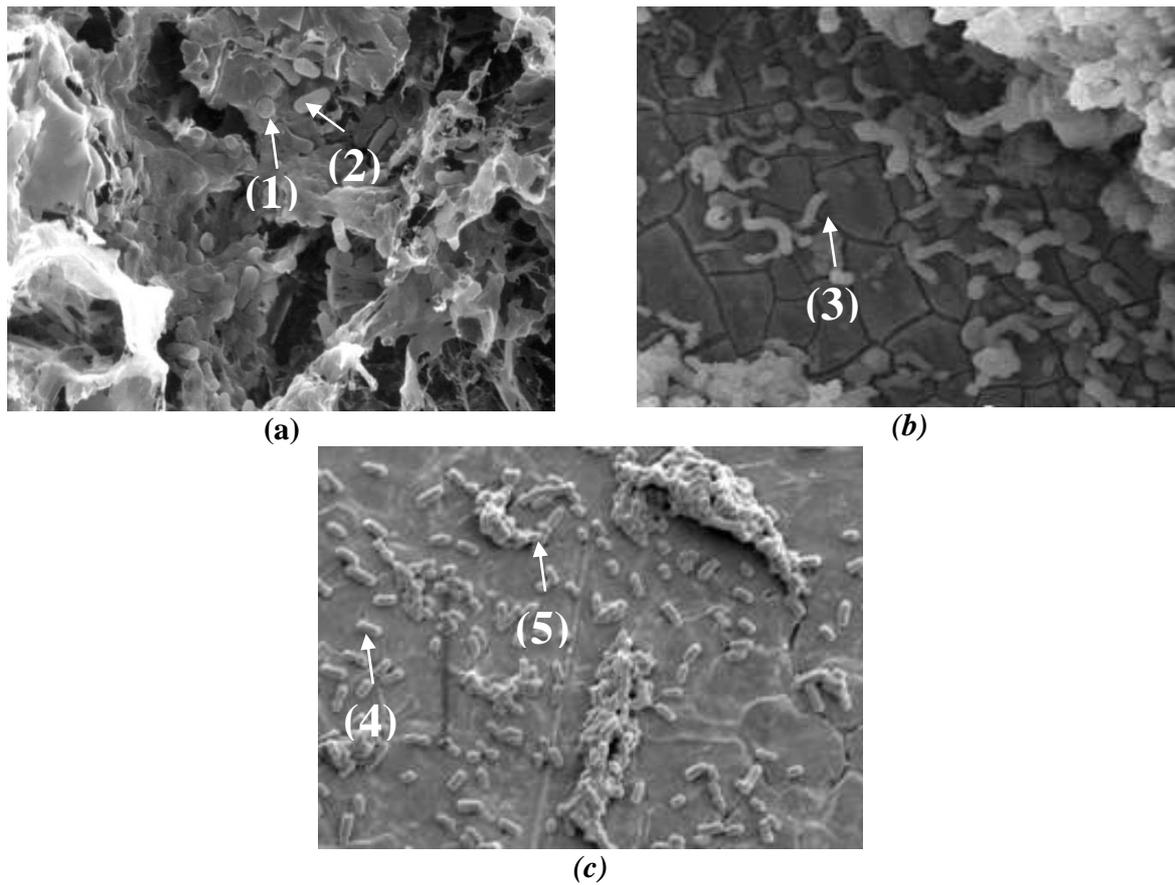


Fig. 16 : Illustration photographique au MEB à différents grossissement de biofilm formé dans le milieu API-Lac.

(a) Polymorphisme cellulaire très riche : vibrions, cocci (1), bacille isolées (2) ... (Gr x 3500)

(b) Vibrions (3) (Gr x 4000)

(c) Bacille isolées (4), bacille en chaînette (5) (Gr x 3500)

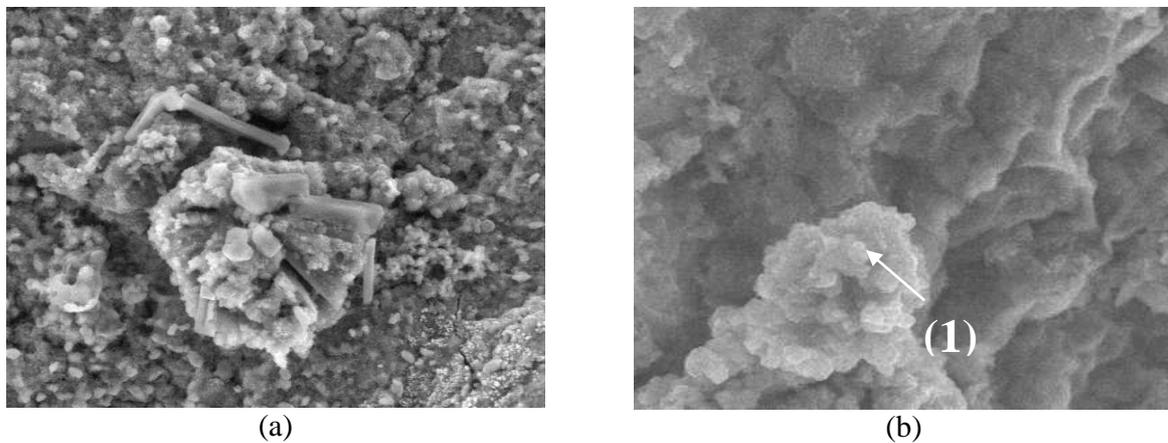


Fig. 17 : Illustration photographique au MEB à différents grossissement de biofilm formé dans le milieu API-Lac /Act

- (a) Structure hétérogène de biofilm avec la présence des cristaux intégrés dans l'EPS (Gr x 1000)
(b) Cocci enveloppés dans les EPS (1) (Gr x 1500)

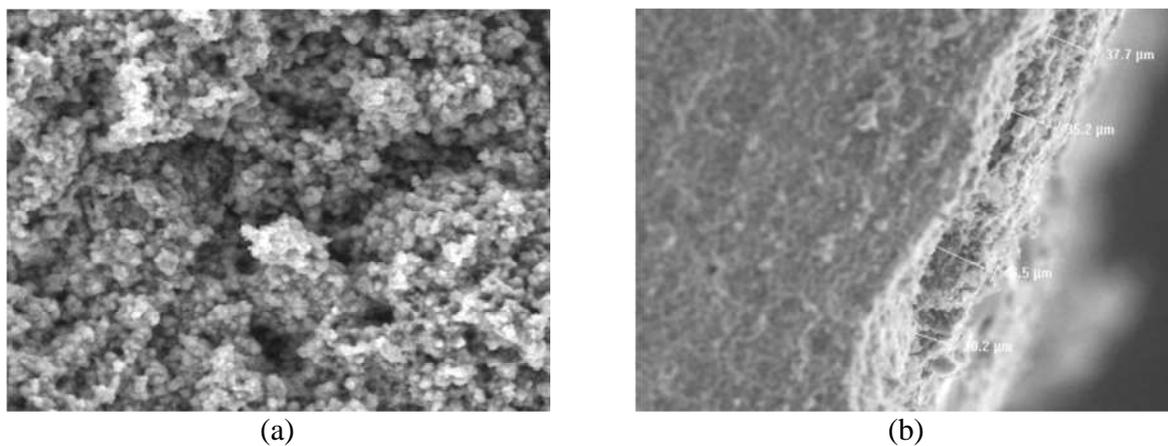


Fig. 18 : Illustration photographique au MEB à différents grossissement de biofilm formé dans le milieu MSTR

- (a) Aspect homogène de biofilm (Gr X 2000)
(b) Visualisation de biofilm (Gr x 500)

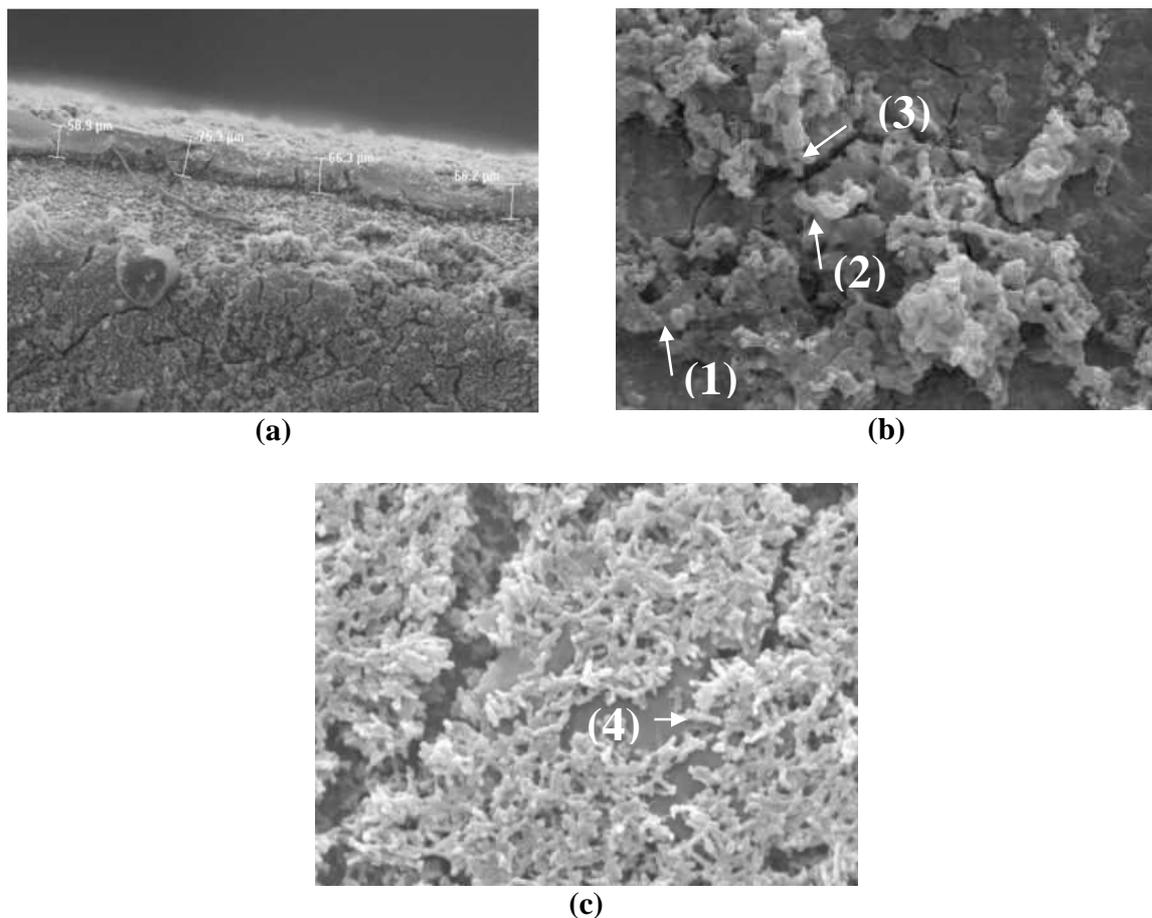


Fig. 19: Illustration photographique au MEB à différents grossissements de biofilm formé dans le milieu postgate

- (a) L'épaisseur de biofilm est de 66.7μm (Gr x 500)
- (b) Structure hétérogène (cocci (1), coccobacilles (2), vibrions (3) ...) de biofilm avec la présence des cristaux intégrés dans l'EPS (Gr X1000)
- (c) Batonnets (4) (Gr x 3500)

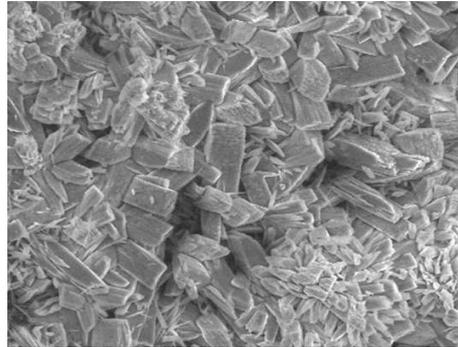


Fig. 20 : Illustration photographique au MEB à différents grossissements des oxydes formé dans le milieu témoin (Gr x 1000)

A lumière des observations obtenues, il apparaît que les biofilms formés donnent une réalité sur la flore sulfurogène qui apparaîtrait à l'eau de STA. En effet concernant les biofilms formés en milieu liquide, le paramètre de la vitesse d'écoulement de l'eau qui en temps réel (site) est un paramètre très important intervenant dans l'adhésion des bactéries, n'a pas été pris en considération.

De plus, les biofilms sont des structures dynamiques évoluant avec le métabolisme microbien. Par conséquent, ils sont composés d'une succession de flores selon les variations des conditions physico-chimiques du milieu interne qui résultent elles-mêmes de l'action des micro-organismes (Percival, 2000). L'observation microscopique révèle qu'ils sont hétérogènes et formés de microcolonies séparées par des espaces qui sont soit non colonisés, soit recouverts de cellules éparses ou en tapis (Carpentier, 1999). Ainsi les cellules microbiennes sont emballées dans une matrice formée de biopolymères, généralement polysaccharidiques et protéiques, excrétés par certains de ces micro-organismes à certains moments de leur cycle cellulaire. Cette matrice extracellulaire fortement hydratée, appelée aussi couche muqueuse, permet la survie des micro-organismes, favorise leur nutrition (Oliveira, 1992) et leur développement, surtout en milieu oligotrophe, en piégeant les nutriments (Carpentier, 1999).

Un biofilm peut être constitué d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes : on parle respectivement de biofilms homogènes ou de biofilms hétérogènes (Tolker-Nielsen, 2000). La plupart des biofilms rencontrés sont hétérogènes. La présence d'une espèce de micro-organisme ou d'une autre au sein du biofilm dépend des conditions environnementales. Les biofilms récemment formés sont souvent monocouches, à l'inverse des biofilms plus anciens qui sont stratifiés (Bury-Moné, 2007).

Un biofilm est constituée d'une fine monocouche de cellules à sa base (fixées à la surface du substrat), surmontée de plusieurs couches épaisses de cellules enfermées dans une matrice et reliées par des canaux aqueux. Il s'agit d'une organisation spatiale stratifiée, permettant des

échanges (informations, nutriments...) et une coopération entre micro-organismes (Stoodley, 1997 ; Tolker-Nielsen, 2000).

Le biofilm se forme en quelques jours sur les coupons immergés dans les différents milieux de culture. Les propriétés des surfaces, des interfaces et la disponibilité en nutriments influencent la structure des biofilms (Boudaud et al., 2004).

L'analyse de surface, montre une étroite relation entre l'agencement du biofilm bactérien et les zones de corrosion localisée : un biofilm dense est observable autour des piqûres alors que dans les zones loin des piqûres, les bactéries sont disposées aléatoirement.

Deux hypothèses peuvent expliquer ces observations : soit les bactéries colonisent préférentiellement les zones de défauts structuraux du matériau où auront lieu les piqûres préférentiellement, soit la présence d'un biofilm bactérien dense crée une zone cathodique accélérant la corrosion localisée (Mehanna, 2009).

L'observation des surfaces des coupons à la fin de l'expérience montre des signes de corrosion généralisée sur toutes les surfaces avec un dépôt plus important de fer sur les coupons en présence des bactéries.

Le biofilm peut accumuler les substances issues de l'environnement, de la détérioration du support ou de l'activité microbienne. Parmi ces substances, il peut y avoir des acides aminés, des acides organiques, des enzymes, des sucres, des alcools, etc. Certaines de ces substances peuvent être à l'origine des problèmes de corrosion (Flemming et al., 1996). L'activité microbienne joue un rôle clé dans la dégradation des substances organiques, la corrosion et la génération de gaz à travers la médiation des réactions d'oxydoréduction (Feugas et al., 1997).

Ces précipités semblent être majoritairement constitués de NaCl et de Na₂SO₄, bien que de nombreux petits cristaux (de l'ordre du µm) de carbonate de calcium aient été également observés (Dupont., 2005).

La production de sulfures dans le milieu par le métabolisme spécifique des bactéries sulfatoréductrices (BSR) paraît très importante dans l'accélération des processus de biocorrosion. Il a été montré que ces sulfures favorisent la dissolution du métal immergé. La flore sulfurogène rassemble plus de 200 espèces bactériennes présentes dans plusieurs branches phylogénétiques. Certaines BSR se montrent plus agressives que d'autres vis-à-vis des matériaux métalliques immergés. Il semblerait que ce soit la nature et le métabolisme de certaines BSR qui soient à l'origine, ou qui favorisent cette Corrosion Induite par les Microorganismes (*CIM*).

L'architecture du biofilm dépend des conditions nutritives, ce qui suggère une facilité de remodelage des biofilms. De bonnes conditions nutritives sont nécessaires aux étapes de formation du biofilm, alors que les phases de développement tardif sont possibles dans des conditions nutritives moins bonnes.

Conclusion

De nombreuses installations pétrolières dans le monde, y compris l'Algérie, utilise des installations métalliques, de surfaces et des canalisations confrontées à la corrosion bactérienne, d'où un impact néfaste sur le rendement des infrastructures.

Ces installations sont sensibles au phénomène de la biocorrosion induite par des bactéries anaérobies sulfurogènes. C'est la forme la plus insidieuse qui peut être catastrophique (Cotiche et al. 2006).

L'analyse chimique d'une eau très utilisée dans le domaine de l'exploitation pétrolière, l'eau d'injection de STAH, était essentielle pour pouvoir aborder l'étude de l'influence des bactéries sulfatoréductrices vis-à-vis de la corrosion de l'acier au carbone. Cette analyse a montré une richesse quantitative et qualitative en éléments minéraux et oligoéléments et a permis de mettre en évidence l'importance des éléments nutritifs nécessaire à la prolifération des bactéries de la corrosion.

L'accent a été mis l'optimisation des milieux de cultures des bactéries sulfurogènes isolées à partir de l'eau d'injection provenant du champ STAH puits n° 205.

La mise au point d'une procédure ayant pour but l'étude de la cinétique de croissance des BSR, a nécessité une optimisation des conditions de culture et particulièrement la composition chimique du milieu de culture qui a permis d'obtenir le maximum de croissance.

La caractérisation du consortium sulfurogène a montré la présence d'un polymorphisme cellulaire très diversifié, ceci indique la richesse de notre eau d'injection en flore sulfurogène.

Ces bactéries ont subi une étude microscopique, révélant une différence du point de vue de l'aspect, de la forme et de la morphologie cellulaire.

L'utilisation des milieux postgate, MSTR, API, nous a permis d'isoler et de donner une meilleure compréhension de la flore sulfurogènes constitutive de l'eau de STAH. Le milieu postgate est par excellence le milieu le plus adapté à être utilisé par le laboratoire de corrosion de CRD lors d'une étude caractéristique des BSR.

Le changement de la source de carbone a montré l'affinité des BSR pour la dégradation des substrats organiques, tels que l'acétate et le lactate.

Enfin les observations au MEB nous a permis de visualiser l'état du biofilm qui s'est formé sur les aciers au carbone, immergées dans les milieux liquides.

En définitive, l'ensemble de ce travail pluridisciplinaire fait partie intégrante d'un domaine de recherche en pleine expansion nécessaire à une meilleure connaissance des micro-organismes BSR et à l'amélioration des méthodes de prévention et de lutte contre la corrosion.

PERSPECTIVES

Les bactéries sulfurogènes, c'est-à-dire étymologiquement les bactéries qui produisent des sulfures, et plus particulièrement les Bactéries Sulfatoréductrices (BSR) sont considérées à ce jour comme les plus agressives vis-à-vis des matériaux métalliques.

De nombreuses inconnues demeurent quant au déclenchement du phénomène de biocorrosion. La seule chose, qui soit à ce jour scientifiquement étayée, est que la présence de bactéries sulfurogènes est potentiellement dangereuse pour le matériau métallique.

Le mécanisme de biocorrosion a été étudié : les bactéries sulfurogènes ne provoquent pas la corrosion mais créent les conditions propices à son établissement par la modification des conditions physico-chimiques à l'interface milieu-matériau (production de quantité importante de sulfures, modification du pH, création de pile d'aération différentielle, ...). Les recherches continuent dans la compréhension des mécanismes mis en jeu. La voie enzymatique apparaît, aujourd'hui, comme l'une des plus prometteuses.

En perspective, il serait intéressant de signaler que les résultats obtenus au cours de ce travail méritent d'être améliorés :

En utilisant des techniques électrochimiques pour l'étude du pouvoir corrosif des BSR en mesurant la vitesse de la corrosion dans les différents milieux de cultures testés.

Aussi l'étude du pouvoir corrosif des BSR en présence et absence d'une protection cathodique

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. **Abada B., Saidi A., Chergui-Bouafia S., (2006).** Métabolisme des Bactérie sulfatoréductrices : Approche Protéomique et Génétique.
2. **API (Américain petroleum institut).** “API recommended pratice for biological analysis of subsurface injection waters” art., pp 2-7, 1965.
3. **Akashi A et al., (1960).** Studies on the cellulose decomposing bacteria in the rumen. Jour. agr. chem. soc. Jap. nb 34, pp : 895, 90.

B

4. **Boudaud N., Amiel C., Mariey L., TraverTJ., (2006).** Applications de la spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier (IRTF) pour la caractérisaton de bactéries sulfurogènes présentes dans les biofilms marins Journées thématiques Biofilms 2006 BRGM (Orléans, 14-15 Juin 2006)
5. **Bury- Moné S., (2007).** Les biofilms. Polycopié. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 17 p.
6. **Béranger G., et Mazille H., (2002).** Corrosion des métaux et alliages.Mécanismes et phénomènes. Ed. Lavoisier, Paris. Pp : 121-404.
7. **Baena M.I., Marquez M.C., Matres V., Botella J., Ventosa A., (2006).** Bactericidal activity of copper and niobium-alloyed austenitic stainless steel. *Curr. Microbiol.* 53, 491-495.
8. **Beech., (1999),** la corrosion bactérienne, biofutur, pp 36-41.
9. **Blanchet D., Kowalewski L., Magnier C., Marchal R., Grebowski A. et Huc A.-Y. (2005).** Microbiologie des réservoirs pétroliers, in Microbiologie pétrolière : Concepts, Implications environnementales, applications industrielles, Volume 2, ed Technip, p 651-652, Paris.
10. **Beech I.B., Sunner J., (2004).** Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 81-186.
11. **Benbouzid-Rollet N., (1993).** Influence des bactéries sulfato-réductrices sur la corrosion d’acier en milieu marin : étude en laboratoire et en milieu naturel, thèse, université de Bretagne Occidentale.
12. **Bergey R. (1984).** Bergey’s manuel of systematic bacteriology, 9th edition voll, pp: 663-679.
13. **Beerstecher E. (1954).** An introduction to microbiology petroleum hydrocarbons. Petroleum microbiology, ed Elseivier press. Inc., pp 58-61.
14. **Boudrant J., Corrieur G., Coulet P., (1994).** Capteurs et mesures en biotechnologie. Ed techniques et documentations. Lavoisier pp 83-110.
15. **Booth G. H. et al., (1983).** Mechanism of anerobic corrosion of steel by sulfate reducing bacteria. Art. Corrosion. The international corrosion from sponsored by the NACE, California, April 13-22, pp 243/2, 243/7.
16. **Basalo, C., (1987).** «Les canalisations d’eau et de gaz : Corrosion dégradation et potection », Technique et documentation Lavoisier.

C

17. **Carpentier, B., (1999).** Les biofilms dans l'industrie agro-alimentaire, Bulletin de la Société Française de Microbiologie, Vol. 14, N°2, Juin 1999, pp. 105-111
18. **Characklis W.G., Marshall K.C., (1990).** Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York.
19. **Campanac C., Pineau L., Payard A., Baziard-Mouysset G., Roques C., (2002).** Interactions between Biocide Cationic Agents and Bacterial Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*46, 1469-1474.
20. **Chantereau J., (1980).** Corrosion bacterienne et bactéries de la corrosion. 2^{ème} ed., Technique et documentation, Paris, Pp : 23-58, 153-164.
21. **Crolet J.L., (1998).** Corrosion bactérienne des métaux, dans biodétérioration des matériaux. EDP science, p : 267.
22. **Chambre syndicale de la recherche et de la production du pétrole et du gaz naturel,** rapport n° 6925, Pp : 2-11.
23. **Chambre S., (1973).** Manuel de traitement des eaux, méthodes et techniques. Ed Masson, Paris, Pp : 120-150, 335-336.
24. **Claude R., (1992).** Traitement des eaux dans l'industrie pétrolière IFP.
25. **Costerton J.W., (1999).** Bacterial biofilm, Rev Science, n°284, p 1318-1322.
26. **Costerton J.W., Geesey G.G., et Cheng K.J., (1978).** How bacteria stick, rev scientific American, n°238,p 86-95.
27. **Costerton D. E., Lewandoski Z., Caldwell D. E., Kosber D., et Ippiscott H. M., (1995).** Annu. Rev. Microbiol, 45, 711.
28. **Castro HF, Williams NH, Ogram A. (2000).** Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiol. Ecol, 31 : 1-9.
29. **Cordonnier J. et al., (1995).** Corrosion bacterienne et protection , application au circuit d'eau
30. **Cotiche C., Boutayeb M. (2006).** Instrumentation de mesure de la biocorrosion des aciers. CFG.

D

31. **Dupont-Morrall I., (2005).** De la microbiologie dans la compréhension des phénomènes de corrosion microbienne
32. **Dupont-Morrall I., (2004).** Les bactéries sulfato-réductrices et la corrosion bactérienne. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 19, 108-115.
33. **De Silva Munoz, (2007).** Des aspects positifs issus des recherches en biocorrosion de la production d'hydrogène aux biopiles à combustible, Thèse de doctorat, L'institut national polytechnique de toulouse.
34. **Degremont., (2005).** Mémento technique de l'eau. 10^{ème} Lavoisier, pp : 422-480, 595-635.
35. **Duga. J. (1973).** Manuel de traitement des eaux d'injection. Ed technip, pp : 62-73.

F

36. **Feugas F., J.P. Magnin, A. Cornet, J.J. Rameau., (1997).** Corrosion influencée par les microorganismes: influence du biofilm sur la corrosion des aciers, techniques et résultats
37. **Frank J.F., Koffi R.A., (1990).** Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Protect.* 53, 550-554.
38. **Flemming. H.C., (1990).** Introduction: biofilm as a particular form of microbial life. In: *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems.* H.C. Flemming, G.G. Geesey (Eds.), Springer, Heidelberg, Germany.
39. **Flemming H.-C., (1996).** Biofouling and Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) an Economical and Technical Overview. E. Heitz, H.-C. Flemming, W. Sand (Eds.), Springer, Heidelberg.
40. **Feron D. et Thierry D., (1998).** Corrosion bactérienne des métaux, dans biodétérioration des matériaux. EDP Sciences, pp : 89-99.
41. **Ford T.E., Mitchell G.J., (1989).** Hydrogen embrittlement: a microbial perspective. *Corrosion 89, paper 18*, NACE, Houston
42. **Fratesi et Elizabeth S., (2002).** Distribution and morphology of Bacterium and their products in microbial enhanced oil recovery operations. Athesis submitted to the faculty of mississippi state university.
43. **Fardeau M., (1996)** Effect of tiosulfate as electron acceptor on glucose and xylose oxidation by thermo anaerobacter sp isolated from oil field water. *Pes. Microbiol*, PP: 159-165, 177.
44. **Féron D., Compère C., Dupont I., Magot M. (2002).** Biodétérioration des matériaux métalliques ou biocorrosion. In « *Corrosion des métaux et alliages* ». *Lavoisier-Hermès Science (Eds.) Techniques & Documentations, France.*

G

45. **Garcia et al., (2000).** Taxonomic outline of prokaryote genera Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd edition.
46. **Gargaud M., Barbier B., Parisot J. P., Despois D., Reisse J., Lehn J. M., (2003).** Les traces du vivant. Ed. Presses, Université de Bordeaux.
47. **Garrity winter., (2001).** Searles 2.
48. **Gibson, G.R., McFarlane, G.T. and Cmmings, J. H. (1988)** Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to ethanogenesis in the large gut. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 103-11.

H

49. **Hansen TA., (1994).** Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1994,66: 165-185.
50. **Hasley C., et Leclerc M., (1993).** Microbiologie des eaux d'alimentation : mémento technique de l'eau. *Technique de documentation*, pp : 134-181, 418-431.

51.

I

52. **Iverson P.I., (1987).** Microbial corrosion of metals. *Adv. Appl. Microbiol.*, 32:1-36.

J

53. **Javaherdashti R., Singh Raman R.K., Panter C., Pereloma E.V.. (2006).** Microbiologically assisted stress corrosion cracking of carbon steel in mixed and pure cultures of sulphate reducing bacteria. *Int. Biodeter. Biodegr.* 58, 27-35.

54. John lynch, analyse physico-chimique des catalyseurs industriels " manuel pratique de caractérisation " edition TECHNIP . 2001

K

55. **Koch J.H., Brongers M.P.H., Thompson N.G., Virmani Y.P., Payer J.H., (2002).** Corrosion Cost and Preventive Strategies in the United States. Federal Highway Administration, Washington, D.C. Report no. FHWA-RD-01-156.

56. **Kroder M, Kroneck PMH, Cypionka H (1991).** Determination of the transmembrane proton gradient in the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* by ³¹p nuclear magnetic resonance. *Arch Microbiol* 156:145 147

L

57. **Lappin-Scott H.M., Costerton J.W., (1995).** Microbial biofilms. *Cambridge University Press*, Cambridge, England.

58. **Lopez, M.A. De la Serna, F.J.Z. Jan-Roblero, J. Romero JM, J.M. Hernandez-Rodriguez, C., (2006).** Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in a water pipeline in the Gulf of Mexico. *FEMS microbiol. Ecol.* 58, 145-154.

59. **Lee D. et Debeer., (1995).** *Bioling*, 8, 273-283.

60. **Loubinoux J., 2001.** Les bactéries sulfatoréductrices humaines: caractérisation et pouvoir pathogène. *Thèse. Doc.* Université de Nancy, France.

61. **Le Faou A., Rajagopal, B. S., Daniels L., FauqueG., (1990).** Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world, *FEMS Microbiol. Rev*, 75, pp: 351-382.

62. **Liu M-Y, Le Gall J., (1990).** Purification and characterization of two proteins with inorganic pyrophosphatase activity from *Desulfovibrio vulgaris*: rubrerythrin and a new, highly active, enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 171 : 313-8.

63. **Leclerc J. P., Gaillard J. I., Simonet M., (1995).** Microbiologie générale, la bacteria et le monde bactérien. *Doin, Paris*, pp : 201-203, 386-391.

M

64. **Mehanna, M., (2009).** Mécanismes de transfert direct en corrosion microbienne des aciers: Application à *Geobacter sulfurreducens* et à l'hydrogénase de *Clostridium acetobutylicum*. *These. Doc.* L'institut National Polytechnique de Toulouse. France.

65. **Mah T.C., O'Toole G.A., (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agent. *Trends Microbiol.* 9, 34-39.
66. **Morton L.H.G., Greenway D.L.A., Gaylarde C.C., Surman S.B., (1998).** Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *Int. Biodet. & Biodeg.* 41, 247-259.
67. **Marconnet. C., (2007).** Comportement d'aciers inoxydables en eaux naturelles. *Thèse de Doctorat.* École centrale de Paris.
68. **MD-Média(2001).** est une revue trimestrielle de la Direction régionale DPR de Hassi Messaoud Responsable de la publication Abdelhak ZIADA Directeur régional Conception, graphisme Régie Sud Méditerranée Crédit photos : Sonatrach/RSM Photogravures . 2001
69. **Magot M., (1998).** Bactériostase et bactéricide in biodétérioration des Matériaux, Ed EDP Sciences, p 146-153,Paris
70. **Magot M., (1998).** Introduction à la microbiologie des bactéries, in biodétérioration des Matériaux , Ed EDP Sciences, p 41-42,Paris
71. **Marchal .R., (1999).** Rôle des bactéries sulfurogènes dans la corrosion du fer, Rev Oil & Gas Science and Technology, Vol.54, n°5, Septembre-Octobre 1999, p 649-659.
72. **Madigan M. et martinko J., (2007).** Brock, Biologie des microorganismes, 11ème édition, ed EDP Sciences, p 146-153.
73. **Magot M. (1999).** La corrosion de l'acier par les bactéries sulfurogènes. Bull. Soc. Fr. Microbiol 14.
74. **Marchal N., Bourdon J. L. (1987).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, PP : 73.
75. **Marchal N. et Bourdon J.H. (1973).** Les milieux de cultures pour l'isolement et 'identification biochimique de bactéries .Doin éditeurs, Paris, pp 48-120.

N

76. **Neveux M., (1968).** La corrosion des conduites d'eau et de gaz. Causes et remèdes, ED EYROLLES. Paris, PP 185-207.
77. **Neria-Gonzalez I., Wang E.T., Ramirez F., Romero J.M., Hernandez-Rodriguez C., (2006).** Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. *Anaerobe.* 12, 122-123.
78. **Nace. (2004).** Field manitoning of bacterial, growth in oil and gaz systems. Article TM0194 de la nace.

O

79. **Oliveira D.R., (1992).** Physico-chemical aspects of adhesion. Dans *Biofilms-Science and technology.* Melo L.F., Bott T.R., Fletcher M., Capdeville B. Ed., NATO ASI Series, Serie E: applied sciences, Vol 223, ISBN: 0-7923-2022-0, p. 45-58
80. **(Ollivier, 1996).** Découverte d'un métabolisme ancestrale chez les procaryotes fiches scientifiques. Fiche 24.

P

81. **Percival S.L., Walker J.T., Hunter P.R., (2000).** Microbiological aspects of biofilms and drinking water. CRC Press ISBN: 0-8493-0590-X
82. **Parsek M.R., Greenberg E.P., (2000).** Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *PNAS*. 97, 8789-8793.
83. **Prescott M., Harley J.R et Klein D.A., (2003).** Microbiologie. 2eme Ed, de Boeck université. Paris, pp 493-496, 1012.
84. **Pelmont J., (2005).** Biodégradation et métabolisme, les bactéries pour la technologie de l'environnement. Ed. EDP science, pp : 326-347, 171-181, 134-136, 115-118.
85. **Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C., Lejeune P. (1999).** Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 5993-6002.
86. **Postgate J. R., (1973).** Manuel de traitement de l'eau d'injection. Ed. technip, pp : 62-73.
87. **Pineau S., I Dupont, (2002).** Influence de la protection cathodique sur la colonisation de la flore sulfurogène en milieu marin, Matériaux et technique, 23-29.
88. **Pourbaix M., (1963).** Atlas d'équilibres électrochimiques, ed Gauthier-Villars, Paris.
89. **Pereira IAC, Teixeira M, Xavier AV., (1998).** Hemeproteins in anaerobes. Structure and Bonding, 1998, 91 : 65-89.
90. **Postgate JR. (1984)** The sulphate-reducing bacteria. In: Cambridge University Press (ed.), second edition, Cambridge, United Kingdom.
91. **Perry J., Jerome J., James T., Staley et Stephen, (2004).** La microbiologie. ED Dunod, pp: 116-144.
92. **Pfennig N., Widdel F & Truper M. C. (1981).** Isolation and identification of bacteria. A handbook on habitats, vol 2, Prokaryotes, ed by spinger verloy Berlin, Heidelber pp 926-940.
93. **Padilla-Viveros A., Garcia-Ochoa E., Alazard D., (2006).** Comparative electrochemical noise study of the corrosion process of carbon steel by the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio alaskensis* under nutritionally rich and oligotrophic culture conditions. *Electrochim. Acta.* 51, 3841-3847.
94. **Plessis A. Gatelier C. (1974).** Dégradation microbienne des métaux .Ed Technip, Association des ingénieurs en anticorrosion.
95. **Plment J., (1993).** Bactéries et environnement, adaptations physiologiques .Ed press universitaire de Grenoble pp 633-668.

Q

96. **Qatibi A., (1990).** Fermentation du lactate, du glycérol et des diols par les bactéries sulfatoréductrices du genre *desulfovibrio*. *Thèse. Doc. Univ. Marseille, France.*

R

97. **(Rivière, 1974) Rivière J., (1981).** Bacteries du cycle du soufre et corrosion. Art. pétrole et technique n° 280 pp 17-22.

98. **Ravot G., Magot M., fardeau M., Bhanat K. C., Thomas P., Gracian P., Olivier B., (1999).** Fusibacter paucivorans gen. Nov, sp. Nov, an anaerobic thiosulfato-reducing bacterium from oil-producing well. International journal of systematic bacteriology, pp : 49.
99. **Reis MAM, Almeida JS, Lemos PC, Carrondo MJT., (1992).** Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate-reducing bacteria. Biotechnology and Bioengineering, 40 : 593-600.
100. **Regnault G. P., (1990).** Microbiologie générale. Ed Vigot, pp: 494-517, 565-579.
101. **Rivière J. (1981).** Bactéries du cycle du soufre et corrosion. Art. Pétrole et technique n° 280, pp 17-22.

S

102. **Stoodley P, Boyle. J.D., Dodds. I., et al., (1997).** Biofilms : community interactions and control, 1-9.
103. **Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton J.W., (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187-209.
104. **Sidorv W., (1986).** Forage et exploitation des puits de pétrole et de gaz .Edition Mir.
105. **Schmidt R., (1999).** Traité des matériaux, chapitre : Comportement des matériaux dans les milieux biologiques. 1^{er} Ed. Presses Polytechniques et universitaires Romandes, PP : 101, 112, 195-196.
106. **Singleton P., (2005).** Bactériologie, pour la médecine, la biologie et la biotechnologie. 6^{ème} Ed. Dunod, Paris, pp : 98-100, 304-305.
107. **Singleton P., (1996).** Bactériologie, 4^{ème} ed, Dunod, pp : 75-80, 356-362.
108. **Stetter, K.O. (1988).** *Archeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov. A new taxon of extreme thermophilic archeobacteria. *Syst Appl Microbiol* 10: 172-173
- 109. Scriban R., (1993).** Cinétique microbienne. Biotechnologie 4^{ème} ed., Technique et documentation, Lavoisier pp 184-207.
- 110. Stilinovic B., Hrenovic J., (2004).** Rapid detection of sulfide-producing bacteria from sulfate and thiosulfate. Department of biology, faculty of science, University of Zagreb, Croatia

T

111. **Tolker- Nielsen T., Molin S., (2000).** Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb. Ecol.*, **40**: 75-84.
112. **Taylor J, Parkes R.J., (1983).** The cellular fatty acids of the sulfate reducing bacteria. *Desulfobacter sp., Desulfobubulbus sp. and Desulfovibrio desulfuricans.* *J. Gen. Microbiol*, 129:3303-3309.

V

113. **Videla H.A., (1996).** Manual of biocorrosion. Lew publisher, CRC Press, Boca Rator, florida, pp: 273.

W

114. **Walch, PJ, Parent, JJ & Henry, RP (1989).** Carbonic anhydrase fournitures Carbonic anhydrase supplies Zoologie de bicarbonate pour la synthèse de l'urée dans les hépatocytes toadfish. *physiologiques* 62, bicarbonate for urea synthesis in toadfish hepatocytes. *Physiological Zoology* 62, 1257-1272. 1257–1272
115. **Widdel F., (1988).** Microbiology and ecology of sulfate and sulfure-reducing bacteria in biology of anaerobic microorganisms, ed J. Wiley & Sons, London, 469-585.
116. **Widdel F., Pfennig N., Truper M. G., (1981).** “Isolation and identification of bacteria” A handbook on habitats, vol 2, Prokaryotes, ed by Springer Verlag Berlin, Heidelberg pp 926-940.
117. **Widdel, F. (1980)** Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. Doctoral thesis, Univ Göttingen, FRG.

X

118. **Xu C., Zhang Y., Cheng G., Zhu W., (2007).** Localized corrosion behavior of 316L stainless steel in the presence of sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria. *Mater. Sci. Eng.* 443, 235-241.

Z

119. **Zobbel C.E. (1969).** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology*. n° 46, pp: 39-56.
120. **Zellner, G., Messner, P., Kneifel, H., Winter, J. (1989).** *Desulfovibrio simplex* spec. nov., a new sulfate-reducing bacterium from a sour whey digester. *Arch Microbiol* 152: 229-334
121. **Zhang T., Fang H.H.P., Ko B.C.B.. (2003).** Methanogen population in a marine biofilm corrosive to mild steel. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63, 101-106.
122. **Zobell, C.E. (1957)** Ecology of sulfate-reducing bacteria, In: Sulfate-reducing bacteria, their relation to the secondary recovery of oil, Science symposium, St Bonaventure College. St Bonaventure. New York, 1-24

ANNEXE I

1. CLASSIFICATION DES BSR:

Dans la dernière édition du Manuel de Bergey, Widdel et Pfennig (1984) proposèrent une classification de ces microorganismes **sur la base de leur morphologie** et définirent 8 genres. Widdel (1988) a proposé depuis une classification actualisée et détaillée (Tableau 1.1).

D'un point de vue physiologique et métabolique, on peut distinguer 2 types de BSR : celles qui **oxydent incomplètement les substrats carbonés en acétate** et celles qui **dégradent complètement les substrats carbonés en CO₂** (Tableau 1.2).

Il existe plus de deux cents espèces de BSR avec des morphologies et des métabolismes très diversifiés : mésophiles, thermophiles, Gram-négatif, à spores Gram-positif (Castro et al., 2000). Les espèces les plus étudiées appartiennent au genre *Desulfovibrio*, la plupart ont été isolées de sites de corrosion dans des pipelines (**Padilla-Viveros et al., 2006**).

Cette classification physiologique ne recoupe pas exactement celle qui est basée sur la morphologie; il existe en effet des espèces de *Desulfovibrio* et de *Desulfotomaculum* qui dégradent complètement leurs substrats carbonés (Tableau 1.2) (Qatibi., 1990), et qui ne peuvent utiliser que quelques **composés carbonés en C₃** (lactate, CH₃CH₂COOH; pyruvate, CH₃COCOOH) ou **l'hydrogène moléculaire comme donneurs d'électrons**. Quelques souches peuvent également se **développer sans sulfate**, les électrons provenant du pyruvate ou du fumarate étant utilisés pour réduire les ions H⁺ avec formation d'hydrogène moléculaire. Dans tous les cas, l'oxydation de ces composés s'arrête à l'acétate (CH₃COOH) qui n'est pas dégradé (Garcia., 2000).

La diversité des formes (coques, bâtonnets plus ou moins allongés, bactéries filamenteuses) et du Gram, indiquent que les bactéries sulfato-réductrices n'ont pas de parenté phylogénique étroite (Garcia., 2000); la généralisation des études de biochimie ou physiologie ne peut être faite de façon aisée, surtout si l'on considère qu'on connaît mal les propriétés biochimiques ou physiologiques de beaucoup de nouveaux genres. Par conséquent, des études systématiques supplémentaires sont nécessaires pour affiner la classification des BSR. L'isolement d'autres espèces entraînera des aménagements constants de la classification actuelle. Il est à noter qu'avec la description de nouvelles souches, le nombre de substrats utilisés par les bactéries sulfatoréductrices a augmenté (**Hansen., 1988; Widdel., 1988 ; Qatibi., 1990**).

Tableau 9. Classification morphologique des bactéries Sulfatoréductrices

(Qatibi., 1990)

Genre	Morphologie	Références
<i>Desulfovibrio</i>	vibrio, spirille, bacille incurve	Potgate et Campbell (1966)
<i>Desulfotomaculum</i>	bacille sporulé	Campbell et Postgate (1965)
<i>Desulfomonas</i>	bacille droit non mobile	Moore et al. (1976)
<i>Desulfomicrobium</i>	petit bâtonnet	Rozanova et al. (1988)
<i>Desulfobulbus</i>	bacille citriforme	Widdel et Pfenning (1982)
<i>Thermodesulfobacterium</i>	bâtonnet	Rozanova et Khudrakova (1974)
<i>Desulfobacterium</i>	bâtonnet, parfois incurvé	Widdel (1988)
<i>Desulfobacter</i>	bacille de forme ellipsoïdale	Widdel et Pfenning (1981)
<i>Desulfosarcina</i>	sarcine, coques en paquet	Widdel (1980)
<i>Desulfococcus</i>	coque	Pfennig (1981)
<i>Desulfonema</i>	filament	Widdel et al. (1983)

Tableau 10. Classification Physiologique des Bactéries Sulfatoréductrices

(Qatibi., 1990)

<p>* <u>Oxydation incomplète des substrats organiques</u></p> <p>- Substrats pairs :</p> $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{2n} - \text{COO}^- + \frac{n}{2} \text{SO}_4^{2-} \rightarrow (n+1) \text{CH}_3 \text{COO}^- + \frac{n}{2} \text{HS}^- + \frac{n}{2} \text{H}_2\text{O}$ <p>- Substrats impairs :</p> $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{2n+1} - \text{COO}^- + \frac{n}{2} \text{SO}_4^{2-} + \frac{n}{2} \text{OH}^- \rightarrow \text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{COO}^- + n \text{CH}_3 \text{COO}^- + \frac{n}{2} \text{HS}^- + \frac{n}{2} \text{H}_2\text{O}$ <p><i>Desulfovibrio: africanus; carbinolicus; desulfuricans; fructosovorans; furfuralis; giganteus; gigas; salexigens; sapovorans; simplex; sulfodismutans; vulgaris;</i></p> <p><i>Desulfotomaculum: nigrificans; orientis; ruminis; antarcticum; guttoideum; kutnevsovii</i></p> <p><i>Desulfobulbus :elongatus; propionicus</i></p> <p><i>Desulfomonas: pigra</i></p> <p><i>Thermodesulfobacterium: commune; mobile</i></p> <p><i>Desulfomicrobium: aspheronum; baculatus</i></p>
<p>* <u>Oxydation complète des substrats organiques</u></p> $4\text{H} - (\text{CH}_2)_n - \text{COO}^- + (3n+1) \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (4n+4) \text{H} - \text{CO}_3^- + (3n+1) \text{HS}^- + \text{H}^+ + \text{HO}^-$ <p><i>Desulfobacterium: aniline; autotrophicum; cathecholicum; indolicum; macestii; phenolicum, vacuolatum</i></p> <p><i>Desulfovibrio: baarsii</i></p> <p><i>Desulfotomaculum: acetoxidans, geothermicum, sapomandans</i></p> <p><i>Desulfobacter: curvatus; hydrogenophilus; latus; postgatei</i></p> <p><i>Desulfococcus: multivorans, niacini</i></p> <p><i>Desulfonema: limicola; magnum</i></p> <p><i>Desulfosarcina: variabilis</i></p>

La récente découverte du genre *Archaeoglobus* (Stetter, 1988) a révélé l'existence de bactéries sulfatoréductrices appartenant aux archéobactéries (ZeUner *et al* .,1989) et représentant une troisième branche au sein de ce groupe. (Qatibi., 1990)

ANNEXE II

Rappels sur la croissance bactérienne

La présence d'un microorganisme dans un milieu approprié permet à celui-ci de développer une activité en relation avec la composition et les conditions environnantes. Cette activité bactérienne présente deux aspects (Scriban, 1993) :

La croissance ou l'augmentation de la concentration cellulaire (biomasse)

Le microorganisme excrète, à travers ses enveloppes cellulaires, des substances corrosives tels que les sulfures et les acides organiques.

1. les principaux éléments de la physiologie bactérienne

- les conditions de la croissance bactérienne:

* nutritionnelles

* environnementales

- la croissance bactérienne proprement dite :

* division bactérienne

* dynamique de la croissance

Principaux éléments de la physiologie bactérienne	Implication lors de l'examen bactériologique
Besoins nutritifs	Choix des milieux de culture
Conditions environnementales	Choix de la température et de l'atmosphère d'incubation des milieux de culture
Division bactérienne	Délais de croissance et de rendu des résultats
Dynamique de la croissance	Dénombrement, identification et antibiogramme

2. Besoins nutritifs des bactéries et milieux de culture

2.1. Les besoins nutritifs des bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants devant trouver dans l'environnement l'ensemble des substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires.

Leur **source d'énergie** peut être de nature lumineuse (bactéries phototrophes) ou représentée par des composés minéraux ou organiques divers : on parle alors de bactéries chimiotrophes. Parmi cette dernière catégorie de bactéries, on distingue les bactéries chimiolithotrophes tirant leur d'énergie d'un élément minéral et les bactéries chimioorganotrophes pour lesquelles la source d'énergie est un élément organique.

La plupart des bactéries d'intérêt médical sont des bactéries chimioorganotrophes.

La **source de carbone** nécessaire à la vie bactérienne peut être le dioxyde de carbone qui est la source de carbone exclusive pour les bactéries autotrophes alors que les bactéries dites hétérotrophes utilisent le carbone de substances organiques diverses comme un alcool, l'acide acétique, l'acide lactique, des sucres divers, ...). Les bactéries doivent également trouver dans leur environnement une **source d'azote** et une **source de soufre**. Les bactéries ont des **besoins inorganiques** (exemple du phosphore). Les autres éléments nécessaires à la vie bactérienne sont les **ions** comme le sodium, le potassium, le magnésium, le chlore ; divers **oligo-éléments** comme le manganèse, le nickel, le zinc, le sélénium, ... ; divers **facteurs de croissance** comme des acides aminés (acide folique, acide nicotinique, ...) ou des dérivés de l'hème et des **vitamines** : B6 (pyridoxine), K et dérivées, ...

1.2. Les milieux de culture

Leur **composition** doit permettre la croissance bactérienne et doit donc tenir compte des besoins nutritifs des bactéries. La composition de base de ces milieux comprend :

- des substrats nutritifs : acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres, ...,
- un système tampon assurant la constance du pH
- des sels minéraux,
- des vitamines,
- d'autres facteurs de croissance pour certaines bactéries dites exigeantes : sang, protéines, hémoglobine, vitamines supplémentaires.

On distingue **plusieurs types de milieux de culture** selon leur composition :

- les milieux **synthétiques** de composition définie,
- les milieux **semi-synthétiques** qui sont des milieux synthétiques additionnés d'un extrait d'organismes comme un extrait de levures contenant des facteurs de croissance pour les bactéries,
- des milieux **complexes** de réalisation empirique (extraits de viande, de levure, extraits enzymatiques, protéines ou peptones).

On distingue également les milieux de culture selon leur fonction :

- les **milieux d'isolement** permettant la croissance de plusieurs espèces bactériennes,
- les **milieux d'enrichissement** permettant de favoriser la croissance d'une espèce en faible quantité dans un échantillon,

- les **milieux enrichis** permettant la croissance des bactéries exigeantes,
- les **milieux sélectifs** favorisant la croissance d'un type bactérien particulier tout en inhibant celle des autres types bactériens (exemple des milieux sélectifs pour les bactéries à Gram positif contenant des antibiotiques inhibiteurs des bactéries à Gram négatif).

Ces milieux peuvent se présenter sous forme **liquide** : bouillons de culture en tubes ou en flacons (exemple des flacons d'hémoculture). La croissance bactérienne peut alors être objectivée par un trouble du bouillon après incubation de 2 à 15 jours à 37° C le plus souvent.

Les **milieux solides** sont le plus souvent des milieux gélosés en boîte de Pétri. Après incubation de 24 à 72 heures à 37° C, la croissance bactérienne est objectivée par la mise en évidence de colonies bactériennes à la surface du milieu gélosé. Chaque bactérie présente initialement dans l'échantillon cultivé va donner une colonie.

3. Conditions environnementales et conditions d'analyse

3.1. Conditions environnementales

Plusieurs facteurs environnementaux vont conditionner la croissance bactérienne :

- **Le pH** : certaines bactéries se développent à pH compris entre 6 et 8 : elles sont appelées bactéries neutrophiles (exemple : *Escherichia coli*), d'autres se développeront préférentiellement à pH alcalin (>8) et sont appelées bactéries alcalinophiles (exemple : *Pseudomonas*).

Enfin, la croissance de certaines bactéries dites acidophiles est optimale à pH acide (<6) (exemple : *Lactobacillus*).

- **La pression osmotique** : les bactéries ont une bonne tolérance générale au sel. Certaines bactéries dites halophiles nécessitent du chlorure de sodium (NaCl) pour leur croissance ; d'autres sont dites halotolérantes.

- **La pression mécanique ou hydrostatique** : les bactéries ont une bonne tolérance générale à la pression ; certaines espèces vivants dans les grands fonds marins supportent une pression très importantes et sont dites barophiles.

- **La température** : cinq catégories de bactéries sont différenciées sur la base de leur fourchette de températures de croissance :

- les bactéries mésophiles dont la croissance est possible de 10 à 45°C mais ayant une température optimale de croissance comprise entre 30 et 37°C et parmi lesquelles se trouvent la plupart des bactéries d'intérêt médical,

- les bactéries psychrophiles poussant de -15 à 20°C (optimum : 5-10°C) (exemple : *Listeria monocytogenes*, agent de la listériose, dont la croissance est optimale à la température des réfrigérateurs),

- les bactéries psychrotropes se développant à des températures de -5 à 35°C (optimum : 20-25°C),

- les bactéries thermophiles poussent de 45 à 70°C,

- les bactéries hyperthermophiles pouvant croître à des températures $> 80^{\circ}\text{C}$.

• L'oxygène moléculaire

Les bactéries possèdent des modes respiratoires variés : certaines nécessitent de l'oxygène pour leur croissance alors que, pour d'autres, l'oxygène peut être délétère.

On distingue :

1. Les bactéries **aérobies strictes** (exemple : *Pseudomonas*) nécessitant une teneur en oxygène moléculaire suffisante pour pouvoir se multiplier,
2. Les bactéries **micro-aérophiles** (exemple : *Campylobacter*) se développant uniquement lorsque la teneur en oxygène moléculaire est réduite,
3. Les bactéries **aéro-anaérobies facultatives** (exemple : *Escherichia coli*) dont la croissance n'est pas affectée par la concentration en oxygène moléculaire,
4. Les bactéries **anaérobies strictes** ne se développant qu'en absence d'oxygène (exemple : *Clostridium*).

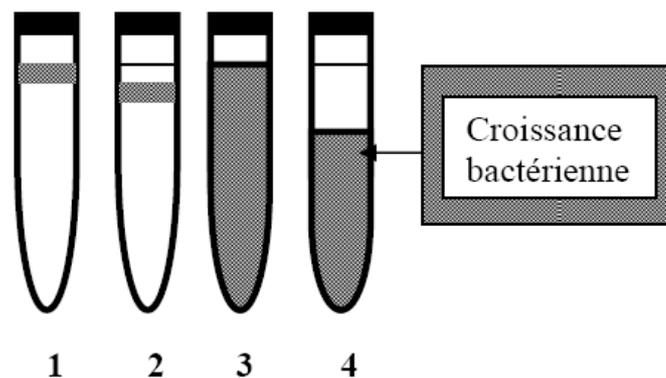


Figure 21. Représentation schématique des différents modes respiratoires dans le monde bactérien.

4. Division bactérienne, délai de croissance et délai des résultats

4.1. Division bactérienne

La croissance bactérienne est un accroissement ordonné et coordonné de tous les composants de la bactérie. Le nombre de bactéries augmente entraînant un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et un enrichissement du milieu en sous-produits du métabolisme.

Les bactéries sont des organismes asexués dont la reproduction a lieu par division cellulaire ou **reproduction binaire** encore appelée **scissiparité**.

La reproduction se fait selon trois phases :

- Allongement de la bactérie,
- Duplication des constituants,

- Séparation

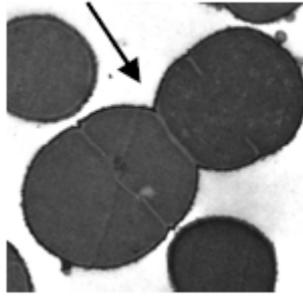


Figure 22. Bactérie en cours de division (la flèche représente la zone de future séparation des deux bactéries néo-formées).

Une bactérie mère va donc engendrer deux bactéries filles identiques qui pourront à leur tour se diviser par scissiparité. L'ensemble des bactéries issues d'une même cellule mère formera une colonie bactérienne.

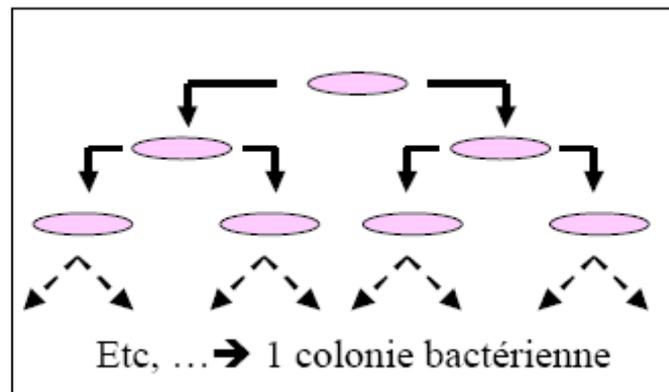


Figure 23. Représentation schématique de la division bactérienne par scissiparité.

4.2. Délais de croissance

Le temps de division et les délais de croissance dépendent de l'espèce bactérienne et des conditions du milieu extérieur (favorables ou défavorables).

5. Phénomène de croissance des bactéries :

L'augmentation de la population microbienne au cours de la croissance résulte de la multiplication qui peut se faire, selon des modes de variable, d'un type de microorganisme à un autre. L'étude de la croissance des bactéries de la corrosion dans un milieu est possible grâce à l'utilisation des techniques d'évaluation et de dénombrement suivant (Scriban- 1993, Boudrant et al.,1994).

5.1. Mesure du nombre de cellules :

5.1.1. Méthodes directes, détermination du nombre de cellules par unité de volume :

5.1.1. Numération directe au microscope optique :

La méthode est utilisée couramment pour les microbes de grandes tailles. Pour cela, on utilise un hématimètre.

Pour les bactéries de plus petites tailles, on utilise des grossissements forts, ce qui réduit la profondeur du champ donc, on utilise une chambre de comptage spéciale dont la profondeur de la cuvette est dix fois plus faible que celle d'un hématimètre. Il y a une autre possibilité pour dénombrer les bactéries de petites tailles, c'est la technique de Breed

5.1.2. Méthodes indirectes, dénombrements après culture :

Le dénombrement des micro-organismes viables après culture est peu utilisé. Il peut s'agir de dénombrement en milieu liquide ou en milieu solide. Dans la plupart des cas, une série de dilution au 10^{ème} de l'échantillon à analyser, est réalisée.

L'avantage est que l'on compte que les cellules vivantes et le principale inconvénient est le temps d'incubation.

La principale méthode parfois utilisée est le dénombrement en milieu solide. Ce type de dénombrement repose sur le principe, que chaque bactérie, après incubation, donne naissance à une colonie repérable macroscopiquement. Cependant, les bactéries ou les levures formant des groupements en suspension ne donneront qu'une seule colonie, c'est pourquoi, on n'exprime pas le résultat en nombre de cellules mais en unité formant colonie (UFC) par unité de volume.

1.2. Mesure de la densité optique :

C'est une méthode basée sur l'atténuation de l'intensité de la lumière transmise I_t à travers le milieu contenant la suspension bactérienne. Pour des faibles teneurs en biomasse C , l'intensité de la lumière transmise est proportionnelle à la concentration microbienne ; Elle se traduit par l'équation suivante :

$$-dI_t / dL = \alpha \cdot I_t \cdot C \quad (1)$$

L : distance parcourue par la lumière

α : Coefficient molaire d'absorption

L'intégration de l'équation (1) permet d'obtenir :

$$\ln I_t / I_0 = \alpha \cdot C \cdot L \quad (2)$$

I_0 est l'intensité de la lumière incidente. Le rapport $100 I_t / I_0$ donne le pourcentage de la transmission "T". L'absorbance "A" correspond à :

$$A = \log_{10} \cdot I/T \quad (3)$$

5. Dynamique de la croissance bactérienne et implication dans le diagnostic bactériologique

5.1. Dynamique de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne est un phénomène dynamique qui comporte six phases représentées schématiquement dans la figure suivante.

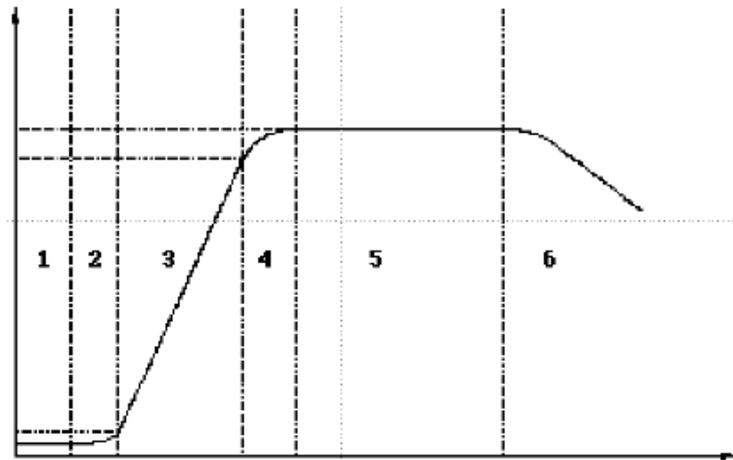


Figure 24. Courbe de croissance bactérienne en milieu liquide adapté non renouvelé (en abscisse figure le temps d'incubation et en ordonnée la valeur logarithmique du nombre de bactéries).

- Phase 1 : **phase de latence** : la croissance est nulle, il y a accoutumance des bactéries à l'environnement,

Il s'agit d'une période d'adaptation du microorganisme au milieu. Au cours de cette période, la cellule bactérienne synthétise les enzymes nécessaires pour métaboliser le substrat présent.

Durant cette phase, il n'y a pas de multiplication cellulaire.

$$X = C^{te} = X_0 \quad (4)$$

X_0 étant la concentration cellulaire au temps $t=0$. La durée de cette étape varie avec l'importance de l'inoculum bactérien, l'âge et l'étape physiologique des cellules que renferme l'inoculum, le type du micro-organisme et la nature du milieu de croissance

Durant cette phase, la vitesse de croissance et la vitesse spécifique de croissance μ sont nulles.

- Phase 2 : **phase d'accélération** avec augmentation de la vitesse de croissance, cette phase correspond au commencement de la multiplication cellulaire. La concentration cellulaire X et la vitesse spécifique de croissance μ augmentent, suite au début de la reproduction cellulaire.

- Phase 3 : **phase de croissance exponentielle** durant laquelle le taux de croissance est maximal,

Quand la vitesse de reproduction cellulaire atteint son maximum, on assiste à une phase exponentielle de croissance ; Elle dure tant que la reproduction dX/dt est constante.

Elle est évaluée par le temps de doublement de la production microbienne ou pas le temps de génération de la bactérie "G". Durant la phase de croissance logarithmique :

La valeur de G prend sa valeur minimale,

La vitesse de croissance dX/dt augmente proportionnellement à X ,

La vitesse spécifique est constante et maximale

En coordonnée semi-logarithmique, une droite : $\log X = f^{et}(t)$ est obtenue :

$$dx/dt \cdot 1/X = \mu_{max} \quad (5)$$

Phase 4 : **phase de ralentissement** : la vitesse de croissance diminue, il y a épuisement des nutriments du milieu de culture et accumulation des déchets. En biochimie, cette inflexion correspond à l'épuisement du milieu de culture. Il n'y a alors disparition de un ou de plusieurs composés nécessaires à la croissance. La concentration X continue d'augmenter, alors que les rapports dX/dt et $dX/dt \cdot 1/X$ diminuent.

- Phase 5 : **phase stationnaire** : il y a un arrêt de la reproduction due à un facteur limitant dans l'environnement, le taux de croissance est nul et le taux de division égale le taux d'autolyse. La concentration cellulaire X atteint son maximum et la croissance s'arrête. Les cellules bactériennes conservent une activité métabolique et leur structure biochimique subit des modifications.

- Phase 6 : **phase de déclin** : les ressources sont épuisées et le nombre de bactéries diminue.

2.2. Les paramètres de la croissance :

2.2.1. Définition :

2.2.1.1. Le temps de génération :

C'est le temps nécessaire au doublement de la population en minutes ou en heures. On définit le nombre de division par :

$$G = \frac{t}{n}$$

Si N_0 = inoculum, alors $N = 2^n \times N_0$.

2.2.1.2. Le taux supérieur de la croissance ou vitesse spécifique de la croissance, μ :

Il correspond à la pente de la phase exponentielle de croissance de la courbe $\ln N = f(t)$.

$$\mu = \frac{(\ln N_2 - \ln N_1)}{(t_2 - t_1)}$$

2.2.1.3. Le taux horaire de la croissance, r :

Parfois, on utilise X pour N .

Si au temps t , Z et si au temps $t + 1$, $X + 1$, alors, $r = (X + 1) / X$.

2.2.2. Détermination des paramètres de la croissance :

2.2.2.1. G :

Graphiquement, on choisit une valeur de $\ln N$ pendant la phase exponentiel et un $\ln N$ du double de ce N . On reporte les deux valeurs sur l'axe des abscisses et on lit directement la valeur de G . Par le calcul, $\mu = \ln 2 / G$.

2.2.2.2. μ :

Graphiquement, $\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$. Par le calcul, $\mu = \ln 2 / G$.

2.2.2.3. Durée de la phase de latence, t_L :

Elle est comprise entre 3 et 4 heures. Comme on n'a pas de valeur intermédiaire pour déterminé le moment précis à partir duquel $\ln N$ commence à augmenter, on procède graphiquement :

- On trace la droite horizontale passant de $\ln 0$.
- On prolonge la phase exponentielle.
- L'abscisse du point d'intersection des deux points donne la durée de la phase de latence.

ANNEXE III

1. Matériel

1.1. Matériel de la boratoire utilisé

1.1.1. Appareillage

- Incubateur à 37°C (Mettler)
- pH mètre (SympHony)
- Balance (KERN 770)
- Four
- Agitateur magnétique muni d'une plaque chauffante (Stuart SB162)
- Autoclave (AVX électronique)
- Etuve (Mettler)
- Hotte bactériologique (TELSTART AV-100)
- Microscope électronique à balayage (ZEISS MC 80 DX)

1.1.2. Verrerie

- Bêchers , fioles, erlen-Mayer de 250 mL, 500 mL et 1000 mL
- Flacon de type pénicilline.
- Entonnoir.
- Tubes à essai.
- Pipettes pasteurs.
- Capsule .

1.1.3. Divers

- Bec bensen.
- Dessicateur .
- Pipettes Pasteur.
- Lames et lamelles.
- Bouchons en polyéthylène.
- Clous et acétone.
- Micropipettes.
- Gants, pince et pissette.
- Bouteille d'azote pourvue de manodétendeur allant jusqu'à 300 bars.
- Seringues de 1 mL, 5 mL et 10 mL.
- Distributeur pour flacon (Socorex).

Analyses chimiques :

1. VOLUMETRIE :

1.1. METHODE COMPLEXOMETRIQUE

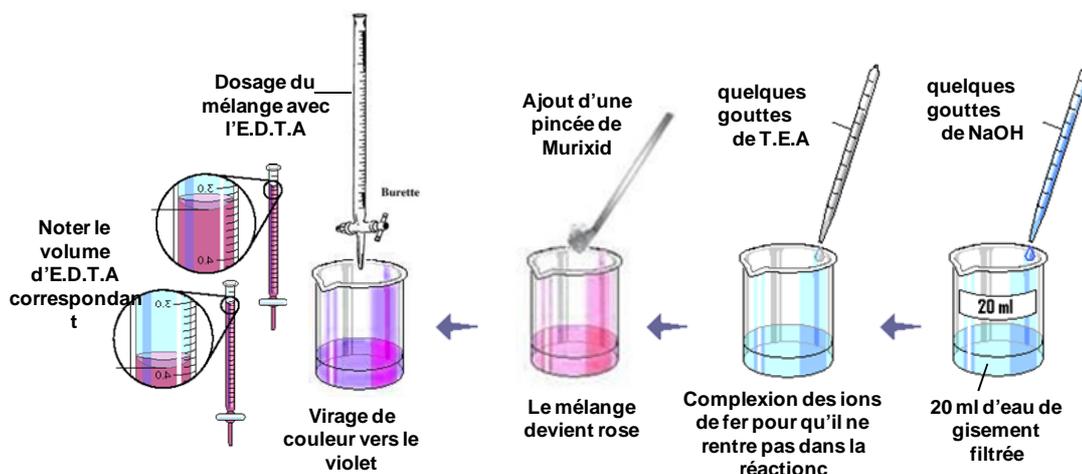
➤ dosage de calcium (Ca^{2+})

→ **Principe : Complexation** du calcium avec E.D.T.A

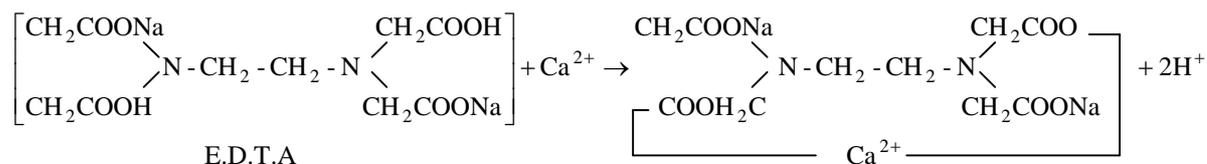
→ **Réactifs :**

- solution d'E.D.T.A (acide éthylène diamine tétracétriqne)
- solution de NaOH
- T.E.A (triéthanolamine)
- Murixid (indicateur coloré)

→ **Mode opératoire :**



→ **Mécanisme de la réaction :**



→ **Expression des résultats :**

$$[\text{Ca}^{2+}] (\text{mg/l}) = \frac{V \cdot N \cdot D \cdot 40,08 \cdot 10^3}{PE}$$

V = volume versé de l'E.D.T.A

N = normalité de l'EDTA à 0.01N

D = la dilution

P.E = prise d'essai

40,08 = masse molaire de Ca^{2+} .

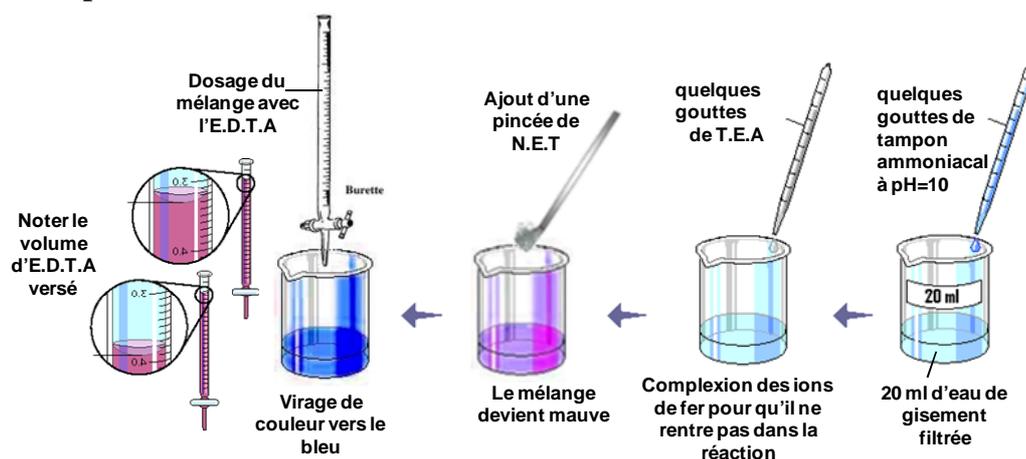
➤ dosage de Magnésium (Mg^{2+})

→ **Principe : Complexation** du Magnésium avec E.D.T.A

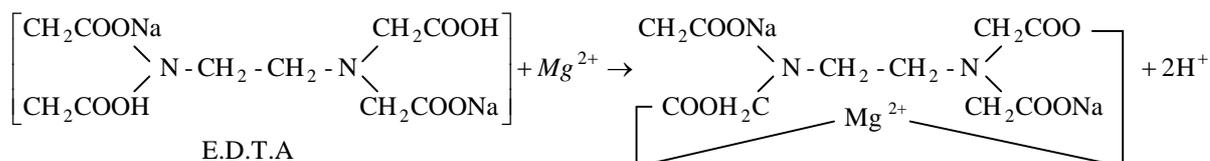
→ **Réactifs**

- solution d'E.D.T.A à 0.01N
- solution de tampon ammoniacal (NH₄Cl + NH₄OH) à pH=10
- T.E.A (triethanolamine)
- Solution N.E.T (noir d'ériochrome)

→ **Mode opératoire :**



→ **Mécanisme de la réaction :**



→ **Expression des résultats :**

$$[Mg^{2+}] (\text{mg/l}) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot N \cdot D \cdot 24,32 \cdot 10^3}{PE}$$

V₁ = volume de l'E.D.T.A versé pour le dosage de Ca²⁺ et Mg²⁺.

V₂ = volume de l'E.D.T.A versé pour le dosage de Ca²⁺.

N = normalité de l'EDTA à 0.01N

D = la dilution

P.E = prise d'essai

24,32 = masse molaire de Mg²⁺.

➔ dosage de fer (Fe²⁺)

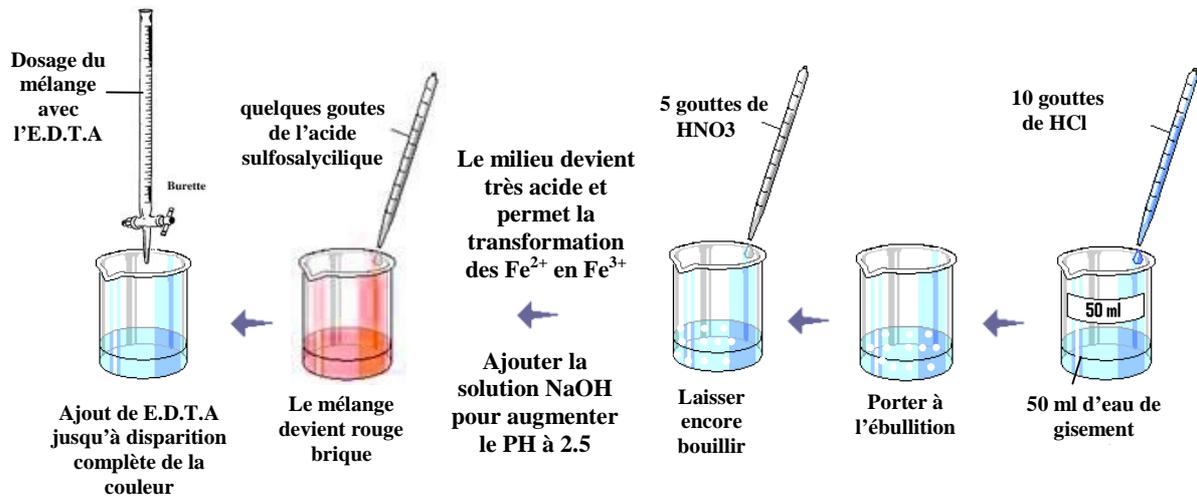
→ **Principe :** Le but derrière ce dosage est **de complexer le fer**, et puisque ce dernier existe sous deux formes (Fe²⁺ et Fe³⁺), il faut avoir une seule forme en oxydant le Fe²⁺ en Fe³⁺ selon la réaction : Fe²⁺ → Fe³⁺ + 1e⁻

→ **Réactifs :**

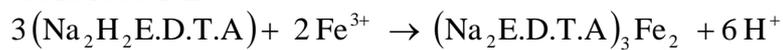
- solution d'E.D.T.A (0.01N)
- Acide chloridrique HCl.
- Acide nitrique HNO₃
- Solution NaOH à 10%

- Acide sulfosalicylique

→ **Mode opératoire :**



→ **Mécanisme de la réaction :**



→ **Expression des résultats :**

$$[\text{Fe}^{2+}] (\text{mg} / \text{l}) = \frac{V.N.D.55,85.10^3}{PE}$$

V = volume versé de l'E.D.T.A

N = normalité de l'EDTA à 0.01N

D = la dilution

P.E = prise d'essai

55,85 = masse molaire de Fe^{2+} .

1.2. METHODE ARGENTIMETRIQUE

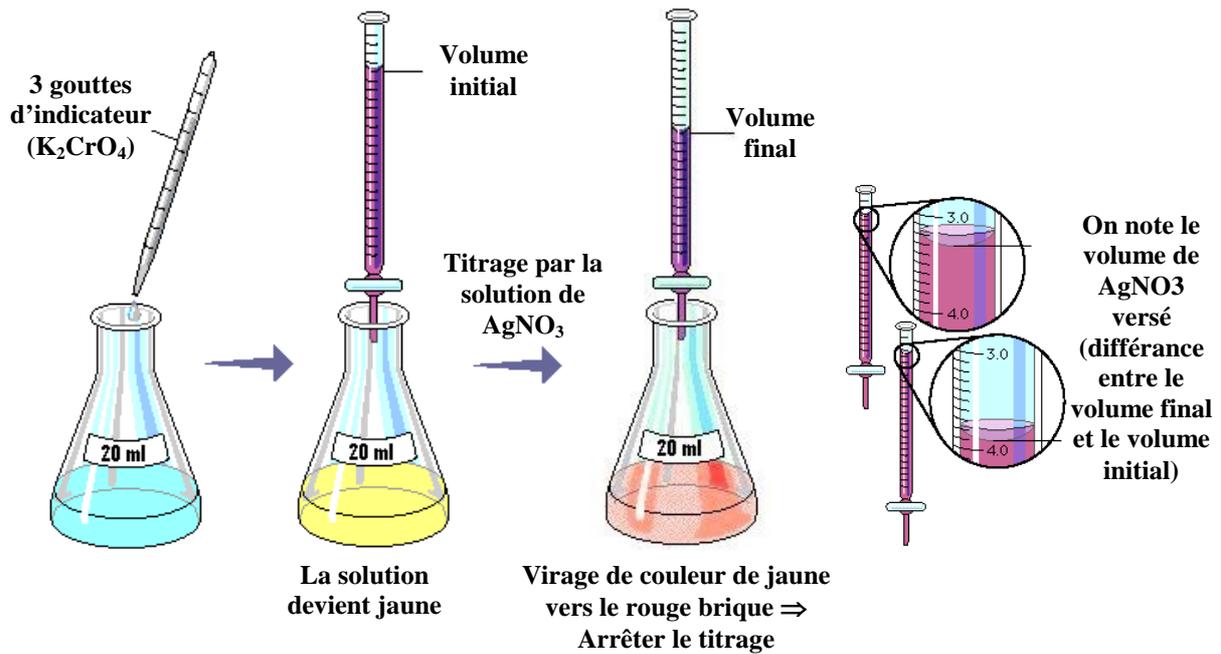
➔ dosage de chlorures (Cl^-)

→ **Principe :** le dosage consiste à former un précipité de l'ion de Ag^+ avec l'ion à doser (Cl^-) en employant comme titrant le nitrate d'argent, le volume dépensé de celui-ci permet de déterminer la concentration de l'échantillon à doser.

→ **Réactifs :**

- Chromate de potassium (K_2CrO_4)
- Nitrate d'argent (AgNO_3).

→ **Mode opératoire :**



→ **Mécanisme de la réaction :**



→ **Expression des résultats :**

$$[\text{Cl}^-] (\text{mg/l}) = \frac{V.N.D.35,457.10^3}{PE}$$

V = volume versé de l'E.D.T.A

N = normalité de AgNO_3 à 0.1N

D = la dilution

P.E = prise d'essai

35,457 = masse molaire de Cl^- .

1.3. METHODE ACIDIMETRIQUE

☉ dosage des carbonates (CO_3^{2-}) et des bicarbonates (HCO_3^-)

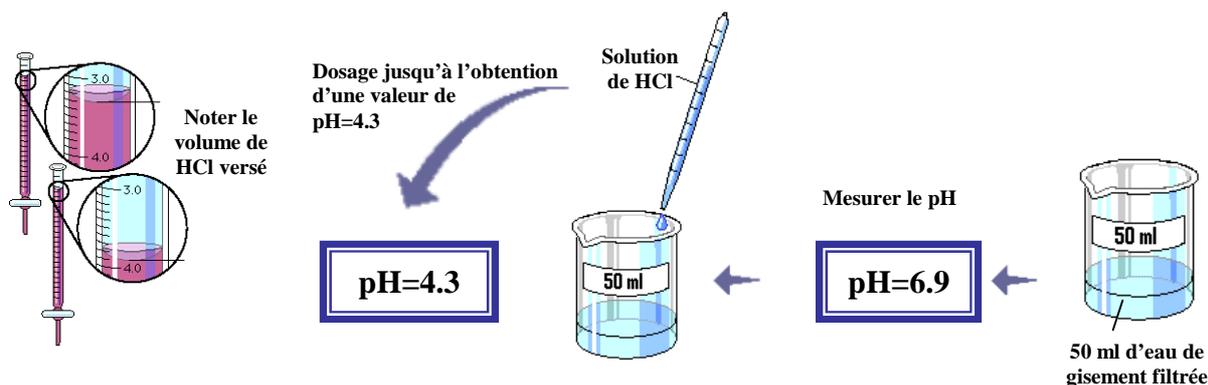
→ **Principe :** le pH de la solution détermine la teneur en carbonates et bicarbonates :

- Si le pH est supérieur à 8.3 : la solution contient les carbonates
- Si le pH est compris entre 4.3 et 8.3 : la solution contient les bicarbonates
- Si le pH est inférieur à 4.3 : la solution ne contient ni les carbonates, ni les bicarbonates.

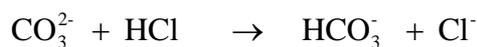
→ **Réactifs :**

- Solution de HCl (0.05N)

→ **Mode opératoire :**



→ **Mécanisme de la réaction :**



→ **Expression des résultats :**

$$[\text{CO}_3^{2-}](\text{mg/l}) = \frac{V.N.60.10^3}{PE}$$

$$[\text{HCO}_3^-](\text{mg/l}) = \frac{V.N.61.10^3}{PE}$$

V = volume versé de l'E.D.T.A

N = normalité de HCl à 0.05N

P.E = prise d'essai

60 = masse molaire de CO_3^{2-} .

61 = masse molaire de HCO_3^- .

2. GRAVIMETRIE :

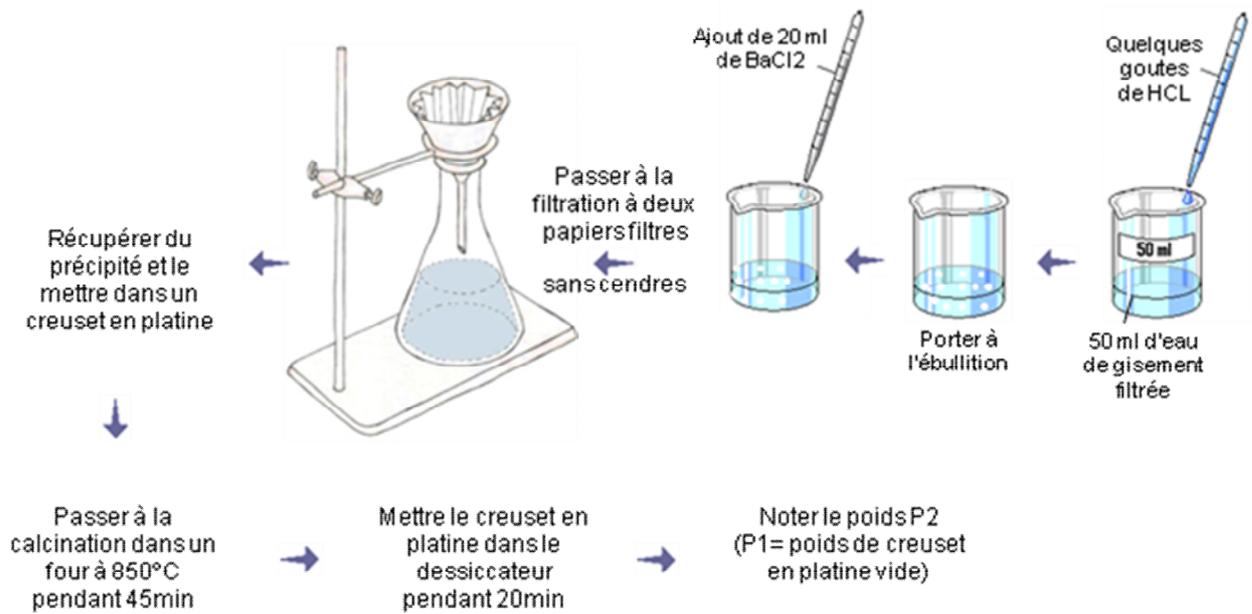
➡ dosage des sulfates (SO_4^{2-})

→ **Principe :** Précipitation des ions sulfates par le BaCl_2 et pesage du précipité de sulfate de baryum ainsi formé.

→ **Réactifs :**

- Solution de HCl
- Solution de BaCl_2 à 20%
- Indicateur coloré (le Heliantine)

→ **Mode opératoire :**



→ **Mécanisme de la réaction :**



→ **Expression des résultats :**

$$[\text{SO}_4^{2-}] (\text{mg/l}) = \frac{(P_1 - P_2) \cdot D \cdot 20,576 \cdot 20}{PE}$$

P₁ = poids du creuset vide + dépôts

P₂ = poids du creuset vide

D = la dilution

P.E = prise d'essai

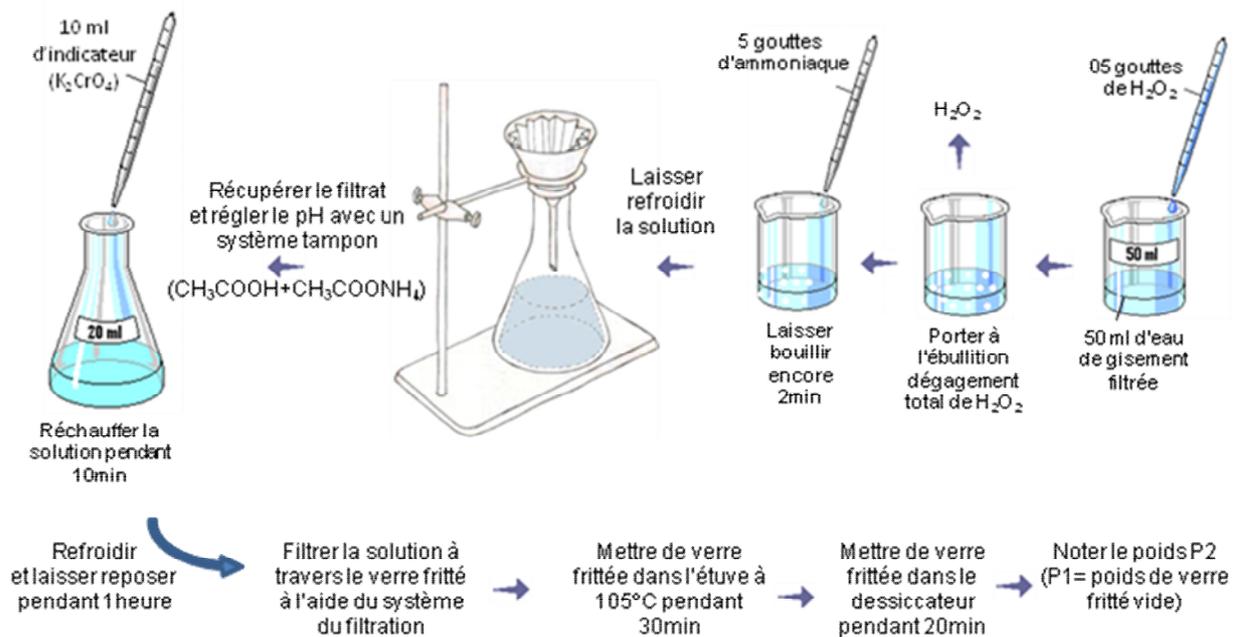
➤ dosage de Baryum (Ba²⁺)

→ **Principe :** La baryum est précipité sous forme de chromate de Baryum et pesé sous cette forme.

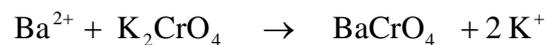
→ **Réactifs :**

- L'eau oxygénée à 30%
- Solution ammoniacale NH₄OH à 30% p.a.
- Solution tampon CH₃COOH à 0,135M + CH₃COONH₄ à 0,1M.
- Chromate de potassium K₂CrO₄ à 10%.

→ **Mode opératoire :**



→ **Mécanisme de la réaction :**



→ **Expression des résultats :**

$$[\text{Ba}^{2+}] (\text{mg/l}) = \frac{(P_1 - P_2) \cdot 542,13 \cdot 10^3}{PE}$$

P_1 = poids du creuset vide + dépôts

P_2 = poids du creuset vide

P.E = prise d'essai

542.13 : le rapport $\frac{\text{masse atomique du Baryum Ba}^{2+}}{\text{masse molaire du BaCrO}_4}$

☛ l'extrait sec

→ **Principe :** Il caractérise la quantité totale des sels dissous, il a pour but de transformer tous les ions présent dans la solution en fluorures non hygroscopiques.

→ **Réactifs :**

- Fluorure de Sodium NaF.

→ **Mode opératoire :**

- On introduit une pincée de naf dans une capsule anti-grimpante qu'on la mit dans l'étuve pendant une heure à 105°C. Après refroidissement dans le desiccateur on pèse la capsule et on note P1.
- Ensuite on itroduit une prise d'essai de 10ml d'eau à analyser dans la capsule précédante et on remet à l'étuve jusqu'à évaporistion totale de l'eau, on pèse pour déterminer le poids P2.

→ **Expression des résultats :**

$$\text{La teneur en extrait sec (mg/l)} = \frac{dP \cdot D \cdot 1000}{PE}$$

dP = La différence de poids (P₁ - P₂)

D = la dilution

P.E = prise d'essai

$$\text{La teneur en extrait sec} = \frac{(64,028 - 64,023) \cdot 100 \cdot 1000}{10} = 50 \text{ mg/l}$$

3. PHOTOMETRIE DE FLAMME :

☛ dosage de Sodium et de Potassium

→ **Principe :** Mesurer l'intensité de différentes concentrations de la solution de sodium et de potassium à l'aide d'un spectrophotomètre de flamme, puis tracer les courbes d'étalonnage afin de déduire la concentration inconnue en sodium et potassium de l'eau à analyser à partir de la courbe d'étalonnage $C = f(DO)$.

Résumé

Ce mémoire fait le point sur les connaissances concernant l'implication des bactéries sulfurogènes dans la corrosion des aciers au carbone. Après la description de quelques cas récents tirés de l'industrie pétrolière, la physiologie des bactéries sulfurogènes qui jouent le rôle principal dans le mécanisme de la corrosion anaérobie d'origine bactérienne est examinée. La participation des bactéries productrices d' H_2S à la constitution de biofilms est une condition importante à la manifestation des phénomènes de corrosion.

L'accent a été mis sur l'optimisation des milieux de cultures des bactéries sulfurogènes isolées à partir de l'eau d'injection provenant du champ STA. Le milieu Postgate est par excellence le milieu le plus adapté à être utilisé par le laboratoire de corrosion de CRD lors d'une étude caractéristique des BSR.

La caractérisation du consortium sulfurogène a montré la présence d'un polymorphisme cellulaire très diversifiée, ceci indique la richesse de l'eau d'injection de STA en flore sulfurogène.

Mots clés : Biocorrosion, bactéries sulfato-réductrices (BSR), acier au carbone, biofilm.

التلخيص

عملنا هذا يتمثل في التعرف على فهم ظاهرة التآكل البكتيري. بعد التطرق إلى بعض الحالات الجديدة الم من الصناعة البتروكيميائية، ركزنا على دراسة قدرة التآكل للبكتيريا المختزلة للسلفات بواسطة تقنية ميكروبيولوجية. إن الدور الذي تلعبه البكتيريا المنتجة لـ H_2S في تشكل البيوفيلم يعتبر من أهم الأسباب المؤدية لظاهرة التآكل.

في التجارب التي قمنا بها، ركزنا اهتمامنا على تحسين وسط النمو الأنسب لتكاثر هذا النوع من البكتيريا التي تم عزلها من مياه الضخ التابعة لحقل STA. هذا ما سمح لنا باستنتاج يبين أن الوسط Postgate يعتبر الأنسب للاستعمال في مخبر التآكل التابع لمركز البحث والتطوير عند دراسة خصائص هذه البكتيريا.

إن دراسة خصائص أظهرت وجود تنوع واضح في أشكال البكتيريا، ما يؤكد أن مياه الضخ التابعة لحقل STA غنية بالبكتيريا المختزلة للسلفات.

الكلمات الرئيسية: التآكل البكتيري، البكتيريا المختزلة للسلفات، حديد كربوني، بيوفيلم.

Summary

The involvement of sulfidogenic bacteria in the corrosion of carbon steel is reviewed. After a brief description of some recent cases drawn from the petroleum industry, the physiology of the sulfidogenic bacteria which plays the most important role in the mechanism of anaerobic bacterial corrosion is examined. The involvement of H_2S -producing bacteria to the biofilm formation is a prerequisite for biocorrosion.

The focus was on optimizing culture media sulfurogenes bacteria isolated from the injection water from the field STA. The medium Postgate is par excellence the medium best suited to be used by the laboratory corrosion CRD in a study characteristic of BSR.

Characterization sulfurogène consortium showed the presence of a polymorphism diverse cell, this indicates the richness of the water injection plant in STA sulfurogène.

Keywords: Biocorrosion, sulfate-reducing bacteria (SRB), carbon steel, biofilm