

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
DEPARTEMENT GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

PROJET DE FIN D'ETUDE

EN VUE D'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT EN GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

المدرسة الوطنية المتعددة التخصصات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

THEME

ETUDE DES BACTERIES RESPONSABLES DE
LA BIODEGRADATION DES MATERIAUX

Proposée par :

M^{elle} : D.Zoughlache

Dirigé par :

M^{elle} : D.Zoughlache

M^{me} : S.Bedjaoui

Présenté par :

M^{elle} : Abdelli Mounia

Promotion 2000

E.N.P 10, Avenue Hassen Badi El Harrach-Alger



Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents dont le calme, la compréhension et la tendresse ont toujours été mon meilleurs recours

Mes chers frères et sœurs

Toute ma famille: ma grand-mère , mes neveux et mes nièces

Ma meilleure amie Salima

Mes amis: Sarah, Salim, Wassila, Isma, Kader, Radia, Nadjiba et tout ceux nombreux que je ne peux mentionner

Remerciements



Je tiens à remercier vivement et à exprimer ma reconnaissance à M^{elle} D.Zoughlache pour avoir proposé et encadré ce travail.

J'adresse également mes remerciements à M^{me} S.Bedjaoui pour son soutien, sa gentillesse et l'aide efficace et éclairée qui ont permis la réalisation de ce travail.

J'exprime également ma profonde gratitude et ma reconnaissance à M^r M.BOUNOUGHAS chef de département corrosion au C.R.D, Sonatrach pour m'avoir accepté au sein de sa structure.

Je tiens à remercier chaleureusement M^r A. GANA pour son aide et sa disponibilité.

Ainsi que M^{elle} D.Dih et M^{me} D.Oumensour pour leur conseils et leur compréhension.

Je remercie l'ensemble des membres du jury : M^{elle} D.Arrar , M^{me} N.Abdi, M^{me} D.Mameri, M^r H.Grib d'avoir accepté de juger ce travail

Je remercie tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

Je remercie enfin tout le personnel du département corrosion C.R.D , Sonatrach.

Liste des figures par chapitre.



Chapitre 1

Fig 1: Schéma de la structure bactérienne.

Fig 2: Structure de l'enveloppe bactérienne des bactéries Gram⁺ et Gram⁻

Fig 3: Courbe de croissance bactérienne.

Chapitre 2

Fig 4: Cellules d'aération différentielle sous un biofilm avec ou sans zone anaérobie.

Fig 5: Principe d'une réduction bactérienne des sulfates (SO_4^{2-}) par les bactéries sulfato-réductrices.

Chapitre 3

Fig 6: Ensemble de processus de corrosion à l'intérieur Des conduites en métal ferreux.

Planche 1: Mécanisme de la réduction des sulfates en sulfures chez les bactéries sulfato-réductrices.

Fig 7: Mécanisme d'oxydation et de précipitation du fer et du manganèse en présence des ferro-bactéries.

Chapitre 5

Photo n°1: photo montrant une culture des bactéries méthanigènes.

Photo n°2: photo montrant une culture des Pseudomonas.

Photo n°3: photo montrant une culture des Gallionella.

Photo n°4: photo montrant une culture des Leptothrix.

Liste des tableaux par chapitre

chapitre I

Tableau 1: Les deux règnes des procaryotes

Tableau 2: Tableau représentant les différents métabolismes énergétiques chez les bactéries

Tableau 3: Tableau représentant les différents métabolismes carbonés chez les bactéries

Tableau 4: Les facteurs physiques affectant la croissance bactérienne

Chapitre IV

Tableau 5: Condition d'incubation des bactéries isolées

Chapitre V

Tableau 6: Résultats de l'analyse chimique des eaux d'injection provenant des quatre régions étudiées

Tableau 7: Résultat du dénombrement des groupes bactériens présents dans les échantillons d'eau provenant de la région In-Aménas

Tableau 8: Résultat du dénombrement des groupes bactériens présents dans les échantillons d'eau provenant de la région de Ohanet

Tableau 9: Résultat du dénombrement des groupes bactériens présents dans les échantillons d'eau provenant de la région de T.F.T

Tableau 10: Résultat du dénombrement des groupes bactériens présents dans les échantillons d'eau provenant de la région de Stah

Tableau 11: Résultat du dénombrement des bactéries isolées à partir des quatre la régions

Tableau 12: Caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries sulfato-réductrices isolées à partir des différents échantillons de la région de In-Aménas

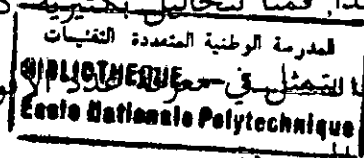
Tableau 13: Caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries sulfato-réductrices isolées à partir es différents échantillons de la région de Ohanet

Tableau 14: Caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries sulfato-réductrices isolées à partir des différents échantillons de la région de T.F.T

Tableau 15: Caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries sulfato-réductrices isolées à partir des différents échantillons de la région de Stah

- Tableau 16:** Caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries méthanigènes isolées à partir des différents échantillons de la région de In-Aménas
- Tableau 17:** Caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries méthanigènes isolées à partir des différents échantillons de la région de Ohanet
- Tableau 18:** Caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries méthanigènes isolées à partir des différents échantillons de la région de T.F.T et Stah
- Tableau 19:** Caractérisations macroscopiques et microscopiques des Pseudomonas isolées à partir des différents échantillons de la région de In-Aménas
- Tableau 20:** Caractérisations macroscopiques et microscopiques des Pseudomonas isolées à partir des différents échantillons de la région de TFT et Stah
- Tableau 21:** Caractérisations macroscopiques et microscopiques des Gallionella isolées à partir des différents échantillons de la région de In-Aménas
- Tableau 22:** Caractérisations macroscopiques et microscopiques des Gallionella isolées à partir des différentes échantillons de Ohanet, T.F.T et Stah
- Tableau 23:** Caractérisations macroscopiques et microscopiques des Leptothrix isolées à partir des différents échantillons
- Tableau 24:** Caractérisations macroscopiques et microscopiques des Thiobacillus isolées à partir des différents échantillons
- Tableau 25:** Caractérisations macroscopiques: et microscopiques des B S.R incubées à 60°C
- Tableau 26:** Résultats du test de la recherche de la catalase et de l'oxydase
- Tableau 26 :** : Caractérisations macroscopiques: et microscopiques des Gallionella isolées à partir des différents de la région de T.F.T

في عملنا هذا، قمنا بتحليل بكتيرية كمية و نوعية لمياه مستعملة في ميدان الصناعة البترولية. الجزء الأول التمثيل في مجموعة الأبحاث التي تشمل الأبحاث التي أجريتها في مختلف العينات الموجودة.



في الجزء الثاني قمنا بالتعرف على هذه البكتيريات من خلال مجموعة من الاختيارات الجهرية و المجهرية.

العينات المستعملة أوخذت من مناطق مختلفة. و النتائج المتحصل عليها برهنت على وجود شعبية متعددة من البكتيريات و التعداد سمح لنا بتقدير تركيز هذه البكتيريات في العينات المؤخودة. و فيما بعد بمقارنة عدد هذه البكتيريات في المناطق المدروسة.

Résumé :

Au cours de ce travail , nous nous sommes intéressés à l'analyse Bactériologique qualitative et quantitative des eaux utilisées dans l'industrie pétrolière. La première partie a porté sur le dénombrement des groupes bactériens responsables de la corrosion, présents dans les différents échantillons. Dans la deuxième partie nous avons effectué une identification des bactéries pas dans une caractérisation macroscopique et microscopique. Les échantillons d'eau ont été prélevés de différentes régions, les résultats obtenus ont montrés la présence d'une population bactérienne hétérogène, et le dénombrement nous a permis d'évaluer les concentrations bactériennes dans les différents points de prélèvements et par la suite de les comparer entre les quatre régions étudiées .

Abstract

In this work, we are interested by the quantitative and qualitative bactériological analysis of water in the petrolium industry. In the first part, we were dealing with the bacterial group count, present, in the different samples, wich are responsible of the corrosion. In the second part we carried out the bactéria indentifacation by macroscopic and microscopic characterization. The water samples were collected from different locations and the obtained results of the analysis showed the presence of heteregenous bacterial population. The population count, permitted us to determins the bacterial concentration present in the collected samples from the four regions and to proced to a comparision between the differents results.

Mots clés :

**Corrosion, Coorrosion bactérienne, Bactéries sulfato réductrices,
Bactéries méthanigènes, Pseudomonas, Gallionella, Leptothrix,
Thiobacillus.**

SOMMAIRE



INTRODUCTION.....(1)

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I / Généralités sur le monde microbien.....(3)

I-1 Définition d'une taxonomie.....(3)

I-2 La cellule bactérienne.....(4)

I-2-1 Définition.....(4)

I-2-2 Morphologie et principales caractéristiques cellulaires.....(4)

I-3 Les bactéries et leurs écosystèmes.....(5)

I-3-1 Les bases nutritionnelles.....(6)

I-3-1-1 Le métabolisme énergétique.....(6)

I-3-1-2 Le métabolisme carboné.....(7)

I-4 La croissance bactérienne.....(7)

I-4-1 Mesure de la croissance.....(8)

I-4-2 Les Paramètres de la croissance.....(8)

I-4-3 La courbe de croissance.....(10)

I-5 Les facteurs physico-chimiques influençant la croissance bactérienne.....(10)

I-5-1 Influence de la température.....(10)

I-5-2 Influence du pH.....(10)

I-5-3 Influence de l'oxygène.....(10)

I-5-4 Influence de la salinité.....(10)

Chapitre II / La corrosion bactérienne

II-1 Définition de la corrosion.....(12)

II-2 Rappels théoriques sur la corrosion bactérienne.....(12)

II-3 Influence des bactéries corrosives.....(12)

II-4 Influence des constituants du milieu.....(13)

II-5 Mécanismes de la corrosion bactérienne.....(14)

II-5-1 Production de substances corrosives.....(14)

II-5-2 Formation de cellules d'aération différentielle.....(14)

II-5-3 Dépolarisation cathodique.....(15)

Chapitre III / Les bactéries responsables de la biodégradation des matériaux.....(17)



III-1 Les bactéries anaérobies strictes.....	(18)
III-1-1 Les bactéries sulfato-reductrices.....	(18)
III-1-1-1 Définition.....	(18)
III-1-1-2 Métabolisme des B.S.R.....	(19)
III-1-1-3 Mécanisme des réduction des sulfates.....	(20)
III-1-2 Les bactéries méthanigènes.....	(22)
III-1-2-1 Définition.....	(22)
III-1-2-2 Mécanismes réactionnels.....	(22)
III-2 Les bactéries aérobies strictes.....	(23)
III-2-1 Les bactéries oxydant le soufre.....	(23)
III-2-1-2 Les Thiobacillus.....	(23)
III-2-2 Les bactéries du fer et du manganèse.....	(24)
III-2-2-1 Les Gallionella.....	(25)
III-2-2-2 Les Leptothrix.....	(25)
III-2-3 Les Pseudomonas.....	(26)
III-2-3-1 Définition.....	(26)
III-2-3-2 Action des Pseudomonas.....	(26)

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre IV / Matériels et méthodes

IV-1 Présentation des stations de prélèvement.....	(28)
IV-2 Analyses physico-chimiques des échantillons.....	(29)
IV-3 Analyses microbiologistes des échantillons.....	(30)
IV-3-1 Matériels.....	(30)
IV-3-1-1 Verreries et appareillages utilisés.....	(32)
IV-3-1-2 Milieux de cultures et réactifs.....	(33)
IV-3-2 Méthodes.....	(33)
IV-3-2-1 Préparation de milieux de culture.....	(34)
IV-3-2-2 Culture et dénombrement bactérien.....	(34)
IV-3-2-3 Caractérisations macroscopiques.....	(35)
IV-3-2-4 Caractérisations microscopiques.....	(35)
IV-3-2-5 Conservation des souches isolées.....	(36)
IV-3-2-6 Etude du type respiratoire.....	(36)
IV-3-2-6-1 Tests pour la recherche de la catalase.....	(36)
IV-3-2-6-2 Tests pour la recherche de l'oxydase.....	(37)

Chapitre V / Résultats et discussions

V-1-Influence de la composition chimique des eaux d'injection.....	(38)
V-2-Evaluation de la flore microbienne des échantillons.....	(38)
V-2-1-Dénombrement des espèces bactériennes rencontrées dans la région de In-Aménas.....	(42)
V-2-2-Dénombrement des espèces bactériennes rencontrées dans la région de Ohanet.....	(42)

V-2-3 Dénombrement des espèces bactériennes rencontrées dans la région de T.F.T.....	(45)
V-2-4 Dénombrement des espèces bactériennes rencontrées dans la région de Stah.....	(47)
V-2-5 Evaluation de la population bactérienne totale dans les quatre régions.....	(49)
V-3 Identification bactériologique des souches isolées.....	(51)
V-3-1 Mise en évidence des bactéries sulfatoréductrices (BSR)	(53)
V-3-2 Mise en évidence des bactéries méthanigènes.....	(56)
V-3-3 Mise en évidence des Pseudomonas.....	(58)
V-3-4 Mise en évidence des Gallionella.....	(63)
V-3-5 Mise en évidence des Leptothrix.....	(64)
V-3-6 Mise en évidence des Thiobacillus.....	(65)
V-3-7 Mise en évidence des B.S.R à 60°C.....	(67)
CONCLUSION.....	(68)



BIBLIOGRAPHIE

ANNEXE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
المكتبة — BIBLIOTHEQUE
Ecole Nationale Polytechnique

PARTIE THEORIQUE

Introduction

Longtemps sous estimée, il apparaît aujourd'hui que la corrosion est responsable de la dégradation de nombreuses structures métalliques dans le monde. Toutefois, cette corrosion est sous différentes formes : corrosion électrochimique et corrosion bactérienne, faisant intervenir des micro-organismes tels que les bactéries, les levures et les champignons, cette dernière a donné naissance à la biocorrosion qui a des répercussions économiques notables dans toute l'industrie.

Très tôt, dès la production et la commercialisation du pétrole il y a de cela 140 ans environ l'industrie pétrolière fait face aux problèmes causés par les microorganismes.

Les bactéries sulfato-réductrices sont principalement reconnues comme étant des agents responsables de la corrosion, avec production de H_2S , ayant aussi des effets néfastes sur la qualité du pétrole, sur les canalisations, ainsi que sur la santé des ouvriers, dus à la haute toxicité

Des secteurs comme la construction navale, le génie civil ont eux aussi à déplorer des surcoûts importants, dus aux dommages causés par la corrosion microbienne. On estime que 10 % environ de la corrosion totale est sans doute sous influence microbienne. [1].

Un gisement de pétrole ne produit pas que de l'huile. Il produit également de l'eau et du gaz. Ces eaux de production ont des compositions et des salinités très diverses (de 0 à 300 g/l). Toutefois, elles sont toutes naturellement désaérées et plus ou moins acidifiées par la dissolution de CO_2 , le cas échéant de H_2S .

Pour maintenir le plus longtemps possible la pression des gisements, les volumes extraits sont compensés par une injection de volumes équivalents d'eau. Cette eau est extraite des puits producteurs, puis une fois acheminée jusqu'au centre d'injection d'eau, sera injectée dans le gisement par les puits injecteurs.

L'eau ainsi injectée est acheminée dans des canalisations en acier. Il arrive très souvent que cette eau soit chargée d'impuretés et fortement contaminée par des micro-organismes. Ces derniers, au cours de leurs métabolismes vont sécréter des substances corrosives pour le métal.

C'est ainsi que dans un souci de remédier aux endommagements causés par la corrosion , et de préserver les installations pétrolières, nous nous sommes intéressés à la taxonomie des bactéries responsables de la dégradation des matériaux, qui a pour but la caractérisation des bactéries responsables de la corrosion, et qui nous permettra du point de vue quantitatif d'évaluer la biomasse bactérienne, et du point de vue qualitatif de mettre en évidence la biodiversité de ces écosystèmes.

Pour ce faire, une étude bactériologique a été effectuée sur des échantillons d'eau provenant de différents puits : il s'agit d'une eau prélevée d'un puits injecteur ou du centre principal d'injection, d'une eau de décantation des bacs de stockage, et d'une eau produite avec le brut. Le présente étude porte sur la mise en évidence de certaines bactéries présentes dans l'eau et qui seraient responsables de la dégradation des matériaux, sur leurs dénombrements, et sur leurs caractérisations bactériologiques.

L'étude a été réalisée au laboratoire du Centre de Recherche et Développement de Sonatrach (CRD/SH), en collaboration avec l'Ecole Nationale Polytechnique d'El Harrach- Alger.

Les échantillons d'eau proviennent de quatre Directions Régionales de Sonatrach à savoir :

- Direction Régionale d' Alrar-Stah
- Direction Régionale de In Aménas
- Direction Régionale de Tin-Fouye-Tabankort
- Direction Régionale de Ohanet

CHAPITRE I

I / Généralités sur le monde microbien.

La division du monde vivant entre le règne animal et le règne végétal est une notion qui nous est à tous familière. A la fin des années 70, une autre classification dichotomique était en usage, basée sur la présence ou l'absence d'une structure moléculaire caractéristique: le noyau, chez les Procaryotes, regroupant toutes les bactéries et chez les Eucaryotes regroupant les protozoaires, les levures, les champignons, les végétaux supérieurs et les animaux [1]

Les bactéries au sens le plus commun du terme, se répartissent en deux règnes: les Archaeobactéries qui sont principalement représentées par les bactéries méthanigènes et les bactéries dites extrémophiles (halophiles et thermophiles extrêmes), et les Eubactéries regroupant les bactéries sulfato-réductrices, les bactéries pathogènes, etc.

Tableau 1: Tableau représentant les deux règnes chez les Procaryotes [1].

PROCARYOTES	Eubactéries	La plupart des bactéries classiques (bactéries sulfato-réductrices, bactéries pathogènes, etc.).
	Archaeobactéries	- Méthanigènes - Thermophiles extrêmes - Halophiles

I-1- Définition d'une taxonomie:

La taxonomie ou taxinomie définit comme étant la science de la classification biologique elle comprend trois parties:

- La classification: est l'arrangement des microorganismes en groupe selon leur similitude.
- La nomenclature: qui attribue un nom à chacun de ces groupes.
- L'identification: qui consiste à déterminer un isolat particulier qui appartient à un taxon connu[1].

◆ Les rangs taxonomiques:

Le rang le plus important dans la hiérarchie taxonomique est l'espèce qui est un ensemble de souches qui ont en commun de nombreux caractères stables et différentes de façon spécifique des autres groupes de souches.

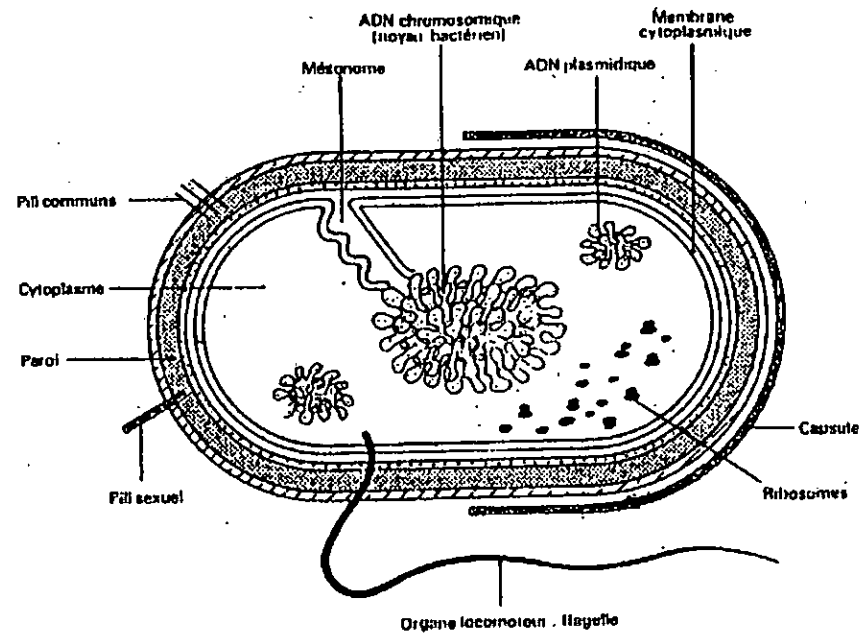


Figure 1 : Schéma de la structure bactérienne [4]

-une souche est une population de microorganismes issue d'un microorganisme unique ou d'un isolat de culture pure.

Les espèces apparentées sont classées en un genre.

I-2- La cellule des bactéries

I-2-1- Définition:

Une bactérie est un micro-organisme Procaryote , unicellulaire et dépourvu de noyau. On distingue deux grandes catégories morphologiques: les bacilles en forme de bâtonnet, et les coques (cocci) de forme sphérique . Leurs longueurs varient de 0,5 à 10 μm en moyenne, mais il existe des bactéries filamenteuses qui peuvent mesurer plusieurs dizaines de micromètres [3].

I-2-2- Morphologie et principales caractéristiques cellulaire

La structure de la cellule bactérienne peut être schématiquement décrite par trois unités de base [1](Fig 1)

- **Le cytoplasme:** c'est le milieu interne de la cellule et le siège de toutes les fonctions vitales, il contient le matériel génétique (ADN) et les enzymes nécessaires au déroulement des processus métaboliques et la synthèse des constituants structuraux [1].

- **La membrane cytoplasmique :** Le cytoplasme est isolé du milieu extérieur par la membrane cytoplasmique , épaisse de 8 nm environ et composée de deux feuillettes de nature lipidique, elle est le siège des échanges avec le milieu extérieur par transport actif des métabolites (nutriments et produits du métabolisme) et des ions.

La membrane cytoplasmique contient de nombreuses enzymes (protéines) assurant des fonctions telles que la fonction respiratoire [1].

-**La paroi :** La paroi est l'enveloppe externe de la bactérie, sa grande rigidité assure l'intégrité structurale de la cellule, elle est composée d'un polymère de sucres aminés liés par de courtes chaînes d'acides aminés.

De nombreuses bactéries sont entourées d'une enveloppe appelée capsule, qui peut atteindre plusieurs microns, elle est constituée de polysaccharides qui jouent un rôle important dans les propriétés d'adhésion des bactéries et dans la formation des biofilms.[1]

La structure de la paroi détermine deux grands groupes, les bactéries **Gram-positif** et les bactéries **Gram-négatif** , au nom d'une coloration spécifique : la coloration de Gram.

Les bactéries Gram-positif ont une paroi épaisse (20 à 80 nm) composée de 50% d'acide teichoïque en plus de la muréine.

Les bactéries Gram-négatif ont une paroi plus fine (10 à 15 nm) constituée de muréine pure. Elles se distinguent surtout des précédentes par la présence d'une seconde membrane, la membrane externe. L'espace situé entre les deux membranes, où se trouve la paroi, est appelé espace périplasmique, il est le siège de certaines réactions métaboliques (Fig 2).

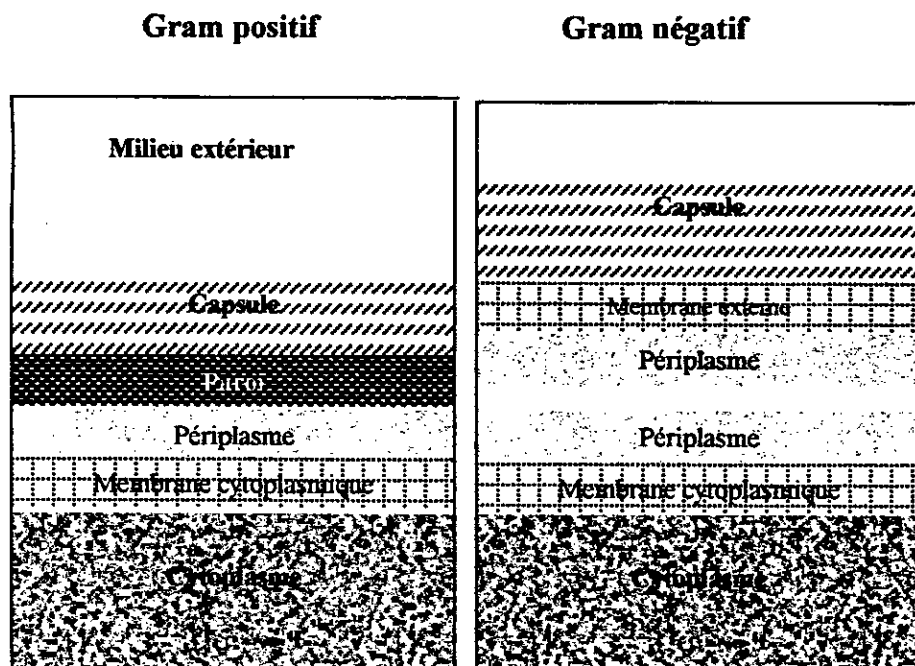


Figure 2 : Structure de l'enveloppe bactérienne chez les bactéries Gram⁺ et Gram⁻

Les cellules de certaines bactéries (*Clostridium*, *Desulfotomaculum*) se différencient en une structure appelée **spore** qu'elles utilisent lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables à leur croissance (chaleur, dessiccation).

De nombreuses bactéries possèdent, au niveau de leur enveloppe externe, un ou plusieurs appendices appelés **flagelles**, ils sont les organes locomoteurs des bactéries mobiles, en plus, le cytoplasme en général très homogène contient essentiellement des granulations d'acide ribonucléiques, les ribosomes et parfois des substances de réserve [1].

I-3 - Les bactéries et leurs écosystèmes:

Lorsque l'on étudie la population microbienne d'un échantillon provenant d'un site naturel, sol, eau, sédiments, on y trouve le plus souvent un assortiment très riche de micro-organismes différents, ils décomposent activement les matières organiques et minérales participant ainsi aux grands cycles naturels du carbone, de l'azote et du soufre [4].

I-3-1-Les bases nutritionnelles

Le métabolisme peut être défini comme l'ensemble des réactions biochimiques qu'un organisme peut accomplir: dégradations, synthèses et transformations de molécules chimiques en présence de catalyseurs biologiques d'enzymes. Ces réactions nécessitent de l'énergie [5], on distingue de ce fait deux types de métabolismes:

I-3-1-1 Le métabolisme énergétique

Les bactéries puisent leur énergie de la lumière ou de réactions chimiques. Cette énergie est stockée et transportée dans la cellule sous deux formes :

- Elle est utilisée pour la synthèse d'adénosine-5-triphosphate (ATP) permettant à la cellule de gérer ses besoins énergétiques.
- L'énergie peut aussi être stockée sous forme de «pouvoir réducteur» dans des molécules qui peuvent recevoir des électrons d'intermédiaires métaboliques. [1]

On distingue deux types trophiques selon la source primaire d'énergie utilisée par les bactéries (Tableau 2).

◆ Les bactéries **phototrophes** utilisent l'énergie lumineuse par l'intermédiaire de pigments chlorophylliens, pour la synthèse d'ATP couplée à l'apparition d'un pouvoir réducteur.

◆ Les bactéries **chimiotrophes** utilisent une énergie d'origine chimique (respiration, fermentation)

Tableau 2: Tableau représentant les différents métabolismes énergétiques chez les bactéries [1]

Types trophiques	Sous types	Sources d'énergie	Donneurs d'électrons	Accepteurs d'électrons
phototrophie	photolithotrophie	lumière	minéral	
	photoorganotrophie	lumière	organique	
chimiotrophie	chimiolithotrophie	chimique	minéral	minéral
	chimioorganotrophie	chimique	organique	minéral (respiration)
		chimique	organique	organique (fermentation)

I-3-1-2 Le métabolisme carboné

Les bactéries utilisent différentes sources de carbone pour pourvoir à leurs besoins en carbone cellulaire (Tableau 3)

Le métabolisme énergétique et le métabolisme carbonés sont en pratique très liés puisque souvent la source d'énergie est aussi la source de carbone cellulaire[1].

Tableau 3 : Tableau représentant les différents métabolismes carbonés chez les bactéries.[1].

Type trophique	Sous type	Source de carbone
Autotrophie	Autotrophie stricte	CO ₂
	Autotrophie facultative	CO ₂ ou carbone organique
Hétérotrophie	Prot ophie	Une seule source de carbone organique
	Auxotrophie	Une source de carbone organique et facteurs de croissance

I-4 La croissance bactérienne

La croissance chez les bactéries aboutit à une augmentation du nombre d'individus. Cet accroissement est donc synonyme de multiplication et parallèlement il se produit un appauvrissement du milieu en substrats catabolisables et un enrichissement en divers métabolites. [6]

I-4-1 Mesure de la croissance

Les techniques de mesure de la croissance sont fondées sur l'évaluation du nombre de bactéries ou de leur masse par unité de volume ou de poids du milieu.

La technique la plus habituelle est la culture en boîte de pétri, un volume fixe de la suspension est étalé à la surface d'un milieu gélosé, après incubation à une température optimale de croissance , le nombre de colonies apparues correspond au nombre de cellules bactériennes présentes [4] .

I-4-2 Les paramètres de la croissance

La croissance d'une bactérie placée dans des conditions idéales de culture peut être définie par deux constantes., Le temps de génération et le taux de croissance , les mesures sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre [7] .

i-Le temps de génération

C'est l'intervalle de temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire au doublement de la population, il n'est pas le même pour toutes les bactéries.

Le temps de génération est donné par la formule:

$$\tau = t / n$$

t: temps (connu)

n: nombre de divisions

ii - Taux de croissance

C'est l'inverse du temps de génération et on le définit comme étant le nombre de divisions par unité de temps.

$$U = n / t$$

I-4-3 - La courbe de croissance

La croissance bactérienne est limitée par les conditions du milieu: milieu non renouvelé, conditions de température et de pH déterminés.

Si on trace la courbe log(N), (Nombre:des bactéries) en fonction du temps, on obtient quatre phases distinctes:

a- La phase de latence

Cette phase commence immédiatement après l'ensemencement des micro-organismes dans le milieu, elle correspond à une phase d'adaptation c'est à dire le temps que met la bactérie à synthétiser les enzymes capables de dégrader le substrat. Dans cette phase le taux de croissance est nul.

La durée de cette phase varie avec l'importance de l'inoculum bactérien, le genre considéré, l'âge de la bactérie et la composition du milieu [7] .

b- La phase exponentielle

Dans cette phase, les bactéries se multiplient activement, leur nombre augmente, le taux de croissance est maximum et est sous la dépendance des facteurs de l'environnement (température, nature du substrat).[7]

$$U_{\max} = (dx / dt) . 1 / x$$

I-5-1 Influence de la température

Comme tous les mécanismes de croissance dépendent des réactions chimiques et que les vitesses de ces réactions sont influencées par la température, cette dernière va avoir une profonde influence sur le développement des bactéries, leur taux de multiplication ainsi que leur croissance totale. Des variations de température peuvent aussi modifier certains processus métaboliques et la morphologie cellulaire. Chaque espèce bactérienne croît à des températures situées à l'intérieur de certaines limites (Tableau. 4)[8].

I-5-2 Influence du pH

Pour la plupart des bactéries, le pH optimal se situe entre 6 et 8 et sont donc parfois qualifiés de neutrophiles. Il existe toutefois des germes extremophiles par rapport au pH: les bactéries alcalophiles qui ont un pH optimum de croissance supérieure à 8 et les bactéries acidophiles préférant les pH inférieurs à 6 (*Thiobacillus thiooxydans*) (tableau 4).

Par les effets de leurs métabolismes, les bactéries font souvent varier le pH de leurs milieu de culture, en produisant des acides organiques. par exemple [1].

I-5-3 Influence de l'oxygène

Les bactéries réagissent différemment en présence d'oxygène moléculaire libre, cela nous permet de diviser les bactéries de la façon suivante:

Les bactéries aérobies strictes qui ne peuvent pousser qu'en présence d'oxygène, les bactéries aéro-anaérobies (ou anaérobies facultatives) qui peuvent croître avec ou sans oxygène et les bactéries anaérobies strictes ne se développant qu'en absence d'oxygène [8]. Le niveau de sensibilité de ces organismes peut varier considérablement: les bactéries méthanigènes par exemple sont tuées par un contact de quelques minutes avec l'oxygène de l'air, alors que les bactéries sulfato-réductrices, bien que ne se multipliant qu'en anaérobiose stricte, supportent généralement des expositions de quelques heures [1].

I-5-4 La salinité

Les bactéries qui se développent dans des milieu contenant entre 20 et 300 g/l de NaCl sont dites halophiles (les bactéries halophiles extrêmes ont une croissance optimale entre 200 et 300 g/l de NaCl).

Il existe par ailleurs des bactéries pour lesquelles le sel n'est pas indispensables à la croissance, mais qui peuvent se développer dans des milieux modérément salés: elles sont halotolérantes par opposition aux halophiles pour lesquelles la présence de sel est indispensable.[8]

Tableau 4: Facteurs physiques affectant la croissance bactérienne.[8]

Facteurs physiques	Types de bactéries Catégories physiologiques	Conditions de culture (ou d'incubations)
-Températures minimales et maximales:	-Psychrophiles -Mésophiles -Thermophiles	0 - 30°C 25 - 40 °C 45 - 75 °C
-Oxygène	-Aérobies strictes -Anaérobies strictes -Aérobies / Anaérobies facultatives -Microphiles	-Croissance en présence d'O ₂ -Croissance en absence d'O ₂ -Croissance en présence ou en absence d'O ₂ -Croissance en présence d'une faible concentration d'O ₂
pH	-Neutrophiles -Acidophiles -Alcalophiles	pH optimal 6,5 - 7,5 pH optimal 0,5 pH optimal 9,5
Salinité	Halophiles strictes	Concentration élevée de sel 10 - 15 % de NaCl
Lumière	Photosynthétiques	Source de lumière

CHAPITRE II

II- La corrosion bactérienne

II-1- Définition de la corrosion

Du point de vue étymologique, le terme « corrosion » vient du mot latin « corroder » qui signifie ronger , attaquer [9]. La corrosion est définie par la norme **ISO 8044**, comme étant « une interaction physico-chimique entre un métal et son environnement entraînant des modifications dans les propriétés du métal et souvent une dégradation fonctionnelle du métal lui-même, de son environnement ou du système technique par les deux facteurs »[10].

Il s'agit là d'un processus électrochimique mettant en jeu deux réactions simultanées, l'une « anodique » et l'autre « cathodique ».

La réaction anodique correspond à une oxydation du métal en espèces solubles, ce qui provoque son attaque et son apparente dissolution. Des ions métalliques par exemple Fe^{2+} passent en solution dans le milieu environnant, à l'inverse , la réaction cathodique correspond a la réduction d'une espèce de ce milieu par exemple la molécule d'eau H_2O [11].

II-2- Rappels théoriques sur la corrosion bactérienne

De nombreuses observations concernant l'activité des bactéries vis-à-vis des matériaux ont donné naissance au concept de la « corrosion biologique » L'idée que les micro-organismes peuvent intervenir dans la corrosion des métaux est d'abord émise par **GARRET**(. . .). Un peu plus tard , **GAINÉ** discute du rôle des bactéries sulfato-réductrices , des bactéries oxydantes du soufre et des bactéries ferrugineuses au cours de ce phénomène .

Cependant , ce n'est qu'en 1934 que **VON WOLZOGEN KUHR** et **VAN DER VLUGT** proposent une véritable théorie biologique de la corrosion, basée sur l'intervention des germes sulfato-réducteurs[5].

II-3- Influence des bactéries corrosives

La corrosion biologique est en réalité une manifestation de l'activité d'êtres vivants qui elle-même résulte d'un ensemble de réactions métaboliques catalysées par des enzymes.

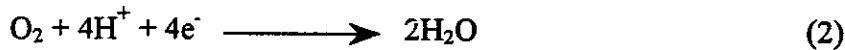
La nature biochimique de l'attaque d'un métal ne change pas la réalité électrochimique du phénomène de corrosion, il s'agit plutôt de modifications engendrées par des effets microbiologiques et conduisant à l'existence ou au maintien de réactions physico-chimiques tout à fait connues[12].

Rappelons simplement que la réaction partielle anodique est l'oxydation du métal qui correspond à une perte d'électrons :

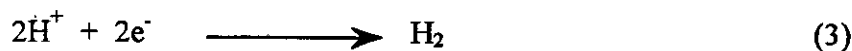


Alors que la réaction partielle cathodique implique la réduction d'un composé du milieu aqueux et qui correspond a un gain d'électrons :

En milieu aéré



Ou dans les solutions désaérées :



La présence de micro-organismes vient donc modifier ou accélérer une de ces réactions anodiques ou cathodiques[13].

II-4- Influence des constituants du milieu

De nombreuses observations et études effectuées dans le milieu naturel ont montré que toute surface immergée ^{dans l'}en eau était rapidement colonisée par divers micro-organismes , ces derniers peuvent former des dépôts denses qui conduisent à des effets de corrosions remarquables [14], soit que le système contienne de l'oxygène , ce qui favorisera la croissance des bactéries aérobies, soit que le système soit très peu à enrichi en oxygène, ce qui favorisera la croissance des bactéries anaérobies.

La présence de gaz carbonique dans l'eau favorise le développement des bactéries autotrophes [15].

D'après Peng et Park , la vitesse de corrosion de l'acier est modifiée en présence de micro-organismes et de sels dissous tels que les carbonates de calcium et les sulfates de sodium.

Certains sels minéraux constituent des sources d'oligo-éléments nécessaires aux métabolismes bactériens .

La présence de chlorures dans l'eau augmente sa corrosivité et conduit à des attaques localisées dans les canalisations en acier[16].

II-5- Mécanismes de la corrosion bactérienne.

Il est commode de différencier trois moyens d'action [12], :

- Une attaque « chimique » liée à la production métabolique de substances agressives pour le métal comme l'acide sulfurique, l'ammoniac ou les acides organiques.
- Une attaque « physique » par réaction de dépôt responsable d'une pile électrochimique d'aération différentielle.
- Une attaque « enzymatique » directement responsable d'un déplacement de l'équilibre électrochimique par une action dépolarisante à la cathode.

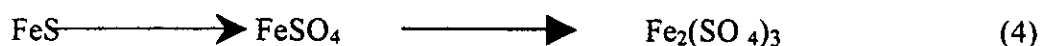
II-5-1- Production de substances corrosives

Les micro-organismes sont capables de produire au sein du milieu de nombreux métabolites qui vont modifier le pH, mais aussi intervenir directement en favorisant l'attaque des métaux [17].

Ainsi de nombreuses bactéries hétérotrophes sont capables de produire des acides minéraux ou organiques, de l'ammoniac par dégradation des protéines.

Si des conditions d'anaérobiose sont créées à la suite d'un dépôt de micro-organismes telles que les bactéries ferrugineuses, les bactéries sulfato-réductrices peuvent se multiplier et favoriser leur auto-reproduction par la libération d' H_2S et le maintien d'un état réducteur.

H_2S libéré pourra agir sur les composés oxygénés du fer : FeO , Fe_2O_3 pour former du FeS celui-ci pourra à son tour subir de nouvelles transformations :



En présence de dioxyde de carbone (CO_2), il y a formation de carbonates de fer :



II-5-2- Formation de cellules d'aération différentielle

Le biofilm qui se forme à la surface d'un métal est hétérogène que ce soit du point de vue chimique (présence de zones aérobies et anaérobies), ou microbiologique (croissance de micro-colonies inter dépendantes).

Les bactéries en utilisant l'oxygène rendent possible le développement des bactéries anaérobies et par conséquent la formation d'une zone hétérogène avec oxygénation différente entre la périphérie du dépôt et son centre.

La concentration en oxygène étant supérieure à la périphérie, 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 la cathode et le centre du dépôt fonctionnant comme anode [18].

Ce mécanisme peut résulter du développement de micro-organismes hétérotrophes tels que *Pseudomonas* souvent associés à des bactéries du cycle du fer et à des bactéries sulfato-réductrices [18].

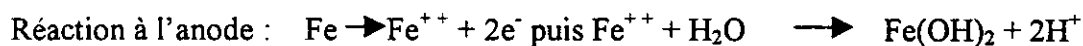
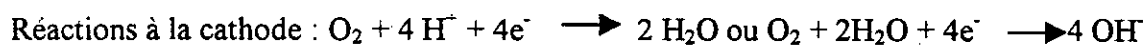
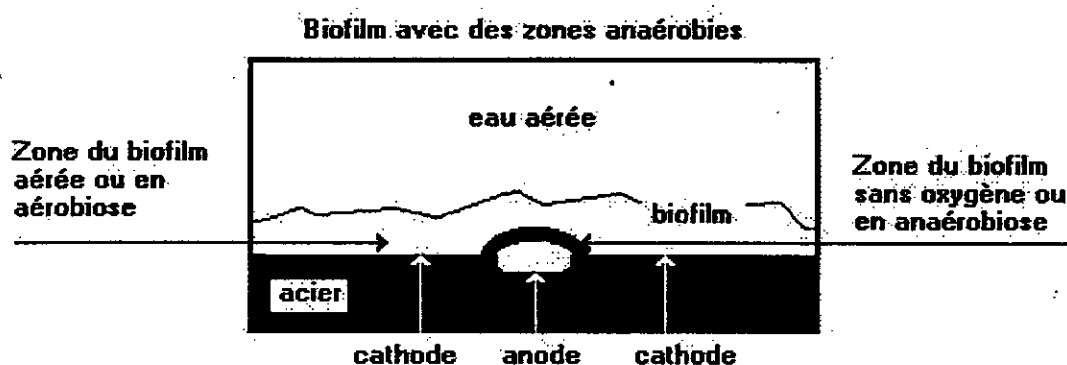


Figure 4 : Cellule d'aération différentielle sous un biofilm avec ou sans zone anaérobie. [17]

II-5-3- Dépolarisation cathodique

La théorie électrochimique de la corrosion repose essentiellement sur le phénomène de l'aération différentielle.

Un couple électrochimique est créé à la suite d'une hétérogénéité du milieu: l'eau d'une part et un dépôt d'autre part sur la surface anodique, le fer est mis en solution tandis qu'un film d'hydrogène se forme au niveau de la cathode, le processus tendrait vers un état d'équilibre.

Pour que l'électrolyse puisse se poursuivre il faut que la pile soit dépolarisée, c'est à dire que l'hydrogène soit consommé au fur et à mesure de son apparition. [5] Les bactéries sulfato-réductrices interviennent à ce niveau [5] STEPHENE et AL (1931) ont démontré que les

bactéries possèdent l'équipement enzymatique suffisant pour utiliser l'hydrogène et d'entraîner la reprise des réactions anodiques et cathodiques par le pompage de l'hydrogène cathodique [12], d'après VON WOLZOGEN KUHR le mécanisme est décrit par les équations suivantes [5]

Dissolution de l'eau ::



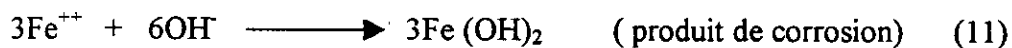
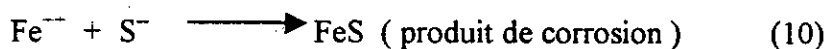
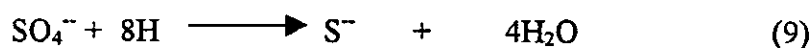
Réaction anodique :



Réaction cathodique :



Dépolarisation cathodique bactérienne



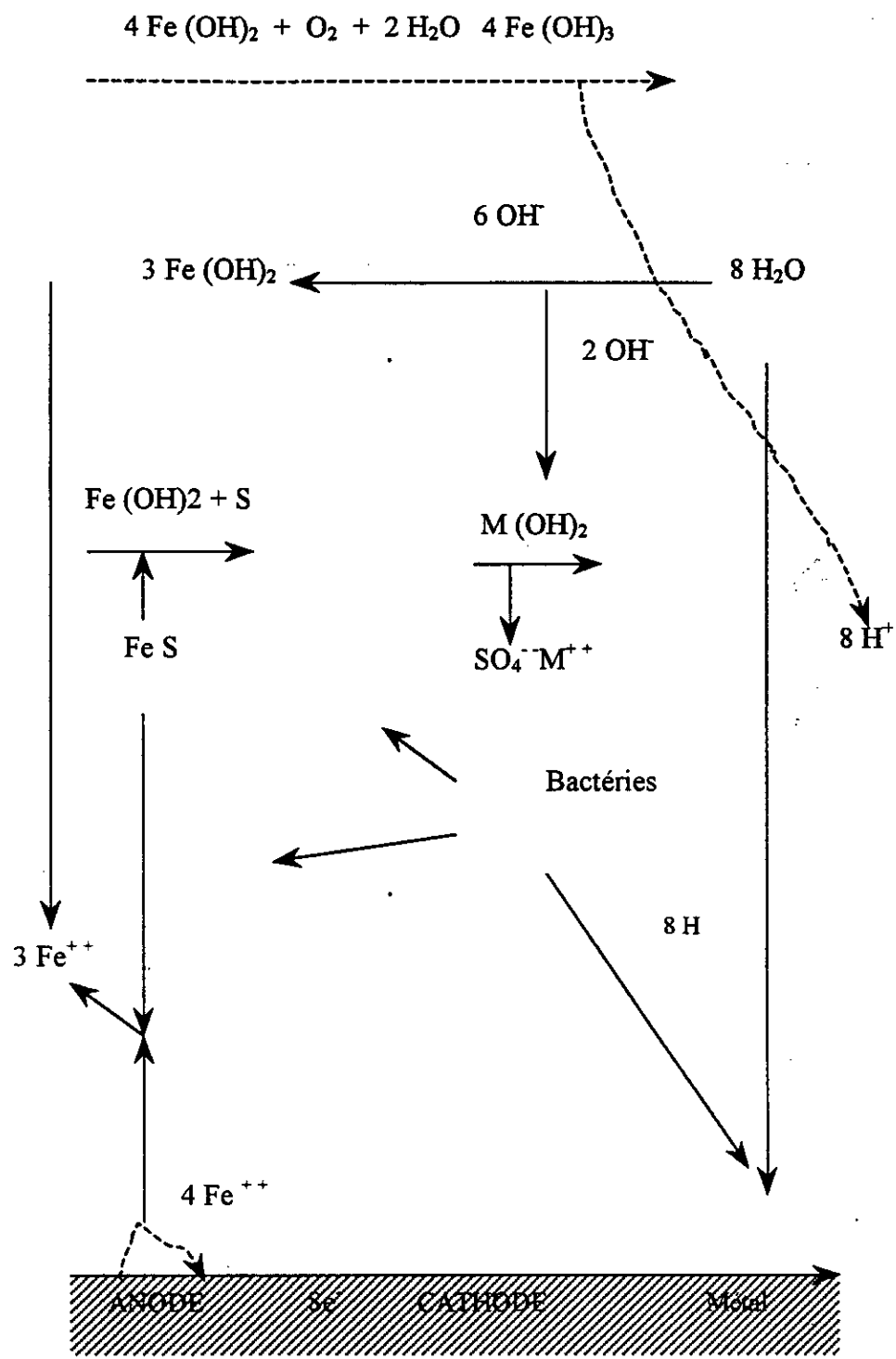


Figure 5 : Principe d'une réduction bactérienne des sulfates (SO_4^{2-}) par les bactéries sulfat-réductrices.

CHAPITRE III

III. Les bactéries responsables de la biodégradation des métaux :

Les principales bactéries associées à la corrosion des métaux (fonte, aciers ordinaires ou aciers inoxydables) sont les bactéries sulfato- réductrices , les bactéries oxydant le soufre, les bactéries oxydant ou réduisant les oxydes de fer ou de manganèse et celles qui sécrètent des acides organiques.

Ces divers micro-organismes coexistent dans des biofilms. Dans cette association avec des surfaces métalliques, ils peuvent agir sur les réactions cathodiques ou anodiques et modifier ainsi les processus électrochimiques au niveau de l'interface métal-biofilm [11].

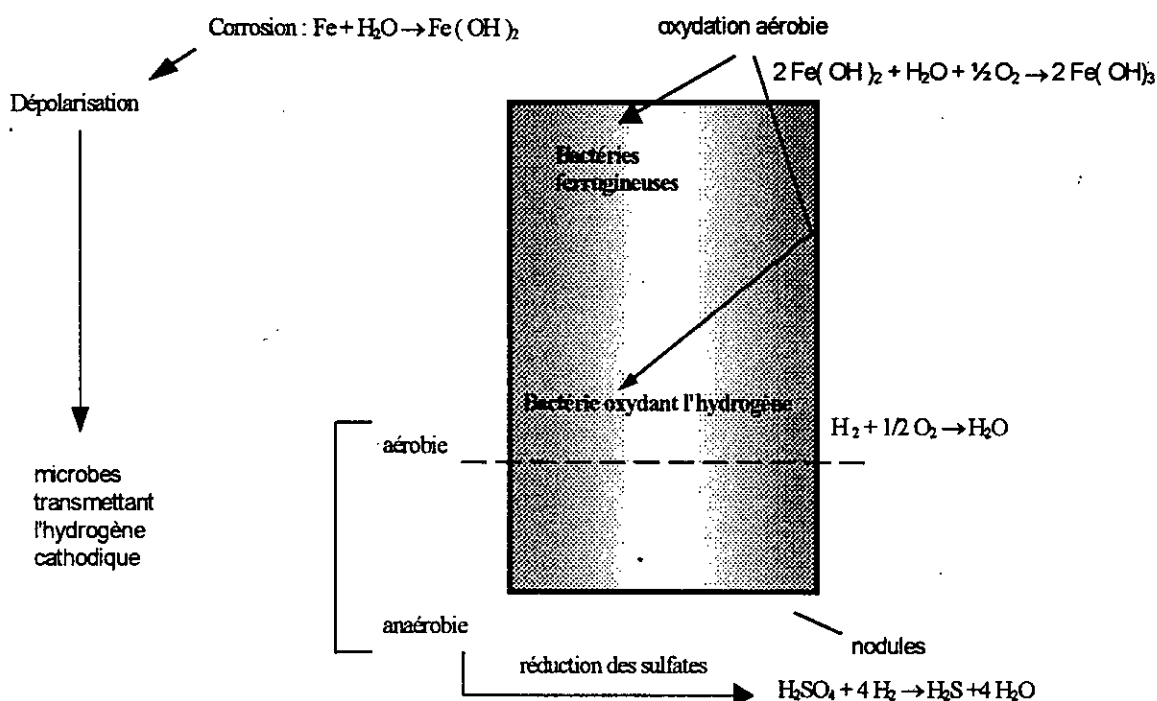


Figure - 6 - Ensemble de processus de corrosion à l'intérieur des conduites en métal ferreux (d'après Von Wolzogen Kuhr) [5].

III-1- Les bactéries anaérobies strictes

III-1-1- Les bactéries sulfato-réductrices(BSR)

III-1-1-1- Définition:

D'après **BERGEY** les bactéries sulfato-réductrices (BSR) constituent un groupe très diversifié, formé d'une quinzaine de genres différents et appartenant à une soixantaine d'espèces [2]. Taxonomiquement, elles appartiennent au règne des Eubactéries, on les rencontre dans les eaux douces et salées, particulièrement dans les sédiments de fond (milieux anoxique), dans les circuits de refroidissement d'eau désaérée ou des canalisations de transport de pétrole (eau- pétrole) [5].

Ces bactéries sont anaérobies strictes, Gram négatif, flagellées ou non, la taille variant entre 1 à 5µm de long et 0.5 à 1µm d'épaisseur [12].

Leur particularité métabolique se traduit par la production de sulfure (S₂⁻) au cours de la réduction des sulfates (SO₄²⁻) qui leur servent d'accepteurs d'électrons [12].

Les pH qui leur sont les plus favorables sont voisins de la neutralité, au dessous de 5.5 et au dessus de 9,5, les bactéries sont inactives.

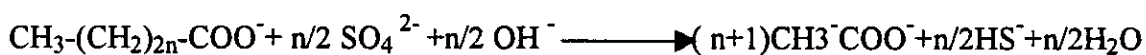
Du point de vue température, elles sont mésophiles ou thermophiles, leur température de développement varie entre 5 et 75° C, mais leur température optimale de croissance est de 37° C [6]. On distingue deux principaux genres de BSR capables de réduire les ions sulfates en sulfures, il s'agit de : **Desulfovibrio** et **Desulfotomaculum** [19].

III-1-1-2- Métabolisme des B.S.R

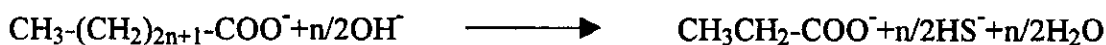
Le métabolisme énergétique est assuré par le couplage de l'oxydation d'un substrat généralement organique(chimioorganotrophie) avec la réduction des sulfates. On distingue deux grandes classes métaboliques des BSR :

Les BSR qui conduisent à une oxydation incomplète de leur donneur d'électrons organiques en hydrogénosulfures et acétates, selon que le donneur d'électrons soit pair ou impair:

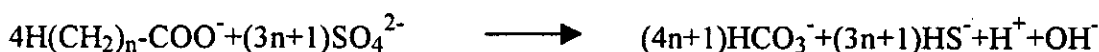
-Substrat pair:



-Substrat impair:



les BSR qui conduisent à une oxydation complète en hydrogénocarbonates selon la réaction:



Les molécules organiques utilisées comme source de carbone et d'énergie par les BSR sont les acides organiques simples ou d'alcools, les acides gras qui servent comme donneurs d'hydrogène[3].

Le CO₂ pourrait être utilisable comme source carbonée et ferait de ces bactéries des autotrophes [5].

Certaines BSR possèdent l'équipement enzymatique (hydrogénase) suffisant pour utiliser l'hydrogène moléculaire comme donneur d'électrons, on a pu démontrer que des suspensions stables de *Desulfobrio vulgaris*, hydrogénase-positif, dépolarisent les zones cathodiques d'une surface d'acier en utilisant l'hydrogène à la réduction de l'ion sulfate [5], le métabolisme énergétique s'écrit alors :



III-1-1-3- Mécanisme de la réduction des sulfates :

L'assimilation du soufre dans la structure moléculaire des bactéries ne peut se faire qu'au stade de sulfure, la réduction complète de chaque ion sulfate en sulfure nécessite huit électrons et on peut s'attendre à ce qu'elle se fasse en plusieurs étapes catalysées par des enzymes spécifiques.

Pelement en 1993, a expliqué que la réduction des sulfates en sulfure se fait selon deux mécanismes [5] :

1. La génération d'ion sulfure nécessaire au métabolisme de synthèse, c'est la réduction assimilatrice des composés soufrés.
 2. La production d'énergie, le sulfate et autres composés du soufre (sulfure mis à part) servent d'accepteurs d'électrons des oxydations génératrices d'énergie(ATP), cette étape est appelée dissimulatrice.
- La première étape correspond à l'activation des sulfates par une ATP sulfurylase en adénosine phosphosulfate (APS) qu'il y' ait assimilation ou dissimilation.
 - La deuxième étape est propre à l'assimilation, elle correspond à une deuxième activation de l'APS en phosphoadénosine 5 - phosphosulfate (PAPS) catalysée par l'enzyme APS kinase.

Les deux voies passent donc par le sulfite comme intermédiaire et conduisent à H₂S, la dissimilation en libère de grandes quantités et permet aux bactéries sulfato-réductrices de se procurer l'énergie nécessaire à leur métabolisme de synthèse [3].

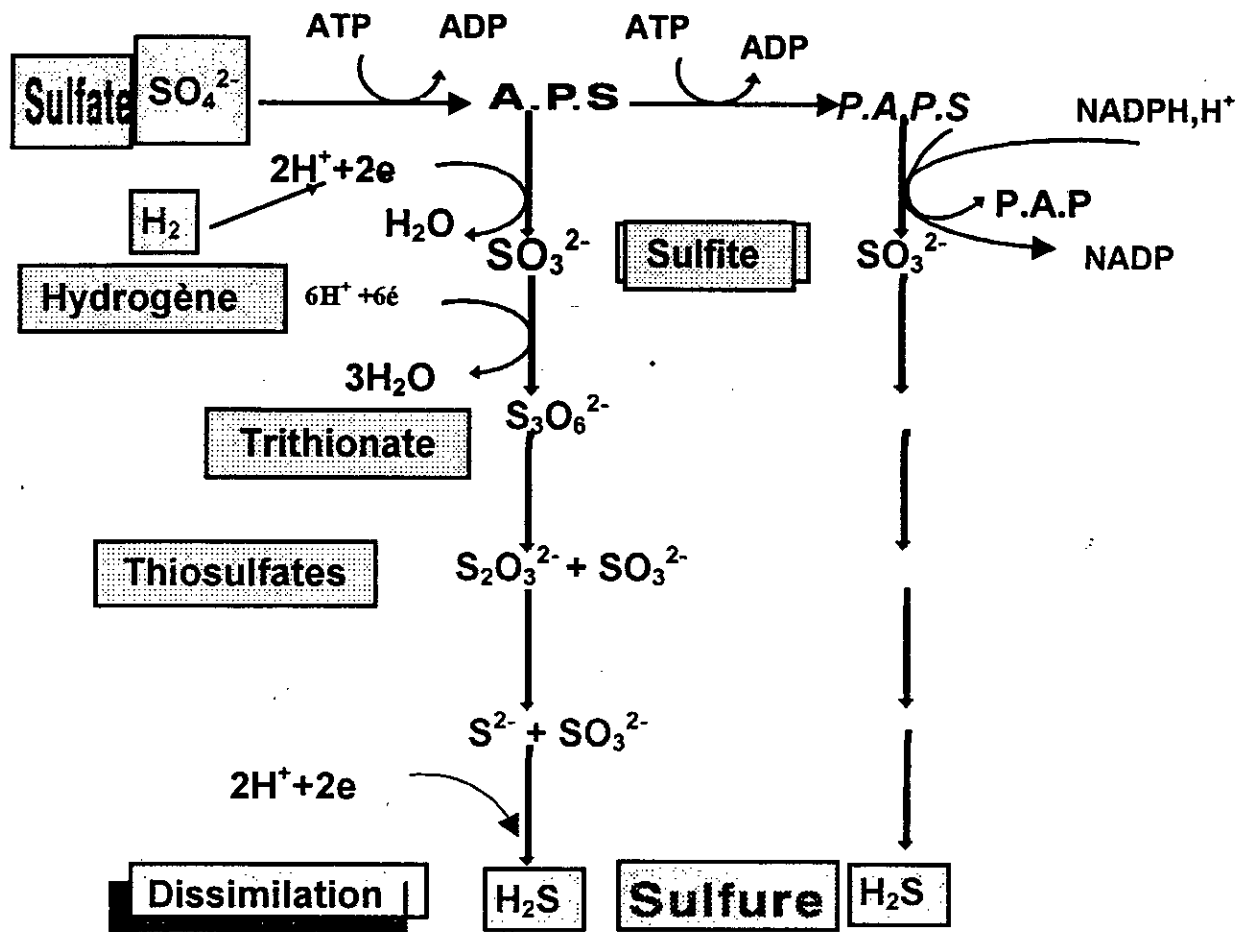


Planche -1: Mécanisme de réduction des sulfates en sulfures chez les bactéries sulfato-réductrices.

III-1-2- Les bactéries méthanigènes:

III-1-2-1- Définition :

Les bactéries méthanigènes sont strictement anaérobies, elles appartiennent au groupe des Archaeobactéries, des traces d'oxygène suffisent à les tuer en partie par l'auto-oxydation de certains cofacteurs nécessaires à leurs métabolismes [3], elles peuvent être Gram négatif ou Gram positif, en forme de coques, de bâtonnets, de filaments droits ou spirallés, sporulés ou asporulés [5]

Les bactéries méthanigènes sont des bactéries hétérotrophes, mésophiles ou même modérément thermophiles, le pH favorable à leur développement est compris entre 6 et 8 et la croissance se produit dans un intervalle de salinité compris entre (0,5 et 10%) [3].

Leurs principales caractéristiques est la production de méthane à partir d'un mélange de gaz carbonique et d'hydrogène ou d'acétate selon la réaction que les bactéries utilisent pour la production d'énergie. (13)



Pour la méthanogénèse et la croissance, les substrats préférentiels sont l'acétate et l'hydrogène.

Certaines espèces peuvent utiliser le formate comme source de carbone et source d'énergie.

Les méthanigènes vivent en association avec d'autres anaérobies qui leur fournissent en continu l'hydrogène et le gaz carbonique indispensables [3].

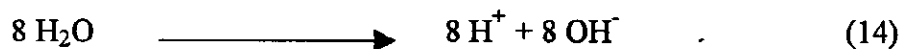
III-1-2-2- Mécanismes réactionnels:

Des bactéries réduisant les sulfates, il faut rapprocher les méthanigènes qui possèdent également une enzyme hydrogénase.

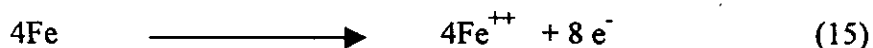
Certains auteurs ont trouvé dans les produits de corrosion environ 7.000.000 de bactéries sulfato-réductrices et 8.000.000 méthanigènes par gramme de matière sèche.

Un mécanisme de corrosion peut s'écrire comme suit :

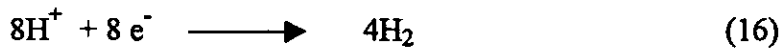
- Dissociation de l'eau :



- Réaction anodique :



- Réaction cathodique :



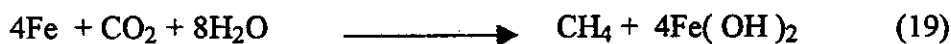
- Action des méthanigènes :



- Corrosion à l'anode :



- Réaction globale :



III-2- Les bactéries aérobies strictes:

III-2-1- Les bactéries oxydant le soufre

Le soufre sous ses différentes formes réduites (sulfure et H_2S , soufre élémentaire, sulfite) est hautement toxique pour le milieu, il ne s'accumule heureusement pas, et est oxydé chimiquement soit par l'oxygène atmosphérique, soit par les bactéries sulfo-oxydantes. Les Thiobacillus sont les principaux représentants de ce groupe physiologique[15].

III-2-1-1- Les Thiobacillus

III-2-1-1-1- Définition

Les Thiobacillus sont des bacilles à cils polaire , Gram négatif , aérobies strictes et chimio-autotrophes [4]. Les Thiobacillus utilisent les sels ammoniacaux comme source d'azote et le gaz carbonique comme source de carbone[15].

Les Thiobacillus tirent leur énergie de l'oxydation des formes réduites du soufre en sulfate, avec formation concomitante de l'acide sulfurique corrosif (H_2SO_4) , produit final du méabolisme [8].

Les installations et les pipes sont rapidement ~~dégradées~~ par la présence et la croissance des Thiobacillus.[5].

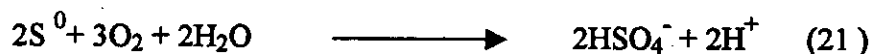
III-2-1-1-2- Métabolisme énergétique

Certaines bactéries comme les *Thiobacillus thiooxydans* sont remarquables pour leur tolérance exceptionnelle aux pH bas, et poussent à des pH inférieurs à 5 [8].

Les *Thiobacillus* produisent des sulfates par l'oxydation des composés minéraux soufrés : thiosulfate, soufre élémentaire, H_2S .

Les équations du métabolisme énergétique sont les suivantes :

- Soufre élémentaire :



- Sulfure d'hydrogène :



- Thiobacillus:



Un autre genre comme *Thiobacillus ferrooxydans* tire également son énergie de l'oxydation des composés soufrés, ces organismes se rencontrent habituellement dans les eaux acides et les eaux riches en sels ferreux [5].

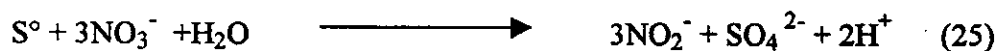
Le métabolisme énergétique de ces bactéries peut être la cause d'une dépolarisation anodique: les bactéries forment une véritable biogée qui isole une partie de la surface métallique sous des tubercules dont les centres désaérés, constituent des anodes à partir desquelles migrent les ions Fe^{+2} vers l'extérieur où l'oxygène est en concentration suffisante pour permettre le développement des bactéries du fer [5] (Fig 7).

Bien que décrit comme aérobie stricte, on s'est aperçu récemment que *thiobacillus ferrooxydans* pouvait puiser son énergie de l'oxydation du soufre couplé à la réduction du fer ou des nitrates (respiration anaérobie) [1].

- Soufre élémentaire + fer :



- Soufre élémentaire + nitrates :



III-2-2-Les bactéries du fer et du manganèse.

On englobe sous le nom de bactéries du fer (ou ferrobactéries) toute une série d'organismes aérobies strictes comme Gallionella, Leptothrix et Crénothrix., qui puisent leur énergie de synthèse dans la consommation du fer ferreux (Fe^{2+}) et son oxydation en fer ferrique (Fe^{3+}), ce qui se traduit par la formation d'un dépôt gélatineux d'hydroxyde ferrique sous lequel peut se former une zone d'anaérobiose [20].

III-2-2-1-Les Gallionella :

III-2-2-1-1 Morphologie :

Gallionella est une bactérie réniforme, 0.5μ à 1.2μ , qui excrète sur sa face concave au cours de sa croissance un pédoncule filamenteux. Elle est Gram négatif, aérobie stricte, et se développe de façon optimale entre 20 et $25^{\circ}C$, son optimum de pH est situé entre 6.3 et 6.6 [5].

Les Gallionella se développent souvent en masse d'eau où elle provoquent des dépôts importants d'hydroxyde ferrique de couleur ocre, elles forment des cellules arquées, fixées à l'extrémité d'un filament spiralé d'hydroxyde ferrique.

Les eaux où se développent les Gallionella contiennent peu d'oxygène, relativement peu de fer, sont riches en CO_2 et le pH est voisin de la neutralité. Ces bactéries sont microaérophiles et nécessitent peu de fer : $1,6\text{ mg Fe(II)/l}$.

III-2-2-1-2 Mécanisme de corrosion :

Les Gallionella oxydent les ions ferreux en ions ferriques, attirent les ions chlorures et produisent le chlorure de fer, les dépôts sont alors riches en chlorures ferriques et attaquent de manière agressive l'acier inoxydable[21].

Les Gallionella sont capables d'oxyder les ions manganoux (Mn^{2+}) en ions manganiques (Mn^{3+}). La formation de dépôts d'oxydes de fer et de manganèse aboutit à la formation de tubercules recouvrant des zones anaérobies où se développent alors des bactéries sulfato-réductrices (Desulfovibrio desulfuricans), ces proliférations bactériennes favorisent la corrosion des conduites. [20] (Fig 7)

III-2-2-2-Les Leptothrix

Les Leptothrix sont des filaments (ou trichomes), contenant une file unique de cellules cylindriques et entourées d'une gaine. Celle-ci est d'abord mince et incolore, puis elle s'épaissit et prend une couleur brune de plus en plus accentuée à mesure qu'elle s'imprègne de fer oxydé.

Elles sont Gram négatif, aérobies strictes, vivant de préférence à un pH compris entre 6 et 8, la température optimale de croissance est de 32°C [22].

Ces bactéries oxydent le fer soluble en fer insoluble $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Elles peuvent également se concentrer et oxyder le manganèse [20].

Les Leptothrix se fixent sur les parois des conduites, forment de gros amas gluants susceptibles d'obstruer les conduites [21].

Ces bactéries du fer vivent en milieu aérobie et puisent leur énergie de synthèse dans la consommation du fer ferreux et son oxydation en fer ferrique. Elles accélèrent par la sécrétion d'enzymes cette oxydation qui est lente, appauvrissent le milieu en oxygène et dépolarisent les anodes [5].

III-2-3-Les Pseudomonas.

III-2-3-1-Définition:

Ce sont des bâtonnets droits ou incurvés de 0.5 à 1 μm sur 1.5 à 4 μm , Gram négatif, mobiles grâce à des flagelles polaires, aérobies strictes, chimiorganotrophes, certains sont chimolithotrophes facultatifs capables d'utiliser l'hydrogène ou le CO_2 comme source d'énergie, leur température optimale de croissance est de 37°C.

Les Pseudomonas forment souvent des films fins combinés avec les dépôts de la corrosion sur les surfaces métalliques. Ces bactéries consomment l'oxygène, réduisent le Fe^{3+} en Fe^{2+} et corrodent le métal, il s'en suit la formation d'une piquuration qui se fait en deux étapes: initiation et propagation. Les bactéries forment un biofilm et la cellule à concentration en oxygène initie la piquuration [14].

III-2-3-2-Action des Pseudomonas :

Les Pseudomonas appartiennent au groupe des bactéries réduisant les métaux (BRM), très exactement, les BRM réduisent la valence supérieure des composés métalliques, tels que les oxydes ferriques et manganiques hydroxyde de fer ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), oxyde de manganèse MnO_2 qui peuvent servir d'accepteurs d'électrons pour les chaînes respiratoires des bactéries [11].

La résistance à la corrosion des aciers vient de la formation d'une couche protectrice de produit de corrosion ferriques insolubles. Les Pseudomonas pourraient alors favoriser la corrosion en réduisant ces dépôts de corrosion en composés ferreux solubles, et donc moins protecteurs.

Certaines Pseudomonas produisent des acides organiques qui peuvent attaquer les surfaces métalliques [11].

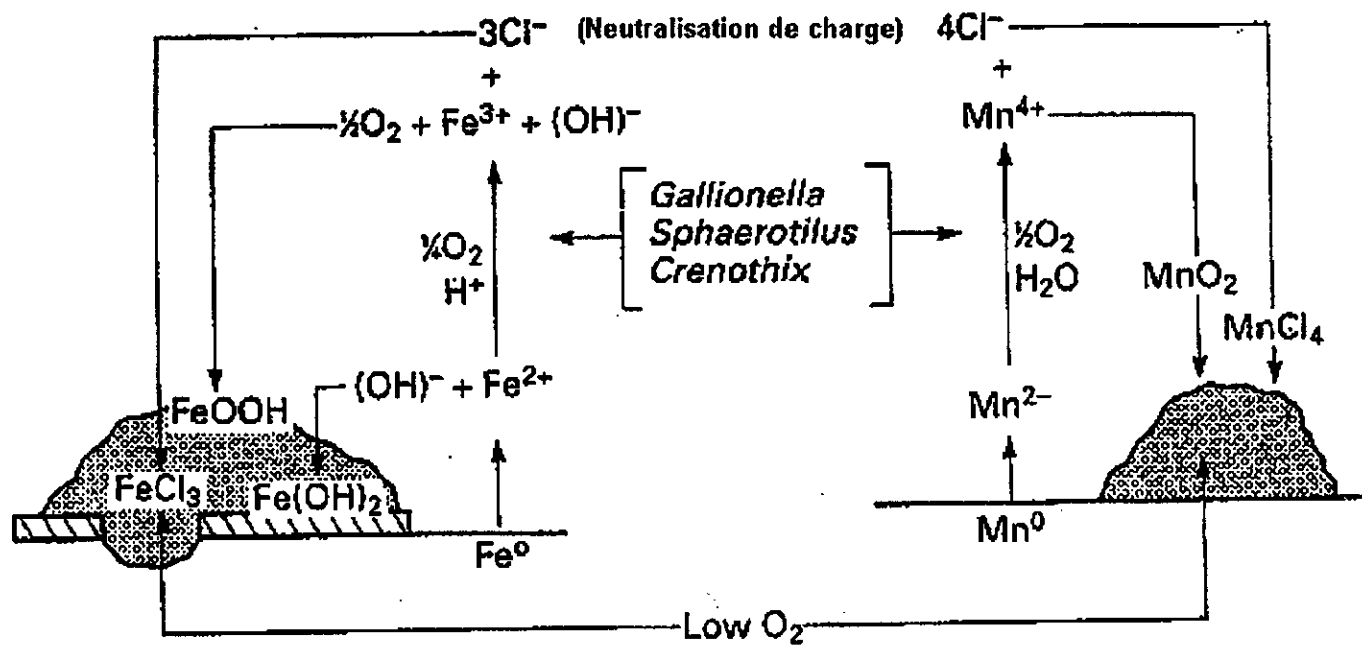


Figure 7 : Mécanisme d'oxydation et de précipitation du fer et du manganèse en présence des ferrobactéries [20]

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV

**MATERIELS
ET
METHODES**

IV-1-Origin des échantillons

Les échantillons d'eau ayant servi à notre étude proviennent des quatre régions précitées (In-Aménas , Ohanet, TFT, Stah), les points de prélèvement choisis ont été répartis comme suit :

Région d'In-Aménas :

- Echantillon n°1 (ZR 220) : puits d'huile
- Echantillon n°2 (ZR CPE) : centre de production d'eau
- Echantillon n°3 (A2 RTI) : bac de stockage

Région de Ohanet :

- Echantillon n°1 (6101 DTR) : bac de stockage
- Echantillon n°2 (OTW5) : puits producteur d'eau
- Echantillon n°3 (OTS 9) : puits d'huile

Région de TFT :

- Echantillon n°1(TFT R1) : bac de stockage
- Echantillon n°2(TFT CS2) : eau d'injection
- Echantillon n°3 (TFY4) : puits d'huile

Région de Stah :

- Echantillon n°1 (MRK Q6) : un bac de stockage
- Echantillon n°2 (549 inj) : une eau d'injection
- Echantillon n°3 (SEP MRK) : un séparateur

IV-2-Analyses physico-chimiques des échantillons

Pour effectuer l'analyse physico-chimique des échantillons, nous avons utilisé pour chaque région une eau d'injection qui provient d'un puits producteur d'eau :

- Echantillon: ZR CPE : région d'In-Aménas.
- Echantillon OTW5: région de Ohanet

- Echantillon TFTCS2 : région de T.F.T

- Echantillon 549 : région de Stah.

Différentes méthodes ont été utilisées pour doser les éléments chimiques et physiques présents dans les eaux [32].

1- Mesure de la variation du pH.

La mesure du pH se fait par méthodes électrométriques (NF T 90 008). Cette méthode s'applique au moyen d'une électrode en verre utilisée à tout type d'eau ou de solution, dont le pH est compris entre 1 et 11 et la température entre 0 et 60°C (voir annexe).

2- Dosage simultané du calcium et du magnésium par complexométrie

Le dosage du calcium et du magnésium présents dans l'eau a été effectué par la méthode API 1965 (voir annexe).

4- Dosage du fer par complexométrie

La méthode standard API-(1965) est utilisée pour doser le fer total dissous contenu dans l'eau d'injection (voir annexe).

4-Dosage du potassium et du sodium par absorption atomique

L'absorption atomique (norme T 90-112) permet de doser les éléments ayant la raie spectrale dans le domaine d'utilisation de l'appareil.

les éléments dosés par cette méthode sont : Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Sr^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Al^{2+} et Pb^{2+}) (voir annexe)

6-Dosage des chlorures par volumétrie

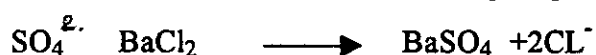
La méthode est basée sur la précipitation des chlorures par le nitrate d'argent, en présence de chromate de potassium comme indicateur (voir annexe)

7-Dosage des carbonates et bicarbonates par acidimétrie

C'est une méthode (API) basée sur la détermination de l'alcalimétrie d'une eau par la mesure des ions carbonates (CO_3) et bicarbonates (HCO_3) avec utilisation d'un pH-mètre et d'une solution d'acide chlorhydrique de normalité connue (voir annexe).

8-Dosage des sulfates par gravimétrie.

La méthode consiste en la préparation des ions sulfates sous forme de sulfate de baryum (voir annexe), la réaction donnant ce précipité est la suivante :



IV-3 Analyse bactériologique des échantillons.

L'analyse microbiologique a pour but la mise en évidence des bactéries présentes dans les différents échantillons. Pour cela nous avons réalisé :

- Un isolement sur milieu spécifique, pour la croissance de chaque genre bactérien.
- Un dénombrement bactérien des germes présents dans l'eau.
- Une identification des bactéries isolées par caractérisations macroscopiques et microscopiques.

IV-3-1 Matériels

A) Verreries et appareillages utilisés

Pour déterminer les caractéristiques microbiologiques des différents échantillons, la verrerie suivante a été utilisée :

- Pipettes Pasteur stériles
- Flacons Pénicillines
- Tubes à essai stériles
- Bechers
- Fioles jaugées
- Cristallisoirs

- Entonnoirs
- Pipettes
- Pipettes en verre graduées
- Lames et lamelles

Les appareils suivants ont été utilisés lors de l'analyse microbiologique des échantillons :

- Balance
- Agitateur magnétique
- Plaque chauffante
- Autoclave
- Etuve
- Vortex
- Trois incubateurs
- Un compteur pour le comptage des colonies.

B- Milieux de culture et réactifs:

Pour l'isolement des bactéries, plusieurs milieux de culture ont été utilisés. Ces milieux contiennent quantitativement et qualitativement les substances exigées pour la croissance des bactéries.

B-1 Composition chimique du milieu de culture spécifique à l'isolement des bactéries sulfato-réductrices [22] :

Le milieu est obtenu à partir de :

- Sulfate de magnésium	1g
- Acide ascorbique	0.1g
- Citrate de sodium	0.5g
- Chlorure d'ammonium	0.5g
- Phosphate bipotassique	0.5g
- Extrait de levure	0.1g
- Agar-Agar	0.05g
- Lactate de sodium	4ml
- Eau distillée q.s.p	1000ml

Pour obtenir un milieu solide, on ajoute 15g d'Agar-Agar, on ajuste le pH à 7-7.5 et on stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

B-2 Composition chimique du milieu de culture spécifique à l'isolement des bactéries méthanigènes [19]:

Le milieu est obtenu à partir de :

- Formiate de sodium	15g
- Sulfate d'ammonium	1g
- Chlorure de calcium	0.015g
- Chlorure de magnésium	0.015g
- Chlorure ferrique	0.02g
- Sulfate de magnésium	0.01g
- Molybdate de sodium	0.001g
- Phosphate dipotassique	2g
- Rouge de phénol	0.003g
- Bleu de méthylène	0.002g
- Thioglycolate de sodium	0.5g
- Eau distillée q.s.p	1000ml

Pour obtenir un milieu solide, on ajoute 15g d'Agar-Agar au milieu, on ajuste le pH à 6 et on stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C

B-3 Composition chimique du milieu de culture spécifique à l'isolement des *Pseudomonas* [22] :

Le milieu est obtenu à partir de :

- Phosphate dipotassique	0.6g
- Phosphate monopotassique	0.6g
- Sulfate d'ammonium	0.4g
- Chlorure d'ammonium	1g
- Phosphate dipotassique	0.5g
- Sulfate de magnésium	0.2g
- Chlorure de calcium anhydre	0.1g
- Eau distillée q.s.p	1000ml

On ajoute 15g d'Agar-Agar pour obtenir un milieu solide, on amène à un pH optimum entre 6 et 7 et on stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

B-4) Composition chimique du milieu de culture spécifique à l'isolement des *Leptothrix* [19] :

- Sulfate de magnésium	0.3g
- Phosphate dipotassique	0.20g
- Chlorure de sodium	0.20g
- Citrate de fer ammoniacal	0.10g
- Eau distillée q.s.p	1000ml

Pour obtenir un milieu solide on ajoute 20g d'Agar-Agar au milieu, on amène à pH optimum entre 7 et 8 et on stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

B-5 Composition chimique du milieu de culture spécifique à l'isolement des *Gallionella*

- Chlorure de sodium	0.1g
- Chlorure de magnésium	0.015g
- Chlorure de calcium	0.0025g

- Citrate de fer 0.001g
- Source carbonée (glucose) 0.5-2g
- Sels d'oligoéléments (Mo, Zn, Ni, Co) 1µ g de chaque.

Pour obtenir un milieu solide, on ajoute 15g d'Agar-Agar au milieu, on ajuste le pH à 6.7 et on stérilise à l'autoclave pendant 20minutes à 120°C.

B-6- Composition chimique du milieu de culture spécifique à l'isolement des Thiobacill~~ls~~ [22]:

a) Milieu de base :

- Sulfate d'ammonium 0.15g
- Chlorure de potassium 0.005g
- Sulfate de magnésium 0.5g
- Phosphate dipotassique 0.05g
- Nitrate de calcium 0.01g
- Eau distillée q.s.p 1000ml

b) Une solution aqueuse à 10% de Fe SO₄,7H₂O stérilisée par filtration (0.45µm)
On ajoute 10ml de cette solution au milieu de base.

Pour obtenir un milieu solide on ajoute 15g d'Agar-Agar, on ajuste le pH à 3.5 et on stérilise à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

B-7-Les réactifs

Durant les étapes des caractérisations microscopiques des bactéries isolées, les réactifs suivants ont été utilisés :

- Bleu de méthylène
- Violet de gentiane
- Lugol
- Ethanol
- Fushine
- Huile de vaseline
- Eau oxygénée à 10 V
- Disques d'oxydase

IV-3-2 Méthodes

IV-3-2-1 Préparation des milieux de culture

Pour l'isolement des bactéries , des milieux de culture spécifiques sont élaborés comme suit

- 1) On dissout chaque ingrédient dans la quantité d'eau distillée nécessaire.
- 2) Après agitation, on ajuste le pH à la valeur optimale pour la croissance de la bactérie à cultiver.
- 3) On verse le milieu dans des flacons de 250 ml que l'on bouche avant de stériliser avec des tampons de coton ou des bouchons de métal.
- 4) On stérilise le milieu à l'autoclave pendant 20 minutes à une température de 120°C

IV-3-2-2 Cultures et dénombrements des bactéries

La culture et le dénombrement sont effectués sur le milieu de culture préparé préalablement.

Pour ce faire, le milieu solide est liquéfié dans un bain-marie porté à 100°C. Au voisinage de la flamme d'un bec Bunsen, le milieu de culture liquide est coulé dans les boîtes de pétri, on le laisse se solidifier, celui-ci servira à l'ensemencement des échantillons à analyser en surface, en parallèle, on effectue des dilutions décimales qui seront utilisées pour le dénombrement.

A) Préparation des dilutions

On effectue les dilutions dans des tubes à essai (160x16mm) contenant 9ml d'eau physiologique stérile. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on prélève 1ml de l'échantillon à analyser, on le verse dans un premier tube, on agite au vortex et on prélève 1ml de ce tube puis on le verse dans le deuxième tube et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-5} .

Ces dilutions permettent le dénombrement des bactéries sur les boîtes de pétri.

B) Techniques d'ensemencements bactériens

Deux types d'ensemencements en boîte de Pétri ont été réalisés:

1-Ensemencement en surface:

Il met en évidence les bactéries aérobies, il s'agit de prélever une goutte de 0.1ml de chaque dilution à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Elle est ensuite déposée au centre de la boîte contenant le milieu de culture spécifique au développement de chaque type de bactérie.

A l'aide d'une pipette râteau, la goutte est étalée sur toute la surface de la boîte de pétri.

2-Ensemencement en profondeur:

Il met en évidence les bactéries anaérobies strictes dans les boîtes de pétri, un volume de 1ml de chaque dilution est déposé dans la boîte de pétri, ensuite on coule le milieu de culture fondu et refroidi à 45°C. On homogénéise le milieu et on le laisse se solidifier.

3-Incubation des boîtes de pétri :

Toutes les boîtes ensemencées sont ensuite incubées selon les conditions contenues dans le tableau 5

Tableau 5 : Conditions d'incubation des bactéries isolées

Bactéries	Température d'incubation	Aérobiose Anaérobiose	Temps d'incubation
Méthanigènes	32°C	Anaérobiose (jarre-déssicateur)	4 semaines
BSR	37°C	Anaérobiose (jarre-déssicateur)	21 jours
	60°C		03 jours
Pseudomonas	37°C	Aérobiose	48 heures
Leptothrix	37°C	Aérobiose	03 jours
Gallionella	20°C	Aérobiose	36 heures
Thiobacillus	32°C	Aérobiose	05 jours

C) Dénombrement

Après l'incubation des boîtes de pétri, on procède aux dénombrements, des bactéries. chaque bactérie correspond à une colonie.

Le dénombrement se fait pour chaque groupe de colonies bactériennes différentes morphologiquement et bien isolées. Chaque boîte de pétri correspond à une dilution, le dénombrement s'effectue sur la dernière dilution qui a donné des colonies.

Pour connaître le nombre total de colonies bactériennes présentes dans 1ml d'échantillon, on multiplie le nombre de colonies comptées sur la boîte de pétri par l'inverse de la dilution.

IV-3-2-3 Caractérisations macroscopiques

Après incubation des boîtes de pétri aux différentes conditions d'incubation, on procède à l'observation à l'œil nu des colonies bactériennes qui ont été cultivées dans les boîtes de pétri.

Les colonies sont sélectionnées sur la base d'éléments d'identification suivants :

- La forme des colonies bactériennes : circulaire, ondulaire, filamenteuse ou irrégulière.
- Le diamètre des colonies qui peut être inférieur ou supérieur à 1mm.
- La chromogénèse (couleur): on note la présence ou l'absence de pigments solubles ou insolubles.
- L'opacité, si elle est transparente, translucide ou opaque.
- L'élévation qui peut être plate, convexe ou concave.
- La surface qui peut être lisse, sèche, rugueuse, plissée, brillante ou émoussée.
- La consistance: visqueuse, ferme ou granulaire.

Les colonies de même caractéristiques sont rassemblées dans un groupe, et chaque groupe de même nature est codifié.

IV -3-2-4- Caractérisations microscopiques :

L'identification microscopique des bactéries est utilisée sur des cellules à l'état fixé par les colorations au bleu de méthylène et de Gram, afin de déterminer la morphologie de la bactérie et son Gram

i) Coloration au bleu de méthylène

Une colonie bactérienne est prélevée avec une pipette Pasteur stérile, et est déposée sur une lame contenant une goutte d'eau physiologique stérile.

Par un étalement de va et vient, on forme une suspension bactérienne.

On sèche la lame à proximité d'une flamme, on fait couler la solution de bleu de méthylène phénique jusqu'à ce que toute la lame soit recouverte. On laisse agir pendant une minute, et on rince à l'eau distillée, on sèche le frottis bactérien et on observe au microscope optique avec l'objectif 100, après avoir déposé une goutte d'huile de vaseline sur la lame.

Cet examen nous renseigne sur la morphologie de la bactérie

ii) Coloration de Gram

1-Préparation du frottis: on dépose une goutte d'eau physiologique sur une lame dans laquelle on fait étaler notre inoculum bactérien, ensuite on sèche la lame à la flamme.

2-On colore le frottis avec une solution de violet de Gentiane. On laisse agir une minute, puis on rince à l'eau distillée, la lame est ensuite recouverte d'une solution de lugol pendant une minute, un deuxième rinçage est effectué. Après décoloration avec l'alcool éthylique pendant 30 secondes, la lame est recouverte avec de la fushine, pendant un temps réactionnel de 2 minutes, après la lame est rincée, séchée et observée au microscope optique avec l'objectif 100 après avoir déposé une goutte de vaseline sur la lame.

IV-3-2-5-Conservation des souches isolées

L'étape suivante est la conservation des cultures des différentes espèces bactériennes isolées, ces cultures servent de souches de référence.

Au moyen d'une pipette Pasteur, chaque souche est introduite dans un tube de conservation qui contient le milieu adapté à chaque espèce (annexe).

Les précautions élémentaires suivantes sont prises pour suivre cette conservation:

- 1 - La dessiccation du milieu est évité en bouchant soigneusement les tubes de conservation.
- 2 - La culture est conservée au réfrigérateur à 4°C.
- 3 - La souche conservée provient d'une culture pure obtenue sur boîte de pétri

IV-3-2-6-Etude du type respiratoire

a)Test pour la recherche de la catalase

- Principe:

Cette enzyme empêche l'accumulation d' H_2O_2 , dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne, catalysant la réaction:



L'oxygène libéré se dégage sous forme gazeuse

- Technique:

Le procédé le plus simple consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes puis un peu de la culture à étudier, prélevée sur milieu solide.

- Lecture:

Si la souche examinée possède une catalase, on observe un dégagement immédiat de bulles gazeuses, si il n'y a pas de dégagement gazeux la bactérie est catalase négative.

b) Test pour la recherche de l'oxydase :

- Principe:

L'oxydase (enzyme intervenant dans diverses réactions d'oxydo-réduction) agit sur substrat incolore (réactif). Il s'oxyde rapidement en donnant un composé noirâtre.

Technique:

On prélève une colonie bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur et on étale sur un disque imprégné d'une solution aqueuse à 1% d'oxalate N-diméthylparaphénylènediamine.

Lecture:

Dans le cas des bactéries oxydase-positives, la coloration violet foncé apparaît immédiatement puis noircit.

RESULTATS
ET
INTERPRETATIONS

V –1 Etude de l'influence de la composition chimique des eaux d'injection :

Le tableau 6 donne la composition chimique des eaux d'injection provenant des quatre régions (Région d'In-Aménas, de Ohanet, de TFT et de Stah). La composition chimique de l'eau a un rôle important car elle contient les éléments indispensables à la croissance des bactéries [28].

Le pH mesuré se situe entre 7,6 et 8,4, cette limite est favorable pour la croissance des bactéries puisque la plupart d'entre elles se multiplient en milieu neutre ou légèrement alcalin [4].

La salinité des eaux d'injection est de 18,52 g/l (ZR CPE), 1,46 g/l (TFT CS2), et 0,438 g/l pour (549 inj et OTW5), ceci montre que les bactéries sont halotolérantes et ont pu se développer dans un milieu modérément salé.

D'après les résultats de l'analyse chimique des eaux d'injection on remarque qu'elles contiennent les différentes sources d'énergie, de carbone et d'éléments minéraux, ces besoins communs vont permettre aux bactéries de croître et de se multiplier.

Il a été démontré que les éléments multiples sont nécessaires à l'activité enzymatique et ont un rôle catalytique dans la cellule bactérienne [24].

L'utilisation des milieux de culture a permis de connaître les besoins multiples des bactéries, le carbone constitue un des éléments les plus abondants de la bactérie, les hétérotrophes comme les BSR utilisent comme source de carbone l'acide ascorbique ($C_6H_8O_6$) qui peuvent le dégrader par la suite, les Pseudomonas utilisent le glucose comme unique source de Carbone.[11].

Par ailleurs, pour synthétiser leurs protéines qui représentent environ 10% de leur poids sec, les bactéries ont besoin de substances azotées. La source essentielle provient de Sulfate d'Ammonium (NH_4^+), ce qui signifie que la présence des Sulfates d'Ammonium dans un milieu de culture est indispensable.

Parmi les éléments minéraux, le phosphore et le soufre tiennent une place de choix, le premier est incorporé sous forme de phosphate organique, il joue le rôle d'une centrale énergétique à l'échelon cellulaire, il permet la récupération, l'accumulation et la distribution de l'énergie dans la cellule.[5].

Les tampons Phosphatés (K_2HPO_4 , KH_2PO_4) constituent une source élémentaire de phosphore mais permettent également de couvrir une large zone de pH autour de la neutralité.[5].

Il à été montré également que le mécanisme de la réduction des Sulfates en Sulfures fait intervenir des ions de Mg, ces derniers sont fournis par les Sulfates de Magnésium [15]. D'autre part, dans la plupart des milieux de culture, la présence des éléments minéraux comme le calcium, le magnésium, le cobalt, le cuivre, constituent des oligo-éléments nécessaires aux métabolismes bactériens. Ils jouent le rôle de cofacteurs ou d'activateurs enzymatiques.

La présence des Chlorures dans l'eau augmente sa corrosivité , les ions chlorure se combinent avec le Fer Ferrique (Fe^{3+}), il se produit alors le Chlorure Ferrique qui est extrêmement agressif et conduit à des attaques localisées dans les canalisations en acier [25].

Tableau 6 : Résultats de l'analyse chimique des eaux d'injection provenant de quatre région étudiées.

Eléments dosés		Méthodes utilisées	Concentration, mole/l			
pH		Méthodes électrométriques	ZR CPE (In-Aménas) <i>7,63</i>	OTW5 (Ohanet) <i>8,10</i>	CS2 (T.F.T) <i>8,25</i>	549 inj (Stah) <i>8,45</i>
Cations	Ca ²⁺	Complexométrie	1002	98	190	54
	Mg ²⁺		195	63	79	3,6
	Fe ²⁺	Complexométrie	Traces	Traces	Traces	Traces
	Na ⁺	Absorption atomique	5975	199	787	368
	K ⁺		50,6	24	43	45
Anions	Cl ⁻	Volumétrie	11239	266	886	266
	Ba ⁺⁺	Absorption atomique	<i>Traces</i>	<i>Traces</i>	<i>Traces</i>	<i>Traces</i>
	Sr ⁺⁺		36,5	5,20	36,5	11
Anions	HCO ₃ ⁻	Acidimétrie	122	171	164	198
	CO ₃ ²⁻		<i>Traces</i>	<i>Traces</i>	<i>Traces</i>	30
	SO ₄ ²⁻	Gravimétrie	485	494	1349	428

V-2 Evaluation de la flore microbienne des échantillons

- Le dénombrement de la flore bactérienne présente dans les échantillons prélevés est réalisé sur les milieux solides. Ce dénombrement s'effectue grâce à un comptage bactérien par méthodes des dilutions. Le dénombrement des germes isolés nous a permis de faire une étude qualitative des différents points de prélèvement présents dans les quatre régions.

Les résultats obtenus révèlent la présence d'une population bactérienne composée essentiellement des bactéries anaérobies (B.S.R, méthanigènes), et des bactéries aérobies (Pseudomonas, Gallionella, Leptothrix et Thiobacillus)

V-2-1-Dénombrement des espèces bactériennes rencontrées dans la région d'In Aménas

Les concentrations bactériennes présentes dans les différents échantillons prélevés de la région de In Aménas, sont représentés dans l'histogramme 1.

On remarque que toutes les espèces bactériennes isolées sont présentes dans les différents points de prélèvements.

la concentration la plus élevée des BSR ($8,24 \cdot 10^6$ germes/ml) est relevée dans le puits producteur d'eau (ZR 220), dans le bac de stockage (A2 RTI) on a recensé une concentration de $7 \cdot 10^5$ germes/ml et dans le centre producteur d'eau une concentration égales à $37 \cdot 10^3$ germes/ml.

Il a été montré que l'eau qui est en contact avec l'huile est favorable au développement des bactéries anaérobies, telles que les B.S.R qui vont réduire les sulfates en sulfures en utilisant l'hydrogène moléculaire (métabolisme autotrophe) ou l'hydrogène provenant des molécules organiques qui se trouvent dans l'huile [25].

Il ressort de cet histogramme aussi que les trois points de prélèvements sont colonisés par les bactéries méthanigènes et avec de fortes concentrations: $3,5 \cdot 10^6$ germes/ml dans le centre producteur d'eau ZR CPE, $6 \cdot 10^6$ germes/ml dans le bac de stockage A2 RTI, et la concentration la plus élevée est de $10,7 \cdot 10^6$ germes/ml relevée dans le puits d'huile ZR 220.

Il a été montré que l'eau produite avec le brut contient souvent du CO_2 dissous que les bactéries méthanigènes utilisent avec l'hydrogène pour la production de méthane [5].

On remarque souvent l'association des méthanigènes avec les BSR qui leur fournissent la source d'hydrogène et de carbone pour la production du méthane [5].

Les concentrations des Pseudomonas dans le bac de stockage et dans le puits d'huile ZR220 sont presque égales ($11,7 \cdot 10^5$ germes/ml, $11,8 \cdot 10^5$ germes/ml) au niveau du centre producteur d'eau, on relève une concentration de $27 \cdot 10^7$ germes/ml.

R.GABRIDENC a montré que les Pseudomonas étaient très répandues dans les puits d'huile, du fait de leur métabolisme très actif et sont responsables de la transformation de la matière organique de l'huile. Il faut noter que les Pseudomonas peuvent effectuer la respiration anaérobie, en utilisant l'oxygène des nitrates présentes dans l'eau.

Par ailleurs, dans les bacs de stockage, à l'interface eau – huile, il y'a une forte teneur en carbone organique, favorisant ainsi le développement des bactéries hétérotrophes telles que les Pseudomonas. [22].

Les bactéries du fer: Gallionella et Leptothrix se distinguent par une morphologie différente mais leur mode de vie est semblable.

Les Gallionella sont présentes à des concentrations égales ($1,6 \cdot 10^6$ germes/ml) dans le puits d'huile ZR 220 et dans le bac de stockage A2 RTI et une concentration supérieure à 10^5 germes/ml est notée dans le centre producteur d'eau ZR CPE.

On note aussi la présence des Leptothrix avec une concentration supérieure à 10^5 germes/ml dans les trois points de prélèvements.

On remarque une concentration très importante de ces bactéries dans les différents puits. CHARLET et SCHWARTZ, ont montré que ces bactéries se développent dans des eaux qui contiennent peu d'oxygène, peu de fer, mais riches en CO_2 . Le pH est voisin de la neutralité. [3].

Dans le centre producteur d'eau, on note l'absence des bactéries du soufre du genre Thiobacillus, et une concentration élevée est retrouvée dans le bac de stockage A2 RTI , ($7,7 \cdot 10^6$ germes/ml) et dans le puits d'huile ZR 220 une concentration de $45,2 \cdot 10^3$ germes/ml.

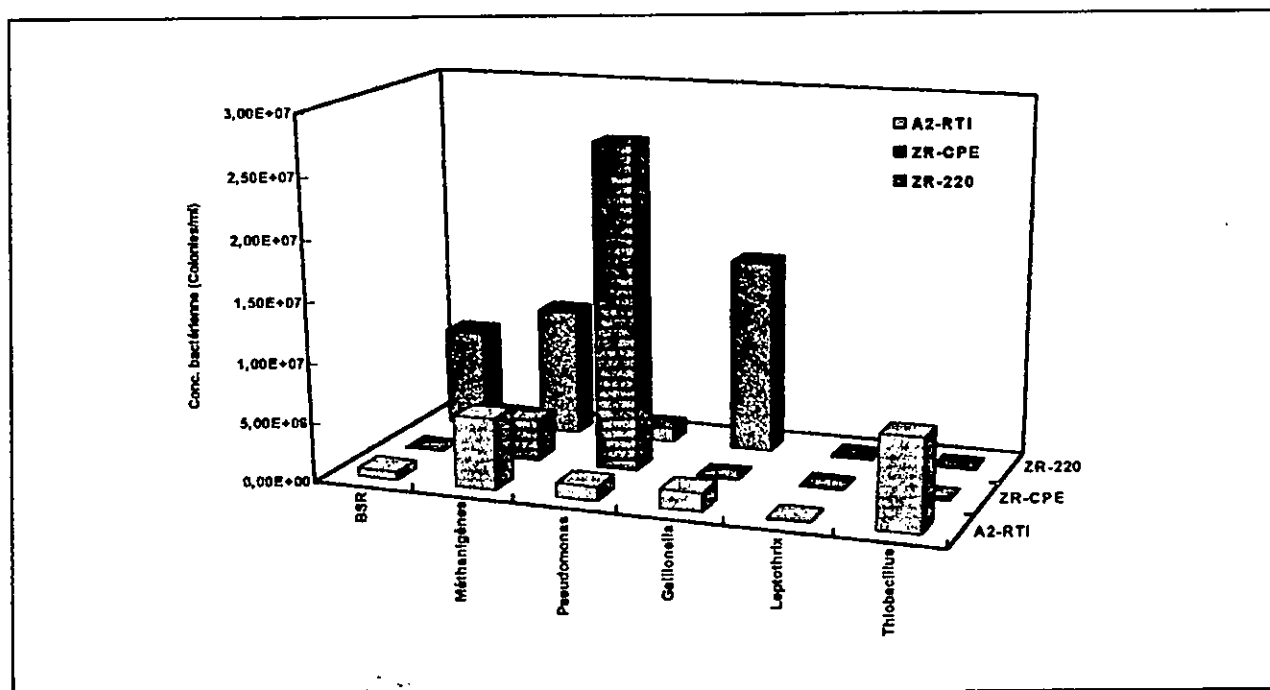
L'eau qui est produite avec le brut contient du H_2S , ce qui implique une condition favorable à la croissance des Thiobacillus qui tirent leur énergie de l'oxydation des sulfures en acide sulfurique (H_2SO_4) corrosif.

Les bactéries sulfato-réductrices participent au cycle biologique du soufre par la réduction des sulfates en sulfures, les Thiobacillus interviennent en oxydant les formes réduites du soufre en acide sulfurique.

En fait, les micro-organismes interviennent en association et généralement une biocénose particulière va s'installer et évoluer en fonction des conditions du milieu. On observe souvent les interventions d'espèces hétérotrophes aérobies telles que les Pseudomonas capables d'attaquer les molécules complexes en consommant l'oxygène et des espèces anaérobies telles que les B.S.R qui vont être stimulées par les métabolites précédemment formés et réduire les sulfates en sulfures[30].

Tableau 7 Résultats des dénombrements des différents groupes bactériens présents dans les échantillons d'eau provenant de la région de In-Aménas.

Groupe bactérien	Points de prélèvement		
	A2 RTI	ZR CPE	ZR 220
BSR	$7 \cdot 10^5$	1370	$8,24 \cdot 10^4$
Méthanigènes	$6 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^4$	$10,7 \cdot 10^4$
Pseudomonas	$11,7 \cdot 10^3$	$27 \cdot 10^6$	$11,8 \cdot 10^3$
Gallionella	$15,3 \cdot 10^3$	10^5	$16,1 \cdot 10^4$
Leptothrix	10^5	10^5	10^5
Thiobacillus	$77 \cdot 10^5$	0	$45,2 \cdot 10^3$



Histogramme n° 1° : Dénombrement des groupes bactériens présents dans les échantillons d'eau provenant de la région de In Aménas

V-2-2-Dénombrement des espèces bactériennes rencontrées dans la région de Ohanet

Les concentrations bactériennes présentes dans les différents puits de la région de Ohanet sont présentées dans l'histogramme 2.

On remarque une prédominance des bactéries anaérobies dans les puits (B.S.R, et bactéries méthanigènes).

Dans le puits producteur d'eau (OTW5), on relève une concentration de 5.10^6 germes/ml de BSR et une absence de celle-ci dans le puits producteur d'huile (OTS9). On recense également une concentration de $3,5.10^2$ bactéries méthanigènes dans le bac de stockage 6101 DTR et des concentrations beaucoup plus élevées dans le puits producteur d'eau OTW5 ($4,8.10^6$ germes/ml) et dans le puits huile OTS9 ($5,8.10^6$ germes/ml).

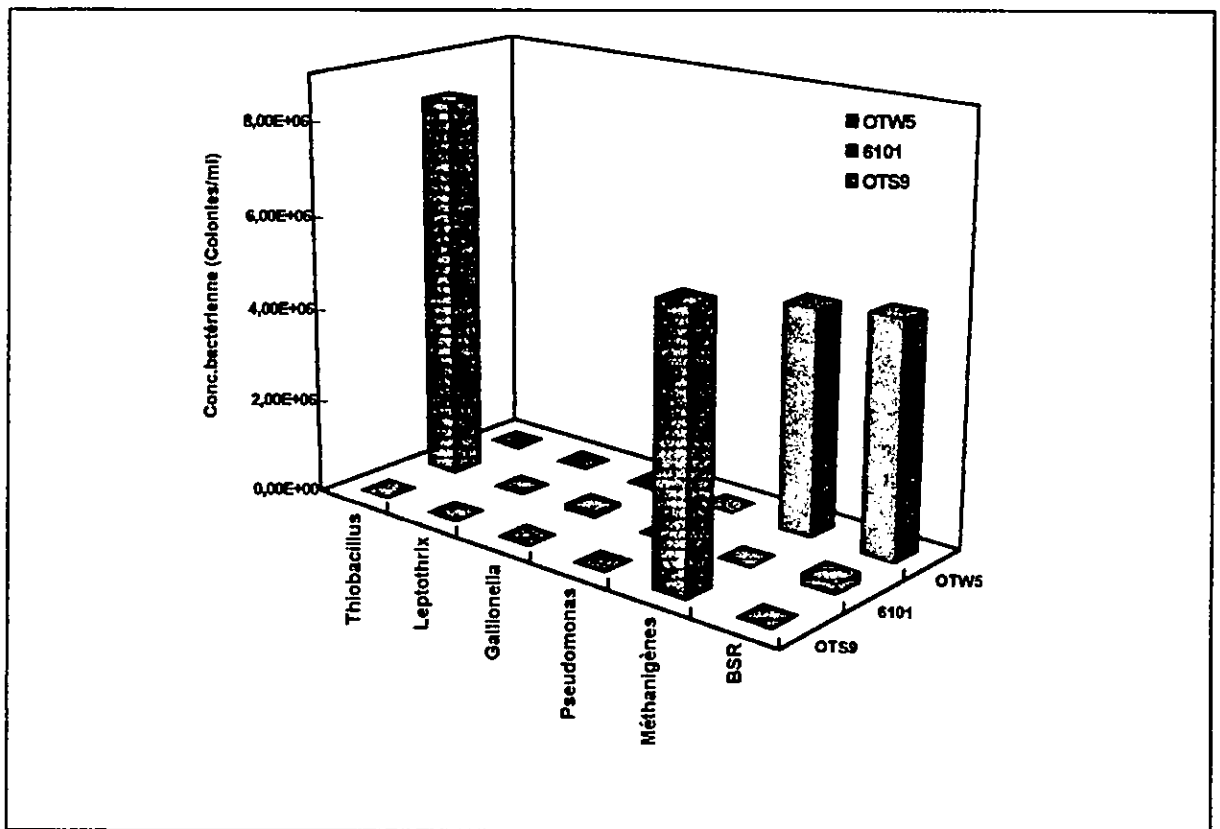
Les bactéries méthanigènes vivent souvent avec d'autres bactéries anaérobies telles que les B.S.R qui leur favorisent en continu l'hydrogène et le gaz carbonique. [5].

Les bactéries aérobies telles que les Pseudomonas, les Leptothrix sont absentes dans la majorité des puits, à l'exception des Gallionella et Thiobacillus qui sont présentes avec une forte concentration dans le bac de stockage 6101 DTR.

Il faut noter que la température optimum de croissance des Gallionella est de 20°C , et qu' en présence d'oxygène elles sont capables d'utiliser le fer ferreux et de le transformer en hydroxyde ferrique hydraté insoluble [26].

Tableau 8 : Résultats des dénombrements des différents groupes bactériens présent dans les échantillons d'eau provenant de la région de Ohanet

Groupe bactérien	Points de prélèvement		
	OTW5	6101 DTR	OTS9
	Concentration bactérienne (Colonies/ml)		
BSR	5.10⁶	217.10³	0
Méthanigènes	48.10⁵	350	58.10⁵
Pseudomonas	0	0	0
Gallionella	0	10⁵	0
Leptothrix	0	0	0
Thiobacillus	0	8,2.10⁴	0



Histogramme n°2: Dénombrement des groupes bactériens présents dans les échantillons d'eau provenant de la région de Ohanet

V-2-3-Dénombrement des espèces bactériennes rencontrées dans la région de T.F.T

Les concentrations bactériennes présentes dans les différents puits de la région de T.F.T sont présentées dans l'histogramme 3.

On a observé la production d'hydrogène sulfuré dans les bacs de stockage par réduction des sulfates, il s'agit d'une action chimioorganotrophe des bactéries sulfato-réductrices [27].

Le bac de stockage R1 abrite également des méthanigènes avec une concentration de 64.10^5 germes/ml et une faible concentration est relevée dans l'eau d'injection CS2 (85 germes/ml).

La présence et une grande teneur en composés organiques dans l'interface eau – huile favorise la croissance des méthanigènes qui tirent leur énergie de la réaction de production du méthane à partir du CO_2 et de l'hydrogène. [3].

La majorité des Pseudomonas est présente dans l'eau d'injection CS2 ($1,5.10^5$ germes/ml) et une concentration inférieure est relevée dans le bac de stockage R1 ($7,3.10^3$ germes/ml).

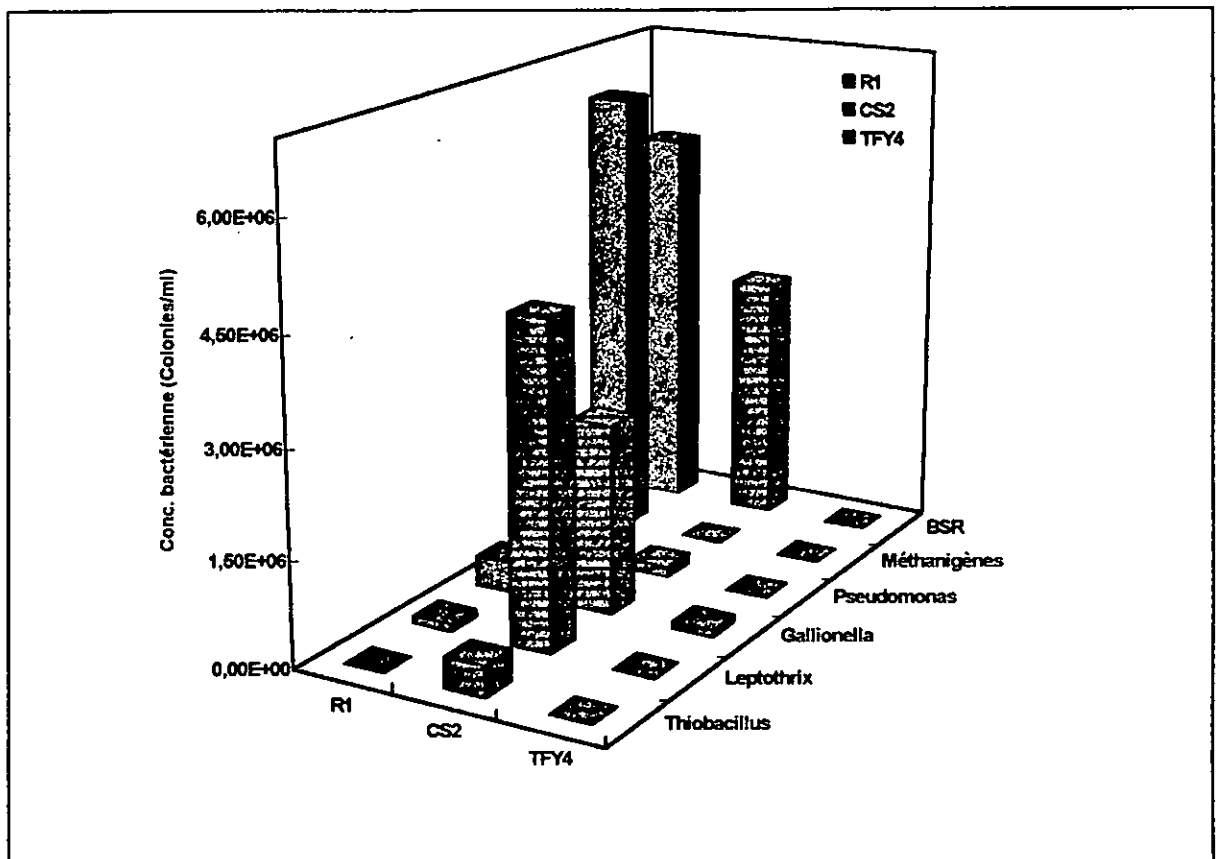
En parallèle, les Thiobacillus sont présentes uniquement dans le bac R1 ($4,4.10^5$ germes/ml).

On remarque que le puits d'huile TFY4 contient uniquement les Gallionella ($>10^5$ germes/ml), dans l'eau d'injection les Leptothrix prédominent avec une concentration de $4,5.10^6$ germes/ml).

Les ferrobactéries s'accrochent aux parois des canalisations, elles jouent le rôle de dépolarisant, et permettent à la corrosion de continuer ou même de s'accélérer. Elles édifient des tubercules pouvant obstruer les conduites et à l'abri desquelles se développent les bactéries sulfato-réductrices qui perforent la conduite avec formation de sulfure de fer. [11].

Tableau 9 : Résultats des dénombrements des différents groupes bactériens présents dans les échantillons d'eau provenant de la région de T.F.T

Groupe bactérien	Points de prélèvement		
	R1	CS2	TFY4
BSR	$55 \cdot 10^5$	$35 \cdot 10^5$	0
Méthanigènes	$64 \cdot 10^5$	85	0
Pseudomonas	$73 \cdot 10^3$	$15 \cdot 10^4$	0
Gallionella	$44 \cdot 10^4$	$27 \cdot 10^5$	10^5
Leptothrix	10^5	$45,810^3$	0
Thiobacillus	0	$44 \cdot 10^4$	0



Histogramme n°3: Dénombrement des groupes bactériens présents dans les échantillons d'eau provenant de la région de T.F.T

V-2-4-Dénombrement des espèces bactériennes rencontrées dans la région de Stah

Les concentrations bactériennes présentes dans les différents puits de la région de Stah sont présentées dans l'histogramme 4.

Dans cette région, on relève des concentrations égales des B.S.R dans le bac de stockage MRK Q6 ($6,26 \cdot 10^2$ germes/ml) et dans le séparateur MRK ($7 \cdot 10^2$ germes/ml) et une concentration beaucoup plus importante dans le puits injecteur 549 ($4,25 \cdot 10^5$ germes/ml.) JONES a montré que l'échantillon d'eau d'injection présente une concentration élevée en B.S.R et que la corrosion tend à augmenter avec le temps de contamination du milieu. [28].

Par contre, on remarque une absence totale des méthanigènes dans l'eau d'injection et une concentration de $22 \cdot 10^2$ germes/ml dans le séparateur et de 171 germes/ml dans le bac de stockage.

Par ailleurs, les résultats des travaux effectués sur l'isolement et le dénombrement des bactéries des eaux profondes ont permis à Bianchi, 1973 de remarquer l'association Des bactéries hétérotrophes aux B.S.R, cela nous permet d'expliquer la présence des Pseudomonas dans le puits injecteur 549 avec une forte concentration ($>10^5$ germes/ml), ces bactéries peuvent être des chimiolithotrophes et utiliser le CO_2 dissous comme source de carbone. On note une absence de ces bactéries dans le bac Q6 et le séparateur MRK.

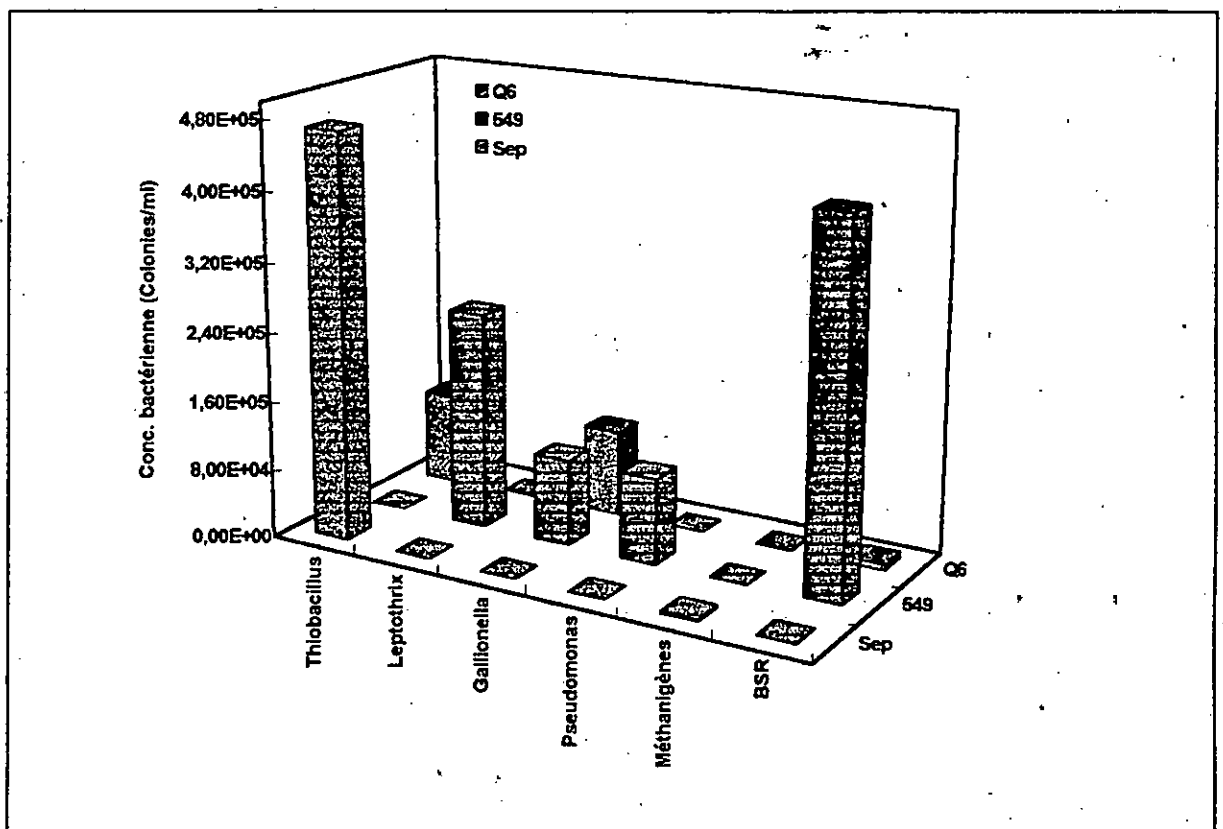
Les Gallionella sont présentes avec des concentrations supérieures à 10^5 germes/ml dans le bac de stockage Q6 et le puits injecteur 549 et sont absentes dans le séparateur MRK.

Les bactéries du fer sont des autotrophes et peuvent se satisfaire de conditions de milieu très pauvres pour leur croissance. Elles peuvent se développer en l'absence de matières organiques avec le gaz carbonique comme source de carbone [20].

En revanche les Thiobacillus sont absentes dans le puits injecteur 549 et on recense une concentration de $10,5 \cdot 10^4$ germes/ml dans le bac de stockage Q6.

Tableau n °10.: Résultats des dénombrements des différents groupes bactériens présents dans les échantillons d'eau provenant de la région de Stah

Groupes bactériens	Points de prélèvement		
	Q6	549 INJ	SEP MRK
BSR	6960	425.10 ³	700
Méthanigènes	171	0	22.10 ²
Pseudomonas	0	10 ⁵	0
Gallionella	10 ⁵	10 ⁵	0
Leptothrix	0	252.10 ³	0
Thiobacillus	105.10 ³	0	47.10 ⁴



Histogramme n°4.: Dénombrement des groupes bactériens présents dans les échantillons d'eau provenant de la région de Stah

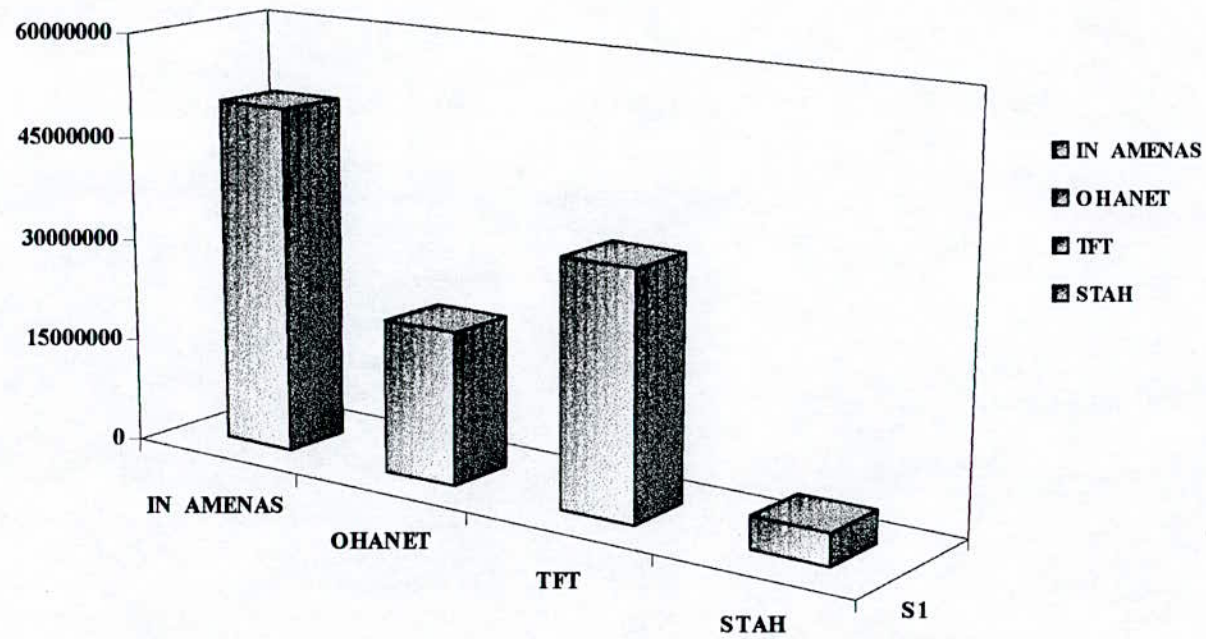
V-2-5-Evaluation de la population bactérienne totale dans les quatre régions

Les concentrations représentées dans l'histogramme 5 montrent que la région la plus contaminée par les bactéries, donc la plus touchée par la corrosion bactérienne est In.Aménas, avec une concentration de 5.10^7 germes /ml.

Qu'elles soient aérobies ou anaérobies, la multiplication de ces bactéries va dans tous les cas être influencée par les conditions du milieu, notamment le pH, la température, la salinité, la source d'énergie.

tableau 11: tableau représentant les concentrations totales des bactéries isolées en fonction des régions étudiées

Régions	Concentrations bactériennes (germes/ml)
In -Aménas	5.10^7
Ohanet	$22,12.10^6$
T.F.T	$34,73.10^6$
Stah	$46,8.10^5$



Histogramme n°5 : histogramme représentant les concentrations des bactéries isolées dans les quatre régions

V-3-Identification bactériologique des souches isolées

L'analyse bactériologique effectuée sur les différents échantillons d'eau à montré que celle ci présente une population bactérienne hétérogène.

V-3-1 Mise en évidence des bactéries sulfato-réductrices :

Les résultats des observations macroscopiques des BSR sont consignés dans les tableaux 12, 13, 14 et 15.

On remarque que les échantillons qui proviennent du puits d'huile (ZR 220) et du bac de stockage(A2 RTI) de la région de In-Aménas présentent les plus grandes concentrations en BSR.

Dans la région de Ohanet la concentration la plus importante (10^7 germes/ml) est relevée au niveau du puits d'huile (OTW5), le bac de stockage (R1) et l'eau d'injection (CS2) de TFT des concentrations qui dépassent 10^5 germes/ml) et on note une absence de culture dans le puits d'huile (TFY4).

Par ailleurs, dans la région de Stah, les BSR sont dominantes dans l'eau d'injection (549) avec une concentration de $8,5 \cdot 10^5$ germes/ml.

On distingue plusieurs types de bactéries, les caractéristiques macroscopiques sont variables d'un type à l'autre, nous avons recensé des bactéries dont le diamètre est < 1 mm, alors que d'autres ont un diamètre > 1 mm, la couleur est blanche ou jaune à l'exception d'un seul type de colonie de couleur orange (B.B.3.1.0H). Quant à la forme, celle ci est variable, elle est circulaire, filamenteuse ou irrégulière.

Par ailleurs, il existe une uniformité dans les caractéristiques macroscopiques comme la surface, l'élévation et la consistance.

l'examen au microscope optique par la caractérisation au bleu de Méthylène montre que les BSR sont des bactéries cocciformes, la coloration de Gram à révélé une prédominance des bactéries Gram négatif.

TABLEAU 12 : caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries sulfato- réductrices isolées à partir des différents échantillons de la région de In Aménas

Echantillons	ZR 220	ZR 220	ZR CPE	ZRCPE	A2 RTI
Dénombrement (germes/ml)	$8,1 \times 10^6$	$8,38 \times 10^6$	$1,6 \times 10^3$	$1,72 \times 10^4$	7×10^5
Forme	Circulaire à bords irrégulière	Circulaire	Circulaire à bords irrégulière	Circulaire	Circulaire à bords irrégulière
Diamètre	> 1mm	< 1mm	> 1mm	< 1 mm	> 1 mm
Couleur	Blanchâtre	Blanchâtre	Blanchâtre (centre jaune)	Blanchâtre (centre jaune)	Blanchâtre
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque
Élévation	Plate	Plate	Plate	Plate	Plate
Surface	Plissée	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse	Plissée
Consistance	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme
Codification	B.H.5.1	B.H.5.2	B.I.2.1	B.I.2.2	B.B.5.1
Coloration au bleu de Méthylène	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Coloration de Gram	G ⁺	G ⁻	G ⁺	G ⁻	G ⁻

exemple de codification des BSR: **B.H.5.1**

B : BSR
H : Puits d'huile
5 : Dilution 5
1 : N° de la colonie

Tableau 13 : Caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries sulfotréductrice isolées à partir des différents échantillons de la région de Ohanet.

Echantillons	6101 DTR	6101 DTR	OTW5	OTW5
Dénombrement (germes/ml)	$13,2 \times 10^4$	$30,2 \times 10^4$	$1,5 \times 10^6$	$8,5 \times 10^6$
Forme	Circulaire	Circulaire	circulaire	Circulaire
Diamètre	> 1mm	< 1mm	> 1mm	<1mm
Couleur	Orange	Blanchâtre	Blanchâtre	Blanchâtre
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque
Surface	Convexe	Plate	Plate	Plate
Élévation	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse	Sèche
Consistance	Visqueuse	Ferme	Ferme	Ferme
Codification	B.B.3.1	B.B.3.2	B.I.5.1	B.I.5.2
Coloration au bleu de Méthylène	Cocci	Cocci	Coccobacille	Coccobacille
Coloration de Gram	G ⁻	G ⁻	G ⁺	G ⁺

Tableau14 : Caractérisations macroscopiques et microscopiques des BSR isolées à partir des différents échantillons de TFT

Echantillons	TFT R1	TFT R1	TFT CS2	TFT CS2
Dénombrement (germes/ml)	$2,1 \times 10^6$	$8,9 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6$	$6,10 \times 10^6$
Forme	Filamenteuse	Circulaire	Filamenteuse	Circulaire
Diamètre	> 1mm	< 1mm	> 1mm	< 1 mm
Couleur	Blanchâtre (centre orange)	Blanchâtre	Blanchâtre orange au centre	Blanchâtre
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque
Surface	Rugueuse	Rugueuse sèche	Rugueuse	Rugueuse sèche
Élévation	Convexe	Plate	Convexe	Plate
Consistance	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme
Codification	B.B.5.1	B.3.5.2	B.I.5.1	B.I.5.2
Coloration au bleu de Méthylène	Cocci en chaîne	Coccobacille	Cocci en chaîne	Coccobacille
Gram	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻

Tableau 15 : Caractérisations macroscopiques et microscopiques de BSR isolées à partir des différents échantillons de région de Stah

Echantillons	MRKQ6	MRKQ6	MRK Q6	549 inj	549 inj	SEP MRK	SEP MRK	SEP MRK
Dénombrement (germes/ml)	$1,8 \times 10^2$	$0,7 \times 10^2$	$16,3 \times 10^2$	$1,6 \times 10^5$	$6,9 \times 10^5$	$0,7 \times 10^3$	$0,8 \times 10^2$	$19,5 \times 10^2$
Forme	circulaire	Filamenteuse irrégulière	irrégulière	circulaire	irrégulière	circulaire	Filamenteuse irrégulière	irrégulière
Diamètre	> 1 mm	> 1 mm	< 1mm	> 1mm	< 1mm	> 1 mm	> 1 mm	< 1mm
Couleur	Jaune (orange au centre)	blanche	jaune	Jaune (foncé au centre)	Jaune	Jaune (orange au centre)	blanche	jaune
Opacité	opaque	opaque	opaque	opaque	Opaque	opaque	opaque	opaque
Surface	Rugueuse	Rugueuse	plate	Rugueuse brillante	Rugueuse	Rugueuse	rigueuse	plate
Élévation	convexe	convexe	convexe	convexe	Plate	convexe	convexe	convexe
Consistance	ferme	Ferme	ferme	ferme	Ferme	ferme	Ferme	ferme
Codification	B.B.1.1.	B.B.1.2.	B.B.1.3.	B.I.4.1.549	B.I.54.2.549	B.S.1.1.	B.S.1.2.	B.S.1.3.
Coloration au bleu de méthylène	Cocci en chaîne	Cocci	Cocci en chaîne	Cocci	Cocci	Cocci	cocci	Cocci en chaîne
Coloration de Gram	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻

Dans la région de Stah, les BSR sont dominantes dans l'eau d'injection (549) avec une concentration de $8,5 \cdot 10^5$ germes/ml

V-3-2- Mise en évidence des bactéries méthanigènes

Les résultats de l'identification macroscopique et microscopique des méthanigènes sont représentés dans les tableaux 16, 17 et 18.

On note la présence d'une concentration supérieure à 10^6 germes/ml dans les trois points de prélèvements de In-Aménas, également dans le puits d'huile (OTS9) et le puits producteur d'eau (OTW5) de Ohanet à l'exception du bac de stockage (6101 DTR) qui contient une concentration de $3,5.10^2$ germes/ml de bactéries méthanigènes.

Le bac de stockage R1(TFT) contient le nombre le plus élevé des bactéries méthanigènes et on note une absence de culture dans le puits d'huile TFY4 (TFT), dans le bac de stockage Q6 (Stah) et dans le puits injecteur 549 (Stah).

On note la présence de quatre types de colonies bactériennes qui se distinguent par la couleur et l'élévation et qui présentent une uniformité dans certaines caractéristiques macroscopiques comme le diamètre, la forme, l'opacité et la surface. L'aspect des colonies bactériennes est illustré sur la photo N°2. Par des colorations de Gram et au bleu de Méthylène, nous avons observé la morphologie cellulaire des différentes colonies, on remarque une prédominance des cocci par rapport au coccobacilles. Quant au Gram, il est soit positif, soit négatif.

Tableau 16 : Caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries Méthanigènes isolées à partir des différents échantillons de In-Aménas.

Echantillons	A2RTI	ZR CPE	ZR 220
Dénombrement(germes/ml)	6×10^6	$3,5 \times 10^6$	$10,7 \times 10^6$
Forme	Circulaire	circulaire	Circulaire à bords irrégulière
Diamètre	< 1mm	< 1mm	< 1 mm
Couleur	Orange	Orange	Orange
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque
Surface	Sèche	Sèche	Rugueuse
Elévation	Plate	Plate	Convexe
Consistance	Ferme	Ferme	Ferme
Codification *	M.B.5.1	M.I.5.1	M.H.5.1
Coloration au bleu de Méthylène	Cocci	Cocci	Cocci en chaîne
Coloration de Gram	G ⁻	G ⁻	G ⁻

**Tableau 17 : caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries
méthanigènes isolées à partir des différents échantillons de Ohanet**

Echantillons	6010 DTR	OTW5	OTS9
Dénombrement (germes/ml)	3,5 x 10 ²	4,8 x 10 ⁶	5,8 x 10 ⁶
Forme	Circulaire	Circulaire	Circulaire à bords irrégulière
Diamètre	< 1mm	< 1mm	< 1 mm
Couleur	Blanchâtre	Blanchâtre	Orange
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque
Surface	Sèche	Sèche	Rugueuse
Élévation	Plate	Plate	Convexe
Consistance	Ferme	Ferme	Ferme
Codification	M.B.1.1	M.I.5.1	M.H.5.1
Coloration au bleu de Méthylène	Cocci en chaîne	Cocci	Cocci
Coloration de Gram	G ⁻	G ⁻	G ⁻

Tableau 18 : Caractérisations macroscopiques et microscopiques des bactéries méthanigènes isolées à partir des différents échantillons des régions TFT et Stah.

Echantillons	TFT R1	TFTCS2	TFTCS2	SEP MRK	MRK Q6
Dénombrement (germes/ml)	64 x 10 ⁵	56	114	22 x 10 ²	17,1 x 10 ¹
Forme	Circulaire	Circulaire à bord irrégulière	Circulaire	Circulaire	Circulaire
Diamètre	< 1mm	1 mm	1 mm	< 1 mm	< 1 mm
Couleur	Blanche	Orange (noir au centre)	Blanchâtre (marron au centre)	Marron	Marron
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque
Surface	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse
Élévation	Convexe	Convexe	Convexe	Convexe	Convexe
Consistance	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme
Codification	M.B.5.1	M.I.1	M.I.2	M.S.1.1	M.B.1
Coloration au bleu de Méthylène	Cocci	Coccobacille	Coccobacille	Cocci	Cocci
Coloration de Gram	G ⁺	G ⁻	G ⁺	G ⁺	G ⁻

V-2-3 Mise en évidence des Pseudomonas

Les résultats de l'analyse microbiologique mettant en évidence les Pseudomonas sont présentés dans le tableau 19 et 20.

A la température de 37°C et après 48 h d'incubation, nous avons obtenu une croissance des Pseudomonas dans les boîtes de pétri.

On remarque que les Pseudomonas sont présentes avec une forte concentration dans la région de In-Aménas, par contre on note une absence totale dans la région de Ohanet, dans le puits d'huile TFY4 (TFT) et dans le bac de stockage Q6 (Stah) et dans l'eau d'injection 549 (Stah).

Les caractéristiques macroscopiques montrent la présence de deux types de colonies bactériennes, le premier genre est de couleur blanchâtre, de diamètre < 1 mm et convexe, le deuxième genre est de couleur jaune, de diamètre > 1 mm et d'élévation plate, par ailleurs il existe une uniformité dans certaines caractéristiques comme la forme, l'opacité, la surface et la consistance (Photo N°3).

La coloration au bleu de Méthylène et de Gram révèlent que les bactéries sont des bâtonnets, Gram négatif.

Tableau 19 : Caractérisation macroscopiques et microscopiques des Pseudomonas isolées à partir des différents échantillons de la région de In- Aménas.

Echantillons	A ₂ RTI	ZRCPE	ZR 220
Dénombrement (germes/ml)	11,7 x 10 ⁵	11,8 x 10 ⁵	2,7 x 10 ⁵
Forme	Circulaire	circulaire	Circulaire
Diamètre	< 1mm	< 1mm	< 1mm
Couleur	Blanchâtre	Faune	Blanchâtre
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque
Surface	Lisse brillante	Brillante	Lisse brillante
Élévation	Convexe	Plate	Convexe
Consistance	Ferme	ferme	Ferme
Codification	P.B.3.1.IN	P.I.5.1.IN	P.H.5.1.IN
Coloration au bleu de Méthylène	Bâtonnet	bâtonnet	bâtonnet
Coloration de Gram	G ⁻	G ⁻	G ⁻

Tableau 20 : Caractérisations macroscopiques et microscopiques des Pseudomonas isolées à partir des différents échantillons des régions de TFT et Stah.

Echantillons	TFT R1	TFT CS2	549 inj
Dénombrement (germes/ml)	7,3 x 10 ³	1,5 x 10 ⁵	> 10 ⁵
Forme	Circulaire	Circulaire	Circulaire
Diamètre	< 1mm	1mm	< 1mm
Couleur	Blanchâtre	Jaune	Blanchâtre
Surface	Lisse brillante	Brillante	Lisse brillante
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque
Élévation	convexe	Plate	Convexe
Consistance	Ferme	Ferme	Ferme
Codification*	P.B.1.1	P.I.3.1	P.I.5.1
Coloration au bleu de Méthylène	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet
Coloration de Gram	G ⁻	G ⁻	G ⁻

V-3-4 Mise en évidence des Gallionella :

Les résultats de l'observation macroscopique et microscopique des Gallionella sont présentés dans les tableaux 15 et 16. Les Gallionella sont incubées à une température de 20°C pendant 3 jours.

On remarque que ces bactéries sont toutes présentes avec des concentrations supérieures à 10^5 germes/ml, et que l'absence de culture est notée dans le puits d'huile OTS9 et dans le puits producteur d'eau OTW5 de la région de Ohanet et aussi dans le séparateur MRK (Stah).

On distingue trois types de colonies bactériennes, les caractéristiques macroscopiques diffèrent d'un type à l'autre. Les bactéries sont opaques ou transparentes, de diamètre supérieur ou inférieur à 1mm, la forme est circulaire ou irrégulière (Voir photo N°4). l'examen au microscopique optique montre que les Gallionella sont des coccobacilles, Gram négatif

Tableau 21 : caractérisations macroscopiques et microscopiques des Gallionella isolées à partir des différents échantillons de la région d'In- Aménas.

Echantillons	ZR 220	A2 RTI		ZR CPE
Dénombrement (germes/ml)	$16,1 \times 10^5$	$6.7 \cdot 10^5$	$24 \cdot 10^5$	$> 10^5$
Forme	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Irrégulière
Diamètre	< 1mm	> 1mm	< 1mm	> 1mm
Couleur	Blanchâtre	Transparente (blanchâtre au centre)	Blanchâtre	Blanchâtre (transparente)
Opacité	rugueuse	rugueuse	rugueuse	Lisse
Surface	Opaque	Translucide	Opaque	Translucide
Elévation	Convexe	Convexe	Convexe	Plate
Consistance	Ferme	Ferme	ferme	Ferme
Codification	G.H.5.1.	G.B.5.1	G.B.5.2.	G.I.5.1
Coloration au bleu de Méthylène	Coccobacille	coccobacille	coccobacille	Coccobacille
Coloration de Gram	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻

Tableau 22: caractérisations macroscopiques et microscopiques des Gallionella isolées à partir des différents échantillons des régions de Ohanet, de TFT et de Stah.

Echantillons	6101 DTR	TFT R1	TFT CS2	TFY4	MRK Q6	549 inj
Dénombrement (germes/ml)	$> 10^5$	$4.4.10^5$	$27,9 \times 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$
Forme	Irrégulière	Irrégulière	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Circulaire
Diamètre	$> 1 \text{ mm}$	$> 1 \text{ mm}$	$> 1 \text{ mm}$	$< 1 \text{ mm}$	$< 1 \text{ mm}$	$< 1 \text{ mm}$
Couleur	Blanchâtre (transparente)	Blanchâtre (transparente)	Transparente (blanchâtre au centre)	Blanchâtre transparente	Blanchâtre	Blanchâtre
Opacité	Lisse	Lisse	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse
Surface	Translucide	Translucide	Translucide	Opaque	Opaque	Opaque
Élévation	Plate	Plate	Convexe	Convexe	Convexe	Convexe
Consistance	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme
Codification	G.B.5.1.	G.B.4.4.	G.I.5.1.	G.H.5.1.	G.B.5.1.	G.I.5.1.
Coloration au bleu de Méthylène	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille	Coccobacille
Coloration de Gram	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻

V-2-5 Mise en évidence des Leptothrix

Les résultats de l'analyse bactériologique sont rassemblés dans le tableau 23 à la température de 37°C et après 3 jours d'incubation, il y'a absence de culture dans toutes les boites de pétri.

On recense des concentrations supérieures à 10^5 germes/ml dans les trois puits de In-Aménas et dans l'eau d'injection CS2 (TFT) et une absence de culture dans les autres points de prélèvements.

A la température de 32 °C, la lecture montre une croissance des bactéries dans les boites de pétri. L'observation macroscopique révèle la présence de deux types de colonies bactériennes, les bactéries ont l'aspect plat, opaques ou translucides (Voir photo N°4).

Les techniques de colorations de Gram et au bleu de Méthylène révèlent des bactéries Gram négatif, de forme bacillaire ou en bâtonnet.

Tableau 23 : caractérisations macroscopiques et microscopiques des Leptothrix isolées à partir des différents échantillons.

Echantillons	ZR 220	ZR CPE	A2RTI	TFT CS2	TFTR1	549 inj
Dénombrement (germes/ml)	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	45×10^5	$> 10^5$	2.52×10^5
Forme	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Circulaire
Diamètre	> 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm
Couleur	Blanchâtre transparente	Blanchâtre	Blanchâtre	Blanchâtre	Blanchâtre transparente	Blanchâtre
Surface	Lisse	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse
Opacité	Translucide	Opaque	Opaque	Opaque	Translucide	Opaque
Élévation	Plate	Convexe	Convexe	Convexe	Convexe	Convexe
Consistance	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme
Codification	L.H.5.1.	L.I.5.1.	L.B.5.1.	L.B.5.8.	L.I.5.1.	L.I.5.1.
Coloration au bleu de Méthylène	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet	Bâtonnet
Coloration de Gram	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻

V-2-6 Mise en évidence des Thiobacillus

Le tableau 24 rassemble les tests d'identification macroscopique et microscopique réalisés sur les Thiobacillus. A une température de 32°C et après 5 jours d'incubation, la lecture des boîtes de pétri nous a permis d'observer les colonies bactériennes.

Les concentrations des Thiobacillus varient entre 10^4 et 10^5 germes/ml dans les puits cités (tableau 24) et on remarque une absence totale de ces bactéries dans le centre de production d'eau ZR CPE (In-Aménas), dans le puits producteur d'huile OTS9 et le puits producteur d'eau OTW5 de Ohanet dans l'eau d'injection CS2 et le puits d'huile TFY4 de TFT et également dans le puits producteur d'eau 549 (Stah).

On distingue un seul type de bactérie, l'observation macroscopique a mis en évidence des colonies circulaires de couleur blanchâtre, transparente et de surface rugueuse.

L'observation microscopique révèle la présence de bacilles incurvés Gram négatif.

Tableau 24 : Caractérisations macroscopiques et microscopiques des Thiobacillus isolées des différents échantillons.

Echantillons	A2RTI	ZR 220	6101 DTR	TFT R1	SEPMRK	MRK Q6
Dénombrement (germes/ml)	$7.7.10^5$	45.10^4	$8.2.10^4$	$4.4.10^5$	$4.7.10^5$	$10.5.10^4$
Forme	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Circulaire	Circulaire
Diamètre	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm	< 1 mm
Couleur	Blanchâtre transparente	Blanchâtre transparente	Blanchâtre transparente	Blanchâtre transparente	Blanchâtre transparente	Blanchâtre transparente
Surface	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse	Rugueuse
Opacité	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
Elévation	Convexe	Convexe	Convexe	Convexe	Convexe	Convexe
Consistance	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme	Ferme
Codification	T.B.5.1.IN	T.H.5.3.IN	T.B.4.1.OH	T.I.5.1.TFT	T.S.5.1.ST	T.B.4.1.ST
Coloration au bleu de Méthylène	Bâtonnets incurvé	Bâtonnets incurvé	Bâtonnets incurvé	Bâtonnets incurvé	Bâtonnets incurvé	Bâtonnets incurvé
Coloration de Gram	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻

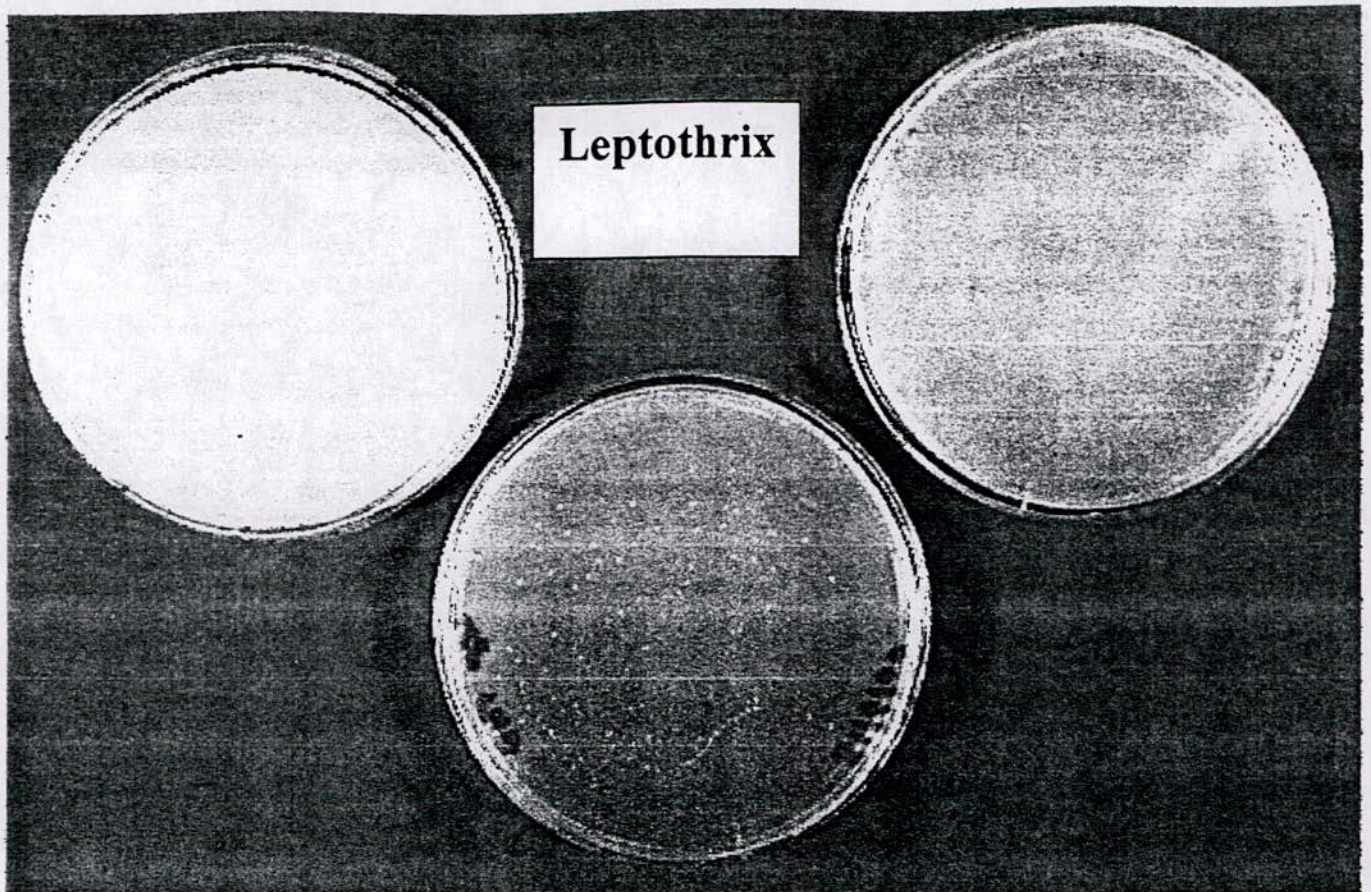


Photo n°1: Photo montrant une culture sur boîtes de Pétri des Leptothrix ,

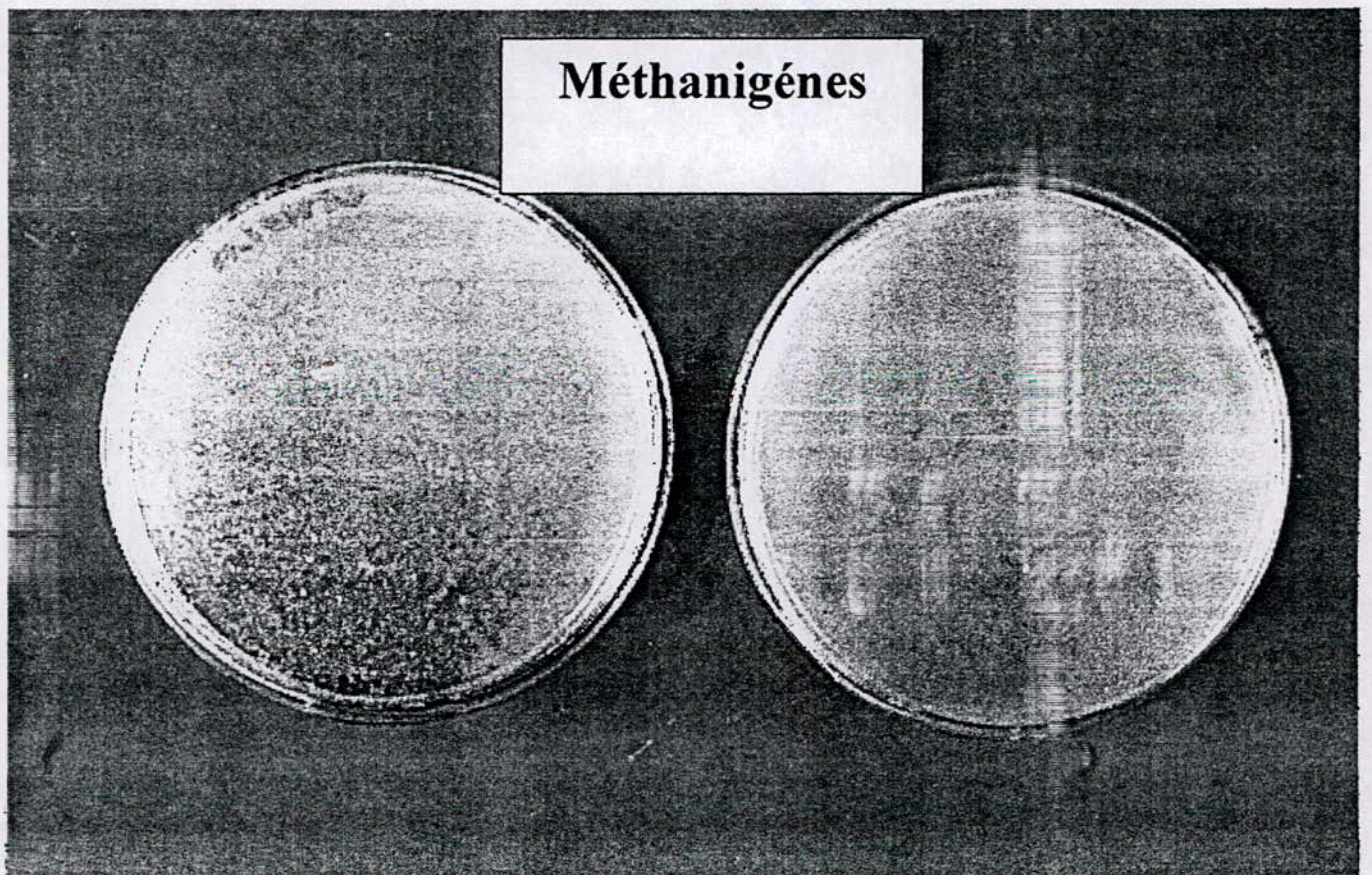
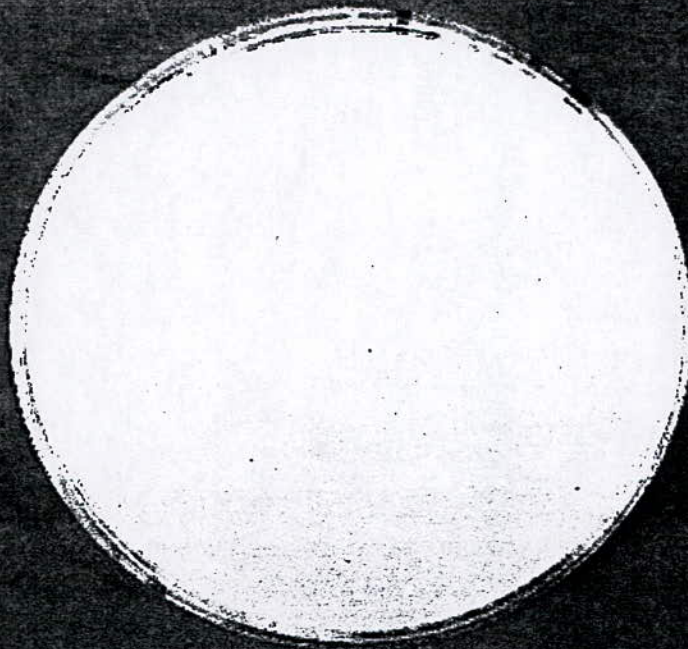


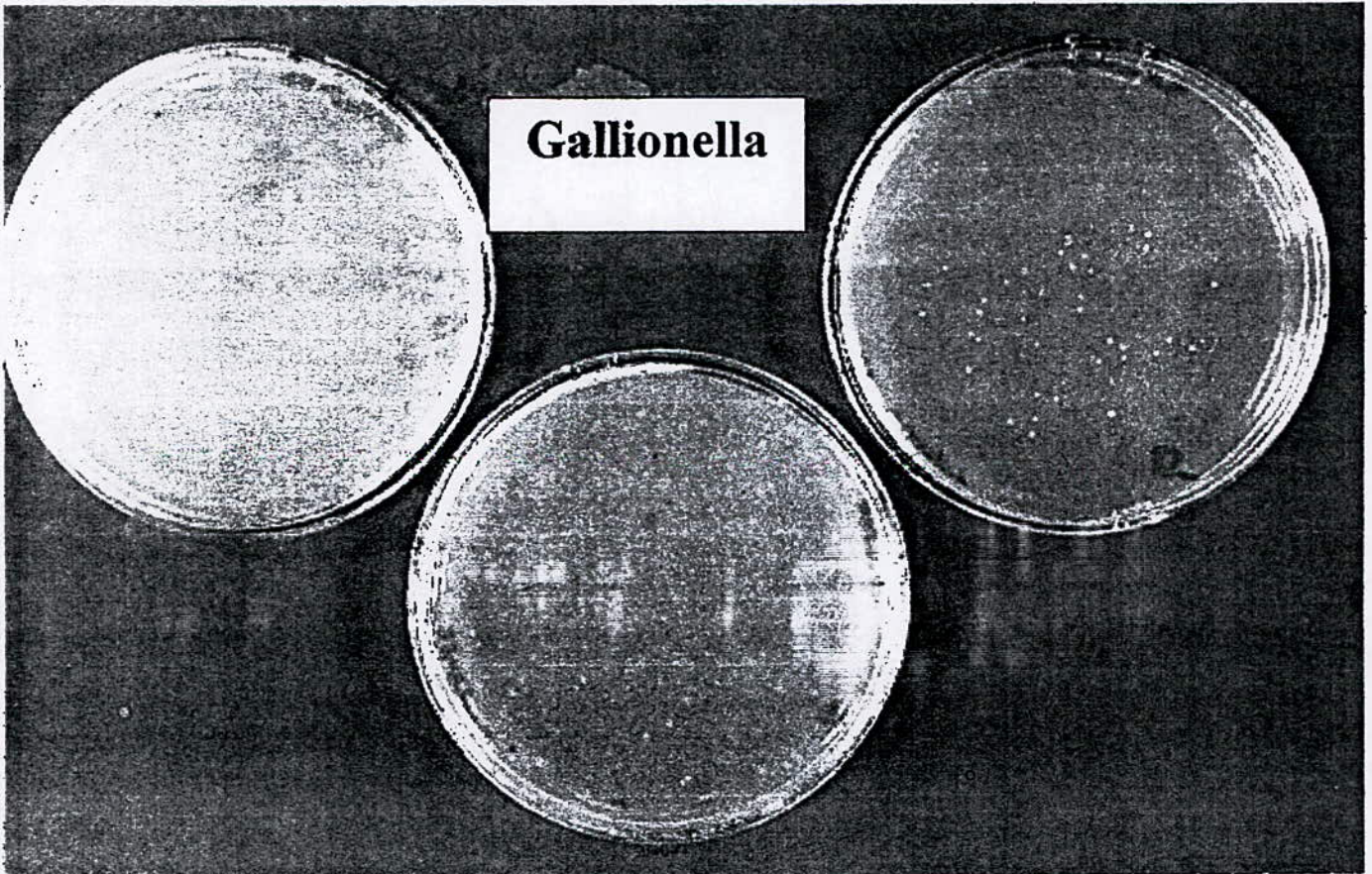
Photo n°2: Photo montrant une culture sur boîtes de Pétri des méthanigènes

Pseudomonas



Photos n°3: Photo montrant une culture sur boites de Pétri des Pseudomonas.

Gallionella



Photos n°4: Photo montrant une culture sur boites de Pétri des Gallionella.

V-3-7 Etude de l'identification des BSR incubées à 60°C

Le but de cette partie expérimentale est de mettre en évidence le caractère thermophile des BSR.

La température d'incubation influe considérablement sur la croissance des BSR, en effet le temps d'incubation des BSR à 37°C et de 21 jours, par contre à une température de 60°C et après 3 jours d'incubation on remarque que les boîtes de pétri sont colonisées totalement par les BSR.

Il a été montré qu'une bactérie thermophile se développera très lentement si elle est cultivée dans un incubateur réglé à 37°C

Les résultats des observations macroscopiques et microscopiques des BSR incubées à 60°C sont rassemblés dans le tableau 19

Pour les ensemencements on a choisi les échantillons qui proviennent des bacs de stockage: A2RTI, 6101 DTR, R1, Q6.

L'observation macroscopique a mis en évidence des colonies circulaires de couleur jaune, < 1mm, opaque et de surface rugueuse.

L'examen microscopique révèle la présence de coccobacilles, Gram négatif.

Tableau 25: Observation macroscopique des BSR incubées à 60°C

Echantillons	A2RTI	6101DTR	TFT R1	Q6
Dénombrement (germes/ml)		> 10 ⁵		Absence de culture
Forme		Circulaire		
Diamètre		< 1mm		
Couleur		Jaune		
Surface		Rugueuse		
Opacité		Opaque		
Coloration de Gram		G ⁻		
Elévation		Convexe		
Consistance		Ferme		
Coloration au bleu de Méthylène		Coccobacilles		

V-3- Résultats des tests respiratoires des souches isolées :

Les résultats du test de la recherche de la catalase et de l'oxydase sont représentés dans le tableau 26, on remarque que les BSR et le méthanigènes sont catalase négative et oxydase négative et que les Pseudomonas, Gallionella, Leptothrix , Thiobacillus sont catalase positive et oxydase positive

Ce test d'identification à une importance capitale pour confirmer le type respiratoire d'une bactérie en effet toutes les bactéries poussant en aérobiose sont catalase positive et oxydase positive [23].

Tableau 26: Résultats du test de la recherche de la Catalase et de l'oxydase

Bactéries/tests	BSR	Metanigènes	Pseudomonas	Gallionella	Leptothrix	Thiobacillus
Catalase	-	-	+	+	+	+
Oxydase	-	-	+	+	+	+

Conclusion

A l'issue de cette étude qui porte sur la taxonomie des bactéries responsables de la biodétérioration des matériaux dans l'industrie pétrolière, il ressort une présence d'une importante population hétérogène.

Ainsi, l'étude bactériologique effectuée sur les eaux provenant des différentes régions (In-Aménas, Ohanet, T.F.T, Stah) et à différents niveaux du réseau pétrolier nous a permis de constater une diversité dans les genres bactériens.

La mise en évidence des bactéries réalisée sur les échantillons d'eau a révélé la présence des bactéries anaérobies strictes, telles que les BSR et les bactéries méthanigènes et des bactéries aérobies strictes telles que les Pseudomonas, les bactéries du fer : Gallionella et Leptothrix et les bactéries du soufre du genre Thiobacillus.

Les bactéries rencontrées diffèrent par l'aspect macroscopique (couleur, forme) et microscopique (morphologie cellulaire).

Toutefois l'étude qualitative pour l'évaluation de la contamination bactérienne au niveau des quatre régions, nous a révélée que la région de In-Aménas présente la contamination la plus élevée (5.10^7 germes/ml).

L'étude taxonomique a permis de recenser toutes les bactéries pouvant être responsables de la dégradation des matériaux, il serait intéressant dans l'avenir de tracer un moyen de lutte contre celles-ci afin de réduire ou de supprimer les coûts liés à la réparation ou au remplacement des équipements.

Recommandations :

- ◆ Pousser l'identification jusqu'à l'espèce.
- ◆ Connaître le métabolisme des bactéries isolées afin d'avoir le maximum de renseignements sur leur mode de d'action
- ◆ Faire une culture mixte des bactéries en développant un film bactérien sur une surface métallique

Bibliographie

- [1] **M.Magot**
« Introduction à la microbiologie des bactéries », Biodégradation des matériaux .
Ed C.I.R.S.E.E , lyonnaise des eaux , pp 28-47 , 1998 .
- [2] **R. Bergey**
« Bergey's manuel of systmatique bacteriology » , 9^{ème} édition , vol 1 , pp 663-679 , 1984 .
- [3] **J.Pelment**
« Bactéries et environnement , adaptation physiologique » Ed . presse universitaire
de Grenoble , vol 1 , pp 224 -230 ,533 ,1993 .
- [4] **n.Leclerc**
« Microbilogie générale , Ed Doin , pp 196-199 , 1975.
- [5] **R. Cobridenc , C. Gatellier , H.Leclerc et O. Kaiser**
« Dégradation microbienne des matériaux » publication de l'association des ingénieurs en
anticorrosion , Ed. Technip . pp 23-30 , 53-60 , 127-130 , 1974.
- [6] **J.P.Larpent**
« Manuel pratique de microbiologie » , Ed. Paris Herman , pp 44-50 , 1985.
- [7] **M.Mayer**
« Cours de microbiologie générales . » , Paris. Doin Editeurs . pp12-18 , 1984.
- [8] **W.LEE et COLL**
Corrosion of mild steel underneath aerobic biofilms containing sulfat-reducing bactéria »
Biofouling , vol 7 , pp217-239 , 1993.
- [9] **A. ROOS**
«Précis de métallurgie appliquée» , 3^{ème} Ed Paris , Tech et doc Lavoisier
pp 100-103 , 1982.
- [10] **L.e service et les spécialistes «PROCHINOR» de l'industrie pétrolière**
CECA Ed Blanchard , pp 23,24,35 , 1976.
- [11] **IWONA.B.Beech**
« La corrosion microbienne» , Rev. Biofutur , pp 36-40 , N°186 , Février .1999.
- [12] **Marc Neveux**
« La corrosion des conduites d'eau et de Gaz » , causes et remèdes , Ed EYROLLES .
Paris , pp215-220 , 1968.

- [13] **Y.Bergey**
« Corrosion et inhibition des puits et collectes », Chambre syndicale de la corrosion et de la production du pétrole et du Gaz , Ed.technique , pp72-73 , 1981.
- [14] **J.GUEZENEC,Ph.FERA**
« Utilisation de techniques bactériologiques et biochimiques pour l'étude du biofilm bactérien » , Rev de l'institut français du pétrole , vol 42 , N°5 , Septembre-Octobre ,1987.
- [15] **J. Cordonnier et al**
« Corrosion bactérienne et protection , application au circuit d'eau de refroidissement »
Ed C.I.R.S.E.E , Lyonnaise des eaux, pp1-10 ,1995.
- [16] **C.G.Peng et J.K.Park**
« Electrochemical mecanismes of corrosion » , departement of civil and environnement engineering , vol 28 , N°8,pp 1681-1692 , 1994.
- [17] **Jean-Louis Crolet**
« Corrosion bactérienne dans l'industrie pétrolière », Biodétérioration des matériaux , Ed C.I.R.S.E.E., Lyonnaise des eaux , pp267-268 , 1998.
- [18] **D.Féron , D.Thierry**
« Corrosion bactérienne des matériaux », Ed. C.I.R.S.E.E , Lyonnaise des eaux
pp 89-91 , 1998.
- [19] **J.Chanterau**
« Corrosion bactérienne et bactéries de la corrosion » , Tech et doc Paris
pp 20-25 ,N°153 , 1980.
- [20] **Susan.Watkins Borenstein**
« Microbiologically influnced corrosion handbook » , Ed Woodhead Publishing Limited
Combridge , England .1998.
- [21] **H.Leclerc et al**
« Mlcrobiologie appliquée » , Ed Doin , pp 37,552-53 , 1977.
- [23] **N.Marechal**
« Milieux de cultures et réactifs de laboratoire » , Biologie appliquée , Ed Doin
pp 239-241 , Avril ,1981.
- [24] **J.Y.Leveau**
« Les micro-organismes d'intérêt industriel » , Ed Tech et doc Lavoisier
pp 520-522 , 1993.
- [25] **S.Thomas,, J.F.Larpent**
« Contribution bactérienne à la corrosion et à la protection des métaux » , corrosion science ,vol 17 , N°9 , pp 753-764 , 1977.

- [26] **K.Emde et al**
« Initial investigation of microbiologically influenced corrosion in a low temperature water distribution system », water resherche , vol 26 , N°2 , pp168-175 , 1992
- [27] **I.Guillaume , J.Grimaudeau , J.Brisau**
« Contribution bactérienne à la corrosion et à la protection des métaux »
Corrosion Science , vol 17 , N°9 , pp 753-764 , 1977.
- [28] **M.L.GANA**
« Etude de la corrossivité des souches de bactéries sulfato- réductrices et leur inhibition par des bactéries antagonistes » , Thèse de magister , ENP , 1998.
- [29] **J.P.Larpent , M.larpent**
« Mémento technique de microbiloie » , Tech et doc Lavoisier
2^{ème} Edition , pp 24-25 , 1990.
- [30] **S.Daumas , J. P.Crousi er.**
« Influence des bactéries sulfato-réductrices actives sur le potentiel de corrosion d'un acier » , Métaux , Corrosion , Industrie ,vol 12 ,pp 547-550 ,1996.
- [31] **J.R.Postegate**
« Manuel de traitement des eaux d'injection » , Ed Technip , pp 62-73 , 1973
- [32] **H.J.Rehm ,G.Reed**
« Source of industriel microorganisms » , Biotechnology , vol 2 , pp 358-360 , 1980.
- [33] **J.Rodier**
« L'analyse de l'eau: eaux naturelles , eaux résiduaires , eaux de mer » , 7^{ème} ed Dunod
pp 456-460 , 555 ,1984.
- [34] **H.Leclerc , D.A.A.Mossel**
« Microbiologie du tube digestif , l'eau et les aliments » ,Ed Doin , pp 34,52; août , 1989
- [35] **A.P.I (Américan petrolium institu)**
« A.P.I recommended practice for biological analysis of subsurface injection water »
pp 2-7 , 1965.
- [36] **W.A..Hamilton**
« The sulfate reducing bactéria , their physiology and conséquent ecology » BC 91
pp 1-6 , 1995.
- [37] **R.Colas**
« Dictionnaire technique de l'eau et des questions » , Ed Connexes , 1968.

- [38] **H.T.ributsch , J.A.Rojas , C.C.Bartels , A.Ennaoui et W.Hofmann.**
« Role of transient Iron sulfide films in microbial corrosion of steel » CorrosionScience
vol 54 , N°3 , pp217 , Mars 1998 .
- [39] **Von Wolzogen Kur , Van Der Vlugt**
« Water » Rev , vol 18 , pp147 , 1934.

ANNEXE

Les méthodes utilisées pour l'analyse physico-chimique de l'échantillon

1 Mesure de la variation du pH

1. 1. Principe

La différence de potentiel existant entre une électrode en verre et une électrode de référence (calomel - KCl saturé) plongeant dans une même solution est une fonction linéaire du pH. La méthode consiste en la mesure d'une différence de potentiel, qui s'effectue à l'aide d'un pH - mètre [35].

1. 2. Appareillage

- Électrode de verre : à l'intérieur se trouve l'électrode de référence formant le relais (calomel - KCl). La partie utile de l'électrode de verre est formée par une ampoule sphérique de 1 cm de diamètre contenant un liquide interne de remplissage (HCl).
- Dispositif potentiométrique : spécialement conçu pour la mesure du pH, alimenté en courant continu constant.
- Prise d'essai: 10ml de volume.
- Agitateur magnétique.

1. 3. Mode opératoire

On prélève à l'aide d'une pipette une prise d'essai de 10 ml est introduite dans un bêcher propre. L'électrode du pH-mètre est rincé avec de l'eau distillée, le bêcher est placé sous une agitation magnétique. ensuite, l'électrode du pH-mètre est introduite dans l'échantillon., La valeur sera affichée par l'appareille, après stabilisation.

2. Dosage simultané du calcium et du magnésium par complexométrie

2. 1. Principe

La complexométrie est l'ensemble des méthodes de dosage volumétrique de certains ions métalliques basés sur l'emploi du réactif organique dit complexant. L'utilisation de deux indicateurs permet de doser successivement le calcium et la magnésium.

2. 2. Mode opératoire

A 25 ml d'eau d'injection à analyser, trois gouttes de triéthanol amine (T.E.A), quelques millilitres d'eau distillée, 3ml de KOH à (20%) et une pincé de calquons sont mélangés, a cette solution, on ajoute goutte à goutte la quantité nécessaire d'E.D.T.A, jusqu'au virage en

bleu. On note le volume V_1 de l'E.D.T.A. La concentration de Ca^{2+} en mg/l est donnée par la formule de calcul suivante:

$$[Ca^{2+}] = \frac{V_1 \cdot N \cdot 40,08 \cdot 10^3}{PE}$$

V_1 = Volume d'EDTA versé en ml

N = Normalité de la solution d'EDTA

$40,08 \cdot 10^3$ = masse atomique du calcium en mg

PE = prise d'essai en ml.

Pour le dosage du magnésium on prend 25 ml d'eau d'injection à analyser, un mélange à 3ml d'une solution tampon (NH_4OH , NH_4Cl) à pH = 10, 3 gouttes de noir ériochrome à 0,5% et quelques gouttes de triéthylène amine (T.E.A). Une quantité nécessaire de solution (E.D.T.A) est ajoutée jusqu'au virage du rouge vin au bleu. Le volume V_2 d'EDTA versé est noté. La formule de calcul suivante donnant la concentration de Mg^{2+} en mg/l est utilisée.

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

V_2 = Volume en ml nécessaire au titrage de la somme Ca^{2+} et Mg^{2+}

V_1 = Volume en ml nécessaire au titrage du calcium [Ca^{2+}]

N = Normalité de la solution d'EDTA

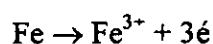
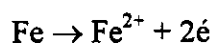
PE = Prise d'essai de l'eau à analyser

$24,32 \cdot 10^3$ = Masse atomique du magnésium en milligramme.

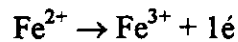
3. Dosage du fer par complexométrie

3. 1. Principe

Le fer total dissous est dosé sous forme de fer ferrique. Le fer ferreux (Fe^{2+}) est oxydé en fer ferrique (Fe^{3+}) par l'acide nitrique, selon les réactions suivantes:



Le fer bivalent est oxydé suivant la réaction suivante:



En présence d'acide sulfosalicylique, les ions ferriques produisent une coloration rouge, La complexation de ces dernières à l'EDTA induit la disparition de la coloration rouge.

3. 2. Réactifs utilisés

- ◆ Acide chlorhydrique dilué à 1/3 avec de l'eau distillée.
- ◆ Acide nitrique dilué à 1/3 avec de l'eau distillée.
- ◆ Solution d'acide sulfosalicylique: préparée par dissolution de 20 g d'acide sulfosalicylique ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_8\text{S}$) dans 1000ml d'eau distillée.
- ◆ Solution d'hydroxyde de potassium ou de sodium à 20%.
- ◆ Solution d'EDTA à 0,01N

3. 3. Mode opératoire

Avec une pipette, 50 ml d'eau à analyser sont prélevés dans un bêcher de 250 ml. On ajoute 15 gouttes d'acide chlorhydrique. Ensuite on chauffe à ébullition sur une plaque chauffante. Après on ajoute 15 gouttes d'acide nitrique et on remet à ébullition.

Après refroidissement et à l'aide d'un pH-mètre, le pH de la solution est ramené à la valeur de 2,5 avec une solution d'hydroxyde. Puis on ajoute 5 ml d'acide sulfosalicylique. S'il y a une coloration rouge, on fait un titrage à l'EDTA jusqu'à la disparition de la coloration rouge et on note le volume V d'EDTA consommé.

La concentration en fer total dissous en mg/l, mesurée par un spectrophotomètre (DR/2000) est donnée par l'expression:

$$[\text{Fe}]_{\text{TOT}} = \frac{V \cdot N \cdot 55,8 \cdot 10^3}{PE}$$

V = Volume d'EDTA consommé.

N = Normalité de la solution d'EDTA.

$55,85 \cdot 10^3$ = Masse atomique du fer en mg.

4. La mesure de la concentration du Potassium et du Sodium

La densité optique des solutions étalons de concentrations connues C_1 , C_2 , C_3 , C_4 et C_5 ainsi que celle de la solution témoin contenant l'élément considéré est mesuré à l'aide d'un spectromètre atomique.

La détermination de la concentration de l'élément à doser est facilitée par l'utilisation d'une courbe étalon donnant la densité optique de l'élément à doser (figure n° 8) en fonction de la concentration de l'élément à doser.

Les conditions de la détermination de la concentration du potassium sont les suivantes:

- La longueur d'onde 767nm,
- Sensibilité avec une concentration donnant une absorption de 1%: 2×10^8 mg,
- Limite de détection avec la plus petite concentration fournissant un signal double du bruit de fond: 2×10^8 mg.

Les conditions physico-chimiques de détection du sodium:

- Longueur d'onde: 589nm,
- Flamme: air / C_2H_2 ,
- Sensibilité: 0,005mg/l.

4. 1. Principe

Les spectres d'absorption atomique d'un élément sont observés en faisant passer un faisceau lumineux d'une source à spectre continu à travers une couche nuageuse renfermant des atomes libres de cet élément.

Les atomes passent à l'état excité en absorbant des photons dont l'énergie est égale à la différence entre les niveaux énergétiques.

La méthode d'adsorption atomique est basée sur la loi de « Lambert-beer ».

$$\text{Log } I_0 / I = K.L.C. = D.$$

D = densité optique,

K = coefficient d'adsorption,

L = longueur du trajet optique,

C = concentration de l'élément à doser dans la solution,

I = intensité de la radiation après la traversée de la flamme,

I_0 = intensité de la radiation incidente.

4. 2. Mode opératoire

On prélève 100ml d'eau distillée acidifiée par 1 ml d'acide nitrique et on porte à ébullition. Après refroidissement le volume est ramené à 100 ml.

Des dilutions nécessaires sont effectuées. On ajoute une quantité de nitrate de strontium pour que sa concentration soit de 0,5% dans la dilution qui sera utilisée.

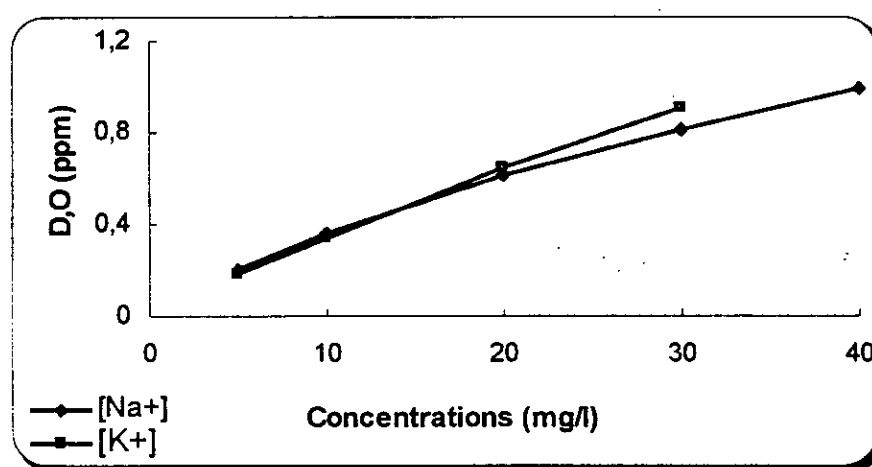


Figure n° 8: montrant la. Courbe d'étalonnage du spectromètre utilisé pour La détermination des concentrations de $[Na^+]$ et $[K^+]$

5. Mode opératoire du dosage des chlorures par volumétrie

A une prise d'essai de 25 ml d'eau à analyser, on ajoute quelques gouttes de chromate de potassium (K_2CrO_4) à 10 %. Puis on titre goutte à goutte avec la solution de nitrate d'argent ($AgNO_3$) 0,1N jusqu'à coloration rouge brique.

La concentration des ions chlorures est donnée en mg/l par la formule suivante:

$$[\text{Cl}] = \frac{V.N.35,457.10^3}{PE}$$

V = volume en ml de AgNO₃ nécessaire à la titration.

N = normalité de la solution de AgNO₃,

35,457.10³ = la masse atomique du chlore en milligramme.

PE = Prise d'essai de l'eau à analyser en ml.

6. Dosage des carbonates et bicarbonates par Acidimétrie

6. 1. Principe

La méthode consiste à déterminer le volume d'acide nécessaire pour neutraliser à un pH = 8,3 puis à un pH = 4,3., le volume d'acide nécessaire à la neutralisation à pH = 8,3 est proportionnel à la concentration en carbonates CO₃²⁻ dans l'eau et à pH = 4,3 correspond à la concentration en ions bicarbonates HCO₃⁻.

6. 2. Mode opératoire

Verser une prise d'essai de 50 ml (échantillon d'eau) dans un bêcher, placé sur un agitateur électromagnétique. Ensuite, on mesure le pH de cette solution à l'aide d'un pH-mètre électrode de référence en verre et une solution tampon à pH=10.

Si le pH est supérieur à 8,30, il y a présence de carbonates (CO₃²⁻) dans l'échantillon.. On titre, alors, avec l'acide chlorhydrique à 0,05N, jusqu'à un pH =8,30. Puis, on note le volume d'HCl ajouté.

Si le pH est inférieur à 8,30, il y a dans ce cas des bicarbonates (HCO₃⁻). On titre avec HCl à 0,05N, jusqu'à ce que l'on obtienne un pH de 4,30. De même, le volume d'acide ajouté est noté.

Les concentrations en carbonates et bicarbonates exprimés en mg/l sont données par les expressions suivantes:

$$[\text{CO}_3] = \frac{V.N.60^3}{PE}$$

$$[\text{HCO}_3] = \frac{V.N.6.10^3}{PE}$$

N = normalité de la solution d'acide,

$60 \cdot 10^3$ = masse en mg de CO_3^{2-} ,

$61 \cdot 10^3$ = masse en mg de HCO_3^- ,

V = volume d'acide en ml nécessaire à la neutralisation à pH = 8,3,

V' = volume d'acide en ml nécessaire à la neutralisation à pH = 4,3,

PE = volume de la prise d'essai en ml

7. Mode opératoire du dosage des sulfates par gravimétrie

Après une prise d'essai avec une pipette de 50 ml de l'échantillon, on ajoute 50 ml d'eau distillée, quelques gouttes d'ammoniaque, une goutte d'Hélianthine à 3% et de l'acide chlorhydrique en excès.

Sur une plaque chauffante (Réf. Labovolt), on porte à ébullition puis on ajoute goutte à goutte la solution de BaCl_2 à 10%. On porte de nouveau à ébullition pendant cinq minutes, pour obtenir de gros cristaux de sulfate de baryum.

On laisse se reposer puis on filtre la solution. Le précipité obtenu et le papier filtre sont lavés à l'eau distillée, afin d'éliminer les chlorures résiduels.

Par la suite, le précipité et le filtre sont mis dans un creuset en platine on les porte au four jusqu'à la température de 850°C . Après refroidissement on pèse et on note le poids (P_1). Après la pesée, le creuset est remis au four pendant une heure à 850°C , on refroidit puis de nouveau on pèse et on note le poids (P_2).

La concentration en ions sulfate en mg/l est donnée par la formule suivante:

$$[\text{SO}_4^{2-}] = \frac{\Delta P \cdot 10^3 \cdot 411,5}{PE}$$

$\Delta P \cdot 10^3$ = masse du précipité en milligramme,

PE = prise d'essai en ml,

411,5 = facteur de conversion de BaSO_4 en SO_4^{2-} .

8- la composition des milieux de conservation est la même que celle des milieux de culture