

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
DEPARTEMENT DE GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Laboratoire des Biotechnologies Environnementales
et Génie des Procédés (BIOGEP)



Thèse

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTORAT ES SCIENCES
EN : GENIE DE L'ENVIRONNEMENT,
Option : BIOTECHNOLOGIES

PRESENTEE Par:

Mohamed Lamine GANA

Thème

**ETUDE DE L'INHIBITION DE LA CROISSANCE DES
BACTERIES DE LA CORROSION ISOLEES DES EAUX DES
CHAMPS PETROLIERS PAR DES COMPOSES CHIMIQUES ET
BIOLOGIQUES**

Président :	M.	T. AHMED ZAID	Professeur	ENP
Examineurs :	Mme	N. ABDI	Professeur	ENP
	M.	R. BAKOUR	Professeur	USTHB
	M.	M. KERKAR	Professeur	U.Mira /Béjaia
	M.	A. PAUSS	Professeur	UTC.Compiègne
Directeurs de thèse :	M.	N. MAMERI	Professeur	ENP
	M.	H. LOUNICI	Professeur	UMMTO

JUIN - 2011

A la mémoire de mes grands parents

REMERCIEMENTS

Gracie!

Voici donc la fin de cette thèse et de toute une expérience humaine et scientifique que je porterai toujours dans mon coeur.

Mais avant de commencer votre lecture, je vous invite à découvrir tous les gens qui ont participé à ce travail, qui m'ont appris une infinité de choses et qui m'ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment.

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre la société Sonatrach/Division Laboratoires (ex : Centre de Recherche et Développement) et le Laboratoire des Biotechnologies environnementales et génie des procédés BIOGEP.

Je tiens à remercier Mme Boumenjel, Directeur de la Division Laboratoires /Sonatrach, et son prédécesseur M. Siaci d'avoir accepté la prise en charge de cette thèse.

Sans les facilités accordées par la Direction Traitement des Hydrocarbures, le présent travail n'aurait pu être réalisé. Que Monsieur Adjeb et son prédécesseur M. Longou, Directeurs TRH, trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance et mes remerciements.

Que serait une thèse sans un directeur de thèse, je tiens donc à remercier chaleureusement les miens, les Professeurs Mameri et Lounici, pour m'avoir fait confiance à l'issue de mon magistère et pour m'avoir dirigé sur ce sujet passionnant. Optimisme, pragmatisme et disponibilité ne sont pas leurs moindres qualités.

J'ai été très sensible à l'honneur que m'a fait M. Ahmed Zaid Toudert, Professeur à l'ENP, en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Un grand merci tout particulier à M. Pauss, Professeur à l'Université de Technologie de Compiègne, de m'avoir fait l'honneur de faire partie de ce jury.

Un grand merci à Mme Abdi, Professeur à l'ENP de m'avoir fait l'honneur de faire partie de ce jury.

Mes remerciements vont aussi à M. Bakour, Professeur à L'USTHB, pour avoir bien voulu être examinateur de cette thèse malgré ses multiples tâches.

Je tiens à exprimer ma plus vive gratitude à M. Kerkar, Professeur à l'université Ahmed Mira de Béjaia, d'avoir accepté de se déplacer pour être examinateur de cette thèse et d'y avoir consacré du temps en dépit de ses multiples engagements.

Au terme de ma thèse, je tiens à adresser mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail, donc à tout le personnel des Laboratoires CRD et plus particulièrement les équipes de TRH.

Je voudrais remercier mes parents

Tout d'abord pour m'avoir mis au monde, c'est un bon début ! Puis,

Je voudrais remercier particulièrement ma mère pour m'avoir accompagnée tout au long de mon long parcours scolaire, pour m'avoir appris à lire.

Non, je n'ai pas oublié mon père Beba, merci pour m'avoir montré la voie des Sciences.

Je voudrais également remercier ma grande et très chère famille, Rachid, Nena, Naguib, Halim, Wassila, Linda, Said, Houria et Mourad ainsi que ma joyeuse belle- famille pour leur soutien et leur encouragement tout au long de toutes ces années.

Une thèse est une période avec de bons moments et d'autres qui le sont moins. Ce sont dans ces derniers que l'on reconnaît le véritable soutien.

Ma chère épouse Hassiba, ton aide scientifique et moral m'a été précieux, je te dirais tout simplement que tu es une femme exemplaire et exceptionnelle, mes chers enfants, Walid, Nassim et Kamel, toutes mes excuses de vous avoir délaissés de temps à autre. Je vous remercie du fond du coeur d'avoir supporté mes caprices et petites absences.

Merci d'avoir été toujours là à côté de moi et au fond de mon coeur.

Cette thèse représente donc l'aboutissement de plusieurs années de travail mais aussi le début d'une nouvelle vie qui, je l'espère, sera consacrée à la recherche,

Au terme de ma thèse, je tiens à adresser mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Résumé

L'objectif principal de notre étude consiste à l'application des relations bactériennes antagonistes pour traiter un type de corrosion induite par les bactéries sulfurogènes (BSR et BTR) sur des installations pétrolières. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'étude de l'effet antagoniste de deux souches de référence appartenant au genre *Bacillus*. Les résultats obtenus ont démontré le caractère inhibiteur exercé sur les bactéries sulfatoréductrices (BSR) et les bactéries thiosulfatoréductrices (BTR).

Une souche antagoniste autochtone dénommée B21 a été isolée, à partir d'une eau de gisement du champ pétrolier d'In-amenas. Il s'agit d'une espèce dominante aérobie facultative, halophile, exigeant une concentration en NaCl supérieur à 5% (p/v). Les résultats de l'analyse phylogénétique basée sur le séquençage partiel de l'ARNr 16S assignent la souche B21 au genre *Bacillus*. Le nom de *Bacillus* sp (EMBL, FR671419) est donné à cette nouvelle souche. L'effet inhibiteur de la souche B21 a été comparé avec succès à celui d'un inhibiteur chimique (biocide à base de THPS).

L'étude de l'effet inhibiteur de *Bacillus* sp est également étudiée dans une boucle de monitoring de la corrosion bactérienne. Les résultats ont démontré une action inhibitrice sur les BSR et BTR confirmant ainsi le fort potentiel d'application de la souche B21 comme agent de lutte biologique contre la corrosion au sein de l'industrie pétrolière.

Mots clés : *Bacillus*, antagoniste, BSR, BTR, eau d'injection, eau de gisement, biocide

Abstract

The main objective of our study is the application of bacterial antagonist's relations to treat a type of corrosion caused by bacteria (SRB and TRB) in oil facilities. We are particularly interested to study the antagonistic effect of two reference strains of the genus *Bacillus*. The results obtained have demonstrated that *Bacillus* strain exerted inhibition against the sulphate-reducing bacteria (SRB) and thiosulphate reducing bacteria (TRB).

An indigenous antagonistic strain called B21 was isolated from a field water oil field of In-amenas. It is a dominant species facultative aerobic, halophilic, requiring a NaCl concentration greater than 5% (w / v). The results of phylogenetic analysis based on partial sequencing of RNA16S of B21 strain assigned to the genus *Bacillus*. The name *Bacillus* sp (EMBL, FR671419) is given to this new strain. The inhibitory effect of strain B21 was successfully compared with that of a chemical inhibitor (biocide containing THPS).

The study of the inhibiting effect of *Bacillus* sp was studied in a loop of monitoring of bacterial corrosion. The results showed an inhibiting action on the SRB and TRB.

Keys words: *Bacillus*, antagonist, SRB, TRB, water injection, water oilfield, biocide

ملخص

في هذه الدراسة ركزنا على تنفيذ مبدأ العلاقات المضادة بين الأحياء الدقيقة لمعالجة حالة التآكل البيولوجي للمنشآت البترولية. وفي هذا السياق، تم في المرحلة الأولى من الدراسة اختبار مدى تأثير عملية منع لسالتين مرجعتين من *Bacillus* ضد بكتيريا التآكل. وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها، بأن *Bacillus* بدلت عملية ضد بكتيريا المرجعات للكبريت.

وفي عملية عزل ميكروبيولوجي من ماء تم الحصول عليه من إن أميناس البترولية، تحصلنا على سلالة أصلية سميت B21 تنمو في وسط غذائي غني بالملح. وأظهرت التحاليل التي أجريت على RNA16S، بأن التسلسل الجيني لسلالة B21 هو *Bacillus*. وتمت تسمية هذه السلالة الجديدة *Bacillus* sp (EMBL, FR671419).

وفي المرحلة الثانية من الدراسة تمت مقارنة التأثيرات المنع لسلالة B21 (المعالجة البيولوجية) ومادة كيميائية (biocide). وأظهرت النتائج أن المعالجة البيولوجية أكثر فعالية ضد بكتيريا التآكل. وقد أبرزت دراسة نموها العلم (coculture) مع البكتيريا B21 انخفاضا في إنتاج الكبريت. نتائج هذه الدراسة تشير إلى إمكانية استعمال سلالة B21 لمكافحة البيولوجية ضد التآكل البكتيري للمنشآت الصناعية النفطية.

كلمات: مادة كيميائية مضادة، بكتيريا التآكل، المعالجة البيولوجية، *Bacillus*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE UN : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.1. BIOCORROSION	5
1.1.1. Mécanismes de la biocorrosion.....	6
1.1.1.1. Production des substances corrosives par les bactéries de la corrosion.....	7
1.1.1.2. Dépolarisation cathodique par les bactéries sulfato- réductrices.....	7
1.1.1.3. Effet de l'aération différentielle sur la corrosion d'un métal.....	8
1.1.2. Influence du soufre sur le développement de la biocorrosion.....	9
1.1.3. Autres mécanismes proposés pour expliquer la biocorrosion des matériaux	10
1.1.4. Rôles d'autres types de bactéries dans la corrosion des aciers	10
1.2. LES BACTERIES DE LA CORROSION	11
1.2.1. Les bactéries sulfato- réductrices (BSR).....	11
1.2.1.1. Généralités sur les bactéries sulfato- réductrices.....	11
1.2.1.2. Taxonomie et classification.....	12
1.2.1.3. Métabolisme des bactéries sulfato- réductrices.....	14
1.2.1.3.1. La réduction dissimilatrice et assimilatrice du sulfate.....	15
1.2.1.3.2. Assimilation des sulfates par les B.S.R	16
1.2.1.4. Les facteurs influençant la prolifération des bactéries sulfurogènes.....	17
1.2.1.5. Mécanismes réactionnels des bactéries sulfurogènes dans la corrosion.....	17
1.2.1.6. Rôles des hydrogénases dans la corrosion des aciers	18
1.2.2. Les bactéries thiosulfatoréductrices (BTR).....	19
1.2.3. Les bactéries nitrifiantes.....	19
1.3. BIOFILM	21
1.3.1. Composition biochimique et minérale.....	21
1.3.2. Influence du biofilm sur la biocorrosion.....	22
1.3.3. Interaction bactéries du biofilm et matériaux.....	22
1.3.4. Nature des biofilms et leur formation	24
1.3.4.1. Film primaire	25
1.3.4.2. Adhésion réversible	26
1.3.4.3. Adhésion irréversible	26
1.3.5. Conséquences du biofilm.....	27
1.3.6. Détection des biofilms	28

1.4. LUTTE CONTRE LA BIOCORROSION.....	29
1.4.1. Antagonisme bactérien (traitement biologique).....	29
1.4.2. Inhibition par les Bacillaceae	29
1.4.3. Inhibition par les bactéries réductrices de nitrate.....	30
1.4.3.1. Mécanisme de l'inhibition par les bactéries réductrices de nitrate.....	32
1.4.4. Biocides (traitement chimique).....	33
1.4.4.1. Utilisations des biocides.....	34
1.4.4.2. Applications et actions des traitements chimiques.....	35
CHAPITRE DEUX : MATERIEL ET METHODES.....	38
2.1. ECHANTILLONNAGES DES EAUX, MILIEUX DE CULTURES UTILISES ET METHODES DE DOSAGE.....	38
2.1.1. Analyses physico-chimiques des échantillons d'eau.....	40
2.1.2. Milieux de cultures utilisés et techniques de dénombrements.....	40
2.1.1.1. Milieux de culture utilisés pour le dénombrement.....	40
2.1.1.2. Dénombrement des bactéries corrosives.....	41
2.1.1.3. Préparation des dilutions.....	42
2.1.3. Méthodes de dosage par spectrophotométrie.....	42
2.1.3.1 Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des bactéries de la corrosion	43
2.2. INHIBITION DES BACTERIES DE LA CORROSION PAR UN INHIBITEUR BIOLOGIQUE DU GENRE <i>Bacillus</i>	43
2.2.1. Origine des inhibiteurs biologiques.....	43
2.2.2 Origine des bactéries corrosives	44
2.2.3. Précultures des bactéries corrosives et des souches de <i>Bacillus</i>	44
2.2.4. Conduite de l'inhibition des bactéries de la corrosion par les souches du genre <i>Bacillus</i>	45
2.2.4.1. Conditions opératoires des cocultures.....	45
2.2.4.2. Inoculation des Erlenmeyers.....	45
2.2.4.3. Méthodes analytiques.....	46
2.3. COMPARAISON ENTRE L'INHIBITION CHIMIQUE ET L'INHIBITION BIOLOGIQUE	46
2.3.1. Origine des souches de bacilles inhibiteurs	46

2.3.2. Isolement et identification de la souche antagoniste	47
2.3.2.1. Caractères cultureux et micromorphologiques.....	47
2.3.2.2. Détermination de la concentration optimale en NaCl.....	47
2.3.2.3. Détermination des optima de température et de pH	47
2.3.2.4. Métabolisme protidique.....	48
2.3.2.5. Métabolisme des sucres	48
2.3.2.6. Recherche des enzymes respiratoires et métaboliques.....	48
2.3.2.7. Test respiratoire.....	48
2.3.2.8. Test de consommation des sulfates	49
2.3.2.9. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	49
2.3.2.10. Extraction de l'ADN, séquençage de l'ARN 16S et analyse phylogénétique et alignement	49
2.3.2.11. Conservation des isolats.....	50
2.3.3. Optimisation du milieu nécessaire à l'évaluation de l'effet inhibiteur de la croissance des BSR	50
2.3.4. Influence de la variation de la concentration en sulfate des eaux.....	50
2.3.5. Conduite du test de l'inhibition biologique des BSR.....	51
2.3.5.1. Préparation de la préculture d'antagonistes.....	51
2.3.5.2. Influence de la variation en inoculum de l'inhibiteur biologique.....	51
2.3.6. Conduite du test de l'inhibition chimique des BSR.....	51
2.3.6.1. Présentation du biocide.....	52
2.3.6.2. Préparation des différentes concentrations en inhibiteur chimique.....	53
2.3.6.3. Influence de la concentration en inhibiteur chimique.....	53
2.3.7. Effet des inhibiteurs biologiques et chimiques sur la cinétique de croissance des BSR.....	54
2.3.7.1. Les méthodes analytiques de l'évaluation de l'inhibition biologique et chimique.....	54
2.4. SIMULATION DE L'INHIBITION BIOLOGIQUE DANS UNE BOUCLE DE MONITORING DE LA CORROSION.....	54
2.4.1. Echantillonnage de l'eau d'injection pour simuler l'inhibition des bactéries corrosion par la souche B21.....	55
2.4.2. Origine des bactéries corrosives	55

2.4.3. Utilisation de la souche B21 pour inhibier la croissance des bactéries de la corrosion isolée t de l'eau d'injection	55
2.4.4. Nature de l'acier utilisé pour étudier l'inhibition par la souche B21.....	55
2.4.5. Etude de l'inhibition de la croissance des BSR dans la boucle de monitoring de la corrosion.....	56
2.4.5.1. Installation de la boucle de monitoring de l'inhibition biologique.....	56
2.4.5.2. Préparation de la boucle de monitoring de l'inhibition biologique par la souche B21.....	57
2.4.5.2.1. Inoculations de la boucle de corrosion par l'inhibiteur biologique (la souche B21).....	57
2.4.5.2.2. Conditions opératoires pour l'application de l'inhibion biologique par la souche B21	58
2.4.5.3. Monitoring de l'inhibition biologique des bactéries corrosives dans l'eau d'injection du champ d'In aménas.....	58
2.4.5.3.1. Evaluation du monitoring de l'inhibion de la croissance des BSR par la souche B21.....	58
2.4.5.3.2. Dénombrement des bactéries corrosives	59
2.4.5.3.3. Caractérisation des biofilms au microscope électronique à balayage.....	59
CHAPITRE TROIS : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	60
3.1. INFLUENCE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES EAUX SUR LES BACTERIES CORROSIVES.....	60
3.1.1. Caractérisation physico-chimique.....	60
3.1.1.1. Paramètres physicochimiques des eaux d'injection.....	60
3.1.1.2. Paramètres physicochimiques de l'eau de gisement.....	61
3.1.2. Caractérisation des isollements bactériens corrosifs des eaux.....	64
3.2. Etude de l'inhibition biologique des bactéries de la corrosion par le genre Bacillus.....	67
3.2.1. Utilisation du genre Bacillus pour l'inhibition des BTR.....	67
3.2.2. Utilisation du genre Bacillus pour l'inhibition des BSR.....	71
3.3. Comparaison entre l'inhibition chimique et l'inhibition biologique.....	73
3.3.1. Caractérisation de l'isolat antagoniste isolé à patir de l'eau de gisement.....	73
3.3.2. Test de consommation des sulfates	76

3.3.3. Analyse phylogénétique et alignement.....	77
3.3.4. Cinétique de croissance du consortium de BSR en présence de l'inhibiteur biologique (souche B21) et chimique (THPS.).....	80
3.3.5 Simulation de l'inhibition biologique des bactéries de la corrosion dans une boucle de monitoring	91
3.3.5.1. Monitoring de la cinétique de croissance des BSR cultivées en absence et en présence de Bacillus sp (B21).....	91
3.3.5.2. Dosage des sulfates dans l'eau d'injection.....	93
3.3.5.3. Evaluation de la concentration en sulfures dans l'eau d'injection.....	94
3.3.5.4. Evolution du pH d'une eau d'injection utilisée pour le maintien de pression d'un champ pétrolier.....	94
3.3.5.5. Etude de la variation de la concentration des BSR planctoniques (BSRp) en fonction du temps de circulation de la boucle.....	96
3.3.5.6. Etude de la variation de la concentration des BSR sessiles (BSRs) en fonction du temps de circulation de la boucle de corrosion.....	97
3. 4. Caractérisation des biofilms en microscopie électronique à balayage.....	99
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	106
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	129
Liste des tableaux	122
Liste des figures.....	123
Liste des photographies.....	127
Liste des abréviations.....	128
Publication.....	129

Résumé

L'objectif principal de notre étude consiste à l'application des relations bactériennes antagonistes pour traiter un type de corrosion induite par les bactéries sulfurogènes (BSR et BTR) sur des installations pétrolières. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'étude de l'effet antagoniste de deux souches de référence appartenant au genre *Bacillus*. Les résultats obtenus ont démontré le caractère inhibiteur exercé sur les bactéries sulfatoréductrices (BSR) et les bactéries thiosulfatoréductrices (BTR).

Une souche antagoniste autochtone dénommée B21 a été isolée, à partir d'une eau de gisement du champ pétrolier d'In-amenas. Il s'agit d'une espèce dominante aérobic facultative, halophile, exigeant une concentration en NaCl supérieur à 5% (p/v). Les résultats de l'analyse phylogénétique basée sur le séquençage partiel de l'ARNr 16S assignent la souche B21 au genre *Bacillus*. Le nom de *Bacillus* sp (EMBL, FR671419) est donné à cette nouvelle souche. L'effet inhibiteur de la souche B21 a été comparé avec succès à celui d'un inhibiteur chimique (biocide à base de THPS).

L'étude de l'effet inhibiteur de *Bacillus* sp est également étudiée dans une boucle de monitoring de la corrosion bactérienne. Les résultats ont démontré une action inhibitrice sur les BSR et BTR confirmant ainsi le fort potentiel d'application de la souche B21 comme agent de lutte biologique contre la corrosion au sein de l'industrie pétrolière.

Mots clés : *Bacillus*, antagoniste, BSR, BTR, eau d'injection, eau de gisement, biocide

Abstract

The main objective of our study is the application of bacterial antagonist's relations to treat a type of corrosion caused by bacteria (SRB and TRB) in oil facilities. We are particularly interested to study the antagonistic effect of two reference strains of the genus *Bacillus*. The results obtained have demonstrated that *Bacillus* strain exerted inhibition against the sulphate-reducing bacteria (SRB) and thiosulphate reducing bacteria (TRB).

An indigenous antagonistic strain called B21 was isolated from a field water oil field of In-amenas. It is a dominant species facultative aerobic, halophilic, requiring a NaCl concentration greater than 5% (w / v). The results of phylogenetic analysis based on partial sequencing of RNA16S of B21 strain assigned to the genus *Bacillus*. The name *Bacillus* sp (EMBL, FR671419) is given to this new strain. The inhibitory effect of strain B21 was successfully compared with that of a chemical inhibitor (biocide containing THPS).

The study of the inhibiting effect of *Bacillus* sp was studied in a loop of monitoring of bacterial corrosion. The results showed an inhibiting action on the SRB and TRB.

Keys words: *Bacillus*, antagonist, SRB, TRB, water injection, water oilfield, biocide

ملخص

في هذه الدراسة، ركزنا على تنفيذ مبدأ العلاقات المضادة بين الأحياء الدقيقة لمعالجة حالة التآكل البيولوجي للمنشآت البترولية. و في هذا السياق، تم في المرحلة الأولى من الدراسة اختبار مدى تأثير عملية منع لسلاطين مرجعتين من *Bacillus* ضد بكتيريا التآكل. وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بأن *Bacillus* بدلت عملية ضد بكتيريا المرجعات للكبريت.

و في عملية عزل ميكروبيولوجي من ماء تم الحصول عليه من إن أميناس البترولية، تحصلنا على سلالة أصلية سميت B21 تنمو في وسط غذائي غني بالملح. وأظهرت التحاليل التي أجريت على RNA16S، بأن التسلسل الجيني لسلالة B21 هو *Bacillus*. وتمت تسمية هذه السلالة الجديدة (*Bacillus* sp (EMBL, FR671419).

و في المرحلة الثانية من الدراسة تمت مقارنة التأثيرات المنع لسلالة B21 (المعالجة البيولوجية) ومادة كيميائية (biocide). وأظهرت النتائج أن المعالجة البيولوجية أكثر فعالية ضد بكتيريا التآكل. وقد أبرزت دراسة نموها العام (coculture) مع البكتيريا B21 انخفاضا في إنتاج الكبريت. نتائج هذه الدراسة تشير إلى إمكانية استعمال سلالة B21 لمكافحة البيولوجية ضد التآكل البكتيري للمنشآت الصناعية النفطية.

كلمات: مادة كيميائية مضادة، بكتيريا التآكل، المعالجة البيولوجية، *Bacillus*

INTRODUCTION GENERALE

Face à la demande énergétique croissante dans le monde, les compagnies pétrolières investissent des budgets de financement conséquents en des technologies, permettant de maintenir les outils de production et d'exploitation au niveau des sites pétroliers et gaziers. Ils ont comme objectifs la réduction des arrêts et des maintenances, le maintien des capacités de production, le prolongement de la durée de vie des installations et la protection des personnes et de l'environnement.

La corrosion représente une des contraintes à laquelle ces compagnies doivent faire face. Ceci passe nécessairement par l'utilisation de moyens, de techniques et de méthodes de protection efficaces contre la corrosion [1-4]. Cette dernière représente un enjeu économique considérable estimé entre 1 et 4 % du produit national brut (PNB) des pays industrialisés [5]. Aux Etats-Unis, un rapport publié par le NACE (National Association of Corrosion Engineers) en 2002, évalue les coûts directs de la corrosion, autrement dit; les coûts engendrés par les dégâts directs tels que le remplacement de tuyaux, l'utilisation d'inhibiteurs de corrosion et les services de maintenance des installations, etc..., à 276 milliards de dollars américains par an, soit 3,1% [5, 6] du PNB du pays.

Les coûts indirects de la corrosion, comme les pertes occasionnées par l'arrêt des installations et les pertes de production, les délais de livraisons prolongés, les consommations de gazoil élevées, dues aux déviations ou le temps d'attente dans un bouchon de véhicules lors de la réparation d'un pont, sont plus difficiles à déterminer, mais avec une estimation optimiste, ils peuvent être considérés comme égaux aux coûts directs. Ce qui a amené à estimer les coûts totaux de la corrosion à 6% du PNB des Etats-Unis [5-7]. Cette analyse réalisée sur une période de deux ans, estime les pertes à 137,9 milliards de dollars américains par an engendrées dans les cinq principaux secteurs économiques. Dans les secteurs de la production et de la fabrication, la branche de l'exploration et de la production du pétrole et de gaz a enregistré des pertes de l'ordre de 1,4 milliards de dollars américains par an [3, 4, 8].

Les conséquences de la corrosion ne se limitent pas aux coûts économiques, mais également à la santé (corrosion des alliages dentaires et des implants métalliques dans le corps), à la sécurité (pannes de véhicules, rupture de structures, contamination des canettes de produits alimentaires), à l'environnement (pollution des ports par les biocides, utilisation de peintures sur les navires), etc... [4, 8].

Parmi les facteurs alourdissant la facture financière due à la corrosion, il y a la lutte contre la corrosion induite par les microorganismes ou biocorrosion. La biocorrosion affecte les canalisations et les installations d'eau utilisées dans le maintien de la pression des gisements pétroliers. Sur le plan industriel, la satisfaction des besoins en eau nécessite l'utilisation permanente des réseaux de canalisation et de stockage des eaux ; qui proviennent du sous sol ou de la surface [1, 9 -13].

En fait, chaque eau comporte une composition bactériologique caractéristique. Les principaux types de bactéries associées à la corrosion des installations sont les bactéries sulfato-réductrices (BSR) [14-16], les thiosulfato-réductrices (BTR) [17], les méthanogènes [17-19], les ferrobactéries [20, 21], les clostridiales et les bactéries oxydantes du soufre [22-24]. Mais les microorganismes corrosifs les plus cités et étudiés sont les bactéries sulfurogènes (BSR et BTR). D'autre part, les propriétés physico-chimiques et bactériologiques de l'eau, utilisée dans le maintien de la pression des gisements pétroliers, représentent un milieu de culture parfait pour les bactéries de la corrosion. En effet, en présence des hydrocarbures dans l'eau, comme source de carbone, ces bactéries se développent [25].

Ainsi, les aciers immergés en milieu aqueux sont, particulièrement, exposés aux risques de corrosion bactérienne et les dégâts occasionnés peuvent provoquer d'importantes pertes et représentent un facteur de risque majeur en termes de sécurité industrielle. La corrosion induite par les micro-organismes ou biocorrosion est estimée chaque année à des milliards de dollars à travers le monde et a fait l'objet de nombreuses études [26, 27]. Les mécanismes de la biocorrosion font appel à des mécanismes électrochimiques classiques où une masse biologique agit directement ou indirectement, avec la formation de cellules de concentration d'oxygène dissous, pH,... ou avec la production de métabolites agressifs, (acides organiques/inorganiques, formation de sulfures) pour n'en citer que quelques-uns [28-31].

Lors de la présentation des résultats sur l'instrumentation de la mesure de la corrosion localisée des aciers au carbone utilisés dans le domaine pétrolier, Beech [11] a rapporté que les phénomènes de la corrosion localisée sur ces aciers sont dus aux bactéries sulfurogènes (BSR et BTR). Cette activité bactérienne a engendré de lourdes conséquences financières. Une reprise d'un puits offshore percé coûte l'enveloppe de 10 millions d'euros et le coût annuel pour le traitement dans le domaine de l'exploitation pétrolière est estimé entre 150.000 et 300.000 euros [26, 27].

Crolet et Magot [32] ont rapporté que la dégradation des métaux, sous l'influence des effets biologiques, a des répercussions économiques notables dans tous les domaines industriels, de la construction navale, de la production pétrolière et gazeuse, du génie civil et de la production électrique classique ou électronucléaire. Ils estiment, ainsi, qu'au moins un tiers de l'ensemble de la corrosion peut être sous l'influence des micro-organismes. Cette estimation reste approximative car elle repose sur une compréhension encore limitée de la biocorrosion. Flemming [8] estime quant à lui, ce taux à 20%. Cependant, en Grande-Bretagne, il a avancé un taux de 50% [33]. La corrosion induite par les microorganismes est responsable de 75% de la corrosion dans l'industrie pétrolière et de 50% des dégâts causés dans les pipelines et les conduits souterrains [34].

Les micro-organismes sont responsables de la dégradation des matériaux notamment lorsque ceux-ci ont une composition organique naturelle ou synthétique [10]. Les dégâts occasionnés par la prolifération microbienne se reconnaissent à différents indices tel que l'envahissement visible des surfaces métalliques par des moisissures, par des levures, des

algues microscopiques ou des bactéries [11, 35, 36]. Ces dernières vivent, souvent en association sur des surfaces inertes, ils y forment des biofilms. Ils sont constitués de cellules bactériennes et de substances polymériques extracellulaires comme les polysaccharides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques après la lyse cellulaire [37- 41].

Aussi, ils comprennent des précipités minéraux provenant soit de la phase aqueuse extérieure d'un biofilm soit de la formation de dépôt de corrosion insoluble sur la surface métallique [42-44].

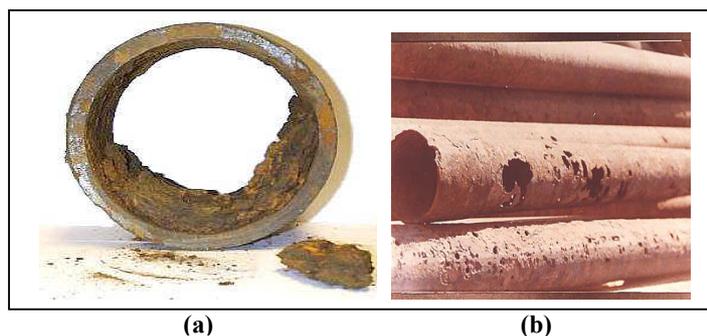


Fig. 0.1: Exemples de corrosion induite par les microorganismes,
(a) : coupe longitudinale d'un pipe présentant un dépôt bactérien,
(b) : piqûration d'un tubing de production d'un puits.

Pour atténuer la gravité de la corrosion bactérienne dans le domaine des hydrocarbures [45- 49], on a recours aux traitements chimiques par l'utilisation des biocides. Mais, en raison du caractère de résistance que peut développer un certain nombre de bactéries de la corrosion et l'apparition de phénomènes d'accoutumance avec lesquels ces bactéries s'adaptent aux traitements chimiques conventionnels fait que l'efficacité des traitements à base de biocides reste réduite [50-52].

Malgré les nombreuses études fondamentales et pratiques menées sur l'utilisation des biocides [15], il reste encore beaucoup à comprendre sur les mécanismes de la biocorrosion. A partir des contraintes pratiques de mise en œuvre de l'application des biocides, plusieurs approches ont été développées afin d'expliquer le fondement des problèmes liés à l'action et au comportement des bactéries de la corrosion en présence des biocides [15, 51-53]. Cependant, les exploitants et producteurs pétroliers sont, actuellement, confrontés à des problèmes techniques liés à la nécessité de remplacer les biocides conventionnels (ammonium quaternaires, aldéhydes, glutaraldéhydes, d'alcools et de dérivés d'acides organiques) dont la stabilité et la biodégradabilité sont, souvent, critiquées, comparativement aux des biocides biodégradables (Tétrakis(hydroxyméthyl)phosphoniumsulfate -THPS) [6, 53, 54].

Toute fois, les biocides biodégradables qui sont composés, essentiellement, d'une mixture composée de matières actives et de solvants, restent néfastes pour la santé des utilisateurs [15, 46, 54].

Dans l'objectif d'approcher l'équation santé -environnement –efficacité et coût, nous nous sommes intéressés, dans notre travail, à l'application des relations antagonistes (traitement biologique) entre les bactéries et la capacité des micro-organismes à synthétiser les substances qui devaient être utilisées comme antagoniste bactérien ou englobant des modalités grâce auxquelles un microorganisme peut interférer avec un autre en créant des conditions défavorables à sa prolifération [55-57]. Ceci engendre une inhibition de la croissance ou une compétition entre les microorganismes [59, 60]. Il est à noter que, l'utilisation de bactéries antagonistes dans le domaine pétrolier a été rarement rapportée. Cependant, dans certains rapports, il est connu que certaines BSR, comme *Desulfovibrio desulphuricans* [61] et *Desulfovibrio gracillis* sont capables de réduire les nitrates produites par d'autres bactéries [62].

Le travail s'articule autour de trois parties distinctes. La première porte sur une analyse de la littérature scientifique où sont exposées les données relatives à la biocorrosion, aux bactéries impliquées dans la biocorrosion (bactéries sulfato- réductrices et bactéries thiosulfato- réductrices), aux traitements utilisés contre la biocorrosion et la formation des biofilms.

La seconde partie est consacrée à l'étude de l'inhibition des bactéries de la corrosion. Dans cette partie, nous présentons la caractérisation des bactéries de la corrosion, isolées des eaux utilisées dans le maintien de pression des gisements pétroliers de cinq régions pétrolières du sud Algérien. Par la suite, nous abordons l'inhibition des bactéries sulfurogènes corrosives (BSR et BTR) par deux souches de bactéries rencontrées dans le commerce et appartenant au genre *Bacillus*. Les bactéries sulfurogènes corrosives seront isolées des eaux utilisées dans le maintien des gisements pétroliers. Après l'étude de l'inhibition des bactéries sulfurogènes, nous faisons la comparaison entre l'inhibition par le biocide THPS (traitement chimique) et l'inhibition par une souche bactérienne autochtone (traitement biologique) isolée d'une eau de gisement (salée) provenant d'un champ pétrolier présentant une corrosion bactérienne assez prononcée. Nous finirons la seconde partie par un essai pilote, sous forme de boucle de corrosion, pour l'application de l'inhibition biologique.

La troisième partie est consacrée à la présentation et à la discussion des résultats obtenus, suivie d'une conclusion générale et des références bibliographiques.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. 1. BIOCORROSION

Du point de vue étymologique, le terme corrosion vient du mot latin *corrode* qui signifie ronger, attaquer. 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». Il s'agit d'un processus électrochimique mettant en œuvre, simultanément, une réaction anodique et une réaction 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. A l'inverse, la réaction cathodique correspond à la réduction d'une espèce chimique ou ionique de ce milieu par exemple la molécule d'eau H_2O [1, 9, 10, 12, 63].

Le terme corrosion bactérienne ou biocorrosion ou corrosion influencée par les micro-organismes (C.I.M) est défini comme l'ensemble des modifications des propriétés physico-chimiques et mécaniques d'un matériau sous l'action des micro-organismes (bactéries, champignons, moisissures, algues) [8, 39, 64]. Généralement, la corrosion bactérienne se caractérise par une attaque localisée profonde et très rapide sur un support métallique (de l'ordre de 1mm/an) [64].

Selon Chantereau [65], la corrosion bactérienne rassemble tous les phénomènes de corrosion où les bactéries agissent directement ou par l'intermédiaire des substances provenant de leur métabolisme. Ces derniers jouent un rôle primordial, soit en accélérant un processus électrochimique déjà établi, soit en créant les conditions favorables à son établissement.

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 a été émise par Garret [66]. Un peu plus tard, Garie [67] discutait du rôle des bactéries sulfato- réductrices, des bactéries oxydantes du soufre et des bactéries ferrugineuses au cours de ce phénomène. Cette biocorrosion atteint tout type de matériaux (métaux et alliages, polymères, bétons, pierres) [10, 12, 65].

Beranger et Mazille [12] ont commenté que la biocorrosion n'était pas une forme nouvelle de corrosion, mais qu'elle résulte de la conjugaison défavorable de trois facteurs : le milieu, le matériau et les micro-organismes (fig. 1.1).

- Un milieu aqueux, généralement, jugé peu agressif, il s'agit de l'action du pH, de l'oxygène, de la température.

- Un matériau réputé compatible avec les conditions d'exposition, il s'agit de la biocorrosion des aciers non ou peu alliés, des aciers inoxydables, du cuivre et de ses alliages, de l'aluminium...

- Des microorganismes dont la présence est souvent inattendue.

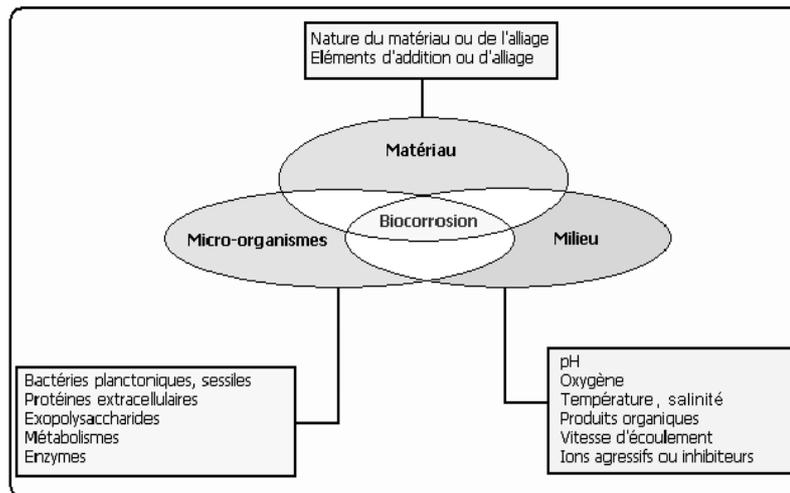


Fig. 1.1 : Biocorrosion ou biodétérioration des matériaux métalliques [12].

1. 1. 1. Mécanismes de la biocorrosion

La production des substances corrosives telles que le sulfure de fer, le gaz carbonique, l'acide sulfurique ou des acides organiques, la dépolarisation d'un équilibre d'oxydoréduction et la réaction de dépôt responsable physiquement d'une pile électrochimique d'aération différentielle sont à l'origine du mécanisme d'attaque microbien des métaux [68].

Les mécanismes de la biocorrosion, reflétant la diversité des micro-organismes, des milieux et des matériaux, sont variés [69]. Actuellement, il est admis que les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et thiosulfato- réductrices (BTR) jouent un rôle prépondérant dans la biocorrosion anaérobie [11, 70-72] de nombreux types de métaux comme les aciers inoxydables [14], les aciers doux [73, 74], les alliages cuivre-nickel [75], etc. Par ailleurs, le rôle clé des hydrogénases présentes dans certaines BSR a souvent été suspecté et démontré dans des conditions de laboratoire [76- 79].

1.1.1.1. Production des substances corrosives par les bactéries de la corrosion

Videla [80] a expliqué que les micro-organismes constituent un paramètre qui influe sur la structure métallique des métaux. Cependant, il n'y a pas eu de corrélation directe entre l'ampleur de cette corrosion et le nombre de micro-organismes. A cet égard, le paramètre le plus significatif serait plutôt leur comportement métabolique vis-à-vis du métal. De nombreuses bactéries et champignons peuvent produire d'importantes quantités d'acide organique (acide formique, acide acétique...) et des acides minéraux (H_2S , H_2SO_4 , NO_2^- , NH_3^+ , HCO_3^- ...) intervenant dans la modification du pH en provoquant la corrosion du fer et de ses alliages [43, 81].

La présence de ces métabolites, dans les circuits de canalisation d'eau et du pétrole associé à l'eau, est le signe d'un développement bactérien. L'action agressive de ces métabolites sur le métal est connue. C'est l'explication utilisée pour interpréter la corrosion en milieu anaérobique.

1. 1. 1. 2. Dépolarisation cathodique par les bactéries sulfato- réductrices

La corrosion des métaux en milieu aqueux est une réaction électrochimique. L'intervention des micro-organismes ne modifie pas l'aspect électrochimique de la corrosion [12]. Toute réaction électrochimique se décompose en deux réactions partielles d'oxydation et de réduction. La réaction d'oxydation est le processus anodique où le métal se solubilise en espèce chimique sous forme d'ions [82, 83].



La réaction cathodique correspond à la réduction d'une espèce chimique (1.1) présente à l'interface métal/solution (milieu). La présence de l'oxygène dans le milieu oriente cette réaction.



L'hydrogène produit s'adsorbe sur la surface cathodique pour former un film moléculaire et le système d'oxydo- réduction tend vers un état d'équilibre pour neutraliser la pile. La polarisation cathodique est obtenue [84]. A l'inverse, l'utilisation de l'hydrogène cathodique par les bactéries sulfato- réductrices à enzyme hydrogénase positive dépolarise le système et la corrosion est initiée [65]. Il a été montré que certaines BSR à hydrogénase positive oxydent l'hydrogène cathodique en réduisant les sulfates contenus dans l'eau, selon la réaction [79, 85, 86]:



Les B.S.R interviennent dans beaucoup de cas de corrosion du fer présent dans le milieu à la surface anodique. Le fer est mis en solution tandis qu'un film d'hydrogène se forme au fur et à mesure de son apparition [20-22]. Et pour chaque équivalent d'atomes d'hydrogène consommé par les B.S.R, un équivalent de Fe^{2+} entre en solution pour former de la rouille et du sulfure de fer (FeS) [87]. Les bactéries sulfato- réductrices permettent à la corrosion de se poursuivre jusqu'à ce que les sulfates présents soient épuisés. Le rôle probable de la bactérie est, donc, d'agir comme dépolarisant. Cette mobilisation de l'hydrogène par les bactéries sulfato- réductrices a été montrée [22, 87].

1.1.1.3. Effet de l'aération différentielle sur la corrosion d'un métal

Plusieurs études de laboratoires [12, 39] ont montré qu'un matériau métallique immergé en milieu non stérile se recouvre d'un film biologique hétérogène. Différentes espèces de bactéries coexistent dans le biofilm et créent des zones où les concentrations des éléments chimiques sont modifiées. La consommation d'oxygène par les bactéries aérobies va conduire à des zones anaérobies où vont proliférer les bactéries anaérobies [12, 39].

Par conséquent, il y a formation d'une zone hétérogène avec une oxygénation différente entre la périphérie du biofilm et son centre. La concentration en oxygène étant supérieure à la périphérie, ce qui conduit la formation d'une pile d'aération différentielle. Une différence de potentiel entre la zone périphérique considérée comme cathode et le centre du biofilm considéré comme anode est créée [88]. Ces auteurs ont expliqué que ce mécanisme résulte du développement de micro-organismes tels que *Pseudomonas* et les bactéries sulfatoréductrices, souvent associé à des bactéries du cycle du fer [88]. Ces mêmes auteurs ont émet plusieurs schémas pour expliquer la notion de l'aération différentielle (fig. 1.2 et 1.3).

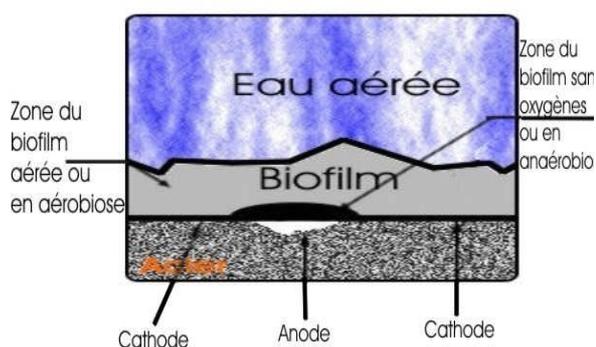


Fig. 1.2 : Schéma de la Cellule d'aération différentielle dans un biofilm [88].

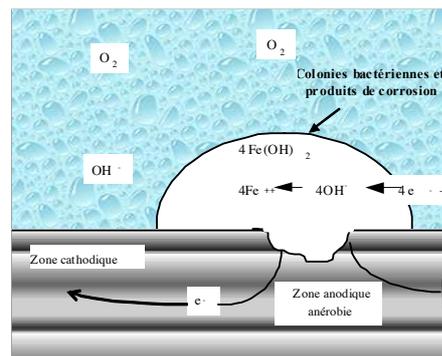


Fig. 1.3 : Schéma de la Cellule d'aération différentielle [88].

1. 1. 2. Influence du soufre sur le développement de la biocorrosion

Le soufre est soumis à un cycle biologique complexe dans la nature et son rôle est considérable, dans le milieu anaérobie. Les micro-organismes qui y participent sont souvent liés à l'attaque des métaux. Sous l'action de plusieurs micro-organismes tels que les bactéries sulfato- réducteurs du genre *Desulfovibrio* et les espèces reliées [89-91], les organismes aérobies tels que *Thiobacillus*, les bactéries hétérotrophes, les bactéries photosynthétiques, les diverses archéobactéries, les méthanogènes et les formes dépendantes du soufre transforment les sulfates en sulfure (S^{2-}), en passant par des produits intermédiaires sulfites (SO_3^-) et soufres (S), ceci correspond au cycle du soufre [15, 32] (fig. 1.4).

Ainsi, un grand nombre d'espèces bactériennes peuvent utiliser les sulfates comme source de soufre (S) pour leur synthèse organique. La dissimilation réductrice des composés soufrés est réalisée par des groupes plus restreints de germes anaérobies. Ils tirent leur énergie de l'oxydation des sulfates en sulfites ou en soufres élémentaires comme accepteurs d'électrons [32]. Dans les eaux marines ou saumâtres riches en ions sulfates, les micro-organismes produisent de grandes quantités de sulfures. Ces quantités viennent s'ajouter à celles des décompositions organiques [92].

Il faut noter que, les sulfures non assimilés, dans la synthèse cellulaire, sont convertis en produits plus oxydés. Parmi les micro-organismes qui participent au cycle du soufre, il y a les BSR. La corrosion est plus accentuée, quand les BSR sont associées avec des bactéries oxydantes du soufre tel que *Thiobacillus spp* [93, 94, 95].

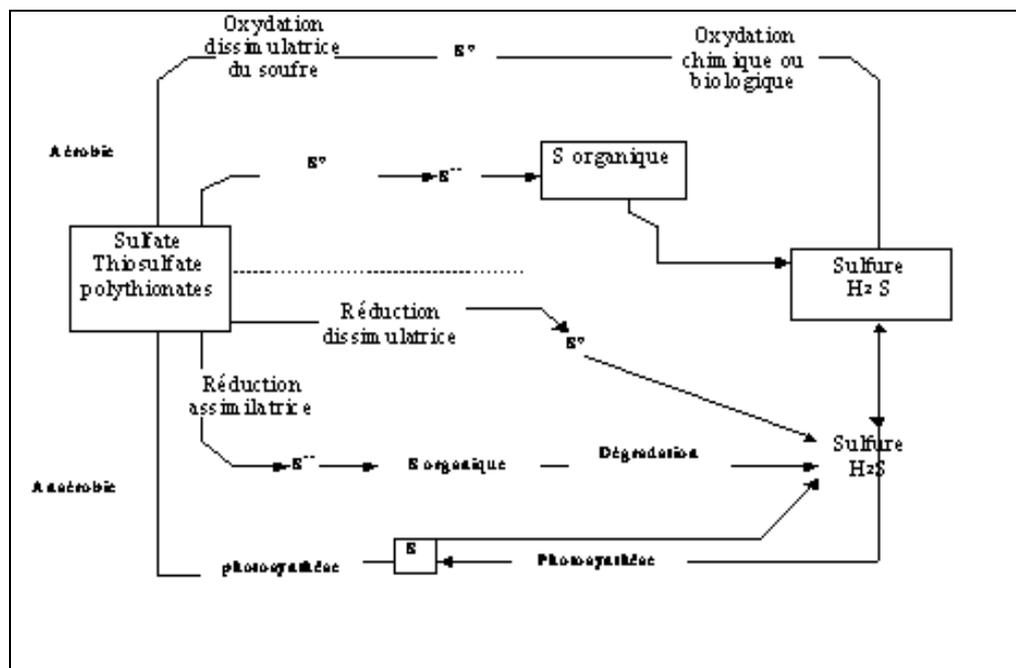


Fig. 1.4 : Cycle du soufre indiqué par Tang et al. [95].

1. 1. 3. Autres mécanismes proposés pour expliquer la biocorrosion des matériaux

La bactérie *Desulfovibrio gabonensis* isolée à partir d'un pipeline corrodé a besoin de Fe^{2+} pour sa croissance [32, 89]. Le remplacement dans le milieu des ions Fe^{2+} par un copeau d'acier doux permet aux bactéries de croître à pH 6,0 mais pas à pH 7,4; aucune croissance n'étant observée à pH 6,0 en absence de copeau [89, 96]. L'acidification par excrétion de produits tels l'acide acétique augmente le taux de sulfures corrosifs (H_2S , HS^-). Les sulfures attaquent le fer métallique qui s'oxyde en Fe^{2+} . Ainsi, la production d'acides par les biofilms garantit la disponibilité du Fe^{2+} pour les BSR et par conséquent assure la persistance de la corrosion [97].

Lopes et al., [91] ont suggéré que *D. desulfuricans* endommage la couche passive de l'acier inoxydable 304L en dissolvant les ions nickel, ce qui influence, positivement le métabolisme des BSR favorisant ainsi la biocorrosion.

1. 1. 4. Rôles d'autres types de bactéries dans la corrosion des aciers

Bien que de nombreuses études démontrent la présence souvent dominante des BSR dans les biofilms prélevés sur des pipelines corrodés (entre 11% et 73%) de la totalité de la communauté bactérienne [98, 99], une étude récente réalisée sur des pipelines mexicains montre que la proportion des BSR est parfois faible bien que la corrosion soit présente [91]. L'analyse de la diversité microbienne dénote la présence de trois groupes physiologiques : anaérobies facultatifs (membres de *Enterobacteriaceae*), halophiliques anaérobies carbohydrates fermentatives (membres de *Halanaerobiaceae*) et réductrices de sulfates (membres de *Desulfovibrionales*). Les espèces *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp* et *Halanaerobium spp* sont prédominantes. La proportion de BSR est très faible et *Desulfovibrio spp* étant majoritaire [100].

Les bactéries méthanogènes (anaérobies strictes) utilisent comme source d'électrons soit du fer pur, soit le fer de l'acier doux pour la réduction du CO_2 en CH_4 [18]. Boopathy et al. [17] ont comparé les vitesses de corrosion des bactéries méthanogènes et des BSR, ils ont trouvé des vitesses de l'ordre de 10 à 14 mg/jour/dm² pour les méthanogènes et 1,3-21 mg/jour/dm² pour diverses cultures pures de *Desulfovibrio*. Les analyses phylogénétiques des espèces responsables de la corrosion ont démontré l'implication des bactéries *Methanococcus thermolithotrophicum*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanospirillum hungatei* ainsi que les espèces bactériennes hydrogénotrophiques *Methanogenium*, *Methanoplanus* et *Methanocalculus* [101].

Le mécanisme proposé pour expliquer la corrosion observée est la dépolarisation cathodique par consommation de l'hydrogène [22], or ce mécanisme est incorrect (cf. dépolarisation cathodique). Des espèces acétotrophiques de la famille de *Methanosaetaceae* peuvent aussi accélérer la corrosion via la croissance syntrophique avec les BSR. La bactérie clostridiale *Clostridium acetobutylicum*) accélère également la corrosion anaérobie des aciers [34, 102].

1. 2. LES BACTERIES DE LA CORROSION

Différents mécanismes de corrosion bactérienne ont été identifiés, selon la variété des activités physiologiques mises en œuvre par les divers types de micro-organismes. Ces derniers coexistent dans des biofilms naturels en formant souvent des communautés synergétiques [103]. Il a été rapporté que la corrosion anaérobie met en jeu des bactéries sulfurogènes : bactéries sulfato- réductrices et bactéries thiosulfato- réductrices [30]. Le métabolisme de ces bactéries se caractérise par la réduction d'un accepteur terminal d'électrons : le sulfate, couplé à l'oxydation d'un donneur d'électrons, qui est le plus souvent, une substance organique (lactate ou acétate) ou l'hydrogène [104]. En outre, pour ces bactéries, le sulfate et le thiosulfate sont réduits en sulfure.

Etymologiquement, une bactérie sulfurogène est une bactérie qui produit des ions sulfures. Ces ions peuvent provenir de la réduction de composés oxydés comme le soufre lui-même, le thiosulfate ou le sulfate [94, 105]. Toutes les bactéries peuvent rejeter de faibles quantités de sulfures quand elles consomment des protéines par exemple. Par ailleurs, certaines bactéries utilisent des composés minéraux soufrés comme accepteur d'électrons dans leur métabolisme énergétique et secrètent des sulfures. Nous y trouvons les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et/ou thiosulfato-réductrices (BTR) que nous appellerons aussi génériquement bactéries sulfurogènes [30, 106].

1. 2. 1. Les bactéries sulfato- réductrices (BSR)

Depuis que les recherches sur l'effet des BSR sur la fonte ont commencé, dans les années 1930, le rôle de ces bactéries dans l'initiation de la corrosion localisée (corrosion par piqûres) a été confirmé aussi bien en milieu terrestre qu'en milieu aquatique, en anoxie comme en présence d'oxygène [11]. Pour ces deux groupes, le sulfate est réduit en sulfure.

1. 2. 1. 1. Généralités sur les bactéries sulfato- réductrices

Les BSR constituent un groupe très hétérogène à beaucoup d'égards, en particulier du point de vue morphologique [84, 107, 108, 109]. Certaines cellules sont mobiles ou non, sphériques, ovoïdes, vibroïdes, seules, en paires ou filamenteuses [110]. La plupart des BSR sont des Gram négatifs mais les types sporulés peuvent être Gram positifs. Marchal *et al.*, ont cité l'exemple du genre *Desulfotomaculum* voisin du genre *Clostridium* [30, 97]. Le tableau 1.1 regroupe les genres sulfurogènes responsables de la biocorrosion.

Les BSR sont, souvent, des anaérobies stricts. Leur activité ne s'observe qu'à des zones où le potentiel redox est assez bas. Elles supportent une large gamme de température et de pH. Les pH les plus favorables au *Desulfovibrio* sont voisins de la neutralité; au dessous de pH 5.5 et au dessus de pH 9,5. Elles sont inactives et même tuées [68, 111].

Tableau 1.1 : Genres bactériens sulfurogènes d'après Brock et al., [112].

Genres	Caractères principaux	CG (%)
GROUPE I : Réducteurs de sulfate n'oxydant pas l'acétate		
<i>Desulfovibrio</i>	bâtonnets, incurvés non sporulés, flagelles polaires, Gram négatif	46-61
<i>Desulfomicrobium</i> ,	bâtonnets mobiles non sporulés, Gram négatif,	2-57
<i>Desulfobotulus</i> ,	vibrions mobiles, Gram négatif,	53
<i>Desulfotomaculum</i> ,	bâtonnets droits ou incurvés mobiles endosporulés,	37-46
<i>Archaeoglobus</i> archaeon,	hyperthermophile,	46
<i>Desulfobulbus</i> ,	ovoïde, Gram negative,	59-60
<i>Thermodesulfobacterium</i> ,	bâtonnets courts, thermophiles,	34
GROUPE II : Réducteurs de sulfate oxydant l'acétate		
<i>Desulfobacter</i> ,	bâtonnets non sporulés,	45-46
<i>Desulfobacterium</i> ,	bâtonnets présentant des vésicules de gaz,	41-59
<i>Desulfococcus</i> ,	cellules sphériques non mobiles, Gram négatif utilisent les acides gras de C1 à C14	57
<i>Desulfonem</i> ,	longs filaments mobiles, Gram négatif, non sporulés, utilisent les acides gras de C1 à C12	35-42
<i>Desulfosarcina</i> ,	cellules en amas, Gram négatif utilisent les acides gras de C1 à C14	51
<i>Desulfoarculus</i> ,	vibrions mobiles de Gram négatif	66
Réducteurs du soufre (voie dissimilatrice)		
<i>Desulfuromonas</i> ,	bâtonnets,	50-63
<i>Desulfurella</i> ,	bâtonnets	31
<i>Campylobacter</i> ,	bâtonnets	40-42
Réducteurs du thiosulfate <i>Archaea</i> thermophiles extrêmes		

Ces bactéries sont des chimioorganotrophes, hétérotrophes, parfois autotrophes [110], hydrogénase positive et une catalase négative. Elles peuvent utiliser comme accepteur final d'électrons les composés d'oxydation du soufre, tels que le sulfate (SO_4^{2-}); la forme usuelle la plus oxydée), le sulfite (S_3O_2^-), le thiosulfate (S_3O_2^-) ou encore le soufre élémentaire (S°). Elles les réduisent tous en sulfure (S^{2-}). La production de pétrole et du gaz et la construction navale sont sérieusement affectés par ce sulfure d'origine bactérienne [71]. Les BSR prédominent les eaux douces (rivières, lacs...), les fonds marins, les boues des estuaires [113]. Nous les trouvons aussi dans les sédiments de cours d'eau dans les lagunes et des digesteurs d'eau d'égout, ainsi que dans les sols imbibés d'eaux [114, 115].

1. 2. 1. 2. Taxonomie et classification

De nombreuses recherches sur les isollements des bactéries sulfurogènes ont été menées [32, 64, 116-122]. Les isollements des différents types métaboliques rencontrés chez les *Desulfovibrionaceae* ont été rapportés par plusieurs auteurs [89, 98, 123-129]. Les *Desulfobacterionaceae* ont été étudiés par Singleton [183], Stackebrandt et Liesack [130] et Watanabe et al. [131, 132].

Les bactéries sulfato-réductrices forment un groupe phylogénétiquement hétérogène [30]. La plupart des BSR sont des eubactéries, Gram négatif et dont les principaux genres sont : *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfococcus*, *Desulfobacter*. D'autres sont des archaebactéries représentées par le seul genre *Archeaoglobus* [71]. Les BSR sont représentés par une quinzaine de genres différents et appartenant à une soixantaine d'espèces. Ainsi, cent trente quatre espèces appartenant à 38 genres ont été isolées. Cette nouvelle classification est proposée par Garcia et al: [89] et Booth et al: [133].

Ce groupe microbiologique est un assemblage physiologique de diverses morphologies strictement anaérobiques qui utilisent comme accepteurs d'électrons soit les sulfates ou d'autres composés sulfurés (sulfites, thiosulfates...). Ces derniers sont réduits en H₂S. Les genres et les espèces diffèrent en fonction de leur utilisation des composés organiques.

Plusieurs espèces réalisent une oxydation incomplète des substrats organiques telles que les lactates en CO₂ et acétates, ces derniers ne peuvent pas être ensuite oxydés, d'autres espèces sont capables d'oxyder les acétates et d'autres composés organiques complètement en CO₂ [89, 133].

Les BSR sont représentées par les huit genres principaux regroupés dans trois groupes à savoir [89, 133]:

Groupe A

- 1- Genre *Desulfovibrio* : des cellules mobiles et ont une forme de bâtonnet, en hélice, en vibrio ou quelquefois spiroïdal. L'oxydation incomplète du lactate en acétate et CO₂ est courante. Quelques variétés utilisent les acides gras qui peuvent être oxydés complètement.
- 2- Genre *Desulfomonas* : les cellules ont une forme de bâtonnet, linéaire et non mobile sans formation d'endospores et une oxydation incomplète de pyruvate et CO₂.
- 3- Genre *Desulfococcus* : les cellules sont sphériques sous toutes les conditions et sont capables de l'oxydation complète des acides gras ou benzoates.
- 4- Genre *Desulfobacter* : les cellules ont une forme ellipsoïdale, en bâtonnet avec une extrémité ronde. Dans certains cas apparaissent en coccoïde. L'acétate est complètement oxydé en CO₂. La croissance se rencontre préférentiellement dans l'eau de mer.
- 5- Genre *Desulfobulbus*: les cellules sont ellipsoïdales, généralement sous forme de citron ou de l'oignon avec une extrémité pointue. L'oxydation du propionate ou du lactate en acétate et CO₂ est incomplète.
- 6- Genre *Desulfatmaculum*: les cellules ont une forme de bâtonnet, linéaires, faiblement incurvées. L'extrémité des cellules peut être pointue. Toutes les espèces sont capables de former l'endospore.

Groupe B :

- 7- Genre *Desulfosarcina* : les cellules sont arrangées dans des paquets (sarcina- line) d'une apparence irrégulière ou désordonnée. Les cellules simples de forme coccoïdes ou

ellipsoïdales peuvent avoir lieu. Elles sont occasionnellement mobiles. L'oxydation incomplète des acides gras ou benzoates peut avoir lieu.

Groupe C :

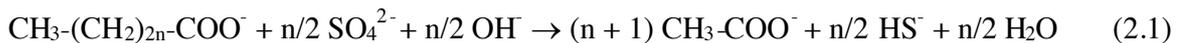
8- Genre *Desulfomena* : les cellules sont arrangées en multi- cellules uniques, des filaments flexibles avec un voile mobile. L'oxydation des acides gras est incomplète.

1. 2. 1. 3. Métabolisme des bactéries sulfato- réductrices

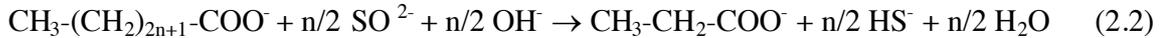
Le métabolisme énergétique des BSR est assuré par le couplage de l'oxydation d'un substrat généralement organique (chimioorganotrophie) avec la réduction du sulfate. Pour l'identification des BSR, Magot et Ollivier [129] et Pfennig et al., [134] ont proposé deux classes métaboliques pour les BSR.

En ce qui concerne les BSR qui conduisent à une oxydation incomplète de leur donneur d'électrons organiques en hydrogènesulfures et acétate, deux cas se présentent, selon que le donneur d'électron soit pair ou impair :

Substrat pair:



Substrat impair:



Et les BSR qui conduisent à une oxydation complète en hydrogénocarbonate, selon la réaction :



La réduction des sulfates (accepteurs d'électrons) en sulfures a été interprétée par Pelmont [92], selon deux mécanismes. Nous connaissons, actuellement, plus d'une centaine de molécules organiques pouvant être utilisées comme source de carbone et d'énergie par les BSR, depuis les acides organiques simples ou les alcools (méthanol, éthanol...) jusqu'aux acides gras à longues chaînes, aux hydrocarbures linéaires saturés ou aux hydrocarbures aromatiques [73].

D'autre part, non seulement les BSR utilisent différents accepteurs d'électrons (sulfate, sulfite, thiosulfate, soufre élémentaire), mais certaines respirent également les nitrates en absence de composés soufrés, exemple le genre *Desulfovibrio* [128]. Certaines BSR peuvent utiliser l'hydrogène produit par la réaction cathodique comme donneur d'électrons, par l'intermédiaire de l'enzyme hydrogénase [79, 86, 128]. Le métabolisme énergétique s'écrit comme suit :



La présence d'une source de carbone dans le milieu est indispensable pour assurer le métabolisme carboné. Ce sont, généralement, l'acétate ou le formiate qui sont utilisés, parfois le CO_2 (bactéries autotrophes) [128]. Dans plusieurs travaux, le milieu de culture des BSR contient du lactate sous forme de lactate de sodium à 50% ou à 60%. La conversion intracellulaire du lactate conduit à la formation de l'acétate, de l'hydrogène (H_2) et du dioxyde de carbone (CO_2) (fig.1.5). La réduction de l'ion sulfate en sulfure nécessite huit électrons, elle se fait en plusieurs étapes, catalysée par des enzymes spécifiques [92, 135].

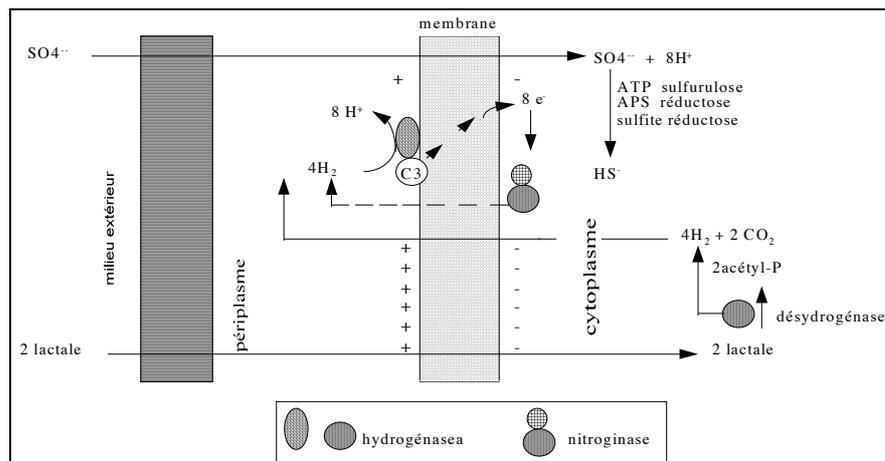


Fig. 1.5 : Cycle de consommation de la source de carbone dans la cellule des BSR [95].

Pour certaines espèces de BSR, le métabolisme peut être de type fermentatif en absence de sulfate ou tout autre accepteur d'électrons. Le composé organique, le plus souvent, fermenté est le pyruvate qui est converti en acétate, CO_2 et H_2 [30]. Cependant, certaines souches montrent une diversité métabolique. L'isolement d'une souche à partir d'une eau de gisement pétrolier, *Desulfatamaculum kuznetsovii* [128] est un exemple de cette diversité métabolique.

1. 2. 1. 3. 1. La réduction dissimilatrice et assimilatrice du sulfate

Contrairement aux autres bactéries dont les besoins en sulfate servent uniquement à la formation des composés soufrés (voie assimilatrice), les BSR utilisent les sulfates, essentiellement, comme accepteurs d'électrons et les réduisent en H_2S au cours de l'oxydation des substrats organiques (voie dissimilatrice) [84]. La réduction dissimilatrice du sulfate (respiration anaérobie) nécessite (fig. 1.6), selon Leclerc et al., [84] :

- ✓ une réaction d'activation du sulfate qui fait appel à une ATP sulfurulase qui échange le diphosphate de l'ATP par un sulfate pour donner l'adénosine -5'phosphosulfate ou APS. Cette étape est rencontrée aussi bien chez les BSR assimilatrices de sulfates que chez les BSR dissimilatrices de sulfates. L'assimilation correspond à la génération

d'ions sulfures pour être utilisée dans les synthèses cellulaires et la dissimulation correspond à la génération d'ATP, lors de l'oxydation des composés sulfurés.

- ✓ La deuxième étape est propre à l'assimilation. Elle correspond à une deuxième activation de l'APS en phosphoadénosine 5' phosphosulfate (PAPS) par l'enzyme APS kinase.
- ✓ La troisième étape est le passage aux sulfites, catalysée par le PAPS sulfotransférase (passage de PAPS en sulfite) et l'adénosine phosphosulfite réductase (passage de l'APS en sulfite).
- ✓ par la suite, deux mécanismes peuvent intervenir :
 - le 1^{er} mécanisme consiste en une réduction directe du sulfite (SO_3^{2-}) en sulfure sans libération des composés intermédiaires.
 - le second comprend trois étapes successives avec formation de deux produits intermédiaires : le tri- thionate ($\text{S}_3\text{O}_3^{2-}$) et le thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$).

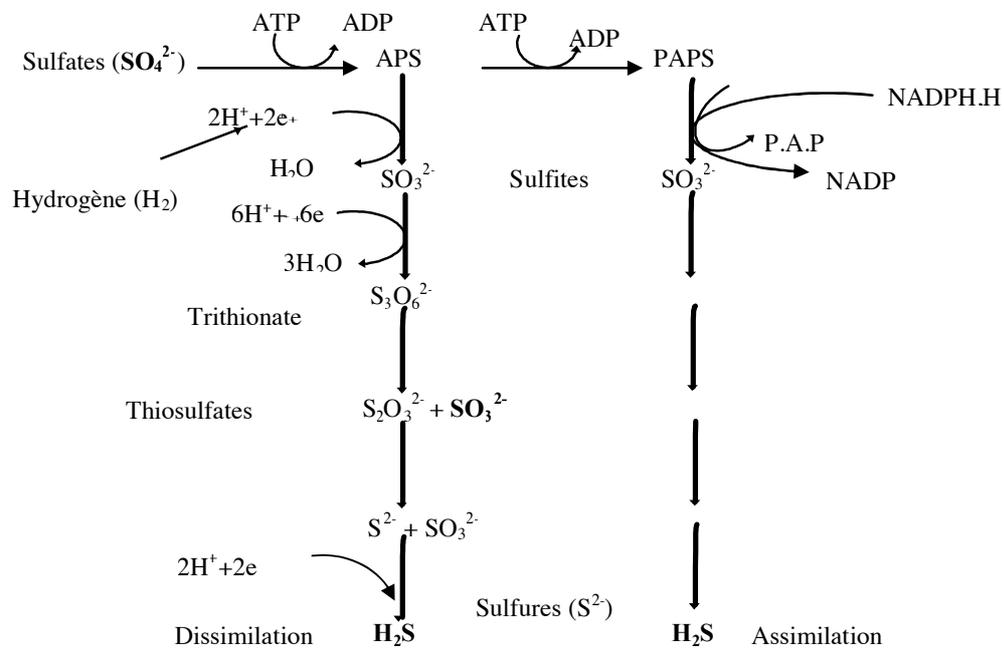


Fig. 1.6 : Mécanisme de la réduction des sulfates en sulfures chez les bactéries sulfato-réductrices [92, 105, 109].

1. 2. 1. 3. 2. Assimilation des sulfates par les B.S.R

Les bactéries sulfato-réductrices sont des réductrices actives des ions sulfates (SO_4^{2-}). Elles tirent leur énergie du développement de l'oxydation de l'hydrogène par les sulfates qui sont utilisés comme source de soufre pour leur synthèse organique [92].

Pour la réduction des sulfates, les B.S.R utilisent différentes sources de carbone, qui sont des acides carboxyliques (lactates), pour activer leur métabolisme, elles consomment l'hydrogène cathodique. Cependant, les BSR forment un groupe écophysologique très

complexe des procaryotes ayant une propriété commune : l'utilisation du sulfate comme accepteur principal d'électron au cours du métabolisme anaérobie [122, 136].

Après la consommation des lactates, elles sont converties à l'intérieur de la cellule en acétates, en H₂ et en CO₂. La réduction de l'ion sulfate en sulfure nécessite huit électrons, et se fait en plusieurs étapes, catalysée par des enzymes spécifiques [92].

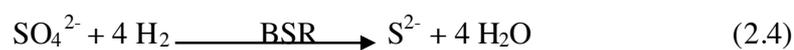
1. 2. 1.4 Les facteurs influençant la prolifération des bactéries sulfurogènes

En présence des micro-organismes, de substances organiques et inorganiques (PO₄³⁻, Fe²⁺) et à une température variant entre 0° et 75°C, la prolifération des bactéries sulfato-réductrices est influencée. Dans ces conditions, la corrosion est tributaire de la composition chimique de l'eau. Aussi, il est important de noter que les facteurs comme la structure, les altérations et les hétérogénéités de la surface que présente le métal sont des facteurs initiant de la corrosion bactérienne [92]. En général, les bactéries ne se développent qu'à un pH voisin de la neutralité (7 à 7,6), pour les BSR, elles exigent ou supportent des pH de 6 à 8. Additivement, le taux d'humidité des milieux de cultures ou de milieux naturelle est nécessaire au métabolisme bactérien.

1. 2. 1.5. Mécanismes réactionnels des bactéries sulfurogènes dans la corrosion

Les mécanismes de l'attaque microbienne des métaux, sont en relation avec les mécanismes électrochimiques. Ces mécanismes sont basés sur la théorie de la dépolarisation cathodique dans un milieu aqueux, à une température compatible avec la croissance des bactéries de la corrosion, en absence d'hydrogène et à un pH favorable. La figure 1.7 propose un des schémas pour illustrer ces mécanismes réactionnels.

Des modèles théoriques ont été proposés pour expliquer les mécanismes par lesquels les BSR peuvent influencer la corrosion de l'acier [125]. Stephenson et Stickland [86] ont mis en évidence l'origine de l'hydrogénase des BSR qui leur permettait d'utiliser l'hydrogène moléculaire adsorbé à la surface d'un métal. Von wolzogen Kuhr et al. [118] ont établi le modèle de la théorie de la dépolarisation cathodique, supposant que seules les BSR ayant une hydrogénase sont capables d'éliminer l'hydrogène produit par la réaction cathodique selon la réaction (2.4) [137, 138]:



Le produit de métabolisme (S²⁻) va réagir sur le produit d'oxydation (Fe₂⁺) pour donner du sulfure de fer (FeS) qui précipite au voisinage de l'anode. Ceci correspond à la dépolarisation anodique (2.5).



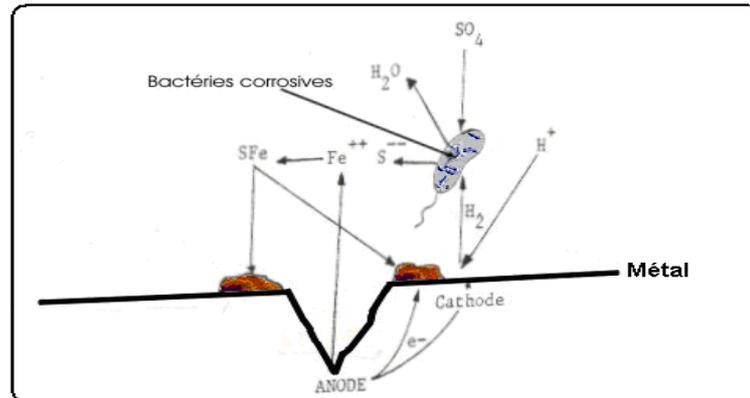


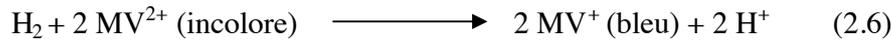
Fig. 1.7 : Mécanisme de la corrosion par les BSR [95].

La corrosion par les BSR se caractérise, souvent, par la formation de piqûre ouverte remplie de produit de corrosion noir riche en sulfure de fer (FeS) [125]. Crolet et Magot [32] ont émis le modèle par lequel les BSR étaient capables de produire une acidification locale. Le résultat de cette acidification conduit à une corrosion localisée du matériau. Ces bactéries modifient, par leur croissance, les propriétés acido-basiques du milieu en sécrétant de l'acide acétique, du CO_2 et du H_2S tout en l'acidifiant.

Cabriden et al. [138] ont expliqué que la nature biochimique de ces mécanismes ne change pas la réalité électrochimique du phénomène de la corrosion. Se trouvant dans des conditions défavorables à leur développement, l'intervention des bactéries sulfato-réductrices conduit à une dégradation du métal. Elles agissent directement ou par l'intermédiaire des substances corrosives. Ces dernières proviennent de leur métabolisme en accélérant un processus électrochimique déjà établi en créant les conditions favorables à leur établissement. Dans leurs travaux, de nombreux auteurs ont mis en évidence certains points communs pour tous les phénomènes de corrosion du fer en milieu aqueux tels que les sels ferreux et ferriques, sous forme de $\text{Fe}(\text{OH})_2$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ et $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$ [32, 63].

1. 2. 1. 6. Rôles des hydrogénases dans la corrosion des aciers

Des études ont révélé un effet notable de l'hydrogénase sur la corrosion. Par ailleurs, d'autres travaux ont démontré que les vitesses de corrosion de l'acier doux, dans l'eau de mer artificielle stérile sont similaires à celles obtenues avec des souches non corrosives de BSR n'ayant pas une activité hydrogénase (0,48 mm/an) [79, 86]. Par contre, en présence de souches de BSR possédant une activité hydrogénase, les vitesses de corrosion atteignent 7,79 mm/an [79, 139, 140]. En outre, des détecteurs de la présence d'hydrogénase sont commercialisés, afin de détecter la corrosion [141]. Bryant et al., [76] ont montré qu'il y avait une corrélation entre hydrogénase et la corrosion. Leurs expériences consistent à plonger des coupons d'aciers dans un vase B et à le connecter, uniquement par la phase gazeuse, à un vase A contenant une solution Tris tamponnée, de l'hydrogénase et du méthyl viologène. Une couleur bleue apparaît indiquant que l'hydrogénase assure la réduction du méthyl viologène (MV) suivant la réaction :



1. 2. 2. Les bactéries thiosulfatoréductrices (BTR)

Le nom des bactéries thiosulfato- réductrices est, conventionnellement, réservé aux bactéries qui provoquent la réduction des ions thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) sans la capacité de réduire les sulfates (SO_4^{2-}) [89, 142]. La réduction de l'ion thiosulfate se fait selon la réaction (2.7):



Garcia et al., [89] et Garrity et al., [133] ont proposé une classification qui regroupe 54 souches de BTR isolées à ce jour. La présence simultanée de thiosulfate et de BTR dans une installation en acier constitue un facteur majeur de risque de corrosion [142]. L'une des particularités de la corrosion des installations pétrolières est la présence des bactéries sulfato-réductrices dans l'eau produite et véhiculée par le pétrole, mais aussi la présence de thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) résultant d'une oxydation partielle du sulfure d'hydrogène (H_2S) présent dans le fluide. Cette étude montre qu'à coté des BSR, le fluide contenait également un grand nombre de diverses BTR [32, 89, 142].

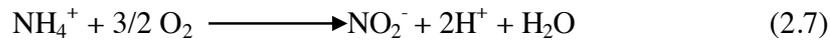
De nouvelles espèces thiosulfato- réductrices appartenant à l'ordre des thermotogales ont été isolées dans des puits de pétrole : *Thermotoga elfii* et *Thermotoga hypogea*. Ces deux bactéries sont capables de réduire les thiosulfates en sulfure; et de corroder les pipes lines et les réservoirs de pétrole en perforant le métal [129, 136].

D'autres travaux ont permis d'isoler une nouvelle bactérie thiosulfato-réductrice (*Dethiosulfovibrion peptidovorans*) à partir d'un puit de pétrole au Congo. Il s'agit d'une bactérie anaérobie stricte, légèrement halophile (3% NaCl). Ils ont, également, montré que cette bactérie était responsable d'une corrosion par piqûre de l'acier doux. La vitesse de pénétration des piqûres de corrosion était de 4 mm/an [129, 136].

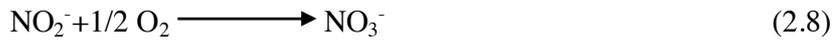
1. 2. 3. Les bactéries nitrifiantes

Le sol, les eaux douces et marines contiennent différents composés azotés; à l'exemple des protéines, de l'urée, des produits de décomposition et de l'azote sous sa forme minérale. Les transformations de l'azote peuvent être décrites sous forme d'un cycle [134]. L'ammoniac peut être oxydé par des bactéries aérobies nitrifiantes. La plupart sont des chimiolithoautotrophes, utilisant l'oxydation de leurs substrats minéraux comme seule source d'énergie et le gaz carbonique comme source exclusive de carbone. Elles sont Gram négatif, sans endospore, capables d'oxyder soit l'ammoniac, soit les nitrites [144]. Aussi; la nitrification est le procédé biologique rencontré chez les bactéries nitrifiantes. Degremont [82] l'a décrit en deux étapes.

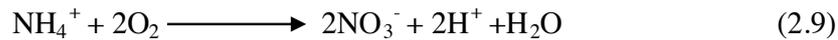
La première étape (nitritation) est l'oxydation de l'ion ammonium/ammoniac en nitrite par les bactéries nitrosantes des genres *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*..., selon la réaction:



La deuxième étape (nitratation) est l'oxydation de nitrite en nitrate par les bactéries nitratantes du genre *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, selon la réaction :



La réaction d'oxydation totale:



Dans certaines références bibliographiques, il a été montré que les bactéries nitrifiantes contribuent à la corrosion par l'acidification du milieu liée à la conversion de l'ammoniac en acide nitrique [82]. Le sulfure produit par l'activité de BSR est transformé en sulfates ou en soufre par les bactéries réductrices des nitrates et oxydantes du sulfure en nitrate puis en azote (dénitrification) ou en ammoniac (Fig. 1.8). D'autre part, la présence des bactéries hétérotrophes réductrices des nitrates concurrencent les BSR pour les donneurs d'électrons organiques, tels que le lactate, excluant la production de sulfure par les BSR (Fig. 1.8). Beaucoup de BSR et des bactéries hétérotrophes réductrices des nitrates oxydent le lactate incomplètement en acétate et en CO_2 . Les deux groupes de réactions A et B ont un point commun : l'oxydation du lactate avec du nitrate [7, 145].

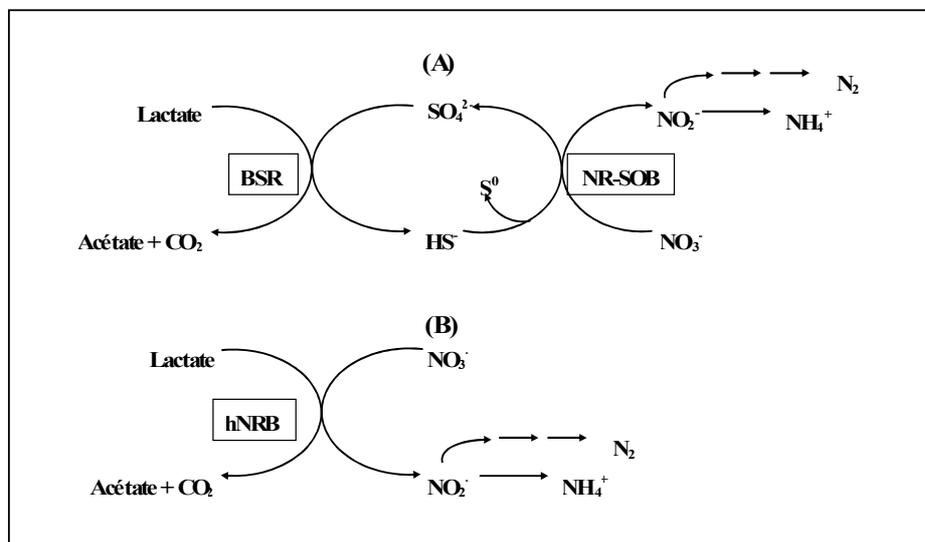


Fig.1. 8: Impact des nitrates sur le cycle du soufre présent dans un gisement de pétrole [7,145].

1. 3. BIOFILM

Les micro-organismes à l'origine de la biocorrosion finissent, toujours, par créer sur le matériau une sorte de colle visqueuse microbienne. Selon Costerton et al. [146], les biofilms sont définis comme des écosystèmes constitués de population de micro-organismes hétérogènes, inclus dans une matrice d'exopolymères et attachés à des supports solides. En milieu anaérobie, le développement des bactéries sulfurogènes (bactéries sulfatoréductrices et bactéries thiosulfato- réductrices) peut conduire à des cas de corrosion graves sur les aciers et/ou des cas de fragilisation par l'hydrogène des aciers sous protection cathodique. Ceci est particulièrement dangereux pour les structures en aciers des installations pétrolières [147].

Toute surface dans un environnement non stérile peut être colonisée par des microorganismes qui peuvent former un biofilm. Plus de 99% des bactéries se développent en biofilms sur une grande variété de surfaces telles que les métaux, les plastiques, les tissus vivants (humains et végétaux), les surfaces minérales (pierres, bétons) [148, 149]. Un biofilm peut être constitué d'une seule espèce bactérienne ou de plusieurs espèces de bactéries mais aussi de champignons, algues, protozoaires [150].

La capacité d'adaptation des microorganismes formant un biofilm est exceptionnelle ce qui limite l'efficacité des moyens de lutte contre la corrosion. Ainsi, des biofilms bactériens peuvent se développer à des températures allant de -12°C à +115°C, à des pH de 0 à 13, dans des milieux aqueux de salinité nulle à la saturation, sous des pressions de 0,01 bar à 1400 bars, à la surface de tous les matériaux, en présence de biocides, à la surface de lampes à ultraviolets ou de sources radioactives [4].

En effet, les bactéries contenues dans un biofilm présentent des caractéristiques très différentes de celles des bactéries planctoniques (bactéries libres en suspension) de par :

- a). la production d'exopolymères,
- b). les modifications structurales, par exemple la disparition des flagelles [38, 146],
- c). la mise en place d'un système de communication chimique, appelé «quorum sensing»;
- d). l'augmentation significative de leur résistance aux agents antimicrobiens (désinfectants, antibiotiques, inhibiteurs de corrosion) et aux stress environnementaux (déshydratation, privation nutritionnelle, rayonnements ultraviolets...) [47, 104, 106, 151], ce qui rend le biofilm plus tenace et difficile à l'éliminer.

1. 3. 1. Composition biochimique et minérale

Les études et les expériences sur le biofilm ont montré qu'il était principalement composé d'eau (80% à 95%), de micro-organismes variés, le plus souvent de bactéries [12] et également de substances polymériques extracellulaires ou « extracellular polymeric substance (EPS) » ou glycocalyx [152, 153]. D'autre part, l'analyse de la composition biochimique des EPS montre l'existence de complexes de polysaccharides exsudés par les cellules, de protéines, de lipides et d'acides nucléiques. En plus de sa partie organique, le biofilm

comprend une partie minérale composée des précipités minéraux provenant soit de la phase aqueuse extérieure au biofilm, soit de la formation sur la surface métallique de dépôt de corrosion insoluble (fig. 1.9) [80].

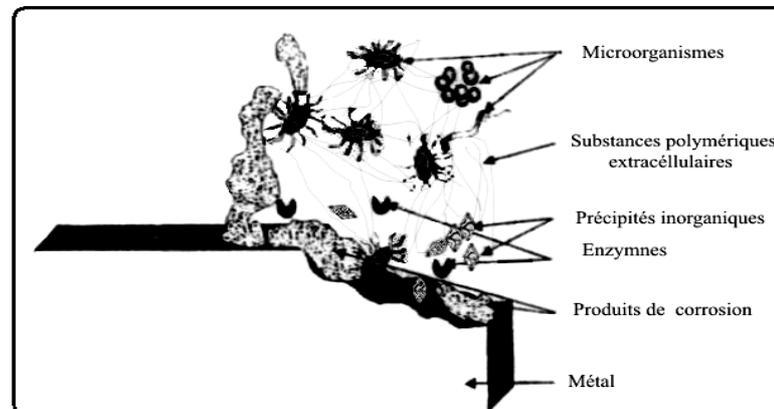


Fig. 1.9: Visualisation schématique des hétérogénéités chimiques et biochimiques dans un biofilm [12].

Les EPS ont notamment pour rôle de favoriser l'adhésion des bactéries au support et de les protéger contre les agressions externes, comme les biocides [12]. Certains auteurs [106, 143, 154] ont montré que le fait de déposer côte à côte deux glycocalix provenant de colonies bactériennes différentes, suffit à provoquer une corrosion, même en absence de bactéries. En effet, une grande quantité de glycocalix a été identifiée dans des cas de corrosion [154].

1. 3. 2. Influence du biofilm sur la biocorrosion

Certains chercheurs, comme Characklis et Marshall. [36] et White et al., [155] ont associé la corrosion bactérienne et le biofilm, estimant que seul la présence de ce dernier permettait d'expliquer l'effet de pile, par hétérogénéité biologique, et l'action métabolique des bactéries anaérobies, comme les bactéries sulfato- réductrices, en milieu aqueux oxygéné [85].

Videla [156] a fait intervenir le biofilm dans la dissolution du métal, montrant que les corrosions localisées (pitting) se trouvaient toujours sous une colonie bactérienne. Lee et Characklis [43] ont détecté la présence des bactéries sulfato-réductrices à l'intérieur du biofilm, et ont déduit que la formation de ce biofilm devait être préalable à sa colonisation par de telles bactéries qui nécessitent des conditions d'anaérobiose pour leur développement. Beranger et Mazille [12] ont avancé que le biofilm intervenait dans la biocorrosion par la création d'une interface biologique hétérogène entre le métal et son milieu.

D'après certains auteurs, lorsqu'un acier est plongé dans un milieu contaminé par des bactéries, il est généralement colonisé par ces mêmes bactéries qui forment un biofilm [11, 35, 37, 157].

1. 3. 3. Interaction bactéries du biofilm et matériaux

Angell et White [35] ont rapporté, lors de leur travaux, que dans une canalisation en acier, les microorganismes se structuraient entre elles pour se protéger des traitements physiques (cisaillement) ou chimiques (traitement par les biocides). Des micro-organismes susceptibles de participer à la biodégradation et à la transformation des matériaux (essentiellement les bactéries et les champignons) ont besoin de nutriments et de sources d'énergie pour reconstituer leur biomasse. Les sources d'énergie résultent le plus souvent des réactions d'oxydo-réduction des substances chimiques ou minérales pour les bactéries chimiolithotrophes. Il a été démontré que quel que soit le type respiratoire, les bactéries utilisaient toujours l'énergie mise à leur disposition pour synthétiser leurs constituants protoplasmiques, à partir, de substrats minéraux ou organiques présents dans le milieu [28, 158-160].

Ces divers micro-organismes coexistent dans les biofilms naturels en formant souvent des communautés synergétiques. Celles-ci affectent, alors, les processus électrochimiques de la corrosion grâce à un métabolisme coopératif global, ce qui n'est pas le cas avec les espèces bactériennes isolées [160]. Nous avons souvent révélé que les bactéries de la corrosion du biofilm correspondaient aux bactéries réductrices des matériaux (BRM). Elles réalisent la réduction des valences chimiques supérieures des composés métalliques à des valences multiples [82]. Ces composés peuvent servir d'accepteurs d'électrons pour les chaînes respiratoires des bactéries. L'environnement naturel contient, en effet, des oxydes ferriques et manganique- hématite (Fe_2O_3), hydroxyde de fer ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), oxyde de manganèse (MnO_2). De nombreux types de bactéries du genre *Pseudomonas* et *Shewanella* sont capables de réduire les oxydes supérieurs de manganèse ou de fer [18, 20, 21, 161].

Or, la résistance à la corrosion des aciers ordinaires survient, suite à la formation d'une couche protectrice de produits de corrosion ferriques insolubles. Les BRM pourraient alors favoriser leur corrosion en réduisant ces dépôts de corrosion en composés ferreux plus solubles et donc moins protecteurs. Aussi, elles pourraient modifier les potentiels d'oxydo-réduction locaux. Ce qui entraînera des conséquences de corrosion des aciers. Dans le cas de l'espèce, *Shewanella putrefaciens* le contact des cellules avec une surface à base d'oxyde de fer est nécessaire pour leur croissance [81, 162, 163].

A l'opposé, d'autres bactéries de la corrosion du biofilm correspondent aux bactéries oxydantes des valences inférieures des composés métalliques en valences multiples. Cela, conduit en sens inverse, à des produits insolubles qui précipitent. Les ions ferreux (Fe^{2+}) sont oxydés en ions ferriques (Fe^{3+}), ces derniers précipitent sous forme d'oxydes ou hydroxydes ferriques insolubles [74, 164].

Des bactéries comme *Gallionella ferruginea* et *Leptothrix spp* sont capables d'oxyder l'ion manganéux (Mn^{2+}) en ions manganiques (Mn^{3+}), induisant ainsi un dépôt d'oxyde manganique (MnO_2) [12, 165].

Ainsi, les accumulations denses de ces bactéries à la surface des métaux pourraient ainsi engendrer des réactions de corrosion, à travers la formation de dépôts d'oxydes de fer et de manganèses ce qui modifiera, nécessairement, le pouvoir oxydant du milieu corrosif sous le dépôt. D'autre part, les bactéries et les champignons peuvent produire d'importantes quantités d'acides organiques et de minéraux [81, 74].

Ainsi, les bactéries oxydantes du soufre et les bactéries acidophiles comme *Thiobacillus spp*, oxydent les formes réduites du soufre (sulfure, soufre élémentaire, sulfite) en sulfates avec formation d'acide sulfurique corrosif [89, 142].

De même, de très nombreuses bactéries fermentaires transforment la matière organique en acides organiques faibles. Ces bactéries se trouvent aussi, impliquées dans la corrosion du fer et de ses alliages. Les acides acétiques, formiques et lactiques sont les métabolites communs des bactéries productrices d'acides [145].

En outre, dans la formation des biofilms, certaines bactéries, comme *Pseudomonas aeruginosa* élaborent des polysaccharides extra- cellulaires acides, (alginates et acide alginique). On peut retrouver une acidité concentrée à la surface des métaux, en raison de la barrière de diffusion constituée par l'épaisseur d'exopolymères. Ce qui affecte la mesure de l'évaluation de l'acidité locale à la surface du métal comparée à celle faite dans la phase aqueuse [166].

1. 3. 4. Nature des biofilms et leur formation

La formation d'un biofilm sur les surfaces exposées à l'eau a fait l'objet de nombreuses études tant en milieu naturel qu'en laboratoire avec notamment des études avec des souches pures [14, 167] ou des consortiums de bactéries. Or, malgré une littérature abondante, les mécanismes d'adhésion et en particulier les étapes initiales lors des premières heures d'immersion restent encore incompris.

Dans la figure 1.10, nous avons proposé un schéma schémoptique des étapes de la formation du biofilm, lors d'un passage dans une canalisation en acier d'une eau contaminée par les bactéries de la corrosion.

Haslay *et al.*, [85] ont expliqué que divers microorganismes pouvaient coexister dans les biofilms naturels en formant souvent des communautés synergétiques. Celles-ci affectent, alors, le processus électrochimique de la corrosion à travers un métabolisme coopératif global qu'aucune des espèces isolées n'aurait pu développé seule. Ces chercheurs ont schématisé cette cohabitation par la figure 1.11.

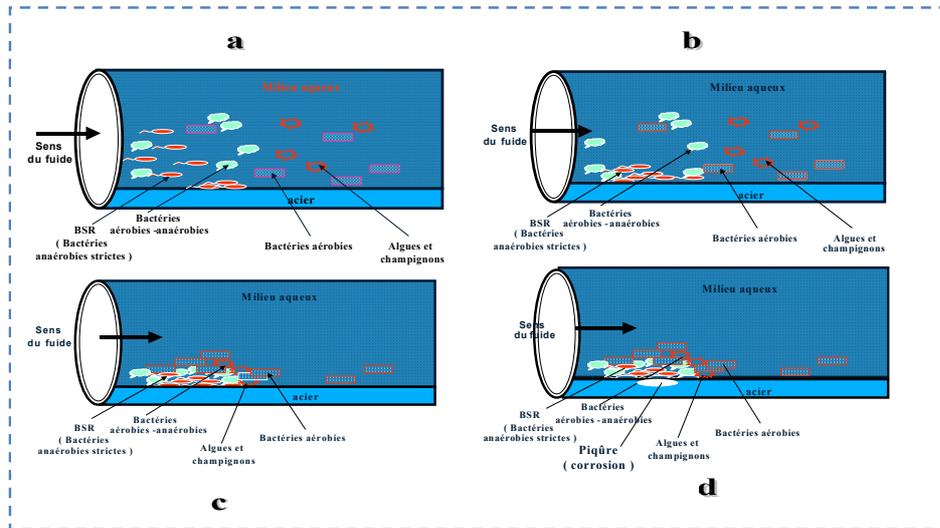


Fig. 1.10: Etapes de formation du biofilm dans une canalisation. **a)**: Adhésion des bactéries à la surface de l'acier, **b)**: Amorçage du biofilm, **c)**: Formation du biofilm, **d)**: Formation de piqûre sur l'acier.

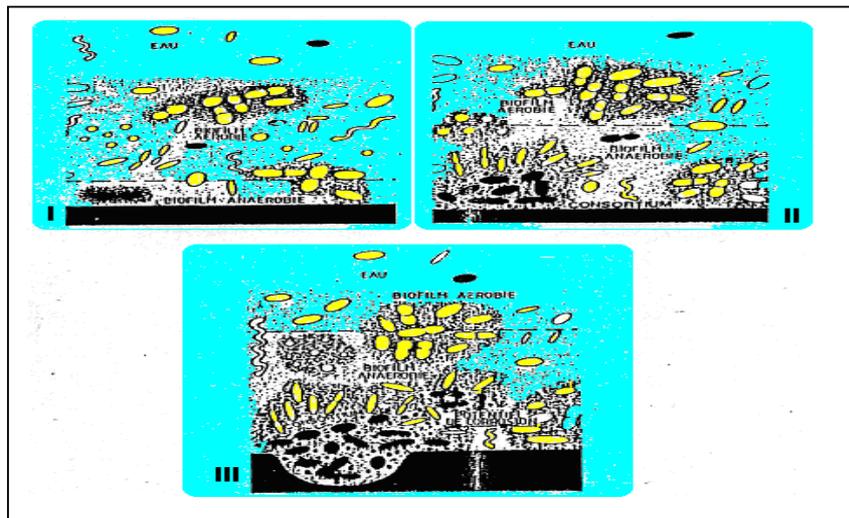


Fig. 1.11 : Représentation schématique des communautés bactériennes responsables de la corrosion métallique.- Développement de I à III d'un biofilm anaérobie avec des bactéries sulfato- réductrices (en noir) et d'autres espèces anaérobies (en blanc), les colonies mixtes (consortium) finissent par provoquer entre elles des potentiels de corrosion [85].

1. 3. 4. 1. Film primaire

L'exposition de tout substrat en milieu aqueux conduit à une colonisation rapide de celui-ci, suivant une séquence couramment admise d'un film primaire, essentiellement composé de macromolécules organiques (exopolymères, glycoprotéines, acides humiques) et/ou inorganiques présentes dans le milieu ou sécrétées par les micro-organismes vivants dans ce

milieu, puis de bactéries et ensuite de macro-organismes. La phase de fixation des organismes de plus grande taille, les macrosalissures, essentiellement constituées d'algues macroscopiques, est toujours postérieure même si la première étape de micro salissures ne semble pas toujours indispensable. Le film primaire est essentiel, car c'est lui qui, en modifiant certaines propriétés de surface métallique (tension de surface, énergie libre de surface, polarité, mouillabilité) du matériau conditionne l'attachement ultérieur des bactéries [154, 166, 167]. Certaines études ont été menées pour étudier la formation du biofilm sur un acier inoxydable immergé dans l'eau de mer naturelle et dans l'eau de mer stérile [113, 147, 154, 159, 169].

1. 3. 4. 2. Adhésion réversible

L'attachement bactérien intervient lui-même quelques heures après l'immersion des supports en deux étapes successives. Dans un premier temps, la fixation des bactéries est réversible sur le support. Elle met en jeu de faibles interactions entre le support et les cellules. La fixation réversible par interactions électrostatiques et forces de Van Der Waals. Les micro-organismes, facilement détachables du substrat par simple rinçage, sont alors à une distance limite de la surface métallique [154, 170-172].

1. 3. 4. 3. Adhésion irréversible

Dans un second temps, l'adhésion de ces micro-organismes est rendue irréversible par la sécrétion de polymères extra- cellulaires formant des ponts de fixation entre la cellule et la surface [154]. L'attachement irréversible des micro-organismes met en jeu, quant à lui, des interactions de haute énergie. Les forces intervenantes sont du type dipôle- dipôle, interactions Debye, interactions ion- dipôle, liaisons hydrogène, ou ponts polymériques.

Ces exopolymères ont un rôle multiple dans l'attachement irréversible des micro-organismes aux surfaces [19, 106, 173], mais également dans le piégeage des éléments nutritifs, (matière organique et inorganique), nécessaires à la croissance bactérienne et protègent ces mêmes bactéries d'agressions de nature biochimiques, chimiques ou biologiques. Si les conditions physico-chimiques de l'interface leur sont favorables, les bactéries vont se multiplier sous forme de micro- colonies [171].

La fusion de ces colonies et de leurs sécrétions polymériques constitue le voile bactérien ou biofilm. Les microsallissures sont constituées de bactéries, de diatomées, de protozoaires et de champignons. Les premiers colonisateurs identifiés sont essentiellement des bacilles de petite taille : *Pseudomonas* et *Flavobacterium* (du type copiotrophes) suivis de bactéries de diverses formes et en particulier les formes pédonculées *Caulobacter* et *Hyphomicrobium* (du type oligotrophes) [113, 174].

Des études qualitatives et quantitatives sur le développement des biofilms bactériens réalisées sur trois supports différents immergées dans une eau de mer naturelle circulante (acier inoxydable, aluminium, filtre nucléopore) ont permis de mettre en évidence de larges

fluctuations saisonnières, tant au niveau des densités bactériennes qu'au niveau des cinétiques de colonisation des supports [40].

La température semble être le facteur prépondérant influençant le taux de colonisation; la période estivale est plus propice à une colonisation importante et plus rapide que la période hivernale. Concernant l'aspect morphologique, les différents types identifiés en sont présents toute l'année, cependant les successions de peuplement (coques, bacilles, formes filamenteuses, pédonculées ou polaires) se font plus progressivement en hiver qu'en été. L'adhésion des bactéries, la formation du voile biologique et son développement dépendent de plusieurs facteurs dont la physico-chimie du milieu (température, salinité, oxygène dissous, teneur en matière organique, etc.), la nature du substrat, la micro-topographie de surface et les conditions hydrodynamiques au niveau des surfaces [175].

La vitesse de colonisation est fortement influencée par la nature du substrat ainsi la présence de métaux lourds (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+} , Ni^{2+}) retarde de façon importante le développement d'un biofilm. De plus, les caractéristiques du substrat peuvent considérablement modifier la communauté bactérienne [41, 176, 177]. Le biofilm développé sur divers supports s'avère fort hétérogène.

Des études sur la formation de biofilms à la surface des aciers au carbone et des aciers inoxydables ont été réalisées après 9 jours et 21 jours d'immersion dans de l'eau de mer naturelle. L'observation au microscope à balayage de biofilms a montré que celui-ci était, essentiellement, composé de cellules en forme de bâtonnet à morphologie trapue ou allongée, des formes filamenteuses apparaissent également [37].

Au 21^{ème} jour d'immersion, le biofilm est multi- stratifié, associé à de la matière particulaire. Les couches les plus profondes sont, essentiellement, composées de formes en bâtonnets à morphologie variable. Les bactéries sont engluées dans des exopolysaccharides; pour les couches supérieures, les formes filamenteuses s'entremêlent. La figure 1.12 présente une photographie prise au microscope à balayage de biofilms formés sur une installation en acier inoxydable, après 9 jours et 21 jours d'immersion dans une eau de mer naturelle en circulation dans cette installation [37].

1. 3. 5. Conséquences du biofilm

Les effets négatifs des biofilms sur les matériaux et les équipements sont nombreux : écran hydrodynamique, diminution des échanges thermiques, pertes des propriétés optiques, blocage de fonctions mécaniques, accélération de la corrosion ou biodégradation [40]. La plupart des activités marines et pétrolières y sont confrontées : ouvrages au large ou côtier, navires pétroliers, plates-formes pétrolières offshore, installations pétrolières onshore. Les dépenses annuelles attribuées à l'existence de biofilms sont énormes, à titre d'exemple, les opérations de nettoyage des noeuds des plates-formes pétrolières avant inspection sont estimées à des millions d'euros/an en mer du Nord; 500 millions de dollars de dépenses

annuelles supplémentaires en fuel sont nécessaires à la marine Américaine pour combattre la résistance des frictions additionnelles occasionnées par la présence d'un biofilm [37].

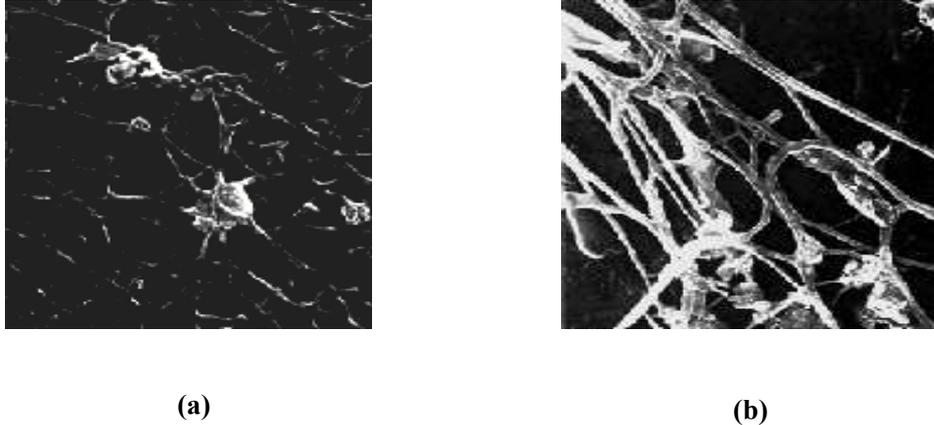


Fig. 1.12: Photographies obtenues au microscope à balayage de biofilm formé sur acier inoxydable, (a) : après 9 jours d'immersion et (b) : après 21 jours d'immersion (Gr x 2000) [37].

Le développement d'un biofilm n'est pas toujours considéré comme un facteur de gêne. Cependant, l'avantage du développement d'un tel voile biologique reste limité, et les applications telles que le traitement des eaux polluées, la récupération des huiles, l'exploitation de la production d'exopolysaccharides bactériens par l'industrie pharmaceutique, alimentaire ou des cosmétiques sont encore restreintes. Mais à l'opposé, des exemples d'inconvénients dus à la présence d'un biofilm sur des structures métalliques pétrolières et marines sont citées.

1. 3. 6. Détection des biofilms

Characklis et Marshall [36] ont mentionné la disponibilité de nombreuses techniques de détection des biofilms. Malheureusement, dans la plupart des cas, ces mesures ne peuvent être réalisées in- situ et en continu sur une même série d'échantillons et nécessitent obligatoirement un prélèvement de la matière. Or, il est important de pouvoir détecter et quantifier in- situ le développement d'un biofilm afin de contrôler au mieux et réduire la biocorrosion due aux bactéries sulfurogènes.

Par contre, au niveau du laboratoire, des techniques récentes et puissantes d'analyses de surface sont utilisées pour étudier les biofilms [36,37]. Nous citons la microscopie électronique à balayage (MEB) et le comptage direct des bactéries contenues dans un biofilm par la microscopie à épifluorescence (DAPI, FISH). Aussi, pour la caractérisation chimique du biofilm passif, la spectroscopie photoélectronique X-ray (AR-XPS) est appliquée. La spectroscopie photoélectronique X-ray associée à la spectrométrie ionique de masse à temps de vol (ToF-SIMS) est utilisée pour la caractérisation chimique des espèces organiques adsorbées. L'identification de la morphologie, la détermination de l'épaisseur et l'homogénéité

du biofilm organique sont obtenues par la microscopie à force atomique (AFM), alors que la microscopie confocale laser (CLM) permet d'observer les biofilms stables et instables.

1. 4. LUTTE CONTRE LA BIOCORROSION

1. 4. 1. Antagonisme bactérien (traitement biologique)

L'antagonisme est le principal mode d'inhibition, ou la principale forme d'association négative rencontrée dans le monde bactérien [134]. Les bactéries peuvent entrer en compétition pour une nourriture peu abondante, pour l'oxygène ou pour l'espace [183]. Regnault [143] a parlé de l'antagonisme direct et indirect. Pour l'antagonisme direct, il est montré que des espèces microbiennes inhibent le développement d'autres espèces avec lesquelles, elles sont en compétition en modifiant certains facteurs physico-chimiques du milieu, comme le pH.

Dans d'autre cas, l'inhibition directe est due aux facteurs intrinsèques liés directement à la physiologie de la bactérie inhibitrice (croissance rapide). Alors que pour l'antagonisme indirect, il a été remarqué qu'il repose sur la production, par une espèce bactérienne donnée, d'une substance qui provoque la mort d'une autre espèce bactérienne ou elle inhibe son développement. Cette substance peut être une toxine, un antibiotique ou une substance chimique à pouvoir bactéricide ou bactériostatique [178].

En bactériologie, le terme de toxine définit toute substance peptidique, protéique simple ou complexe (associée à des glucides ou à des lipides) ou macromolécules lipopolysidiques, capables à des doses très faibles ($\sim 10^2$ à 10^{-6} mg) de provoquer la mort d'un organisme vivant. En outre, le terme d'antibiotique définit les agents antibactériens naturels élaborés par des bactéries et des champignons doués, en général, d'un pouvoir bactériostatique ou bactéricide puissant vis-à-vis d'un autre microorganisme [109].

Plusieurs chercheurs ont tenté de limiter la CIM en testant des sels inorganiques. Ainsi, Rincon et al., [179], Schwermer et al., [180] et Rempel et al., [181] ont montré l'efficacité des molybdates et des nitrates pour limiter la biocorrosion des oléoducs et gazoducs. D'autres chercheurs se sont intéressés à l'amélioration du matériau lui-même en ajoutant des éléments métalliques dans sa composition : l'addition simultanée de cuivre et de niobium dans un acier austénitique inoxydable lui confère des propriétés anti-microbiennes, notamment contre *Escherichia coli* [182].

1. 4. 2. Inhibition par les Bacillaceae

Certains auteurs ont montré que les genres *Bacillus*, *Clostridium* et *Sporolactobacillus* ont la possibilité de se comporter comme des antagonistes bactériens. Les espèces du genre *Bacillus* sont des chimioorganotrophes [183] sous forme de bâtonnets, généralement, mobiles, sporigènes, Gram positif, aérobies strictes ou anaérobies facultatifs [152].

En effet, certaines espèces microbiennes du genre *Bacillus* produisent des toxines (bacitracine, gramicidine et polymyxine) et leur capacité à sporuler, leur confère une très grande résistance dans les milieux extérieurs à leurs milieux habituels. Plusieurs autres espèces microbiennes du genre *Bacillus* produisent d'autres toxines différentes. La céréolysine est produite par *Bacillus cereus*, la bacitracine et la surfacine par *Bacillus subtilis*, la polymexine par *Bacillus licheniformis*, la gramicidine et la tyrocidine par *Bacillus brevis*... [144, 152].

Mais dans certaines littératures, il a été noté que certaines solutions sont apportées par les bactéries elles-mêmes. Nous pouvons citer la production de subtiline, de surfactine, de bacitracine synthétisées par le genre *Bacillus* [110]. En Australie, par exemple, des chercheurs ont développé une peinture, pour les coques de bateaux, à base d'algues dans laquelle ils ont intégré une bactérie *Pseudoalteromonas tunicata*, qui exsude des substances empêchant les organismes marins de proliférer [184]. Par ailleurs, l'addition de *Pseudomonas fragi* ou de *Pseudomonas polymyxa* dans la matrice sol-gel du revêtement améliore la résistance à la corrosion d'un facteur 10 par rapport à une peinture abiotique [167]. D'autres études ont montré l'influence des produits du métabolisme de certaines bactéries dans la lutte contre la biocorrosion. La gramicidine S produite par le biofilm de *Bacillus brevis* inhibe la corrosion induite par les bactéries sulfato-réductrices (BSR).

Les polyglutamates et polyaspartate sécrétés par *B. subtilis* inhibent la corrosion de l'aluminium 2024 [29, 185]. De même pour *B. licheniformis* qui produit une couche adhésive protectrice de gamma-polyglutamate [186]. Par contre, des divergences peuvent exister au sein d'une même famille. Ainsi, par exemple, les souches de *Bacillus* (*Bacillus licheniformis* T6-5 et *Bacillus firmus* H2O-1) produisant des substances antimicrobiennes efficaces empêchent la formation de biofilms nocifs produits par d'autres souches de *Bacillus* (*Bacillus pumilus* LF4) et réduisent de ce fait la viabilité et l'adhésion d'un consortium de bactéries sulfato-réductrices (BSR) [187].

Les substances polymériques extracellulaires (EPS) secrétées par les souches *Desulfovibrio indonesiensis* et *D. vulgaris* favorisent la corrosion alors que celles de *D. alaskensis* l'inhibent [188]. D'autres bactéries sont également responsables des pertes d'efficacité des inhibiteurs commerciaux à base d'acide carboxylique ou d'esters. En effet, *Serratia marcescens* ACE2 et *Bacillus cereus* ACE4 sont capables de dégrader les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques présents dans ces inhibiteurs en les utilisant comme unique source de carbone [165]. Ceci peut s'expliquer par la présence des enzymes contenues dans les micro-organismes. En effet, il a été démontré que la souche ACE2 possède des enzymes telles que la catalase, le cytochrome oxydase et la peroxydase qui dégradent les alcanes linéaires (C10-C20) et ramifiés présents dans le pétrole [189].

1. 4. 3. Inhibition par les bactéries réductrices de nitrate

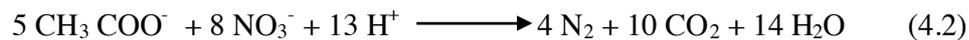
Mais la récente technologie utilisée pour diminuer la CIM consiste à mettre en valeur l'inhibition de la biocorrosion par les bactéries ayant une grande affinité aux nitrates.

Actuellement, et malgré certaines controversions, un nombre croissant d'industriels du pétrole dans le monde ont recours à l'injection de nitrate dans les gisements pétroliers. Ce qui permettra d'éviter les nuisances dues aux émissions de sulfures lors de l'exploitation du pétrole [64, 190, 191-193].

Grâce à l'apport de nitrates, des bactéries nitrato- réductrices initialement présentes en faible proportion dans les eaux des gisements pétroliers peuvent se multiplier et provoquer à la fois l'inhibition du développement des bactéries sulfato- réductrices et l'oxydation des sulfures produits par ces dernières [129, 116], selon la réaction:



Jack [194] et Jenneman et al., [195] ont démontré que l'addition de nitrate aux eaux de gisement d'un champ pétrolier chargées de sulfures pourrait être utilisée pour diminuer la concentration en sulfures dans ces eaux. Dans ce cas, les nitrates stimulent l'activité des bactéries nitrato-réductrices oxydant les sulfures qui à leur tour stimulent la dénitrification hétérotrophe des bactéries. Ces dernières entrent en compétition avec les bactéries sulfato-réductrices pour la source d'énergie (donneurs d'électron) comme par exemple, les acides organiques (acétate) selon la réaction suivante [145] :



Eckford et Fedorack [192] ont montré que l'addition de nitrate d'ammonium à un puits injecteur dans le sud-est d'Oklahoma a provoqué une réduction de 40 à 60% les sulfures de trois puits producteurs de pétrole adjacents. Ils ont attribué cette réduction à l'activité des bactéries nitrato- réductrices.

En prospectant des puits de pétrole en Australie et au Mexique, les chercheurs et leur partenaires nationaux dans ces pays ont pu isoler et identifier deux nouveaux genres bactériens consommateurs de nitrates, *Petrobacter succinatimandens* [116] et *Garciella nitratreductens* [196] qui se distinguent par leurs activités métaboliques. La bactérie *Petrobacter succinatimandens*, isolée d'un puits de pétrole situé dans le Queensland, à l'Est de l'Australie, s'est révélée capable d'oxyder les acides organiques.

Cette nouvelle bactérie se caractérise par un métabolisme aérobie, ce qui signifie qu'elle se développe en présence d'oxygène. L'introduction accidentelle d'oxygène, *via* un apport d'eau extérieur au gisement (infiltrations d'eau de pluie, pratique courante d'injection d'eau lors de l'extraction du pétrole) pourrait expliquer la présence de cette bactérie et son maintien dans un environnement anaérobie. En revanche, *Garciella nitratreductens*, isolée à partir de plusieurs puits de pétrole situés dans le Golfe du Mexique, présente un métabolisme anaérobie, comme la plupart des microorganismes vivant dans ces milieux [196].

1. 4. 3. 1. Mécanisme de l'inhibition par les bactéries réductrices de nitrate

La réduction des nitrates par les bactéries est possible selon deux voies : la réduction assimilatrice et la réduction dissimilatrice [30] (fig. 1.13). En ce qui concerne la réduction du nitrate en ammoniac, dans cette voie, le nitrate est utilisé pour la biosynthèse des protéines et des autres constituants cellulaires azotés [139]. Ce processus existe également chez les souches *Azotobacter chroococcum*, *Arthrobacter globiformis*, chez certaines espèces de *Pseudomonas* et *Bacillus*. Il est également répandu chez les *actinomycètes* [139]. Pour la réduction dissimilatrice, le nitrate intervient comme accepteur final d'électrons en anaérobiose (respiration anaérobie).

La respiration anaérobie est associée à l'activité des enzymes localisées dans la membrane cytoplasmique et réalisent soit la réduction du nitrate en nitrite, soit la dénitrification, soit les deux à la fois [152].

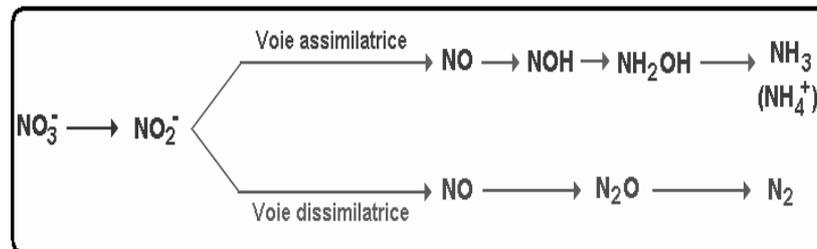
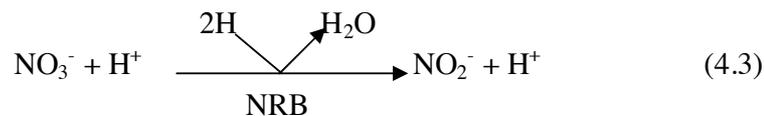
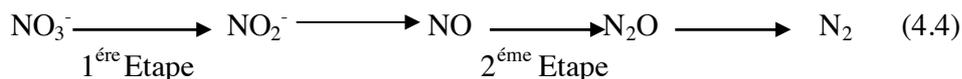


Fig. 1.13: Réduction biologique des nitrates [85].

Hubert et al., [7] et Brock et al., [139] ont rapporté que de très nombreuses espèces bactériennes chémoorganotrophes, aérobies ou anaérobies sont capables de réduire les nitrates en nitrites. Cette réduction est réalisée par une enzyme cytoplasmique la nitrate réductase B (NRB) et comporte les étapes suivantes :



En parallèle, il peut y avoir la réduction des NO_3^- et des NO_2^- en N_2O et N_2 (composés gazeux). Cette dénitrification est un processus très important réalisé par les bactéries dénitrifiantes, selon les étapes suivantes [7, 145]:



Cette voie de dénitrification implique l'action successive des enzymes cytoplasmiques. La première étape de ce processus est identique à celle de la réduction assimilatrice. Nous observons la réduction des ions nitrates en nitrites par l'intervention de l'enzyme nitrate réductase A (NRA), alors que la deuxième étape, correspondant à la réduction des nitrites en oxydes nitriques (NO) puis en oxydes nitreux (N_2O) puis en azote moléculaire (N_2), est

assurée successivement par les enzymes nitrite réductase (NIR), NO réductase et N₂O réductase.

Champiat et Larpent [197] ont cité plusieurs genres bactériens dénitrifiants appartiennent à presque tous les groupes physiologiques de procaryotes. Leur variabilité métabolique s'applique autant à leur besoin en carbone qu'à leur source d'électron ou à leur substrat azoté. Généralement, les bactéries dénitrifiantes sont des chimiohétérotrophes, mais quelques exceptions de bactéries autotrophes peuvent exister.

1. 4. 4. Biocides (traitement chimique)

Dans la nature, les bactéries sont nombreuses, variées et variables. Dotées de mécanismes biologiques, ces microorganismes sont à l'origine de la consommation des éléments nutritifs présents dans le milieu et de la production des métabolites corrosifs, ce qui leur permet d'intervenir dans la corrosion. Afin d'éviter les conséquences nuisibles de ces microorganismes sur les matériaux métalliques telles que les canalisations en acier, de nombreux traitements de natures physico- chimiques ou biologiques sont proposées. Le seul but est recherché est l'inhibition de leur développement.

Beranger et Mazille [12] ont rapporté que pour limiter les mécanismes et les phénomènes dus à la biocorrosion, il faudrait intervenir sur l'un des trois facteurs qui contribuent à son établissement : le matériau, le milieu ou les microorganismes (fig. 1.14). Schmidt [111] a parlé de la protection active contre la biocorrosion par l'utilisation d'inhibiteur de corrosion et de biocide et de la protection passive par un meilleur choix de la nuance de matériaux ou par un revêtement résistant (organique, inorganique, métallique).

Selon la directive européenne concernant la mise sur le marché des produits biocides (98/8/CE1), un biocide est défini comme étant «des substances actives ou des préparations contenant une ou plusieurs substances actives, qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur. Elles sont destinées à détruire, à repousser ou à rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique». D'après Arcy [46], il existe 5 classes de biocides :

- les bactériostatiques qui limitent la prolifération des bactéries ;
- les bactéricides qui éliminent les bactéries ;
- les fongicides qui protègent de la dégradation par les champignons ;
- les algicides qui protègent de la dégradation par les algues ;
- les insecticides qui détruisent les insectes nuisibles.

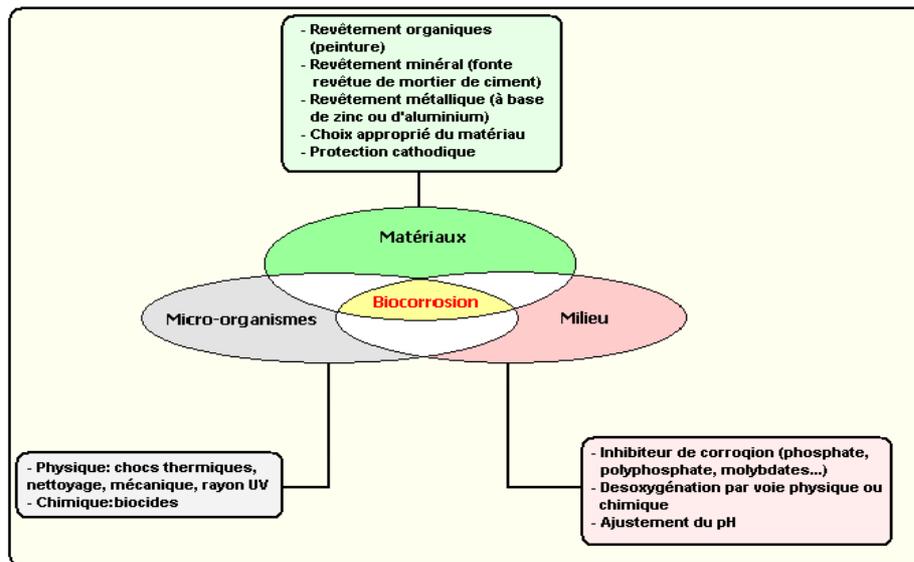


Fig. 1. 14: Moyens de lutte contre les phénomènes de biocorrosion [12]

Ils sont utilisés dans une vaste gamme de produits industriels et domestiques (désinfectant, protecteur du bois, produits antisalissure...) pour tuer ou inhiber la croissance d'organismes vivants nuisibles. L'utilisation des biocides se fait dans divers endroits; dans le secteur pétrolier et gazier, les laveries, les industries agro-alimentaires. Leur fonction principale étant la destruction des microorganismes [46, 48, 196, 198].

D'une façon générale, les biocides à large spectre c'est-à-dire actif sur une large variété de microorganismes (*bactéries Gram positifs* et *Gram négatifs*, aérobies et anaérobies, levures et champignons) seront préférés aux biocides à spectre restreint, surtout lorsqu'il s'agit de lutter contre des biofilms qui sont le plus souvent polymicrobiens [45, 47, 50]. Aussi, pour une meilleure efficacité et notamment une bonne pénétration des biofilms, les biocides peuvent être mis en œuvre en association avec les tensioactifs.

Dans les formulations commerciales, plusieurs biocides sont, en général, associés afin d'augmenter les chances de réussite d'un traitement ou pour élargir le spectre d'activité.

1. 4. 4. 1. Utilisations des biocides

L'Europe est le deuxième consommateur de biocides (26 % du marché) devancée par l'Amérique du Nord (43%). D'après Arcy [46], le domaine des liquides métallurgiques consomme 5% de biocides et le domaine de la fabrication du bois en consomme 25%. D'autre part, lors d'un inventaire de l'utilisation des biocides au Danemark en 1998/99, la consommation des biocides dans le domaine du traitement des eaux est estimé à 18% [54, 193]. La consommation des substances actives dans les produits biocides a été estimée entre 3600 et 5530 tonnes par an. Néanmoins, la demande industrielle de biocides en Europe se

trouve essentiellement en l'Allemagne (25 % du marché), suivie de l'Angleterre, la France et les pays nordiques (15 % du marché).

En Algérie, les domaines de production et d'exploitation du pétrole et du gaz consomment une moyenne annuelle équivalente à 12 millions d'euros de produits de traitement anti-corrosion électrochimique et anti-corrosion bactérienne. Pour traiter les installations de production de gaz, une enveloppe annuelle moyenne de 3 millions 600 mille euros est consacrée pour l'achat des inhibiteurs de corrosion gaz, ce qui représente l'équivalent de 4500 fûts/an [46]. Pour traiter les installations de production de pétrole, une enveloppe annuelle de 50 mille euros est utilisée pour l'achat des inhibiteurs de corrosion huile, l'équivalent de 100 fûts/an. Annuellement, pour la protection des circuits et des installations de production d'eau d'injection, environ 1 million 50 mille euros, l'équivalent de 1500 fûts/an, sont consommés pour l'achat des biocides et 60 milles euros, l'équivalent de 1000 fûts/an, sont consommés pour l'achat des inhibiteurs de corrosion eau [6].

1. 4. 4. 2. Applications et actions des traitements chimiques

L'utilisation des biocides est la caractéristique principale des traitements chimiques. Littéralement, le biocide peut être divisé en deux grandes catégories, les oxydants et les non-oxydants. Les biocides oxydants pénètrent et détruisent les cellules bactériennes, tandis que les biocides non oxydants pénètrent le biofilm et endommagent la membrane cellulaire ou ils détruisent les mécanismes générateurs de l'énergie bactérienne [48, 58].

Dans la littérature, le traitement chimique de la MIC par des biocides est utilisé comme tel pour spécifier un biocide et son large-spectre. Cela signifie que le biocide doit pouvoir tuer autant de types divers de micro-organismes que possibles [46, 48, 200].

En d'autres termes, si un certain biocide est capable de tuer des bactéries et des mycètes, c'est un biocide à large spectre comparé à un biocide qui ne tue que les bactéries. De la même manière, si un biocide peut tuer plusieurs espèces d'un même genre bactérien, c'est un biocide à large spectre comparé à celui qui ne tue qu'une espèce du même genre bactérien [46].

La littérature a mis en évidence les critères de sélection des biocides pour protéger les circuits d'exploitation pétrolière. Cette sélection repose sur le type de micro-organismes impliqués, l'historique antérieure du fonctionnement des circuits, le type des circuits à traiter, le traitement chimique existant pour le contrôle de la corrosion, les caractéristiques chimiques et physiques de l'eau du système ou du circuit à protéger et sa limitation et son restriction vis à vis de l'environnement [45, 47, 50].

Sur un site pétrolier, il est, important, de noter que les inhibiteurs de corrosion utilisés principalement pour le traitement de la corrosion non microbiologique peuvent être associés à l'utilisation des biocides. Dans un circuit transportant un effluent non agressif, Lutey [201] a rapporté que l'injection d'un inhibiteur à base de chromates à une concentration comprise entre 50 à 1000 mg/l, suivi de l'injection d'un acide peut rendre l'inhibiteur de corrosion

toxique vis-à-vis de nombreux micro-organismes de la corrosion [201]. De cette façon, la corrosion électrochimique non- microbienne et la MIC peuvent être traitées.

Boivin [141], Lutey [201] et Videla et al. [128] ont répertoriés les inconvénients et les avantages des biocides oxydants et non- oxydants utilisés dans l'industrie pétrolière. Ce répertoire a porté sur la manipulation des biocides.

Il existe une autre manière de classer les biocides; elle est basée sur leurs mécanismes d'action. Williams [203] a parlé des biocides électrophiles et des biocides actifs sur la membrane bactérienne. Sur la figure 1.15, nous présentons une synthèse des sites d'action de certains biocides au niveau de la cellule bactérienne et utilisés dans la protection contre la corrosion bactérienne des installations pétrolières.

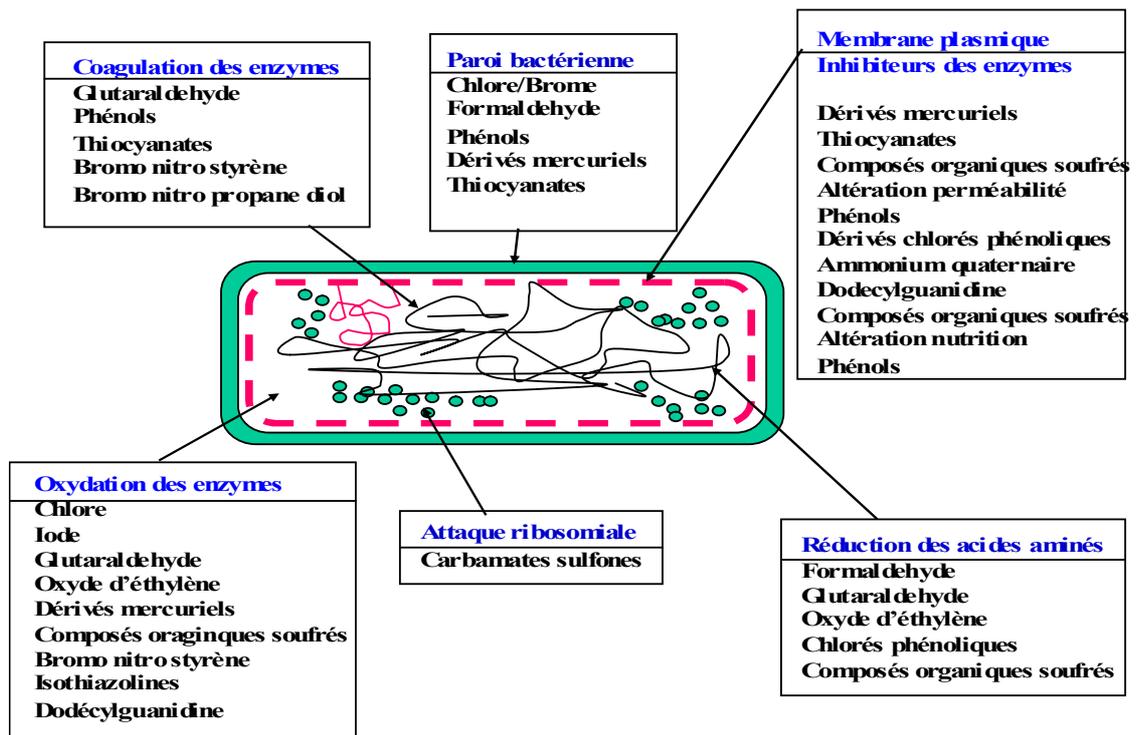


Fig. 1.15: Schéma des sites d'action de certains biocides au niveau de la cellule bactérienne.

Concernant la résistance des bactéries de la corrosion envers quelques agents biocide, il a été montré que les bactéries changent et modifient leur caractères génétiques en subissant une mutation périodique, après une période, ils deviennent résistants à un biocide donnée. Al-Hashem et al; [45] ont différencié entre l'adaptation et la résistance développée à un biocide à partir d'un antibiotique [52, 200].

Cette différence a montré que les biocides agissent par des mécanismes tels que la précipitation des protéines, la solubilisation des lipides...etc avec attaque simultanée sur des sites actifs multiples de la cellule bactérienne; alors que les antibiotiques agissent par blocage biochimique sélectif des accepteurs importants de la bactérie. Mais le point commun entre les biocides et les antibiotiques est l'accoutumance développée par les bactéries [151, 203].

Dans l'industrie pétrolière, des alternances de biocides sont utilisées. A titre d'exemple, un biocide à base de glutaraldéhyde est alterné avec un aldéhyde pour éviter l'accoutumance des BSR présentes dans l'eau d'injection. Le changement de la dose du biocide, l'origine de sa fabrication, la variation de la température et du pH du système et une mauvaise optimisation de son utilisation explique la raison qui fait qu'un biocide, efficace initialement, est devenu inefficace sur les bactéries de la corrosion [5].

MATERIEL ET METHODES

2. 1. ECHANTILLONNAGES DES EAUX, MILIEUX DE CULTURES UTILISES ET METHODES DE DOSAGE

De part le monde, plusieurs travaux ont été effectués sur la chimie des eaux et l'écologie microbienne des eaux d'injection et de gisements provenant des champs pétroliers [69, 73, 94]. Dans notre cas et compte tenu de l'objectif de notre étude, nous ciblons l'ensemble des eaux d'injection et une eau de gisement utilisées, actuellement, par les unités opérationnelles du sud algérien pour la production du pétrole. Ainsi, le choix a porté sur six (06) régions pétrolières (Fig. 2.1) où les échantillons d'eaux, provenant de différents horizons géologiques des champs pétroliers, ont été prélevés (Tableau 2.1). Le choix du lieu de prélèvement est tout simplement arbitraire et volontaire. Il est à noter que ces eaux sont des eaux naturelles non traitées ni par les produits anti-corrosion électrochimique ni par les produits anti-corrosion bactérienne. L'ensemble des opérations d'échantillonnages d'eau a été effectué selon les procédures de l'Américan Public Healt Association [204] et des fiches suiveuses ont été établies selon la norme *ISO- 17025*.

Tableau 2.1 : Origines des échantillons d'eaux.

N° d'échantillon	Nom du puits	Non du champ pétrolier	Horizon géologique	Nature de l'eau
1	HBNS#112	Hassi berkine nord-sud (HBNS)	Albien	injection
2	MDHA#1	Hassi messaoud (HMD)		
3	TFT#624	Tin Foui Tabankourt (TFT)	Lias	
4	ST#203	Stah (ST)	Zarzaitine	
5	ZR#643	In aménas (Inas)		
6	ZR#62 6			
7	ZR#91 bis		carbonifère	Gisement

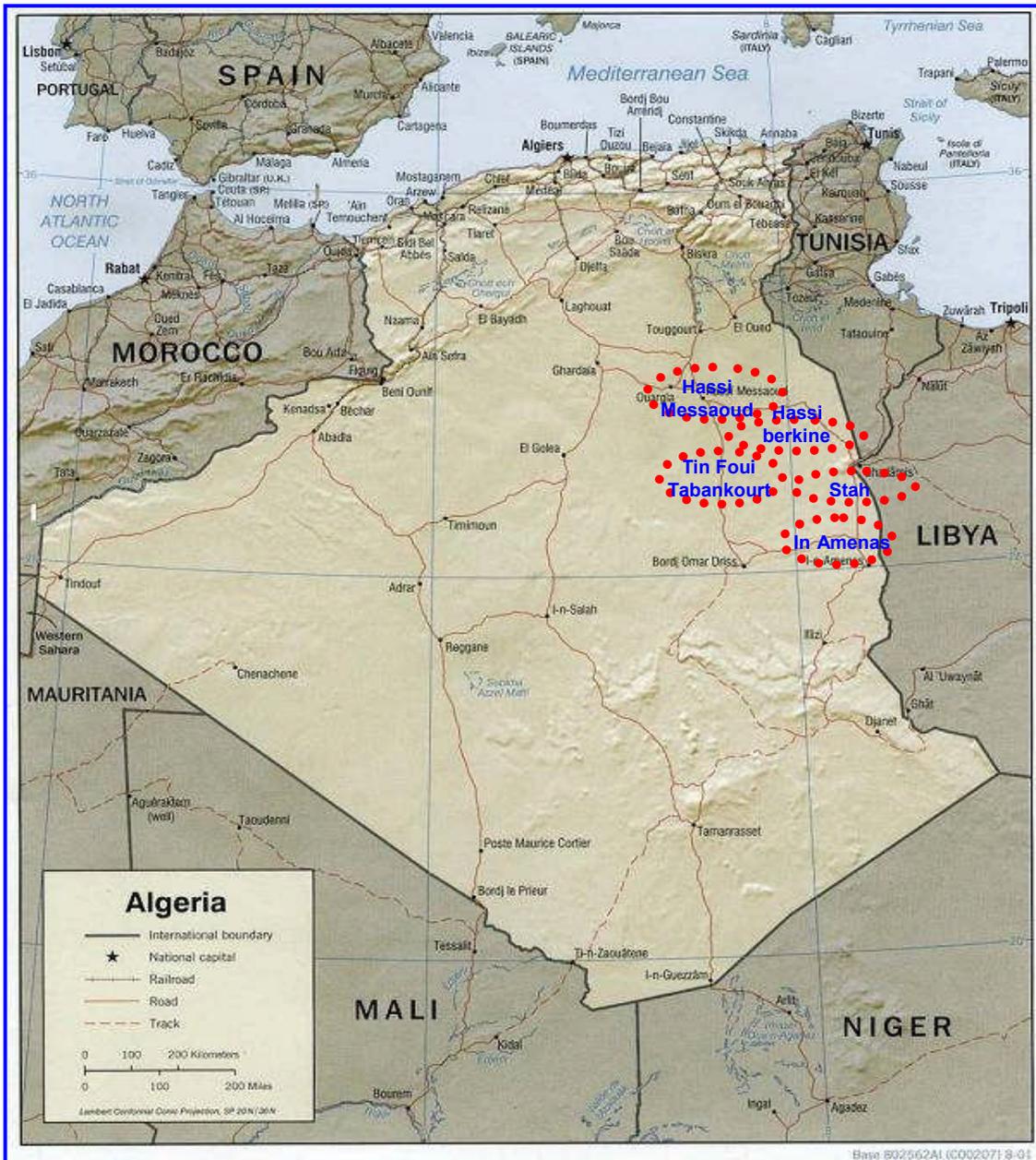


Fig. 2.1 : Situation géographique des cinq (05) régions pétrolières (Collins Maps).

L'échantillon d'eau du champ de HBNS a été prélevé à une profondeur de 700 m. Ce champ est situé dans le bassin de Berkine, wilaya de Ourgala, à 1200 kilomètres au sud-est d'Alger.

Le second échantillon provenant du champ de Hassi Messaoud est prélevé à une profondeur de 700 mètres. Ce champ est situé dans le bassin du triasique, wilaya de Ourgala, à 800 kilomètres au sud-est de la capitale Alger.

Le troisième échantillon d'eau est prélevé à une profondeur de 900 mètres. Le champ de TFT est situé dans le bassi d'Illizi, wilaya d'Illizi, à 1500 kilomètres au sud-est de la capitale Alger.

Quand aux échantillons 4, 5 et 6, ils ont été prélevés à une profondeur de 900 m et l'échantillon 7 à une profondeur de 3000 mètres. Le champ d'In Amenas est situé, à 1800 kilomètres et celui de Stah à 1700 kilomètres, au Sud- Est de la capitale Alger, dans la wilaya d'Illizi.

Les échantillonnages d'eaux sont effectués en fonction de l'état d'avancement du travail expérimental, durant les périodes de juillet 2002 à juin 2003 et de janvier 2006 à fin 2009. Ceci nous a permis de disposer d'échantillons d'eaux fraîches. Les prélèvements sont effectués dans des flacons stériles à raison de deux litres par échantillon, au niveau des têtes des puits producteurs d'eau.

Le transport des échantillons est réalisé par voie aérienne dans des glacières réfrigérées à 4°C jusqu'au laboratoire. Les uns sont destinés à l'analyse physico-chimique et les autres aux études spécifiques à chaque chapitre.

2. 1. 1. Analyses physico-chimiques des échantillons d'eau

Afin de connaître la composition physico-chimique des eaux échantillonnées, les analyses sont réalisées selon les méthodes préconisées par Rodier [241]. Les analyses effectuées concernent les dosages par volumétrie, complexométrie, argémétrie, gravimétrie, acidométrie et photométrie à flamme.

La température, le potentiel d'hydrogène (pH) (*Norme NF T 90-008*) et la conductivité électrique (Cs) sont mesurés in situ à l'aide d'un multiparamètre portatif (Sensor, réf. type C 835). Les Ca^{2+} (*Norme ISO 6058-1984-E*), les ions Mg^{2+} (*Norme (ISO 6059-1984-E)*) et Fe^{2+} sont déterminés par dosage volumétrique, les chlorures (Cl^-) sont dosés par argentimétrie (*Norme : NF T 90-014*), le dosage des carbonates (CO_3^{2-}) et des bicarbonates (HCO_3^{2-}) sont dosés par acidométrie, les sulfates (SO_4^{2-}) sont dosés par gravimétrie (*Norme NF T 90-009*). Le sodium (Na^+) et le potassium (K^+) sont dosés par spectromètre d'absorption atomique (réf. de type Zeenit 700) doté d'un logiciel d'exploitation Win AAS- version 3.17.0), selon la *norme NFT 90-019/NFT90020/T01-041*.

2. 1. 2. Milieux de cultures utilisés et techniques de dénombrements

2. 1. 1. 1. Milieux de culture utilisés pour le dénombrement

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés dans cette étude, les principaux milieux sont présentés dans le tableau 2.2, nous citons :

- le milieu Postgate B thiosulfate (PgBt) préconisé par Postgate [65, 205]. Ce milieu a une composition caractérisée par sa richesse en thiosulfates.

- le milieu Postgate B sulfate (PgB) préconisé par Postage [65, 205]. Ce milieu a une composition caractérisée par sa richesse en sulfates.

- une série de milieux de cultures spécifiques tels que le milieu complexe [206] et d'autres commercialisés par l'Institut Pasteur d'Alger sont utilisés à savoir : le milieu nutritif (gélose et bouillon) pour l'isolement et la culture des bactéries [30, 97].

Les préparations des milieux de cultures mentionnés dans le tableau ci-dessus sont données en (g/l) pour une quantité suffisante (q.s.p) en eau distillée de 1000 ml. Avant la stérilisation et dans les conditions ambiantes de pression et de température, le pH des milieux Postgate B thiosulfate et Postgate B sulfate, est ajusté à 7.00, tandis que ceux des milieux complexes et de la gélose nutritive à 7.20.

2. 1. 1. 2. *Dénombrement des bactéries corrosives*

Des techniques de culture classiques sont utilisées pour dénombrer les différentes bactéries en milieu liquide. Elles sont basées sur le principe des dilutions décimales et successives. En fonction du milieu de culture utilisé, ces méthodes permettent de dénombrer les bactéries de la corrosion (BSR et BTR) et les bactéries inhibitrices des bactéries de la corrosion.

Le dénombrement des BSR et des BTR se fait sur des milieux liquides spécifiques, en utilisant la méthode de dilutions ou test kit (*Norme Nace TM 0194, 1994*). Chaque jour, 1 ml est prélevé à partir de la culture témoin des BSR et des co-cultures incubées. Pour maintenir l'anaérobiose, des seringues stériles sont utilisées pour préparer les dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-8} . Chaque série de flacons est incubée pendant 14 jours à 37°C et une lecture quotidienne est opérée. L'inverse de la dilution du dernier flacon ayant un noircissement correspond au nombre de germes présents par ml d'échantillon d'eau prélevée. Ces mesures nous permettent d'établir les courbes de croissance des BSR en absence et en présence des bactéries antagonistes.

Tableau 2.2 : Composition chimique des milieux de culture utilisés en (g/l).

Ingrédients chimiques et biologiques	Milieu Postgate B thiosulfate [65, 205]	Milieu Postgate B sulfate [65, 205]	Complex medium [206, 207]	Milieu gélose nutritive [97]
Acide ascorbique (C ₆ H ₈ O ₆)	0.1	0.1	/	/
Acide thioglycolique	0.1	/	/	/
Agar	0.1	0.5	/	0.1
Casamino acide	/	/	7.5	7.5
Citrate de sodium (Na ₃ C ₆ H ₇ O ₇ , 7H ₂ O)	0.5	0.5	3	5
Chlorure d'ammonium (NH ₄ Cl)	0.5	0.5	/	/
Chlorure de sodium (NaCl)	25	/	250	/
Chlorure de potassium (KCl)	/	/	2	/
Dichlorure de fer (Fe Cl ₂ , 6H ₂ O)	0.36	/	/	/
Dichlorure de magnésium (MgCl ₂ 6H ₂ O)	1.65	/	/	/
Extrait de levure	1	0.1	10	3
Extrait de viande	/	/	/	/
Lactate de sodium (C ₃ H ₅ NaO ₃) à 60%	3.5 ml	4 ml	/	/
Peptone de viande	/	/	/	3
Peptone tryptique	/	/	/	10
Phosphate bi-potassique (K ₂ HPO ₄)	/	0.5	/	/
Phosphate potassique (KH ₂ PO ₄)	1	/	/	/
Sulfate de magnésium (MgSO ₄)	/	1	40	/
Thiosulfate de sodium (Na ₂ S ₂ O ₃)	1.2	/	/	/

2. 1. 1. 3. Préparation des dilutions

Avant l'autoclavage, les milieux de culture spécifiques aux BSR et aux BTR sont répartis dans des flacons de type pénicilline à raison de 9 ml par flacon. Les flacons sont encapsulés et sertis. L'anaérobiose, dans les flacons, est assurée par un barbotage à l'azote. L'autoclavage est fait à 120°C, pendant 20 minutes et sous une pression de 1 bar. Les flacons sont, ensuite, regroupés en série de six flacons. A l'aide d'une seringue stérile, 1ml d'aliquote est prélevé et injecté dans le premier flacon. Nous obtenons la dilution 10⁻¹. Après agitation, 1ml du premier flacon est prélevé et injecté dans le deuxième flacon. Cette opération est répétée jusqu'à la sixième dilution 10⁻⁶ [207].

2.1.3. Méthodes de dosage par spectrophotométrie

La mesure de la densité optique (D.O), le dosage des sulfures et des sulfates se font par la méthode Lamote à l'aide d'un spectrophotomètre (réf. modèle Lamote®, Smart

Spectro) équipé d'un monochromateur. Les dosages des sulfures et des sulfates sont réalisés dans des cuves en verre de 10 ml à des longueurs d'ondes respectives de 450 nm et 665 nm. La mesure de la D.O de la croissance des BSR et BTR est réalisée dans une cuve en verre de 5 ml à la longueur d'onde de 600 nm.

2.1.3.1 Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des bactéries de la corrosion

Cette observation a pour but de confirmer la présence des bactéries prélevées in-situ au niveau des différents champs pétroliers. L'observation se fait au microscope électronique à Balayage (réf. Philips, XL 20). La préparation des échantillons est réalisée selon un mode opératoire défini. Les échantillons solides sont coupés et leurs dimensions (longueur, largeur, diamètre) égalisées à celles du porte-échantillon (plot) qui est de l'ordre de 12mm de diamètre. L'épaisseur des échantillons doit être fine et de l'ordre de 5 mm. Les échantillons coupés sont collés sur le plot ou sur le porte échantillon par de la laque d'argent.

Elle se pratique en trois étapes essentielles [208] :

a) Fixation et déshydratation des cellules : une suspension en phase exponentielle est étalée sur lamelle, fixée avec du glutaraldhyde à 3% pendant 20 minutes à 4°C, suivie d'un rinçage au tampon cacodylate 0,2 N pendant 30 minutes. La préparation est, ensuite, séchée à 100°C, pendant 15 minutes et baignée successivement dans des solutions d'alcool éthylique à 50°, 70°, 90°.

b) Dessiccation au point critique : l'échantillon fixé est déshydraté et placé dans une enceinte (chambre dryer) où la température et la pression sont augmentées par injection de CO₂ jusqu'à atteindre la température et la pression critiques (32°C, 73 atm). L'échantillon au point critique garde son volume initial, sans déformation, ni dépression.

c) Métallisation : l'échantillon est recouvert d'une mince couche d'un métal conducteur (l'or). L'observation est effectuée au microscope électronique à balayage, après fixation des lamelles sur des portes objets avec une laque conductrice. Des prises de photos des cellules à différents grossissements sont prises.

2. 2. INHIBITION DES BACTERIES DE LA CORROSION PAR UN INHIBITEUR BIOLOGIQUE DU GENRE *Bacillus*

2. 2. 1. Origine des inhibiteurs biologiques

Il est admis que les bactéries changent la structure des protéines cellulaires pour pouvoir résister à un biocide. Ceci exigerait des bactéries un grand nombre de mutations en même temps ou en peu de temps pour devenir résistantes à un biocide. De tels modèles de mutations doivent, cependant, se produire sur des périodes beaucoup plus longues que ce qui est

normalement disponible dans un système industriel. Pour ces raisons, la recherche de méthodes biologiques se basant sur les interactions antagonistes et impliquant le dégagement des substances bactéricides (antibiotiques, enzymes lytiques) par les micro-organismes inhibiteurs est utilisée [56, 209].

Cependant, le succès des bactéries inhibitrices sur les bactéries ayant muté dépend de la nature antagoniste et de l'action des mécanismes d'organisation entre les bactéries. Les modes des actions inhibitrices sont largement variés et peuvent être, par exemple, une concurrence nutritive et la production secondaire de métabolites [210].

Il est à noter que, les bactéries utilisées pour entreprendre l'étude de l'inhibition des bactéries corrosives sont fournies par l'institut Pasteur d'Algérie. Il s'agit des souches *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) et *Bacillus cereus* (ATCC 14579). Les souches bactériennes inhibitrices sont prélevées à partir des tubes de conservation et leur pureté est vérifiée par des ensemencements en stries sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive, selon les étapes classiques de la microbiologie. A partir des tubes de conservation, un autre tube est préparé et conservé au réfrigérateur à +4°C [109, 183] et pour servir au lancement des tests d'inhibition.

2. 2. 2 Origine des bactéries corrosives

Les bactéries corrosives ont été isolées à partir des eaux des champs pétroliers de Hassi berkine nord-sud (HBNS), de Tin Foui Tabankourt (TFT), de Stah (ST) et de Hassi Messaoud (HMD); dans les milieux Postgate B thiosulfate et Postgate B sulfate pour les cultures respectives des BTR et BSR. Ces isolements ont été effectués *in situ*, lors des échantillonnages des eaux au niveau des différents champs pétroliers. Le transport des souches de bactéries corrosives est réalisé par voie aérienne dans des glacières réfrigérées (4°C) jusqu'au laboratoire.

Au laboratoire, la réactivation des bactéries corrosives est réalisée dans les mêmes milieux ayant servi à leur isolement *in-situ*.

2. 2. 3. Précultures des bactéries corrosives et des souches de *Bacillus*

Les précultures des bactéries corrosives de BSR et de BTR sont réalisées sur des milieux préparés séparément avec les eaux des quatre champs pétroliers. Chaque milieu est réparti dans des Erlenmeyers de 100 ml. Après barbotage à l'azote et stérilisation à 120°C pendant 20 min, les milieux sont inoculés avec 1% d'une culture mixte et jeune de BTR et de BSR. Le volume utile de la préculture est fixé à 100 ml. L'incubation se fait à 37°C pendant 03 jours pour les BTR et 7 jours pour les BSR.

Parallèlement aux précultures des bactéries corrosives, il a été procédé de la même manière pour les précultures des bactéries antagonistes. Dans la partie bibliographique, il a été rapporté que la plupart des Bacillaceae élaborent des toxines et ou des antibiotiques [56, 90,

211-214]. Pour notre étude, nous avons utilisé *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*. Pour chaque souche, un lot de huit Erlenmeyers, d'une capacité de 100 ml, remplis avec les milieux à base d'eaux de chaque champ pétrolier, est préparé. Les milieux sont inoculés avec 4% de chaque souche antagoniste. L'inoculation se fait, après la stérilisation des Erlenmeyers à 120°C pendant 20 min, l'incubation quant à elle se fait à 37°C pendant 24 heures.

2. 2. 4. Conduite de l'inhibition des bactéries de la corrosion par les souches du genre *Bacillus*

L'inhibition est réalisée dans des Erlenmeyers d'une capacité de 250 ml. Nous avons préparé une série de huit Erlenmeyers. Le tableau 2. 3 suivant donne les différentes combinaisons des tests d'inhibition par le genre *Bacillus* en fonction de l'origine de l'eau [6].

Tableau 2. 3: Cultures combinées entre les bactéries inhibitrices et les bactéries corrosives dans les différentes eaux d'injection.

Nature du milieu utilisé (eau d'injection)	Bactérie cible (bactérie corrosive) / bactérie test (<i>B. subtilis</i>)		Bactérie cible (bactérie corrosive)/bactérie test (<i>B. cereus</i>)	
	Culture sans ajout de l'inhibiteur biologique	Culture après ajout de l'inhibiteur biologique	Culture sans ajout de l'inhibiteur biologique	Culture après ajout de l'inhibiteur biologique
HBNS#112	+/-	+/+	+/-	+/+
MDHA#1	+/-	+/+	+/-	+/+
TFT#624	+/-	+/+	+/-	+/+
ST#203	+/-	+/+	+/-	+/+

(+) : Présence, (-) : Absence

2.2.4.1. Conditions opératoires des cocultures

Les conditions opératoires des cocultures sont choisies selon les conditions d'isolement et des cultures des souches corrosives étudiées. La température est fixée à 37°C, le pH est ajusté à 7.00 par l'ajout de la soude NaOH (2N) ou de l'HCl (1N). L'agitation est modérée et les cocultures sont conduites en anaérobiose.

2.2.4.2. Inoculation des Erlenmeyers

L'inoculation des Erlenmeyers s'est faite à l'aide d'une seringue, à partir des précultures. Les Erlenmeyers contenant les cocultures sont prêtes à être utilisées pour l'évaluation de l'inhibition par la souche *Bacillus*. Les cultures sont inoculées avec 1% (2.5 ml) des précultures des BTR et des BSR et 4% des précultures d'antagonistes (*B. cereus* et *B. subtilis*). Les cultures sont, ensuite, incubées à 37°C pendant 10 jours. On effectue un prélèvement pour le dénombrement (suivi de la cinétique de croissance) des BSR et des BTR en absence et en présence d'antagonistes. L'efficacité des inhibiteurs biologiques est suivie quotidiennement.

2.2.4.3 Méthodes analytiques

Le suivi de l'inhibition de la croissance a été fait par le contrôle quotidien et régulier de la biomasse (suivi de la cinétique de croissance) des BSR et des BTR lorsqu'elles sont cultivées en absence et en présence d'antagonistes. L'efficacité des inhibiteurs biologiques est suivie quotidiennement. L'estimation de la biomasse des BSR et des BTR se fait par la méthode des dilutions décimales dans les milieux de culture spécifiques. Cette méthode est la plus utilisée sur les sites pétroliers pour l'évaluation de la contamination des eaux de ces sites par les bactéries de la corrosion [6, 207].

Pour la suite des travaux expérimentaux, nous nous focaliserons sur l'inhibition des bactéries sulfatoréductrices.

2.3. COMPARAISON ENTRE L'INHIBITION CHIMIQUE ET L'INHIBITION BIOLOGIQUE

2.3.1. Origine des souches de bacilles inhibiteurs

Pour la suite de notre travail, nous nous focalisons sur l'inhibition de l'activité corrosive induite par les BSR. Beaucoup de travaux relatifs aux effets antagonistes ont décrit plusieurs micro-organismes, souvent désignés, comme des agents potentiels pour le bio-contrôle sur une série de micro-organismes [212]. Certaines espèces de *Bacillus* produisent des métabolites antifongiques ou antibactériens [214]. Ces bacilles se développent facilement sur des milieux riches comme le milieu TSA, agar nutritif à 37°C. Selon les conditions d'exploitation, des isolements bactériens sont réalisés pour étudier l'antagonisme [215, 216].

Quelques auteurs ont proposé que l'utilisation de souches ou d'espèces ou de leurs métabolites antagonistes, puisse être une alternative à la protection des plantes agrochimiques [56, 212]. D'autres métabolites, tels que les biosurfactants et les enzymes qui dégradent la paroi cellulaire, sont également produits par les espèces *Bacillus* [212]. En outre, Rodin et al., [51] ont démontré que la coculture des micro-organismes corrosifs et de leurs antagonistes diminue la perte de corrosion de l'acier au carbone de 20 à 80%. Il a été constaté, également, qu'un micro-organisme peut accélérer ou empêcher la corrosion, selon la composition chimique et bactériologie du milieu. L'importance de l'effet inhibiteur sur la corrosion dépend de la capacité du micro-organisme à s'adapter aux changements de la composition moyenne nutritive du milieu, en libérant les métabolites acides ou alcalins [51].

Par ailleurs, Jayaraman et al., [41] ont étudié la capacité d'un bacille génétiquement modifié à empêcher la croissance des BSR en sécrétant des substances antimicrobiennes. Ces auteurs ont employé des surnageants de bacilles en phase exponentielle pour empêcher la croissance exponentielle des cultures de BSR en suspension par la mesure de la réduction des populations de BSR dans un biofilm composé de *Desulfovibrio vulgaris* et de *Desulfovibrio gigas*.

Suite à cela, nous avons entrepris l'isolement de bactéries autochtones pourvues de la faculté d'inhiber l'action corrosive de certaines bactéries responsables de la biodégradation des outils de production et d'exploitation pétrolière. Ainsi, lors des différentes études de recherches sur les isollements bactériens à partir des eaux du champ pétrolier d'In-Amenas, un isolat bactérien s'est avéré intéressant. Cet isolat, désignée par B21, a été obtenu *in situ* sur le milieu CM, à partir de l'eau de gisement du puits producteur d'huile ZR#91bis. Nous avons procédé à l'identification de cet isolat.

2.3.2. Isolement et identification de la souche antagoniste

Le milieu CM [206] contenant une concentration de 12% NaCl (p/v) et maintenu à pH 7.0 a été utilisé pour la croissance et l'enrichissement de la souche 21. L'enrichissement consistait à inoculer le milieu CM liquide avec un échantillon d'eau de gisement provenant du puit ZR#91 de la région d'In-Amenas, les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyers agités à 120 rpm, la température est maintenue à 37°C pendant 48 heures. L'étape d'enrichissement est suivi par l'isolement de colonies en milieu CM solide à partir du milieu liquide trouble. L'identification des isolats est basée sur l'étude des caractères phénotypiques, physiologiques, biochimiques et génétiques selon les recommandations de Dong et Cai [120], Mancinelli et Hochstein [216] et Oren et al., [217].

2.3.2.1. Caractères cultureux et micromorphologiques

Elle porte sur la description des colonies obtenues sur le milieu solide en se basant sur les caractères morphologiques. L'observation à l'oeil nu est basée sur la description de la forme des colonies, leur taille, la chromogénèse, l'opacité, l'élévation, l'aspect de la surface et du contour, la consistance et enfin l'odeur caractéristique des cultures. Quant à l'étude des caractères micromorphologiques, nous avons eu recours à la coloration de Gram [218].

2.3.2.2. Détermination de la concentration optimale en NaCl

Cette étude est effectuée en réalisant des cinétiques de croissance en milieu liquide à une température de 37°C, la mesure de la croissance se fait à 600 nm pendant 7 jours. Le milieu utilisé est le milieu ATCC 213 liquide préparé avec différentes concentrations en NaCl (%) (p/v) : (2, 5, 10, 15, 20, 25, et 30) inoculés par des cultures bactériennes âgées de 12 heures.

2.3 2.3. Détermination des optima de température et de pH

Elle se fait par le suivi des cinétiques de croissance des cultures liquides. Ces dernières sont inoculées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 25 ml de milieu ATCC 213. L'incubation se fait sous agitation à 120 rpm et à différentes températures (22, 25, 30, 35, 37, 40 et 45°C). La détermination du pH optimal est réalisée par l'utilisation du même milieu tamponné ajusté aux différentes valeurs de pH (5,0-5,5- 6,0- 6,5-7,0-7,5- et 8,0). La mesure de la croissance se fait à 600 nm pendant 7 jours à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS.

2.3.2.4. Métabolisme protidique

Des tests sont effectués pour rechercher les enzymes protéolytiques vis-à-vis de certains acides aminés. Cette activité est due à des enzymes spécifiques de chaque acide aminé que comporte le milieu de Moeller. Nous recherchons l'arginine dihydrolase (ADH). L'uréase et l'indole ont été recherchés en même temps que la croissance anaérobie en présence des nitrates, la réduction des nitrates en nitrites et la formation du gaz à partir des nitrates.

2.3.2.5. Métabolisme des sucres

Nous l'avons étudié grâce au suivi de la cinétique de l'évolution de la biomasse par mesure de la densité optique à 600 nm, ainsi que l'évolution du pH en milieu liquide agité et chauffé à 37°C. L'étude est réalisée par l'utilisation de milieux spécifiques liquides, la source de carbone est parfois un sucre (sucrose, D-glucose, D-fructose, D-galactose, cellobiose, D-mannose, D-mannitol, D-galactose, lactose, D-xylose et dextran). La recherche de la production d'H₂S et du gaz a été également effectuée [6].

2.3.2.6. Recherche des enzymes respiratoires et métaboliques

La recherche des enzymes respiratoires et métaboliques a été réalisée suivant la méthode de Gerhardt *et al.*, [123] et d'Oren *et al.*, [217]. Il s'agit de rechercher la catalase et l'oxydase selon les techniques classiques, la citrate perméase quand à elle a été recherchée sur milieu de Simmons.

La mise en évidence des enzymes (amylase, gélatinase et estérase) est effectuée en utilisant des cellules cultivées sur milieu spécifique liquide additionné respectivement de 0,1% (p/v) d'amidon, de gélatine et de Tween 20 et 80. Ces milieux sontensemencés par l'inoculum de l'isolat, après six heures de culture. Après incubation à 37°C, la lecture se fait par addition d'un révélateur spécifique à chaque enzyme :

- Iode à 10% : colore l'amidon en bleu violacée. L'action de l'amylase se traduit par l'apparition d'un halo clair ;
- Réactif de Frazier colore la gélatine et tveen 80 en noir (15g HgCl₂, 20 ml HCl concentré et 100 ml d'eau distillée). La protéolyse se traduit par une zone d'éclaircissement autour des spots.

2.3.2.7. Test respiratoire

Ce test respiratoire s'effectue sur un milieu de culture à base de viande de foie (V.F) dans des tubes à essai stériles pourvu de septa. Préalablement, le milieu est fondu dans un bain-marie à 100°C, puis refroidi à 45°C. Incliné, le milieu est solidifié et à l'aide d'une seringue, nous prélevons 1ml d'une suspension bactérienne test que nous ajoutons dans le milieu (V.F). L'incubation se fait à 37°C, pendant 24 heures. Après ce temps, nous procédons à la lecture. La connaissance du type respiratoire aéro- anaérobie facultatif de la souche test nous permettra de réaliser la co-culture submergée dans les Erlenmeyers contenant les deux micro-organismes.

2.3.2.8. Test de consommation des sulfates

Un Erlenmeyer de 100 ml est rempli avec le milieu de culture naturel (eau d'injection). Ce milieu est ensemencé, avec 1ml de la suspension bactérienne de la souche B21. Puis, cette culture est incubée à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, la concentration initiale et finale en sulfates est dosée. Une diminution en sulfate avant et après incubation indiquera que la souche bactérienne a bien dégradé les sulfates. La concentration en sulfate est dosée selon la méthode Hach-1993 à l'aide d'un spectrophotomètre (Réf; Hach DR/2000) à une longueur d'onde de 450nm.

2.3.2.9. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Ce test consiste à déterminer la résistance ou la sensibilité de la souche test à certains antibiotiques : Pénicilline G (P), Ampicilline (AM) et kanamycine, Erythromycine (E), Chloramphénicol/ Thiamphénicol (C), Rifampicine (RA) [133]. Le test est réalisé sur milieu solide ATCC 213, inoculé d'une culture bactérienne jeune et mise en culture avec la présence de disques d'antibiotiques, ensuite incubés à 37°C pendant 3 jours. La lecture se fait en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des disques.

2.3.2.10. Extraction de l'ADN, séquençage de l'ARN 16S et analyse phylogénétique et alignement

Cette étude a été réalisée uniquement pour la souche B21 potentiellement intéressante pour notre étude. L'extraction de l'ADN a été réalisée selon la méthode décrite par Ausubel et al., [219]. L'ADN extrait subit une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% durant 30mn sous un courant électrique de 100V. L'ADN a été par la suite récupéré à partir du gel d'agarose et purifié en utilisant le kit de gel d'extraction Jetsorb (Genomic DNA purification system-PROM, EGA).

L'ADN purifié est amplifié par une PCR Hot Start (94°C) en utilisant des amorces spécifiques d'eubacteries 16S rDNA primers (forward primer 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' (*Escherichia coli* positions 8–27) et reverse primer 5'ACGGCTACCTGTTACGACTT3' (*E. coli* positions 1494–1513) [220]. Chaque 50µl de volume réactionnel est composé de 2µl de tampon PCR, chaque une des amorces est à une concentration de 0.5 µM, 1.5 mM MgCl₂ ainsi que chaque desoxynucleoside triphosphate qui est à une concentration de 50 µM, ainsi que 1-µl de Taq polymerase.

Les échantillons analysés sont déposés dans les puits des plaques PCR de 50µl, installées dans un thermocycler de type Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany). Le programme suivant a été utilisé : 95°C durant 1mn, suivie de 40 cycles de dénaturation (1 min à 95 °C), hybridation (1 min à 55 °C) et polymérisation (2 min à 72 °C) pendant 5 min.

Les produits d'amplification sont purifiés en utilisant le Kit GFXTM PCR DNA et le Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences) ensuite clonés dans un vecteur en se basant sur les instructions de manufacturer's instruction (InsT/AcloneTM PCR Product Cloning Kit, MBI Fermentas). Les clones transformés sont sélectionnés sur milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg /ml) et le X-gal (80 µg/ml).

La première étape de l'analyse phylogénétique consiste à aligner la séquence à comparer. Pour cela, nous avons utilisé la méthode du Neighbor-Joining (NJ) disponible dans le package Geneious Pro 4.8.5, dans laquelle une matrice initiale est construite en groupant deux à deux les espèces les plus proches avec la banque de gènes EMBL [221]. Cette matrice de distances servira de base à la construction de l'arbre phylogénétique. Les matrices de distance évolutionnaire ont été calculées avec l'algorithme Tamura-Nei pour la méthode Neighbor-Joining, ainsi que les branches de l'arbre ont été transformées par la méthode cladogram disponible comme option dans l'outil Geneious. Une analyse Bootstrap (100 répliques) a été exécutée pour évaluer la stabilité de l'arbre phylogénétique produit par la méthode Neighbor-Joining toujours dans le package Geneious.

2.3.2.11. Conservation des isolats

Les isolats purs obtenus sont transférés sur un milieu gélosé adapté pour constituer une culture stock. Elle est repiquée à des intervalles réguliers sur un milieu frais [220]. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 48h et conservés à 4 °C.

2.3.3. Optimisation du milieu nécessaire à l'évaluation de l'effet inhibiteur de la croissance des BSR

De nombreux composés chimiques et organiques sont susceptibles d'affecter l'activité enzymatique bactérienne; certains peuvent influencer le métabolisme soit en inhibant ou en activant l'activité d'une enzyme cellulaire. Cependant cette action n'est pas absolue car une même substance peut être activatrice dans certaines conditions et inhibitrice dans d'autres. Dans cette partie expérimentale, il s'agit de mettre en évidence l'influence de l'assimilation de la source de sulfate pour une meilleure inhibition par la souche B21 de la croissance des BSR. Ceci n'exclue pas la présence dans le milieu d'une source d'azote, de carbone et des facteurs de croissance. Il est, en outre, indispensable que ces substrats soient apportés à des concentrations optimales.

2.3.4. Influence de la variation de la concentration en sulfate des eaux

Pour cette partie, quatre échantillons d'eaux d'injection provenant des champs pétroliers de HBNS, de TFT, de Hassi- Messaoud et d'In- aménas sont utilisés. Lors des essais d'inhibition par la souche B21, la gamme de concentration en sulfates à étudier est celles des quatre eaux d'injection notées S1 pour HBNS, S2 pour TFT, S3 pour Hassi- Messaoud et S4 pour In- Aménas. Les essais de croissance sont conduits avec un consortium de souches mixtes de BSR, isolées à partir de l'échantillon d'eau prélevée du puits producteur d'eau d'injection du champ d'In- Aménas. Il a été choisi parce qu'il contenait la concentration la plus élevée en sulfate, d'ailleurs le champ d'In- Aménas est parmi les champs les plus affectés par la corrosion bactérienne.

Le consortium de BSR a été isolé par la méthode des dilutions. Les précultures sont réalisées dans des Erlenmeyers de 100 ml remplis des eaux d'injection des quatre champs.

Après, barbotage dans des conditions d'anaérobiose, les Erlenmeyers sont stérilisés à l'autoclave et inoculés avec 1% du consortium de BSR. Ces pré-cultures sont incubées à 37°C, pendant 48 heures. Cette étape permet la réactivation des souches de BSR. Les cultures se déroulent dans des Erlenmeyers de 250 ml remplis avec 250ml du milieu de culture naturel reconstitué et enrichi. Après barbotage et autoclavage, chaque Erlenmeyer est inoculé avec 1% de la préculture du consortium de BSR. L'incubation se fait à une température de 37°C, pendant 4 jours.

2.3.5. Conduite du test de l'inhibition biologique des BSR

En raison de sa large pluridiversité à synthétiser des substances inhibitrices, nous avons opté pour la souche bactérienne antagoniste test B21. Les caractères cultureux et micromorphologiques montrent que c'est un bacille (bâtonnet court), isolé, mobile, Gram positif. Les colonies sont rondes sur un milieu gélosé. Ce germe utilise le glucose comme source de carbone, sporulant à spore centrale et capable de produire des substances inhibitrices contre les bactéries. La détermination du type respiratoire est importante pour l'étude de son effet inhibiteur sur les BSR; alors que la détermination de la consommation des sulfates a été nécessaire pour l'étude de l'antagonisme.

2.3.5.1. Préparation de la préculture d'antagonistes

Cette préparation est conduite dans un Erlenmeyer rempli avec 100 ml de milieu de culture minimum dont la composition chimique [6, 97] pour un litre comprend 5g de sulfate d'ammonium, 20g de glucose, 0.05g d'agar, 1 ml de NaOH (1N) et 1.7g d'extrait de levure. La préculture est barbotée à l'azote et autoclavée à 120°C, pendant 20 minutes à 1 bar. Ensuite, elle est inoculée, à partir des tubes de conservation contenant la souche antagoniste test. L'incubation se fait à 37°C pendant 6 heures.

2.3.5.2. Influence de la variation en inoculum de l'inhibiteur biologique

Elle est étudiée avec une co-culture en Erlenmeyer. Après incubation à 37°C, pendant 48 heures et 6 heures respectivement pour le consortium de BSR et *Bacillus sp*; les précultures serviront comme inoculums pour lancer les co-cultures des deux micro-organismes en Erlenmeyers de 250ml. Pour ce faire, des Erlenmeyers contenant 2%, 5% et 6% de culture de *Bacillus sp* (souche B21) et 1% en consortium de BSR, sont préparés après 48 heures de l'injection des BSR [6]. Les co-cultures sont incubées, pendant 12 jours à 37°C (fig. 2.2).

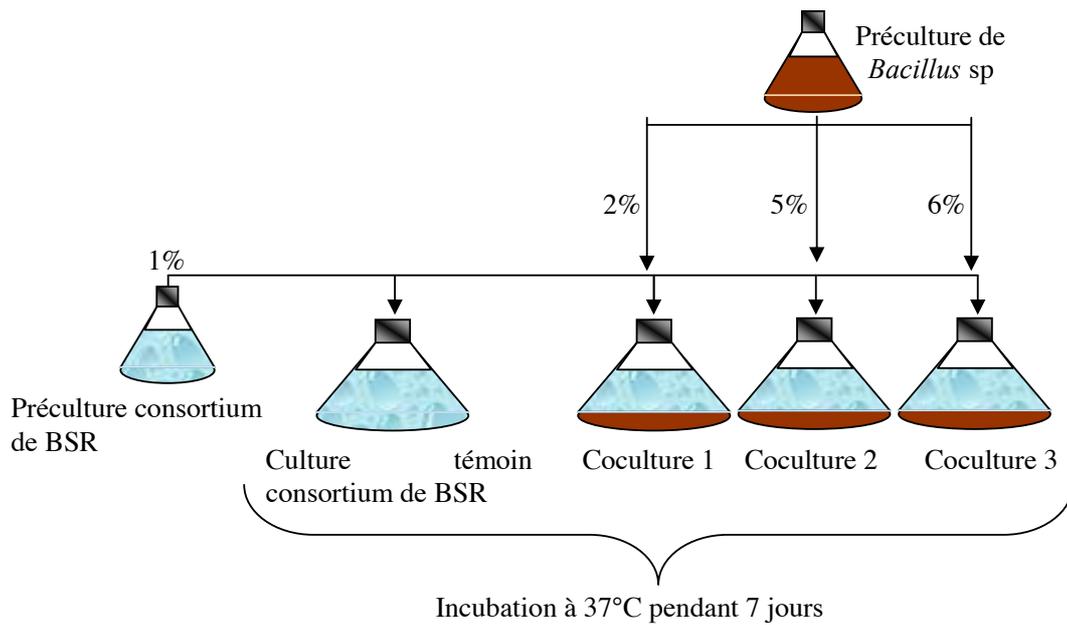


Fig. 2.2 : Schéma représentatif de la procédure expérimentale de l'inhibition biochimique par la souche B21 dans l'eau d'injection.

2. 3. 6. Conduite du test de l'inhibition chimique des BSR

2. 3. 6. 1. Présentation du biocide

Dans sa formule chimique, le biocide test utilisé a une partie active le THPS [Tetrakis (hydroxyméthyl) phosphonium sulfate] (fig. 2.3). Il a été fourni par une compagnie parapétrolière. C'est un biocide à large spectre, caractérisé par une action rapide, extrêmement efficace contre les BSR, entièrement miscible avec toutes les natures d'eau et biodégradable. Selon la littérature [48, 53, 54], le mécanisme par lequel agit ce biocide n'est pas très détaillé mais il a été classé généralement comme actif contre la membrane cellulaire des microorganismes.

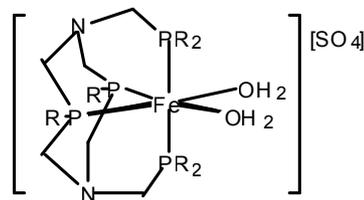


Fig. 2 3 : Formule chimique du complexe THPS [53].

En effet, il perturbe la membrane des cellules, interfère rapidement dans le mécanisme de la paroi cellulaire et empêche l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase [55, 141]. Sur la

fiche technique, les propriétés physico-chimiques du biocide montrent qu'il est pur à 75% en THPS, de densité 1,38 à 25°C, de viscosité de 30 cps, de pH 3-4 et il est non inflammable. Pour le traitement des eaux contaminées par des bactéries de la corrosion des champs pétroliers, le biocide peut être injecté à 50 ppm en continu ou à 100 ppm en discontinu pendant quatre heures.

2. 3. 6. 2. Préparation des différentes concentrations en inhibiteur chimique

Le consortium des souches mixtes de BSR, isolées à partir de l'échantillon d'eau prélevé du puits producteur d'eau d'injection du champ d'In- Amenas est utilisé pour étudier l'inhibition de leur croissance par un biocide (inhibiteur chimique).

A partir d'une solution pure du biocide à 10^6 ppm, nous prélevons un volume de 0.1ml. Ce dernier est dilué dans 100 ml d'eau distillée barbotée et stérilisée à l'autoclave. Une solution mère de 10^4 ppm est obtenue. A partir de cette solution mère, quatre solutions filles à 5, 10, 20 et 50ppm sont préparées.

2. 3. 6. 3. Influence de la concentration en inhibiteur chimique

Elle est étudiée avec une co-culture en Erlenmeyer. Après incubation de la préculture du consortium de BSR à 37°C, pendant 48 heures; cette culture est mise en contact avec le biocide à différentes concentrations dans des Erlenmeyers de 250 ml.

Quatre Erlenmeyers contenant 1% d'inoculum du consortium de BSR sont préparés et dans chaque Erlenmeyer, nous injectons respectivement 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm et 50 ppm. Les cultures sont incubées, pendant 12 jours à 37°C (fig. 2.4).

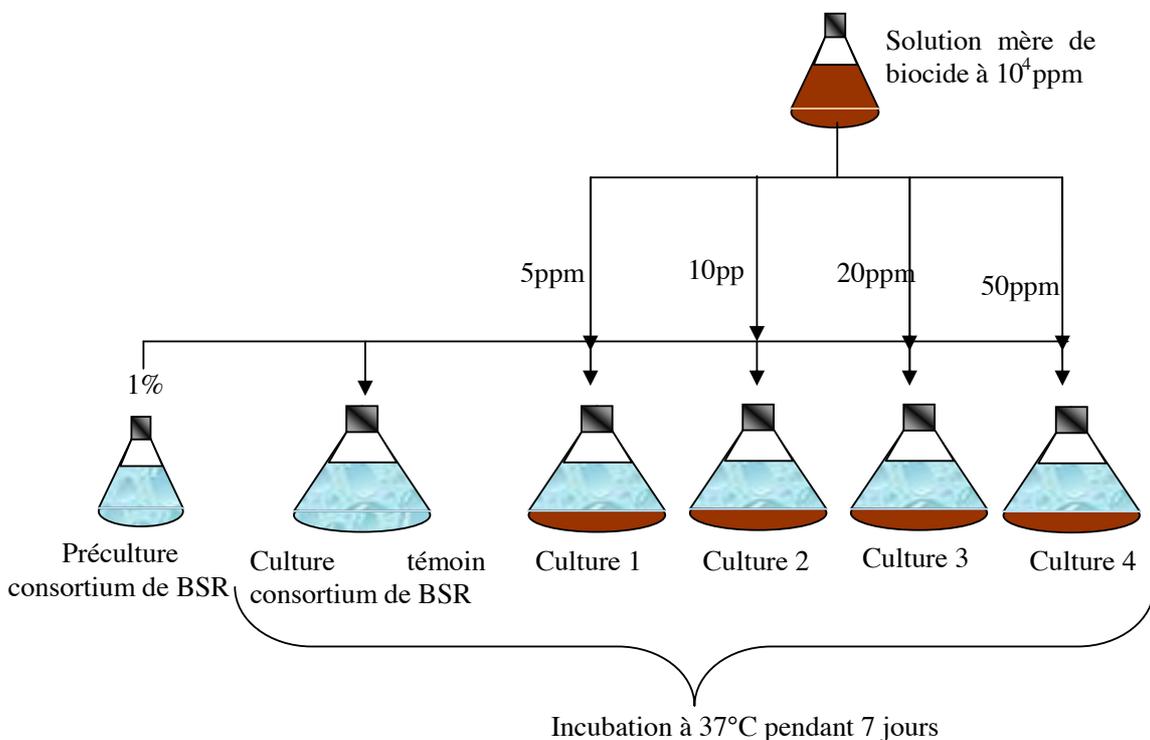


Fig. 2.4 : Schéma représentatif de la procédure expérimentale de l'inhibition chimique par le THPS dans l'eau d'injection.

2.3.7. Effet des inhibiteurs biologiques et chimiques sur la cinétique de croissance des BSR

Pour déterminer les paramètres cinétiques de croissance des BSR et évaluer l'efficacité des inhibiteurs, des prélèvements quotidiens sont effectués. Ces prélèvements servent à mesurer la concentration des BSR, la concentration des sulfates $[\text{SO}_4^{2-}]$, des sulfures $[\text{S}^{2-}]$ et de la densité optique (D.O), en fonction du temps d'incubation. Ces paramètres de mesure sont réalisés en absence et en présence des inhibiteurs biologiques et chimiques [6].

2.3.7.1. Les méthodes analytiques de l'évaluation de l'inhibition biologique et chimique

Le suivi de l'inhibition de la croissance a été fait par le contrôle quotidien et régulier du paramètre du dénombrement de la biomasse. Le dénombrement est réalisé sur milieu liquide par la technique des dilutions. Ces dénombrements nous permettent d'établir la courbe de croissance des BSR $[X]=\text{fct}(t)$ en absence et en présence d'inhibiteur (souche B21) [128, 145, 204, 222].

Durant la culture des BSR, l'influence de la concentration en substrat (sulfate) présente dans les quatre échantillons d'eaux d'injection est étudiée. La densité optique de la croissance des BSR, l'estimation de la dégradation des sulfates, la synthèse des sulfures sont déterminés par les méthodes HACH à l'aide d'un spectrophotomètre (DR/2000) respectivement aux longueurs d'ondes 600 nm, 450 nm et 665 nm. Les méthodes de dosages des sulfates et des sulfures dans notre étude sont identiques à celles utilisées sur les sites pétroliers pour l'évaluation de la corrosion bactérienne ou l'évaluation de l'efficacité d'un inhibiteur chimique (biocide).

2.4. SIMULATION DE L'INHIBITION BIOLOGIQUE DANS UNE BOUCLE DE MONITORING DE LA CORROSION

Certaines études expérimentales ont rapporté des procédés d'adhérence de surveillance et de suivi de la formation de biofilm et les avantages du suivi de la croissance bactérienne. Certains dispositifs ont été conçus pour le suivi *in-situ* du développement des populations microbiennes sessiles dans les systèmes d'alimentation en eau. Un des premiers dispositifs utilisés était le dispositif de Robbins [38, 223- 225]. Il se compose d'un cylindre qui doit être inséré directement à une ligne d'un pipe ou installé en déviation (by-pass) de la ligne. Le dispositif présente un grand nombre de coupons en acier pour surveiller la formation et le suivi des biofilms sur des périodes étendues [169, 226]. Un autre dispositif est cité par la littérature [122], il s'agit du dispositif de Pedersen qui est composé des glissières installées dans un support en plastique acrylique. Il a été développé, afin d'étudier le biofilm microbien dans des systèmes d'écoulement d'eau. Les biofilms, ainsi formés, sont utilisés pour énumérer les bactéries présentes.

2.4.1. Echantillonnage de l'eau d'injection pour simuler l'inhibition des bactéries corrosion par la souche B21

Après la réalisation de l'inhibition biologique à l'échelle Erlenmeyer, il a été nécessaire de faire une extrapolation vers l'échelle semi- industriel. L'échantillon utilisé, dans ce chapitre est une eau d'injection provenant du puits producteur d'eau ZR#643 du champ pétrolier de Zarzaitine, région d'In Amenas. Le choix de cette région est due au fait que cette région est la plus affectée par la corrosion bactérienne. A l'échantillonnage, la température de l'échantillon est de 37°C et son pH est de 7,57. Au laboratoire, nous avons procédé à une analyse chimique de l'échantillon.

2.4.2. Origine des bactéries corrosives

Le milieu Postgate B sulfate a servi de milieu pour la culture et l'isolement des BSR [205]. Les bactéries corrosives ont été isolées à partir de l'eau du champ pétrolier d'In Amenas. Au laboratoire, la méthode des dilutions décimales est utilisée pour la réactivation des bactéries corrosives. Cette réactivation est réalisée dans le même milieu utilisé lors de leur isolement in- situ.

2.4.3. Utilisation de la souche B21 pour inhiber la croissance des bactéries de la corrosion isolées de l'eau d'injection

L'inhibiteur biologique est la souche *Bacillus sp* (souche B21) isolée dans le chapitre précédant. Elle est prélevée, à partir du tube de conservation. La méthode d'ensemencement en stries est utilisée pour réaliser sa réactivation. Cette réactivation se fait, après deux repiquages consécutifs sur le milieu CM.

2.4.4. Nature de l'acier utilisé pour étudier l'inhibition par la souche B21

Pour simuler la corrosion bactérienne, un échantillon d'acier au carbone de nuance API 5LX52 est utilisé. L'analyse chimique de cet acier est donnée dans le tableau ci-après. Elle est réalisée à l'aide d'un Spectromètre séquentiel à dispersion de longueur d'onde (réf. Bruker-Axs: SRS 3400) [15, 228]. Les données sont traitées avec un Logiciel d'acquisition et de traitement des données de type Spectra 3000 AT. L'analyse est effectuée directement sur l'échantillon de forme cylindrique découpé aux dimensions du porte échantillon et d'une épaisseur d'environ 03 mm. La surface de l'échantillon subit un polissage poussé afin d'obtenir une surface bien lisse et uniforme.

Les échantillons, ainsi préparés, sont soumis à une source de rayonnement X primaire, il s'ensuit une excitation des atomes qui vont émettre un rayonnement X secondaire de fluorescence caractéristique de la composition chimique de l'échantillon analysé (tableau 2.4). Les concentrations des différents éléments chimiques de l'échantillon sont déterminées par rapport à des échantillons de référence (courbes d'étalonnage), après mesure de l'intensité de fluorescence [27, 229].

Tableau 2.4 : Composition chimique de l'échantillon d'acier.

Eléments	C	Mn	Si	P	S	Cr	Mo	Ni	Cu
[%] massique	0,25	1,31	0,23	0,013	0,01	0,05	0,016	0,044	0,06

Dans les domaines de la production, l'exploration et le transport des hydrocarbures, l'industrie pétrolière Algérienne utilise des installations en acier au carbone. Cet acier est utilisé pour réaliser le montage de la boucle du monitoring nécessaire à notre étude. Pour cela, des coupons de corrosion de cet acier sont préparés à l'atelier mécanique. Chaque coupon est sous forme de cylindre. Les dimensions sont représentées sur la figure 2.5.

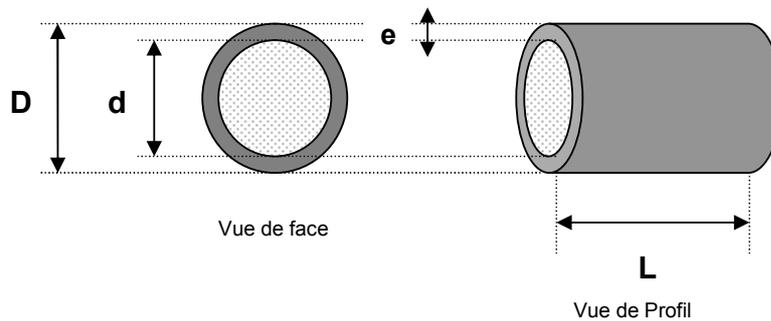


Fig. 2.5.: Schéma des coupons d'acier, (D: Diamètre intérieur = 7mm, d: Diamètre extérieur = 10mm, L: longueur = 10mm et e: épaisseur = 1,6mm)

2.4.5. Etude de l'inhibition de la croissance des BSR dans la boucle de monitoring de la corrosion

2.4.5.1. Installation de la boucle de monitoring de l'inhibition biologique

Pour la mise en évidence de l'effet antagoniste bactérien sur la croissance des BSR corrosives, une boucle de monitoring est installée au niveau du laboratoire (fig. 2.6). La boucle comprend :

- une cuve en verre d'un fermenteur *Heuser/blr* de capacité réelle de 5 litres munie d'une platine supérieur sur laquelle est déposé le moteur d'agitation DC (50 à 1000 rpm) à module digital. Cette cuve sert à la culture des BSR en absence et en présence des antagonistes bactériens,
- un bain-marie réglé à la température optimale de 37°C pour la croissance des BSR et dans lequel la cuve est plongée,
- un filtre à air relié à une bouteille d'azote pour l'obtention de l'anaérobiose,
- une pompe (Réf: Prolabo type A) pour assurer la circulation de l'eau d'injection prélevée du champ d'In-Amenas,
- une installation d'éprouvette test de corrosion composée de plusieurs coupons d'acier assemblés. Ces coupons servent à mettre en évidence la corrosion par les BSR planctoniques, et sessiles et la formation éventuelle du biofilm. Elle permet d'installer trente (30) coupons

d'acier. Cette éprouvette est pourvue de deux robinets réglables d'entrée et de sortie de l'eau d'injection,

- une bonbonne pourvue d'un septum pour l'inoculation et les prélèvements.

2.4.5.2. Préparation de la boucle de monitoring de l'inhibition biologique par la souche B21

Avant de lancer le monitoring de l'inhibition biologique, tous les composants de la boucle sont stérilisés. La cuve de la boucle, préalablement nettoyée, est remplie avec le volume d'eau d'injection du puits ZR#643 requis puis stérilisée avec les périphériques de la boucle (système de prélèvement, éprouvette des coupons; pompe.... etc.) à l'autoclave pendant 20 min à 121°C. L'anaérobiose est obtenue par un barbotage à l'azote filtré. Durant le temps de monitoring aucun élément nutritif n'est introduit dans le milieu de culture.

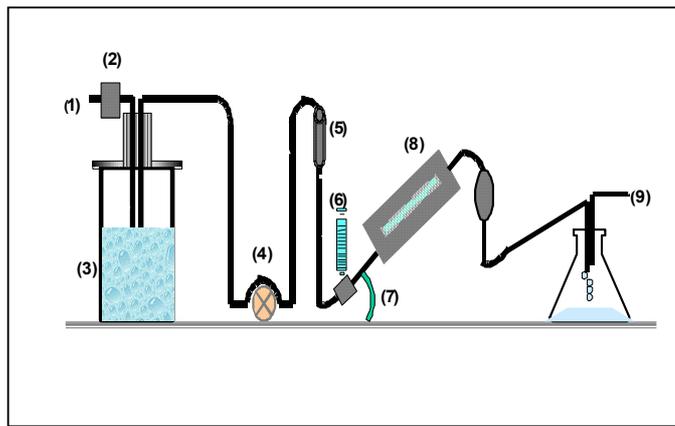


Fig. 2.6.: Installation de la boucle de monitoring de l'inhibition biologique.(1) : Barbotage à l'azote, (2) : Filtre à air, (3) : Eau d'injection stockée, (4) : Pompe de circulation, (5) : Débitmètre, (6) : Point d'inoculation, (7) : Angle d'inclinaison, (8) : Coupons d'acier d'une canalisation, (9) : Point d'échantillonnage.

2.4.5.2.1. Inoculations de la boucle de corrosion par l'inhibiteur biologique (la souche B21)

Lorsque la température du bain-marie atteint 37°C, la cuve est inoculée. L'inoculation se fait à l'aide d'une aiguille à travers le septum. En absence de l'inhibiteur biologique, la cuve est inoculée par la préculture des BSR. Par contre, la culture des BSR, en présence d'inhibiteur biologique, nécessite l'inoculation de la cuve par la préculture de l'antagoniste. Les concentrations en inoculum de l'antagoniste et des BSR sont respectivement 2% et 1% [230]. Toutes les suspensions bactériennes sont pures, âgées de 24 heures et leur densité optique à 600 nm est comprise entre [0,2- 0,3].

Avant l'inoculation de la cuve, des préparations de précultures des BSR mixtes et de l'antagoniste bactérien sont nécessaires. L'ensemble de ces précultures est effectué dans des Erlenmeyers d'une capacité de 250 ml contenant l'eau d'injection du champ pétrolier d'In Amenas. Les milieux sont barbotés avec de l'azote puis autoclavés pendant 20 min à 120°C et à 1 bar. Passé l'autoclavage, la préculture des BSR mixtes est inoculée avec 10 ml (v/v) et incubée à 37°C, pendant 7 jours. Ce temps correspond à la phase de croissance des BSR.

La préculture de l'antagoniste bactérien est inoculée, à partir des tubes de conservation, en prélevant une jeune colonie de 24 heures de la souche *Bacillus sp* (souche B21). La température d'incubation est fixée à 37°C, pendant 48 heures.

2.4.5.2.2. Conditions opératoires pour l'application de l'inhibition biologique par la souche B21

Les conditions opératoires de la culture sont choisies selon les conditions physico-chimiques des eaux utilisées lors de la production, l'exploration et le transport des hydrocarbures dans les champs pétroliers. La température est fixée à 37°C, le pH est ajusté à 7,20 par l'ajout de la soude NaOH (2N) ou de l'HCl (1N) aseptique. L'agitation est modérée et en absence d'aération.

2.4.5.3. Monitoring de l'inhibition biologique des bactéries corrosives dans l'eau d'injection du champ d'In aménas

Ce monitoring est nécessaire pour étudier cette inhibition in-vitro, tout en gardant les mêmes paramètres physico-chimiques du site d'exploitation et de production du champ d'In-Amenas. L'action de l'antagoniste bactérien est testée dans des conditions d'exploitation réelles. Les précultures suscitées seront utilisées pour lancer la boucle de monitoring de l'inhibition des BSR en absence et en présence de l'antagoniste bactérien. La circulation de l'eau dans la boucle est effectuée sur une période de deux mois et demi avec un volume utile en eau d'injection égale à 4,5 litres.

Après 21 jours de fonctionnement de la boucle sans inhibiteur biologique, le milieu est enrichi avec 500 ml d'eau d'injection spécifique aux BSR. L'enrichissement permet de retrouver les conditions initiales. Par la suite, l'inhibiteur biologique est injecté. Des prélèvements aseptiques et quotidiens sont effectués sur une période de deux mois et demi. Ces prélèvements serviront pour l'analyse des différents paramètres de croissance des BSR.

2.4.5.3.1. Evaluation du monitoring de l'inhibition de la croissance des BSR par la souche B21

A partir de la boucle de monitoring, un prélèvement quotidien de 20 ml d'eau est effectué. Des méthodes analytiques sont utilisées pour mesurer en fonction du temps de circulation l'inhibition de la croissance des BSR. Le pH, la concentration des sulfates (SO_4^{2-}), la concentration des sulfures (S^{2-}), la densité optique (D.O), la concentration des BSR planctoniques en germes/ml et la concentration des BSR sessiles en germes/cm² sont déterminés. La concentration en sulfates (SO_4^{2-}) et en sulfures (S^{2-}) et la densité optique (D.O) sont mesurées par un spectrophotomètre (Réf; unicam UV1) respectivement à la longueur d'onde de 450nm, de 665 nm et de 630 nm [145, 204, 222, 231].

2.4.5.3.2. Dénombrement des bactéries corrosives

Les BSR entraînées (BSR planctoniques- BSRp) par le fluide dans la boucle et les BSR attachées (BSR sessiles- BSRs) à la surface du métal sont dénombrées par la méthode des dilutions (Test-Kit). Ces dénombrements se font dans le milieu Postgate B- sulfate. Le dénombrement des BSR sessiles nécessite un détachement du biofilm de la surface du coupon par ultrasons. Nous avons procédé au détachement d'un biofilm homogène (BSRs sans l'inhibiteur biologique) et d'un biofilm hétérogène (BSRs avec l'inhibiteur biologique).

Pour le procédé de dénombrement des BSR sessiles, un coupon d'acier présentant le biofilm homogène ou/et le biofilm hétérogène est mis dans un flacon de pénicilline contenant 9 ml d'eau physiologique à 9‰. Puis, 1 ml est prélevé du flacon pour le dénombrement des BSR sessiles par la méthode du test- kit [154, 207, 232].

2.4.5.3.3. Caractérisation des biofilms au microscope électronique à balayage

Pour mettre en évidence la présence et la formation du biofilm sur les coupons d'aciers, nous observons au MEB (Réf; XL20 Philips) trois types de coupons [208] :

- Un coupon d'acier sans biofilm (acier nu),
- Un coupon d'acier avec biofilm, homogène formé uniquement de BSR (sans *Bacillus sp*),
- Un coupon d'acier avec biofilm hétérogène (BSR et *Bacillus sp*).

Les coupons d'acier présentant le biofilm homogène et hétérogène sont prélevés de l'éprouvette de la boucle de monitoring, après un mois de circulation. La récupération des coupons se fait aseptiquement et après avoir arrêté la boucle. Le robinet de sortie de la boucle de corrosion est ouvert et avec une pince stérile, les coupons d'acier sont récupérés dans des boîtes de Pétri.

L'ensemble des coupons d'acier ayant subi une métallisation (Réf; Edwards/ sputter coater S 15013); sont observés au MEB. Pour des raisons de manipulations au MEB, tous les coupons sont, préalablement, coupés en deux pour observer la présence du biofilm.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. INFLUENCE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES EAUX SUR LES BACTERIES CORROSIVES

3.1.1. Caractérisation physico-chimique

3.1.1.1. Paramètres physicochimiques des eaux d'injection

Dans un premier lieu, nous constatons que l'aspect des eaux d'injection est d'apparence limpide et ne présente aucune odeur particulière. En effet, ces eaux proviennent des nappes phréatiques de ce fait ils ne présentent aucune matière en suspension. Toutefois certains auteurs [14, 233, 234] révèlent que les eaux d'injection peuvent présenter une odeur nauséabonde caractéristique d'un œuf putride signe de présence d'hydrogène sulfuré.

La composition physico-chimique de l'eau a un rôle très important, puisqu'elle nous renseigne sur la présence des éléments minéraux indispensables à la croissance des microorganismes corrosifs. De même que l'influence des paramètres physico-chimiques sur la croissance bactérienne a été abordée, dans différents travaux; d'après Leclerc [109], la croissance des bactéries est fonction d'une part de la composition du milieu et des conditions physico-chimiques, d'autre part des éléments nutritifs spécifiques.

Les résultats de l'analyse chimique des eaux provenant de différentes régions sont portés dans le tableau 3.1. Nous remarquons que pour la plupart des eaux échantillonnées, le pH se situe dans un intervalle de 6,90 à 7,30. Cet intervalle relativement neutre est favorable au développement de la plupart des espèces bactériennes. D'après les résultats présentés dans le tableau I.1, nous remarquons que les eaux d'injection sont riches en chlorures, sulfates, sodium, calcium et magnésium par contre pauvre en fer et potassium. La présence simultanée des sulfates et du magnésium pourrait emmener ce dernier, selon Cordonnier [263] à la réduction des sulfates en sulfures.

L'influence de la salinité sur la croissance bactérienne dépend de la concentration en Na^+ et Cl^- . Dans notre cas et pour ces eaux d'injection, les valeurs de salinité relevées varient de 0,36g/l à 3,54 g/l. La teneur en sel est assez faible comparée aux eaux modérément salées. Ceci conduit, donc, au développement des groupes bactériens corrosifs halotolérants. Les eaux analysées contiennent en quantité assez appréciable en carbone, en soufre et les oligo-éléments nécessaires à la croissance des ces microorganismes. La présence des composés minéraux et carbonatés favorise le développement des bactéries chimiolithrophes (BTR, BSR) et activent les réactions biochimiques dans la cellule bactérienne [82, 109, 197, 235].

Certains éléments minéraux ont un rôle dans l'équilibre physico-chimique de la cellule. Ce sont notamment le sodium, le potassium, le magnésium et le chlore. D'autres plus nombreux, sont une partie constituante des enzymes ou des coenzymes tel que le fer des cytochromes, d'autres tels que le calcium, le magnésium sont des cofacteurs ou des activateurs enzymatiques [197].

Le soufre quant à lui tient une place prédominante à l'échelle cellulaire, il joue le rôle de centrale énergétique en permettant la récupération, l'accumulation et la distribution de l'énergie [197, 236]. Le sulfate constitue la forme la plus oxydée du soufre et joue un rôle essentiel dans le cycle biologique, favorisant ainsi le développement des bactéries corrosives et des germes bactériens utilisateurs de sulfates [236, 237, 238], ce qui favorise le développement du métabolisme des BSR et BTR. Il a été démontré que le milieu spécifique pour la culture des BSR et BTR doit contenir une source de soufre et comme accepteur d'électrons. Nous rencontrons ce soufre dans la composition de deux acides aminés : la cystéine et la méthionine. Ces deux acides aminés participent à la structure des protéines [95].

Les ions chlorures quant à eux se retrouvent en plus forte concentration. Cette dernière se situe entre 197 mg/l et de 22000 mg/l pour l'ensemble des eaux d'injection. Les chlorures accentuent la corrosion, car combinés au fer ferrique, ils forment les chlorures ferriques qui sont extrêmement agressifs.

Les valeurs relevées concernant le fer sont assez réduites. Selon Leclerc [109] bien qu'étant en teneur faible, le fer fait partie de la structure de nombreux cytochromes.

Nous avons constaté aussi que ces eaux sont riches en bicarbonates (HCO_3^-) qui sont utilisés comme source de carbone par les bactéries autotrophes [85, 239]. Les carbonates combinés à l'ion hydrogène, peuvent former l'acide carbonique et constituer des composés minéraux corrosifs [98, 240].

Pour l'ensemble des eaux d'injection, nous notons l'absence de l'ion baryum. C'est la caractéristique principale des eaux d'injection. En conclusion, nous pourrions déduire que les eaux d'injection échantillonnées de différentes régions pétrolières représentent un milieu propice à la prolifération des bactéries de la corrosion (BSR et BTR).

3.1.1.2. Paramètres physicochimiques de l'eau de gisement

Pour nos essais, nous avons opté de travailler avec de l'eau issue du gisement d'In Amenas. Son pH mesuré est de 5,80, elle est d'apparence jaunâtre. Cette dernière est imputée à la présence d'hydrocarbures en suspension avec une odeur assez caractéristique. La présence d'hydrocarbures est en relation avec l'origine même de cette eau de production à savoir que c'est une eau qui se retrouve au dessous ou au dessus d'un gisement pétrolier. Toute fois, le pH des eaux de gisement varie de 2 à 7 selon les points de prélèvements [6, 191], ce paramètre lui-même est lié à la strate géologique de l'aquifère.

Quant à la température, elle est de 40°C. Elle varie d'un point à un autre, selon la région pétrolière. Dans certaines régions, la température des eaux de gisements peut être supérieure à 72°C. Ces températures favorisent la croissance de la flore thermophile.

D'après ces résultats, nous remarquons que l'eau de gisement analysée contient les différentes sources de carbone, de soufre et d'oligo-éléments. Elle constitue des besoins nutritifs communs permettant, ainsi, la croissance de nombreux types de bactéries. Par ailleurs, nous pouvons noter une forte teneur en sels minéraux ; celle-ci est caractéristique de la strate géologique à laquelle appartient cette eau de gisement [197, 241].

En ce qui concerne l'analyse chimique de l'eau de gisement, nous remarquons qu'elle contient une quantité très importante d'ions Cl^- , Na^+ et Mg^{++} . Ce qui peut favoriser la prolifération de la flore halophile extrême [197]. Pour l'ensemble des eaux d'injection, nous notons l'absence de l'ion baryum. C'est la caractéristique principale des eaux d'injection.

Tableau 3.1: Résultats des analyses physicochimiques des eaux échantillonnées.

Echantillons d'eau									
	Région Hassi berkine	Région Tinfoui Tabankourt	Région Hassi messaoud	Région Stah	Région In aménas				
	HBNS#112	TFT#624	MDHA#1	ST#203	ZR#643	ZR#626	ZR#91 Bis		
Concentrations en cations (mg/l)									
Baryum (Ba ²⁺)	0	0	0	0	0	0	0	0	695
Calcium (Ca ²⁺)	267.6	197.5	187.3	45.2	834	1832	9378		
Fer (Fe ²⁺)	0.03	0	0.1	0	0	0.28	21		
Magnésium (Mg ²⁺)	58.8	62.5	163.4	13.9	311	1070	2150		
Potassium (K ⁺)	68	52	39	28	65	95	349		
Sodium (Na ⁺)	760	830	300	180	7250	10200	35660		
Strontium (Sr ⁺⁺)	3.1	4.3	2.1	0.4	/	/	351		
Concentrations en anions (mg/l)									
Bicarbonates (HCO ₃ ⁻)	164.1	178.1	165.9	148.2	198	92	238		
Carbonates (CO ₃ ²⁻)	0	0	0	0	0	0	0		
Chlorures (Cl ⁻)	1428.2	926.1	670.9	197.1	11275	21168	78005		
Sulfates (SO ₄ ²⁻)	324.4	1228.1	752.8	237.9	2390	23964	0		
Paramètres physico-chimiques									
pH	6.90	7.00	7.30	7.10	7.00	7.57	5.80		
Température (°C)	45	46	50	40	35	37	40		
Salinité (g/l)	3.54	0.92	2.51	0.36	2.07	34,9	128.58		

3.1.2. Caractérisation des isoléments bactériens corrosifs des eaux

Les habitats aquatiques hébergent toute sorte de micro-organismes, bactéries, levures, champignons, et algues...etc. Ces micro-organismes vivent souvent en association dans des biofilms [65]. Ces derniers sont constitués de cellules et de substances polymériques extracellulaires [106, 154, 155, 188]. Cette association permet le développement d'un métabolisme coopératif global, affectant sérieusement le processus de corrosion, qu'aucune des espèces isolées n'aurait pu développer seule [11, 157, 166]. Additivement, dans une eau l'abondance relative des différents groupes de bactéries varie avec la nature de l'eau, la quantité des matières organiques, la température....En dépit de ces facteurs, la population bactérienne de l'eau a certains caractères constants et déterminés correspondant à des types bactériens spécifiques. Le nombre de ces bactéries est compris entre quelques centaines de miles et plusieurs centaines de millions par millilitre d'eau ; quoique certaines espèces bactériennes ne se développent pas sur des milieux ordinaires.

Selon Haslay et Leclerc [85], la majorité des micro-organismes identifiés dans l'eau proviennent des biofilms. Ainsi la concentration planctonique (organismes en suspension) influence le nombre des cellules fixées (sessiles) car dans la plupart des milieux naturels, la population de bactéries réellement libres ne présente qu'une part infime de la population bactérienne du milieu (0.02 à 0.04%).

Lorsque les organismes aérobies et anaérobies vivent en communauté, ils forment des couches trophiques entre lesquelles, ils créent leur propre environnement. Selon Hamilton [125], la présence de bactéries aérobies strictes ou aéro anaérobies facultatives dans l'eau permet aux bactéries anaérobies strictes corrosives de proliférer. Ces bactéries participent à la création de conditions anaérobiques avec consommation de l'oxygène présent dans le milieu.

Lors des campagnes d'échantillonnages au sud pour l'isolement des bactéries corrosives (BSR et BTR) sur site, au niveau des régions pétrolières, les milieux de cultures spécifique PgBt et PgBs ont révélé, la présence de sulfures métalliques (FeS) de couleur noire, après la production de sulfures d'hydrogène (H₂S) [125]. La réduction du sulfate et de thiosulfate se traduit par un dégagement de H₂S et un virage au noir du milieu de culture. L'ensemble des germes corrosifs isolés sur site se développe dans une gamme de température allant de 37°C à 40°C. Selon la littérature, cette gamme de température est proche de celles des échantillons d'eaux rapportées dans le tableau 3.1 [14, 98, 237].

L'isolement des bactéries corrosives est confirmé; les BTR ont été isolées après 48 heures d'incubation à 37°C, tandis que les BSR sont isolées après 07 jours d'incubation à 37°C. Pour l'ensemble des isoléments opérés sur site, nous avons constaté que les milieux de culture des BSR et BTR présentaient une couleur noire [164, 202, 242, 243]. Après des cultures conduites sur des supports en acier au carbone, les observations au MEB ont confirmé la présence des bactéries corrosives dans les isoléments bactériens effectués, à partir des échantillons d'eau prélevés des différentes régions pétrolières (photo 3.1 à photo 3.6).

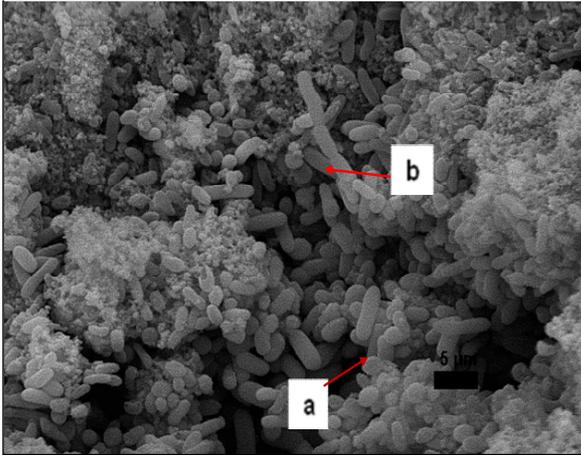


Photo 3.1: Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits HBNS#112 (Gr x 4000), (a) : cellules en forme de cocci, (b) : cellules en forme de bâtonnets.

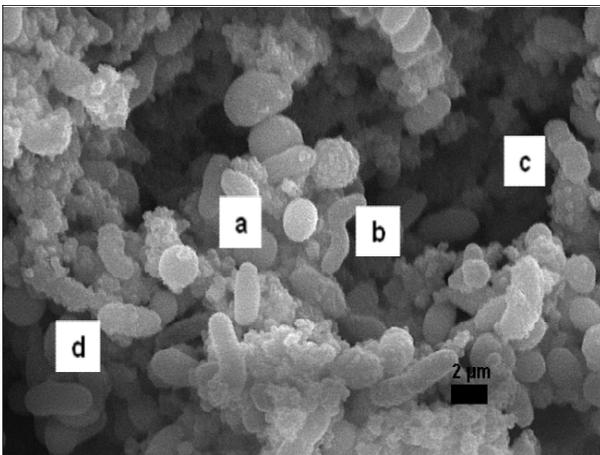


Photo 3.2: Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits TFT#624 (Gr x 8000), (a) : cellules en forme de cocci, (b) : cellules en forme de vibrio, (c) : cellules en forme de cocci en chaînette, (d) : cellules en forme de bacilles.

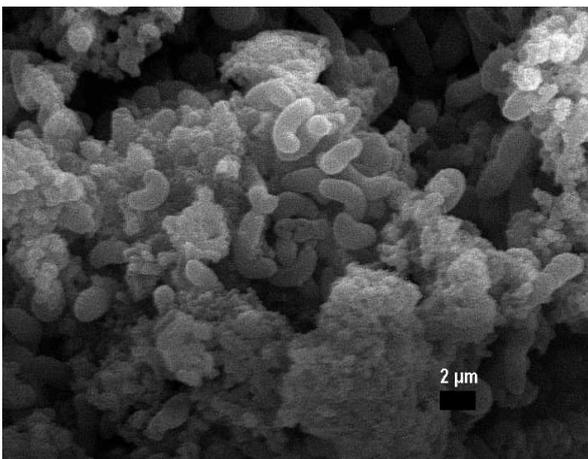


Photo 3.3: Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits MDHA#1 (Gr x 4000).

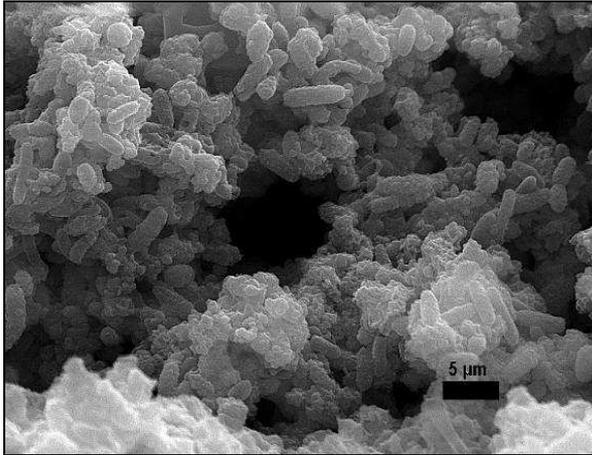


Photo 3.4 : Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits ST#203 (Gr x 8000).

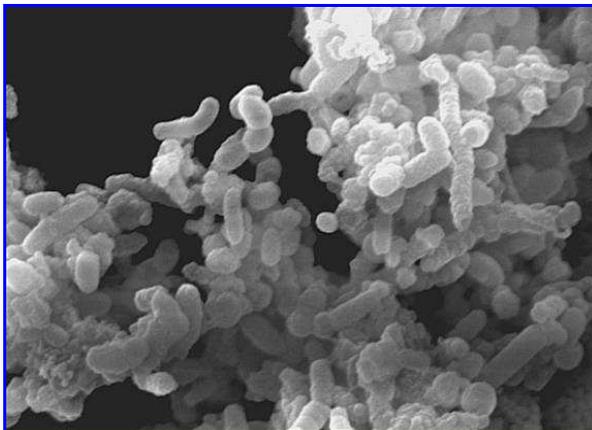


Photo 3.5 : Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits ZR#643 (Gr x 4000).

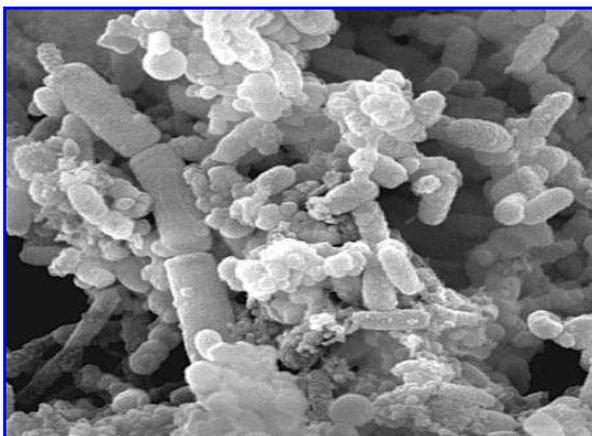


Photo 3.6 : Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits ZR#91 bis (Gr x 8000).

Le repiquage sur la gélose nutritive de *B. subtilis* a révélé l'apparition des colonies, après 24 heures d'incubation à 37°C. Elles sont rondes, ternes, et jaunâtres. Leur diamètre peut atteindre 5mm, avec une odeur caractéristique. Pour *B. cereus*, les colonies formées sur gélose nutritive sont approximativement rondes, de couleur blanche cassée, l'aspect terne de verre pilé et de diamètre de 5 mm. Une colonie peut éventuellement présenter des excroissances partant de son bord.

3.2. Etude de l'inhibition biologique des bactéries de la corrosion par le genre *Bacillus*

Le mécanisme le plus connu pour expliquer la corrosion anaérobie impliquant les bactéries sulfurogènes (BSR et BTR) est la précipitation du sulfure de fer (FeS), qui catalyse ensuite la réduction du proton en hydrogène moléculaire créant des zones cathodiques à côté de zones anodiques composées de fer (Fe) conduisant à une pile galvanique qui provoque la formation de piqûres à la surface du métal [244].

Par ailleurs, l'utilisation des espèces microbiennes du genre *Bacillus* est revue très favorablement, par exemple, dans l'industrie de production du papier, ces espèces sont souvent le contaminant microbien le plus dominant [245] parce que leurs spores sont très résistantes à la chaleur et survivent au séchage. Les mécanismes par lesquels les bacilles sont conservés dans le milieu industriel ne sont pas connus. Certaines espèces du genre *Bacillus* sont résistantes à plusieurs biocides industriels [246] et certaines forment des biofilms qui les protègent contre les agents antimicrobiens [38]. L'inhibition exercée par le genre *Bacillus* sur les bactéries de la corrosion (BSR et BTR) peut être probablement due à la production de substances antimicrobiennes non soupçonnée et non recherchée dans notre étude.

Le genre *Bacillus* est, d'ailleurs, connu pour sa capacité à produire des antibiotiques et/ou des enzymes hydrolytiques. La sécrétion des enzymes et des antibiotiques peut interagir en synergie dans le processus de la croissance des bactéries de la corrosion [55]. Ainsi, Postgate [205] a listé toutes les substances antimicrobiennes inhibitrices des diverses espèces de BSR, y compris la polymyxine B peptide produite par *Bacillus* et qui inhibe *Desulfovibrio vulgaris* à 100 mg ml⁻¹.

3.2.1. Utilisation du genre *Bacillus* pour l'inhibition des BTR

Les courbes de croissance obtenues en présence et en l'absence d'antagonistes, ont l'allure de courbes classiques, avec leurs différentes phases caractéristiques. Partant de cette courbe, nous avons mis en relief celles qui correspondent à la courbe de croissance des BSR et BTR, isolées des quatre eaux d'injection, en présence et en l'absence des inhibiteurs biologiques. Les courbes obtenues donnent le nombre de germes corrosifs en fonction du temps d'incubation.

Ainsi, l'étude de l'inhibition de la croissance des BTR par les inhibiteurs biologiques dans les eaux d'injection des quatre régions est rapportée sur les figures 3.1, 3.2 et 3.3. L'ensemble des données de ces histogrammes a été comparé aux résultats obtenus avec des eaux d'injection sans traitement (témoins) par les inhibiteurs biologiques (fig. 3.1).

En présence de l'eau d'injection de HBNS et en absence de bactéries antagonistes (courbe témoin), la croissance cellulaire, atteint son maximum au bout du 3^{ème} jour. La concentration en germes corrosifs reste stationnaire durant 5 jours, puis décline pour atteindre la concentration de 10^3 germes corrosifs/ml dans l'échantillon d'eau provenant de HBNS.

L'injection de *B. subtilis* et *B. cereus* a entraîné une diminution de la concentration cellulaire par rapport au témoin. En fin du suivi de la croissance, elle est passée de 10^5 germes/ml à 10^2 germes/ml et à 10^3 germes/ml respectivement en présence de *B. subtilis* et *B. cereus*. Pendant le suivi de la croissance et après 4 jours d'injection de l'inhibiteur biologique *B. subtilis*, la concentration en BTR passe de 10^2 germes/ml à 10 germes/ml. Alors que l'injection de l'inhibiteur biologique *B. cereus* a conduit à une diminution de la concentration en BTR sur une période de 5 jours, faisant passer la concentration en BTR de 10^3 germes/ml à 10 germes/ml.

D'après ces résultats, les inhibiteurs biologiques ont exercé un effet inhibiteur sur les BTR isolés de l'échantillon d'eau de HBNS. Elles sont plus sensibles à l'action de *B. subtilis* comparée à celle de *B. cereus*. Dans le cas de l'eau d'injection HBNS, les bactéries antagonistes ont agit par effet bactériostatique sur les BTR. En se référant à la définition de la bactériostase, la concentration en germes corrosifs obtenue, après l'injection des inhibiteurs biologiques, est inférieure à celle obtenue en leur absence, mais égale à la concentration lors de l'isolement. Il n'y a pas de lyse des BTR [138].

Pour l'eau d'injection provenant de la région TFT, l'allure graphique de l'inhibition biologique de croissance des BTR par *B. subtilis* et *B. cereus* montre que le traitement de cette eau d'injection par les inhibiteurs biologiques a affecté la croissance des BTR qui y sont présentes.

Après le traitement de l'eau de la région de TFT, la concentration en BTR est passée, à la fin de la période d'incubation, à 10^3 et à 10^2 germes corrosifs/ml respectivement en présence de *B. subtilis* et *B. cereus*. L'effet inhibiteur par *B. cereus* est nettement supérieur à celui exercé par *B. subtilis*.

D'autre part, l'inhibition des BTR isolées de l'eau d'injection de HMD, nous a amené à tracer les allures de la croissance de ces bactéries, lorsqu'elles sont cultivées en présence et en absence des inhibiteurs biologiques dans l'eau d'injection de HMD. Nous avons obtenu les résultats portés sur les figures 3.2 et 3.3.

D'après ces figures, nous constatons, aussi, qu'après 24 heures de traitement par les inhibiteurs biologiques, la concentration en BTR présentes dans l'eau d'injection de HMD est passée de 10^5 germes corrosifs/ml à 10^3 et 10^2 germes corrosifs/ml respectivement en présence *B. subtilis* et *B. cereus*. Les deux bactéries antagonistes ont un effet bactériostatique sur les BTR, leur sensibilité est presque identique vis à vis de l'action *B. subtilis* et *B. cereus*.

Les deux inhibiteurs biologiques des BTR nécessitent un temps de contact de 24 heures au moins pour exercer leur effet inhibiteur.

Dans l'eau échantillonnée de la région de Stah, les allures des courbes de l'inhibition par *B. cereus* et *B. subtilis* des BTR sont illustrées sur la figure 3.2. L'injection de *B. subtilis* a entraîné une inhibition, à partir du 3^{ème} jour de suivi.

La concentration en BTR est passée de 10^5 et 10 germes corrosifs/ml et reste stable jusqu'à la fin de la période d'incubation. En présence de *B. cereus*, l'inhibition est plus significative que celle observée avec *B. subtilis*. Comparé au témoin, la concentration en germes corrosifs de BTR passe de 10^5 à 10^2 germes/ml, dès le 1^{er} jour de traitement. D'un point de vue de l'action inhibitrice sur les BTR isolées de l'eau d'injection de la région de Stah, l'effet par *B. subtilis* et *B. cereus* est bactériostatique. L'effet inhibiteur par *B. subtilis* nécessite un temps de contact de deux jours, alors qu'en présence de *B. cereus* son effet inhibiteur est instantané.

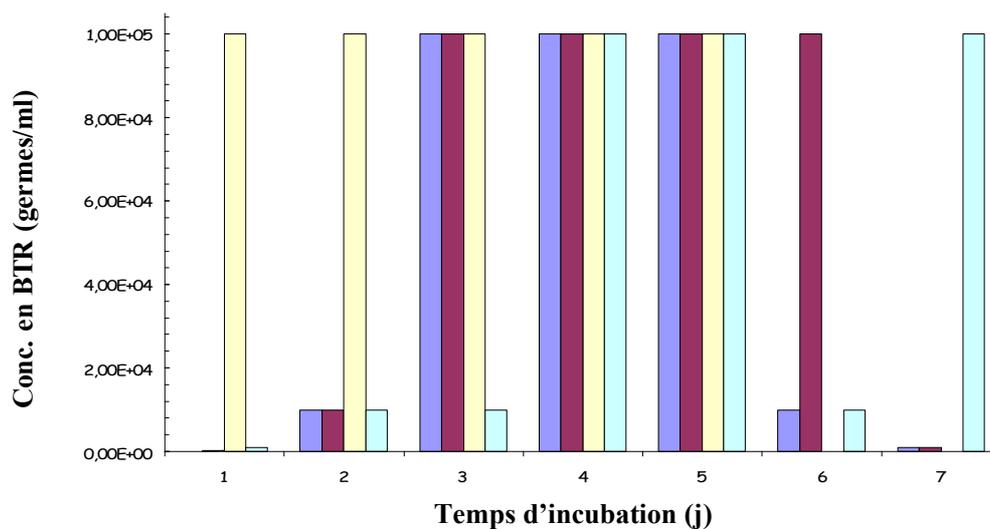


Fig. 3.1 : Croissance des BTR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (■), TFT#624 (■) et ST#203 (■). Ces essais sont réalisés avant l'injection (témoin) de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*.

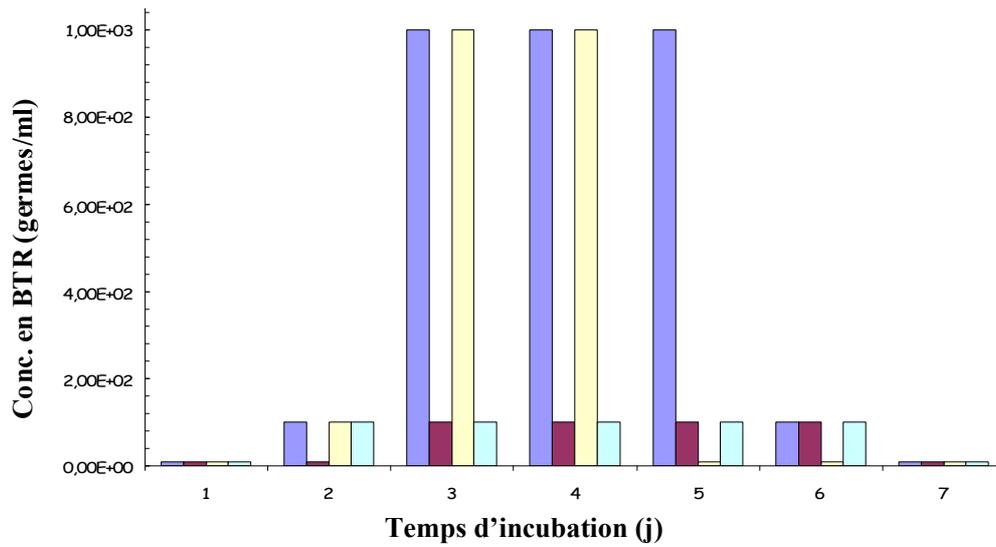


Fig. 3.2 : Croissance des BTR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (■), TFT#624 (■) et ST#203 (■). Ces essais sont réalisés, après l'injection de *Bacillus cereus*.

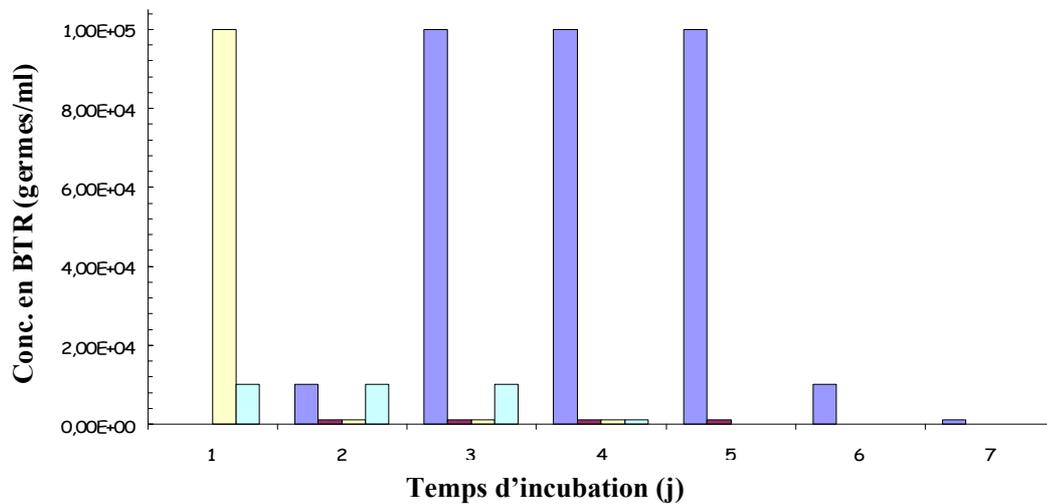


Fig. 3.3 : Croissance des BTR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (■), TFT#624 (■) et ST#203 (■). Les essais sont réalisés après l'injection de *Bacillus subtilis*.

3.2.2. Utilisation du genre *Bacillus* pour l'inhibition des BSR

La croissance des BSR cultivées dans les différentes eaux d'injection et provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112, MDHA#1, TFT#624 et ST#203 a été obtenue par des essais réalisés, avant l'injection des inhibiteurs (témoins) (fig.3.4) et après l'injection des inhibiteurs (fig. 3.5 et fig.3.6).

D'après le graphe, nous constatons qu'en absence des inhibiteurs biologiques, la croissance des BSR isolées de l'eau d'injection du champ de HBNS suit l'allure d'une courbe classique et que la concentration optimale en BSR n'est atteinte qu'au bout du 4^{ème} jour, puis se stabilise et diminue à partir du 7^{ème} jour. Dans les co-cultures des BSR avec *B. subtilis* et *B. cereus*, nous remarquons que la concentration en BSR est de 10^5 germes/ml, après un jour d'injection des inhibiteurs. Ce qui nous a amené à expliquer qu'une synergie s'est établit entre BSR/*B. subtilis* et BSR/*B. cereus*. A partir du 2^{ème} jour, la croissance des BSR diminue à 10^1 et à 10^2 germes corrosifs de BSR/ml respectivement en présence de *B. subtilis* et *B. cereus*. Les BSR isolées de l'eau d'injection de la région HBNS sont plus sensibles à l'action des *B. subtilis* qu'à celle de *B. cereus*. L'effet exercé par les souches de *B. subtilis* et de *B. cereus* est bactériostatique.

Sur les mêmes figures 3.4, 3.5 et 3.6 donnant l'évolution de la croissance des BSR isolées de l'eau d'injection de la région de TFT et cultivées en présence et en absence des inhibiteurs biologiques, nous constatons que la croissance est maximale dans l'échantillon d'eau non traitée (10^4 germes corrosifs de BSR/ml). Dans l'échantillon d'eau traitée par *B. subtilis*, une inhibition de la croissance des BSR a été obtenue, après 03 jours suivant l'injection de l'inhibiteur biologique.

La concentration en BSR décroît de 10^4 germes corrosifs de BSR/ml pour atteindre 10 germes corrosifs de BSR/ml en fin d'incubation. Sur la courbe expliquant l'effet de l'injection de *B. cereus* dans l'eau contaminée par les BSR, nous remarquons une diminution de la croissance des BSR dès le 1^{er} jour. Comparer au traitement de l'eau d'injection de la région TFT, nous remarquons que le traitement par *B. cereus* est plus efficace que celui opéré avec l'inhibiteur biologique *B. subtilis*.

Avec l'eau de la région de HMD, les résultats des traitements de l'inhibition des BSR sont présentés dans les figures 3.5 et 3.6. Le contact avec *B. subtilis* entraîne une diminution de la concentration en BSR de 10^5 germes corrosifs/ml à 10^2 germes corrosifs/ml, alors qu'avec *B. cereus*, l'effet inhibiteur se prolonge sur une période de 4 jours.

Les résultats de l'étude de l'inhibition des BSR par les inhibiteurs biologiques du genre *Bacillus* dans l'eau de la région de Stah, nous ont amené à tracer les allures portées sur les figures 3.5 et 3.6.

Sur cette figure, nous constatons que la croissance est rapide et stable pour le témoin. L'effet inhibiteur de *B. subtilis* et de *B. cereus* n'apparaît qu'après 48 h de contact avec les

BSR isolées de l'eau d'injection de Stah. Ainsi, la croissance en présence de *B. subtilis*, s'arrête dès le début du 3^{ème} jour, alors qu'en présence de *B. cereus*, elle diminue progressivement jusqu'à atteindre une concentration de 10 germes corrosifs de BSR/mL au bout du 5^{ème} jour de suivi. L'effet exercé par *B. subtilis* est bactéricide (arrêt de la croissance cellulaire); alors que celui de *B. cereus* est bactériostatique [138].

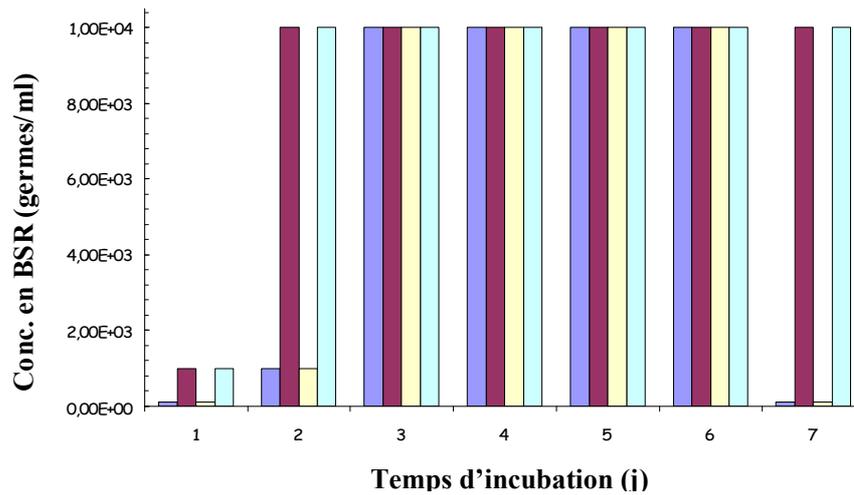


Fig.3.4: Croissance des BSR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (■), TFT#624 (■) et ST#203 (■). Ces essais sont réalisés avant l'injection (témoin) de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*

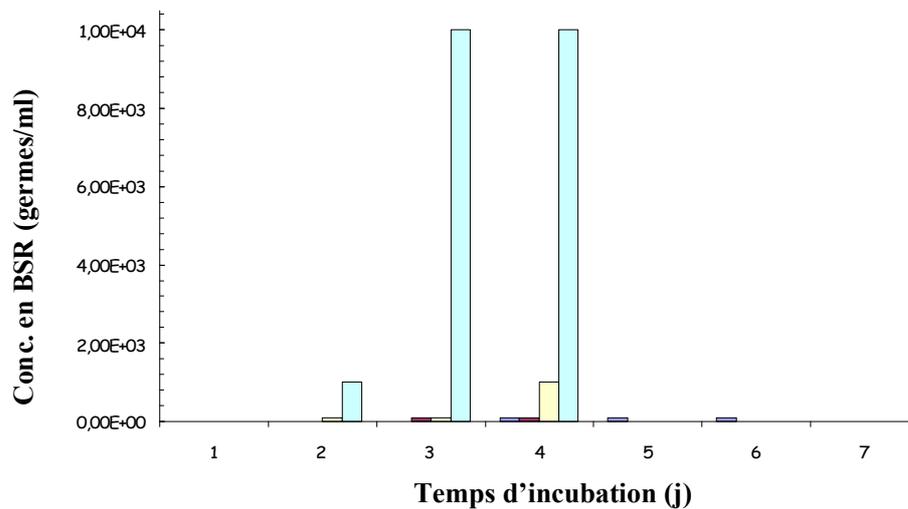


Fig. 3.5: Croissance des BTR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (■), TFT#624 (■) et ST#203 (■). Ces essais sont réalisés, après l'injection de *Bacillus cereus*.

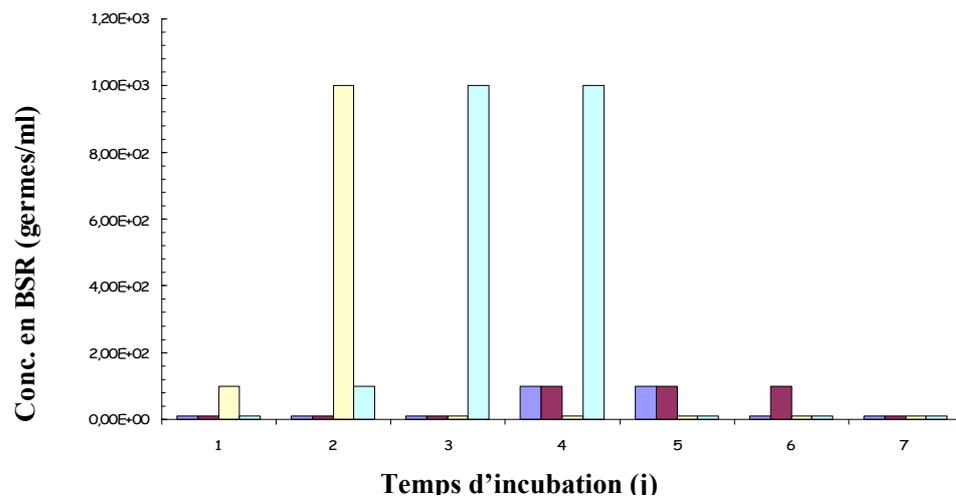


Fig. 3.6 : Croissance des BSR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (■), TFT#624 (■) et ST#203 (■). Les essais sont réalisés après l'injection de *Bacillus subtilis*.

Si nous avons à conclure sur la partie de l'inhibition des bactéries de la corrosion par les souches du genre *Bacillus*, nous écrivons qu'en absence de l'inhibiteur biologique et ce dans un espace de milieu donné, une concentration constante en bactéries de la corrosion "X" est capable de croissance dans chaque type d'eau d'injection. Quand la concentration limite "X" est atteinte, la multiplication cellulaire des BSR et BTR s'arrête, indépendamment de l'épuisement des substances nutritives du milieu ou de la auto- production de substances toxiques (iso-antagonisme).

Les mêmes interprétations sont apportées, quand les BSR et BTR croient en présence des souches du genre *Bacillus*. Les concentrations limites en bactéries corrosives et en *Bacillus* sp (souche B21) sont différentes ; 1% en inoculum de bactéries corrosives et 4% en bactéries antagonistes. La population microbienne qui présente la valeur élevée en concentration inhibe l'autre population [247].

3.3. Comparaison entre l'inhibition chimique et l'inhibition biologique

3.3.1. Caractérisation de l'isolat antagoniste isolé à partir de l'eau de gisement

L'échantillon d'eau de gisement a été utilisé pour l'isolement des bactéries antagonistes; les germes dominants de cette microflore sont essentiellement le genre *Bacillus* dont la souche B21. Cette dernière croit dans une gamme de salinité comprise entre 5–25% (p/v) de NaCl; l'optimum de croissance a été observé en culture liquide contenant entre 10–15% (p/v) de NaCl (Fig. 3.7). Aucune croissance n'a été observée en absence de NaCl. Cette souche est halophile stricte. En milieu solide CM modifié contenant 15% (p/v) de NaCl, les colonies observées ont présenté une chromogènesse crème d'aspect lisse, légèrement convexe, circulaire et d'un contour irrégulier.

Les résultats obtenus; de l'isolement de notre bactérie antagoniste; sont à rapprocher avec ceux de Javaherdashti [228] où il a isolé une espèce *Bacillus* capable de se développer sur un milieu nutritif dans des conditions aérobies et également, capable de se développer dans le milieu Postgate B sulfaté modifié et contenant 35 g/l de NaCl. Cet isolat a été isolé à partir d'un échantillon boueux prélevé à une profondeur de 14 m de l'estuaire de Merimbula Fleuve, Nouvelle-Galles du Sud- Australie. Par ailleurs, la souche B21 croit favorablement en milieu liquide ATTC 213 dans une gamme de pH comprise entre 6.5–7.5 avec 15% (p/v) NaCl. L'optimum de croissance est observé à pH 7.0 (Fig. 3.8). Toutes les caractéristiques phénotypiques suggèrent que cet isolat halophile est un membre du genre *Bacillus*. De plus, une croissance favorable de cette souche a été observée aux températures comprises entre 30 et 45°C; l'optimum de croissance est à 37°C (Fig. 3.9).

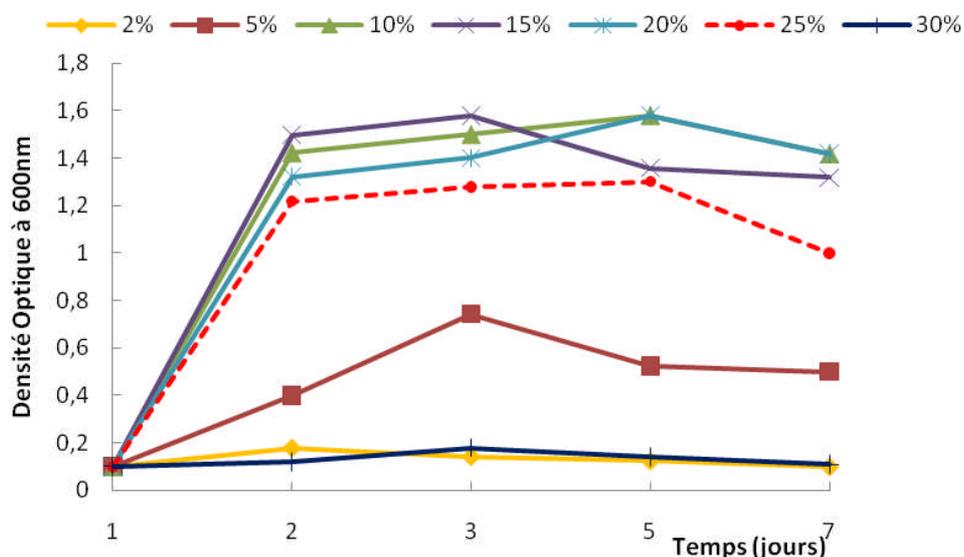


Fig. 3.7: Croissance de la souche bactérienne B21 sur milieu ATCC 213 à différentes concentrations de NaCl % (p/v) à 37°C et pH 7.

Les cellules de la souche B21 sont de type Gram- positive, les cellules sont en forme de bâtonnets courts et fins, de 0.3–0.5 mm de large et de 1.3–1.9 mm de long, cette souche est anaérobie facultative. La spore est présente, il s'agit d'une endospore sphérique de position terminale. L'oxydase est négative et la catalase est positive. La gélatine, l'amidon, le Tween 20 et 80 ne sont pas hydrolysés. Par contre, le H₂S et l'indole ne sont pas produits.

Par ailleurs, l'hydrolyse de l'urée et de l'arginine est positive et les nitrates sont réduits. Cette souche utilise des hydrates de carbone avec une acidification du milieu. Il s'agit du sucrose, D- glucose, D- fructose, D- galactose, cellobiose, D- mannose, D- mannitol, D- lactose, D- xylose et dextrane comme source de carbone. Les réactions de Voges–Proskauer et le rouge de méthyle sont négatifs. La croissance de la souche B21 est inhibée par les antibiotiques comme rifampicine, pénicilline, hygromycine, ampicilline et bacitracine. Aucune inhibition n'a été observée en présence de kanamycine, érythromycine, streptomycine, tétracycline, chloramphénicol ou neomycine. A titre de comparaison, nous

avons dressé le tableau 3.2 qui résume les principales propriétés phénotypiques et physiologiques de la souche B21 avec les autres espèces très rapprochées du genre *Bacillus*. Cette comparaison se réfère aux données de données de Wang et al, [248], Xue et al., [249], Lim et al; [250], Nielsen et al., [251].

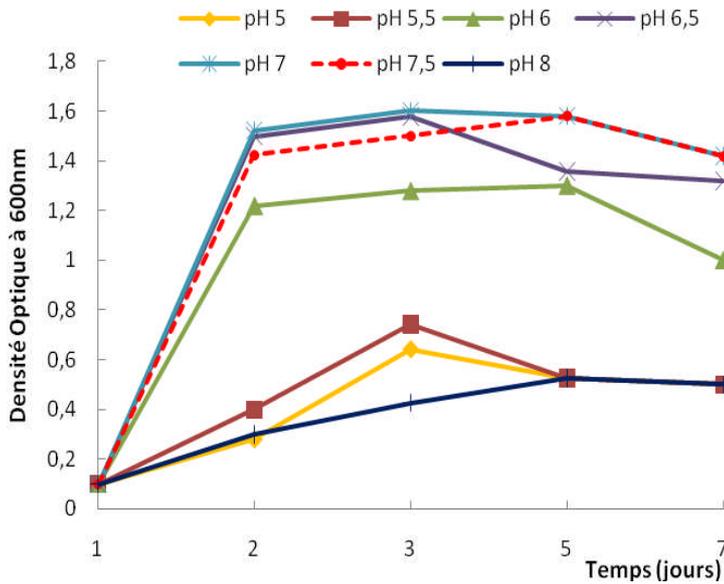


Fig. 3.8: Influence du pH sur la cinétique de croissance de la souche bactérienne B21, croissance obtenue sur milieu ATCC 213 à 37°C.

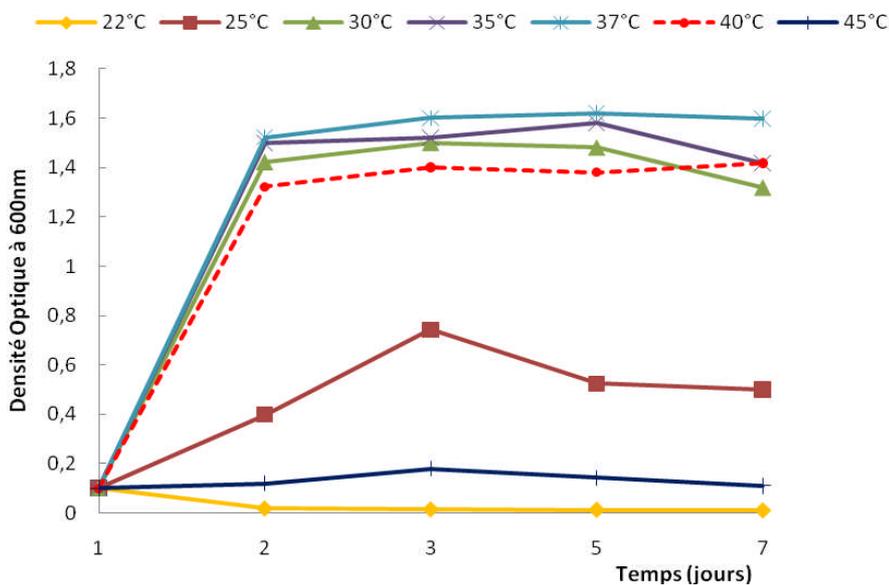


Fig. 3.9: Influence de la température sur la cinétique de croissance de la souche bactérienne B21, croissance obtenue sur milieu ATCC 213 à 37°C.

Tableau 3.2 : Tableau comparatif des caractéristiques de la souche B21 avec les espèces rattachées : Souche : 1, B21; Souche : 2, *Bacillus qingdaonensis* DQ115802; Souche : 3, *Bacillus aidingsensis* DQ504377; Souche : 4, *Bacillus salarius* AY667494; Souche : 5, *Bacillus chagannorensis* AM492159. (+) : Positive; (-) : négative; ND : non définit.

Caractéristique	1	2	3	4	5
Morphologie cellulaire	Bâtonnets courts	Bâtonnets courts	Bâtonnets courts	Bâtonnets courts et trapus	Bâtonnets courts
Couleur de la colonie	Crème	Blanchâtre à jaune	Blanchâtre	Crème	Jaune à orange
Formation de la spore	+	-	+	+	+
Oxydase	-	-	-	+	-
Catalase	+	+	+	+	+
Concentration de NaCl pour la croissance (% p/v)	5-25	2.5-20	8-33	3-20	3-20
Minimum	5	2.5	8	3	3
Optimum	10-15	12	12	10-12	7
Maximum	25	20	33	20	20
Optimum température pour la croissance (°C)	37	37	37	30	37
Réduction des nitrates	+	+	+	-	+
Production de H ₂ S	-	-	+	ND	-
Gammes de pH	6.5-7.5	6.5-10.5	6.0-9.5	6.8-9.5	5.8-11.0
pH optimum	7.0	9.0	7.2	8.0	8.5
Hydrolyse de :					
Gélatine	-	-	+	ND	-
Urée	+	+	-	ND	ND
Tween 20	-	-	-	ND	ND
Tween 80	-	-	-	+	-

3.3.2. Test de consommation des sulfates

Mis en la culture sur un milieu sulfaté, l'isolat B21 croit normalement. Le tracé de la courbe de croissance représentée sur la figure 3.10, fait ressortir une allure classique d'une croissance bactérienne. L'allure de la courbe obtenue est en forme de cloche. La concentration optimale est de $9,8 \cdot 10^7$ colonies/ml, au bout de 5 jours d'incubation. A partir du 5^{ème} jour, la concentration en de l'isolat B21 diminue. Suite à ces résultats, nous déduisons que sa croissance est maximale au bout de 5 jours. Passé ce temps de croissance, une phase de déclin est entamée. L'application du traitement par les bactéries antagonistes de l'isolat B21 pourra nécessiter une inoculation hebdomadaire.

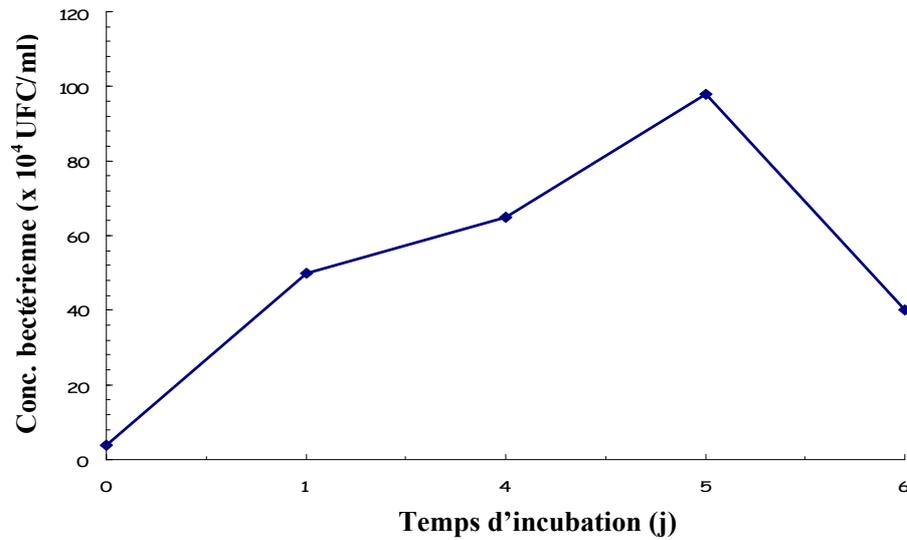


Fig. 3.10: Cinétique de croissance des cellules de l'isolat B21 sur un milieu sulfaté.

3.3.3. Analyse phylogénétique et alignement

Le séquençage partiel de l'ARN 16S, nous a permis d'obtenir une séquence de 529 bp que nous avons enregistré dans la base de donnée EMBL/ GenBank sous le numéro FR671419. Ci-dessous la séquence de la souche B21 (529 nucléotides):

```

ATGGAAGTCTAGGTCTTCTGATCGGTACCGTCATGGAACCG
GCCTCTTCGACCGGTCCTTGTTCTTCTCGGAT AACAGAGCT
TTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCACC
GTCAGGCTTTCGCCCAATTGCGGATGATTCCCTACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCC
GATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTAG
GCTC TTACCCCAACCAACCAGCTAA TGCGCCGCGGGCCCAT
CTGAAAGCGCGAGGAAGATCCCCG CTTTTCCCCATCGACC
AGGCGGTTCGA TGGGCCCATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCC
CGGGGTTATCCCGGACTTTCAGGCAGGTTGCCACGTGTTA
CTACCCCGTCCGCCGCTCGTTCCACAGGTTTCAACCCGAAG
GG ATCTGCCTGCTTCCCGCGCTCGACTTGCATGTATTAGG
CACGCCGCCAGCGTTCGTCTCCTGAGCCAGGATCAAACACTAT

```

L'arbre phylogénétique (Fig. 3.11) a été construit en utilisant la méthode neighbour-joining [221] disponible dans le package Geneious Pro 4.8.5, (Biomatters Ltd, 2009), les matrices de distance évolutive ont été calculées avec l'algorithme Tamura-Nei pour la méthode Neighbor-Joining, ainsi que les branches de l'arbre ont été transformées par la méthode cladogram disponible comme option dans l'outil Geneious.

Les séquences sont comparées à l'ARNr 16S des autres espèces halophiles du genre *Bacillus*. Nous avons observé que la souche B21 présente de grandes similitudes avec la souche *Bacillus qingdaonensis* DQ115802 (94.4% de similitude de séquence), *Bacillus ainingensis* DQ504377 (94.0 %), *Bacillus salarius* AY667494 (92.2 %), et *Bacillus chagannorensis* AM492159 (89.1 %) (Tableau 3.3). La séquence d'ARNr 16 de la souche B21 présente une similitude inférieure à 98 % avec des espèces très proches du genre *Bacillus* ; ceci pourrait supposer qu'il s'agit d'une nouvelle espèce.

Tableau 3.3 : Pourcentage de similitude de la séquence ARNr 16S de la souche B21 avec quelques espèces du genre *Bacillus*.

Nom de la séquence et code d'accension	Pourcentage de similitude (%)
<i>Bacillus halodenitrificans</i> (AB021186)	97.9
<i>Bacillus haloalkaliphilus</i> (DQ157468)	97.6
<i>Bacillus qingdaonensis</i> (DQ115802)	94.4
<i>Bacillus chagannorensis</i> (AM492159)	98.0
<i>Bacillus halodenitrificans</i> (AB021186)	87.9
<i>Marinococcus albus</i> (DQ093350)	87.9
<i>Halophilic bacterium</i> (EF063150)	94.2
<i>Virgibacillus pantothenicus</i> (AB039331)	87.8
<i>Amphibacillus diazotrophicus</i> (EU143690)	87.8
<i>Bacillus salarius</i> (AY667494)	92.2
<i>Bacillus ainingensis</i> (DQ504377)	94.0
<i>Salirhabdus euzebyi</i> (AM292417)	89.4
<i>Salirhabdus euzebyi</i> (AM292417)	89.4
<i>Salinibacillus kushneri</i> (AY321437)	90.3
<i>Filobacillus milosensis</i> (NR027209)	88.4
<i>Sediminibacillus halophilus</i> (AM905297)	88.1
<i>Bacillus agaradhaerens</i> (GQ121032)	89.0
<i>Marinococcus halophilus</i> (DQ093352)	87.0
<i>Virgibacillus siamensis</i> (AB365482)	81.1

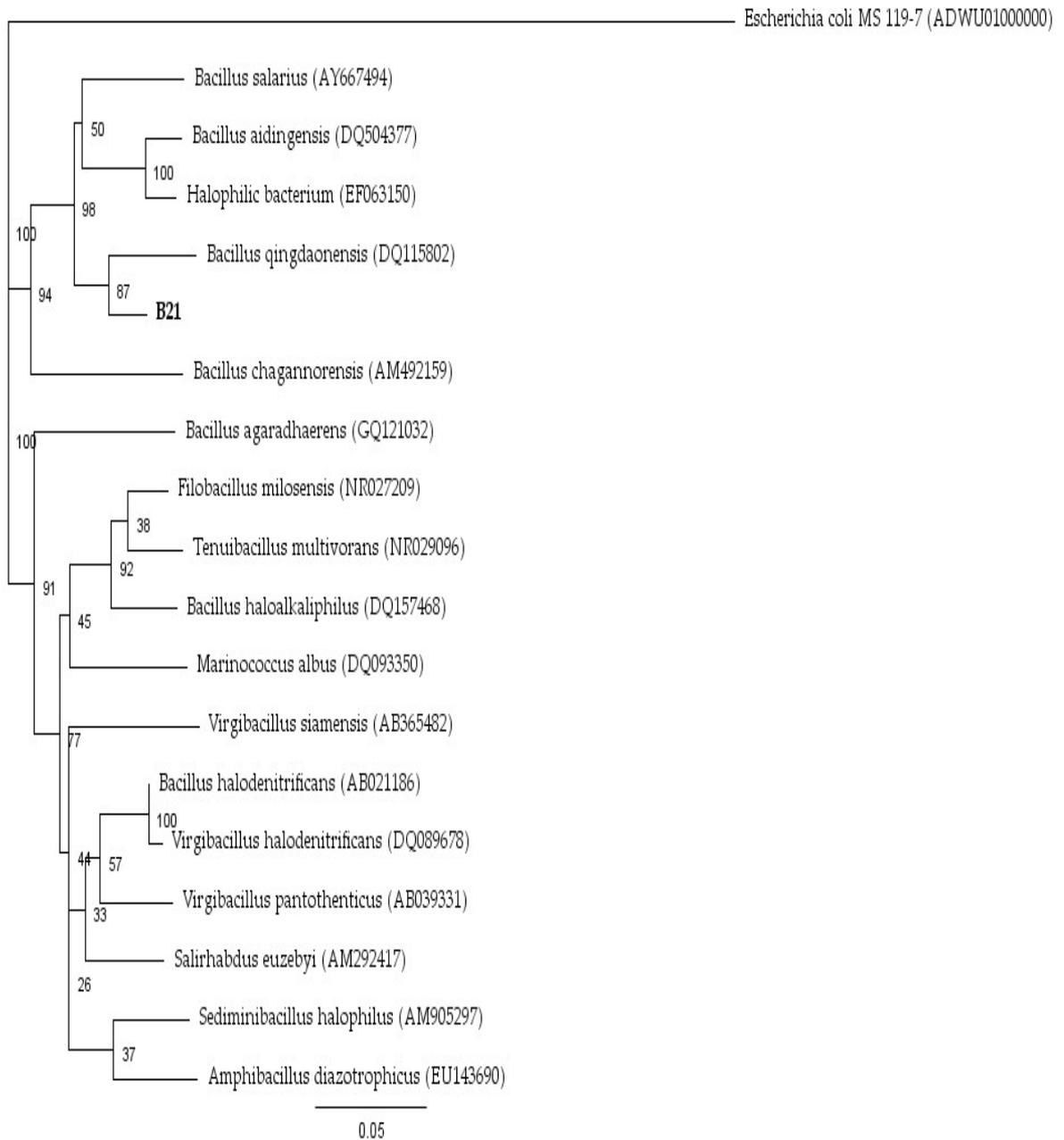


Fig. 3.11: Dendrogramme de la souche B21 basé sur les séquences de l'ARNr 16S séquence indiquant sa position par rapport aux espèces proches. L'arbre a été construit en utilisant la méthode d'assemblage de «Neighbour Joining Method». La séquence de données utilisées a été obtenue à partir de séquences collectées à partir de la banque des séquences nucléotidiques EMBL, *Escherichia coli* MS 119-7 a été utilisé comme « Outgroup ».

3.3.4. Cinétique de croissance du consortium de BSR en présence de l'inhibiteur biologique (souche B21) et chimique (THPS)

Toutes les expériences ont été réalisées avec le milieu de culture contenant des eaux d'injections recueillies, comme déjà mentionné précédemment. Dans notre étude, les eaux présentent une concentration élevée en sulfate, aussi la croissance des BSR et leurs activités biologiques dépendent fortement des sulfates. En outre, cette variabilité de la concentration en sulfate dépend de l'origine du prélèvement de ces eaux. En général, les BSR tendent à synthétiser un ou plusieurs métabolites. Biochimiquement, les BSR transforment les sulfates en sulfites à l'aide de l'adénosine phospho-sulfate réductase. Selon Postgate [205], ces bactéries produisent des sulfures, après dégradation de l'hydrate de carbone sous forme de lactate et libèrent de l'énergie cellulaire.

La cinétique de croissance du consortium de BSR est représentée sur les figures 3.12. et 3.13. Ces croissances ont été étudiées avec et sans l'addition séparée de l'inhibiteur biologique et chimique. L'évaluation de la densité cellulaire fait ressortir une variation de croissance de ces bactéries en fonction du temps dans les différents échantillons d'eau d'injection contenant respectivement 100 mg/l (S1), 600 mg/l (S2), 1200 mg/l (S3) et 2200 mg/l (S4) de sulfate. Ces eaux ont été inoculées avec la même concentration du consortium de BSR (la concentration initiale de l'inoculum était de 1.9×10^5 cellule/ml). Selon les figures 3.12a, 3.12b, 3.13c et 3.13d, l'allure des courbes a montré une différence significative dans la croissance cellulaire.

Nous avons noté également que, durant le temps d'incubation, la densité cellulaire diminuait progressivement dans toutes les eaux d'injection et pour chaque concentration en sulfate considérée. La phase de latence est absente, cette dernière a eu lieu pendant les pré-cultures. Cependant, il faut noter que cette croissance est relativement dépendante de la concentration en ions sulfates présente dans ces milieux de cultures. Cette croissance est plus importante (1.2×10^6 cellule/ml) pour le témoin qui contient 2200 mg/l de sulfate. En outre, nous avons noté que quand la concentration en sulfate diminuait (de S4 au S1), les densités cellulaires diminuaient également, atteignant une valeur minimale (10^6 cellules ml⁻¹) après 12 jours d'incubation.

Pendant le suivi de la densité cellulaire en présence de l'inhibiteur biologique et chimique, nous avons remarqué que dans le témoin négatif, la densité des cellules était plus importante que celle des cultures traitées par l'antagoniste bactérien ou par le biocide et ce, dans toutes nos expériences. Ainsi, les cultures inoculées avec les BSR présentent une densité cellulaire supérieure à celles obtenues avec la culture contenant SRB/THPS.

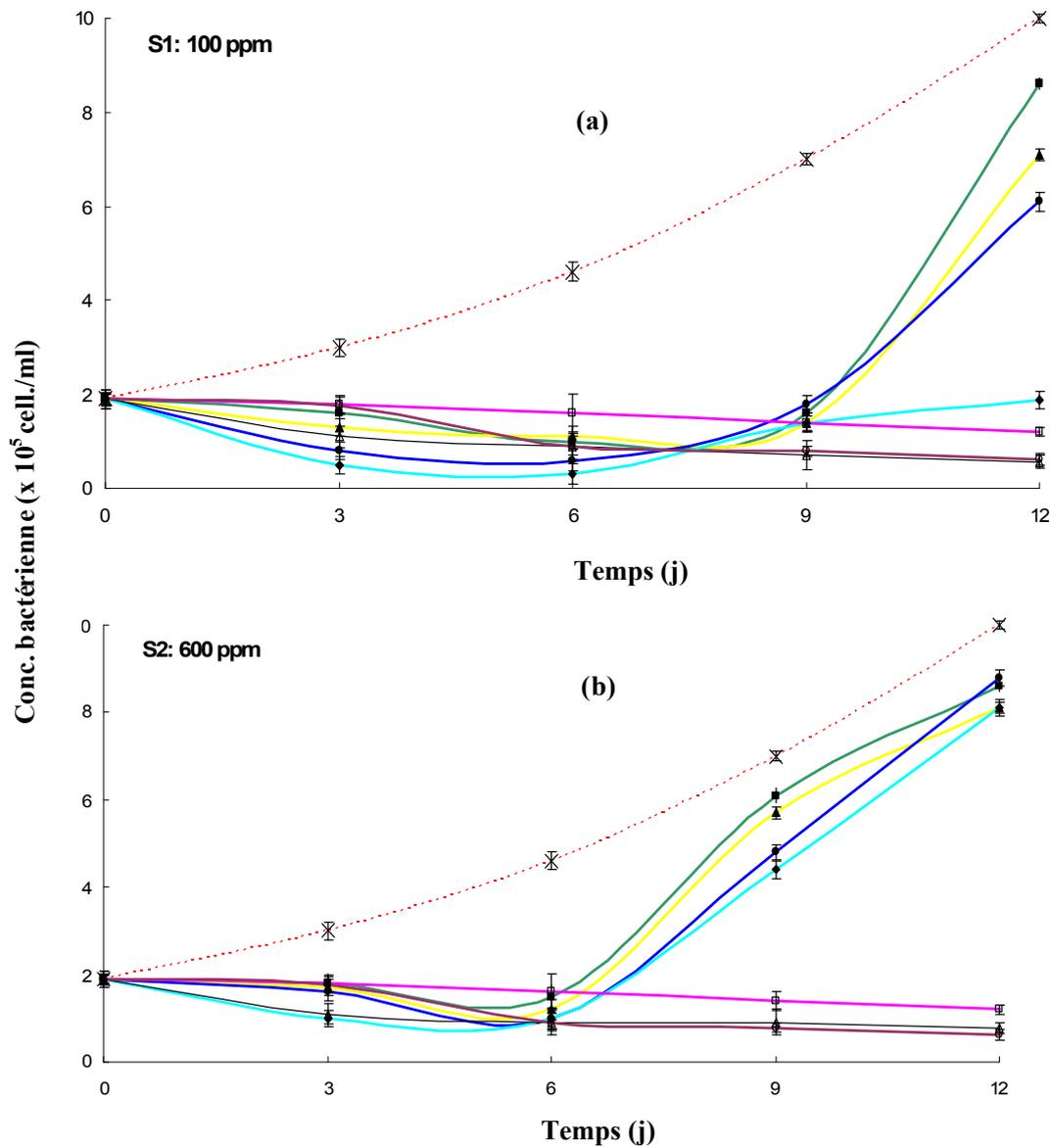


Fig. 3.12 : Cinétique croissance du consortium de BSR après l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différente concentration en inoculum : 2% (\square), 5% (Δ) et 6% (\circ). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de croissance du même consortium après l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5 mg/l (\blacksquare), 10 mg/l (\blacktriangle), 20 mg/l (\bullet) et 50 mg/l (\blacklozenge). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (\times). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu aqueux contenant la concentration en sulfate : 100 mg/l (a) et 600 mg/l (b). Les valeurs rapportées sont la moyenne de 3 répliques.

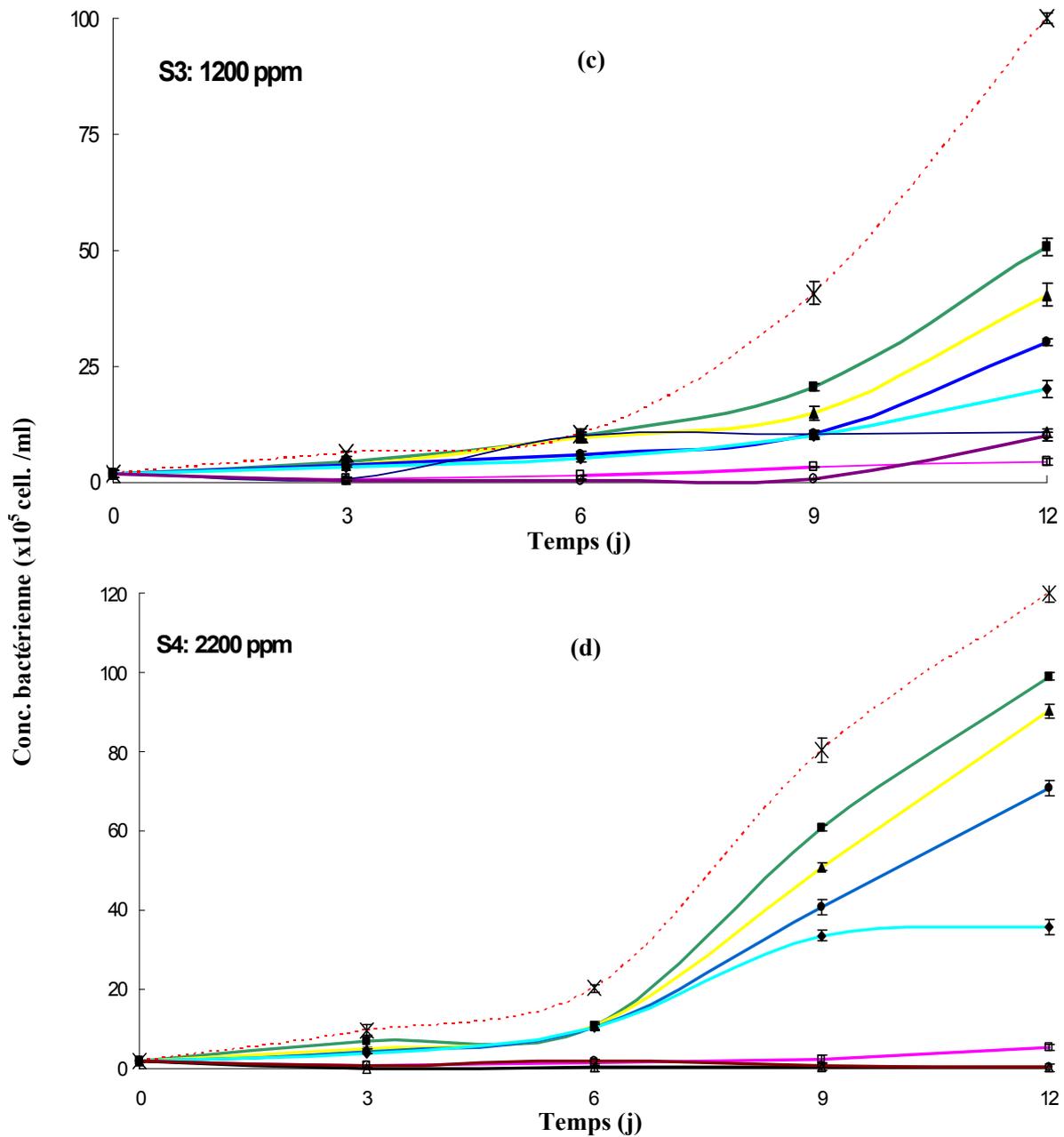


Fig.3.13 : Cinétique croissance du consortium de BSR après l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différente concentration en inoculum : 2% (□), 5% (Δ) et 6% (○). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de croissance du même consortium par l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5 mg/l (■), 10 mg/l (▲), 20 mg/l (●) et 50 mg/l (◆). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (x). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu aqueux contenant différentes concentrations en sulfate 1200 mg/l (c), et 2200 mg/l (d). Les valeurs rapportées sont la moyenne de 3 répliques.

Nous avons également trouvé, que les valeurs de la densité cellulaire dans les eaux traitées par le biocide étaient beaucoup plus importantes que celles obtenues en co-cultures des SRB et de la souche B21, ce qui explique et accentue leur effet inhibiteur sur le consortium de BSR.

Cette inhibition était remarquablement importante. En présence du biocide, nous avons remarqué que la croissance des BSR était réduite pendant les neuf premiers jours et ce, dans toutes les expériences. Dans l'industrie pétrolière, la durée de l'inhibition par un biocide est généralement considérée importante pour l'optimisation de l'efficacité du THPS dans les eaux d'injection contaminées par les BSR [53].

D'une part, en présence de bactéries antagonistes co-cultivées avec les BSR, nous avons noté une diminution significative de la densité cellulaire dans toutes les eaux d'injection. Nous pouvons expliquer ceci par le fait que l'effet provoqué par les bactéries antagonistes est un effet de type bactéricide ou bactériostatique tant qu'elles réalisent une croissance exponentielle.

Ainsi, après une période d'incubation dépassant les trois jours de Co-cultures, nous avons observé une diminution dans la densité cellulaire des BSR dans tous les essais contenant 2% d'inoculum constituant la souche B21 et également dans les Co-cultures contenant 5% et 6%. Nous avons observé que l'inoculation de la souche B21 a réduit fortement la croissance des BSR pendant douze jours. Comparé à l'inhibition par THPS, l'inhibition provoquée par la souche B21 était très élevée. Pour des essais d'efficacité réels sur les sites de gisements de pétrole, ce résultat est considéré comme très avantageux.

D'autre part, les figures 3.14 et 3.15 montrent que les BSR réduisent le sulfate en sulfure, en utilisant l'ion sulfate comme accepteur finale d'électron. En présence de ces ions, les BSR synthétisent l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire pour leur métabolisme. Ainsi, l'enzyme ATP-sulfurylase [205] induit la génération de sulfure d'hydrogène (H₂S) inducteur de la corrosion. En corrélation avec les figures 3.12 et 3.13, nous avons observé durant le temps d'incubation que l'évolution de la concentration en sulfate, dans les cultures contenant le consortium de BSR cultivé sans inhibiteur dans les quatre milieux, suivait la même allure.

Nous avons également noté que, la concentration en sulfate avait diminué au cours du temps d'incubation car, complètement consommée par les BSR. En effet, la quantité de sulfate utilisée est plus importante dans l'eau contenant la concentration de 2200 mg/l (S4) et 1200 mg/l (S3), en comparaison avec la quantité de sulfate utilisée dans l'eau dosé aux concentrations de 600 mg/l (S2) et 100 mg/l (S1) respectivement.

Selon les figures 3.14a, 3.14b, 3.15c et 3.15d, nous avons noté que les BSR dégradent les sulfates en présence de l'inhibiteur, quelque soit sa nature biologique ou chimique. Dans les co-cultures, la souche B21 a probablement inhibé l'activité cellulaire en agissant sur la membrane cytoplasmique ou peut être qu'il y avait compétition pour les nutriments entre les différents types de microorganismes dans les co-cultures [178].

Sur les figures 3.16 et 3.17, nous avons présenté l'évolution des concentrations en sulfures durant le temps d'incubation des co-cultures pour montrer l'évolution des ions sulfures dans les quatre échantillons d'eau, contenant les différentes concentrations en sulfates. Ces concentrations varient en fonction du temps et dépendent de la concentration en sulfates présente dans le milieu.

A la fin du temps d'incubation, cette même quantité de sulfures libérée varie en fonction de la concentration en sulfates : une concentration de 0.66 mg/L a été enregistrée, elle reste la plus importante, retrouvée dans le milieu contenant la plus grande concentration en sulfates (S4, 2200 mg/L), la quantité la moins élevée (0.142 mg/L) a été observée dans le milieu contenant le moins de sulfate (S1, 100 mg/L). En ce qui concerne les deux autres milieux, la concentration en sulfures était moyenne, correspondante aux concentrations S2 et S3.

Une comparaison de la cinétique de production des sulfures dans les eaux d'injection utilisées pour la culture des BSR en absence et en présence de l'inhibiteur chimique ou biologique a montré que les BSR devenaient moins corrosives avec de basses concentrations en sulfures produites.

Généralement la concentration de l'inhibiteur a une influence directe sur la production des sulfures. En effet, la concentration en sulfures a diminué de manière significative, en augmentant la concentration de l'inhibiteur. La présence du sulfate dans les eaux d'injection présente plusieurs problèmes pour l'activité et la croissance des BSR. Le sulfate est utilisé par les BSR comme accepteur final d'électron pendant l'oxydation de la matière organique, ayant pour résultat la production de l'hydrogène sulfure [14, 30, 205]. La présence du H₂S provoque la précipitation des métaux, l'apparition des mauvaises odeurs et la corrosion des pompes et des pipes [30, 252].

Dans tous les cas, il a été noté une consommation progressive des sulfates par les BSR. Par exemple, après 12 jours de croissance dans le milieu S1, le sulfate résiduel atteint la valeur de 40 mg/l dans le témoin. Avec, un inoculum de 2% de la souche B21 qui résulte de la consommation des sulfates par les BSR, la concentration en sulfate diminue de 100 mg/l à 56 mg/l. Egalement, quand nous avons utilisé 5mg/L de THPS, nous avons observé une diminution de la concentration de 100 mg/l à 42 mg/l. Ceci met en évidence l'effet inhibiteur de la souche B21 sur la consommation du sulfate. Le même raisonnement peut être adopté pour les autres milieux (S1, S2, S3 et S4).

Dans tous les cas, il a été noté une consommation progressive des sulfates par les BSR. Par exemple, après 12 jours de croissance dans le milieu S1, le sulfate résiduel atteint la valeur de 40 mg/l dans le témoin. Avec, un inoculum de 2% de la souche B21 qui résulte de la consommation des sulfates par les BSR, la concentration en sulfate diminue de 100 mg/l à 56 mg/l. Egalement, quand nous avons utilisé 5mg/L de THPS, nous avons observé une diminution de la concentration de 100 mg/l à 42 mg/l. Ceci met en évidence l'effet inhibiteur de la souche B21 sur la consommation du sulfate. Le même raisonnement peut être adopté pour les autres milieux (S1, S2, S3 et S4).

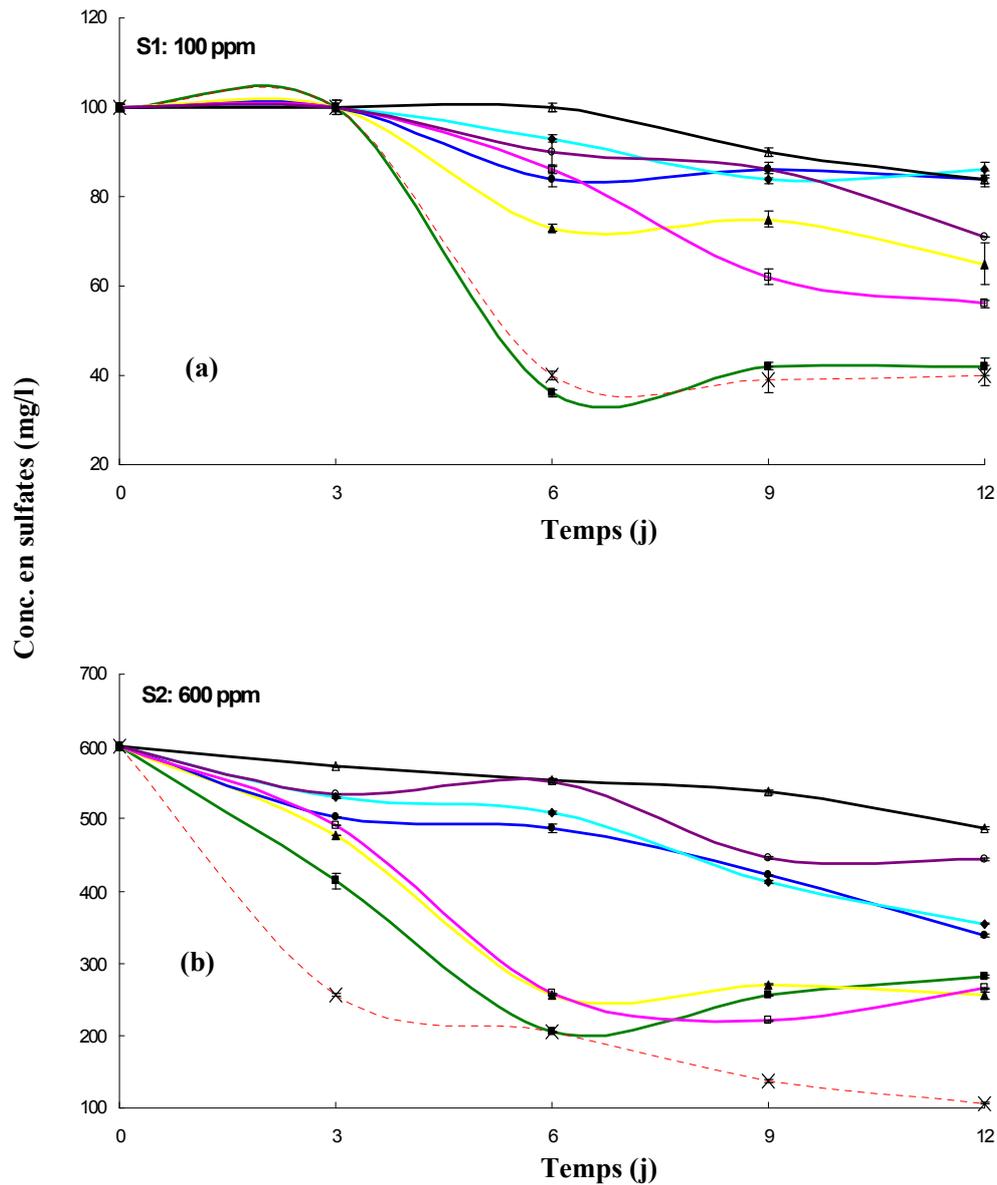


Fig. 3.14: Cinétique de consommation du sulfate par le consortium de BSR après l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différente concentration en inoculum : 2% (□), 5% (Δ) et 6% (○). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de consommation par le même consortium, après l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5mg/L (■), 10mg/L (▲), 20mg/L (●) et 50mg/L (◆). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (x). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu aqueux contenant différentes concentrations en sulfate 100 mg/l (a), et 600 mg/l (b). Les valeurs rapportées sont la moyenne de 3 répliques.

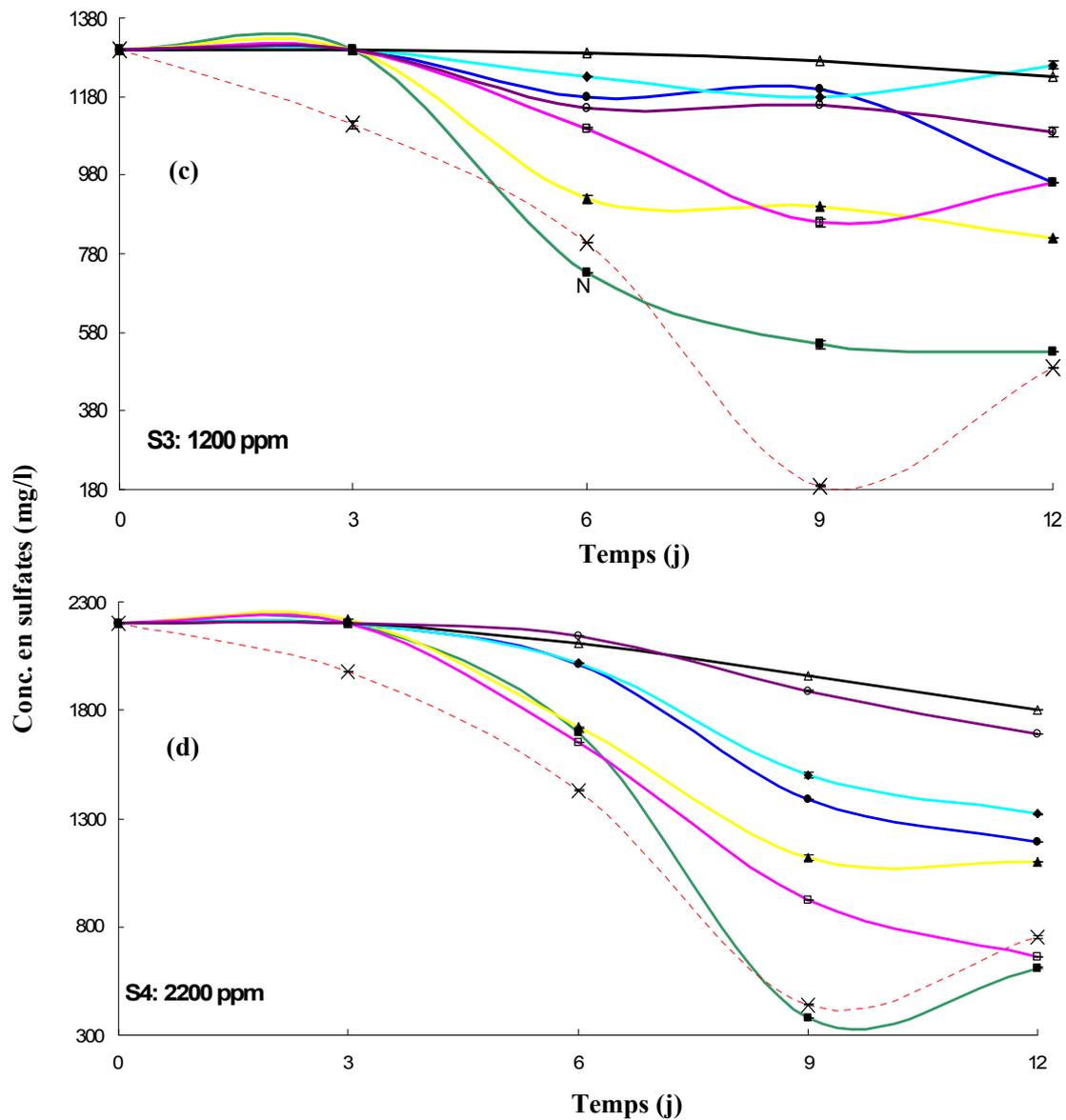


Fig.3.15: Cinétique de consommation du sulfate par le consortium de BSR après l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différentes concentrations en inoculum : 2% (□), 5% (Δ) et 6% (○). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de consommation par le même consortium bactérien, après l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5mg/L (■), 10mg/L (▲), 20mg/L (●) et 50mg/L (◆). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (×). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu aqueux contenant différentes concentrations en sulfate 1200 mg/l (c), et 2200 mg/l (d). Les valeurs rapportées sont la moyenne de 3 répliques.

Dans tous les cas, il a été noté une consommation progressive des sulfates par les BSR. Par exemple, après 12 jours de croissance dans le milieu S1, le sulfate résiduel atteint la valeur de 40 mg/l dans le témoin. Avec, un inoculum de 2% de la souche B21 qui résulte de la consommation des sulfates par les BSR, la concentration en sulfate diminue de 100 mg/l à 56 mg/l. Egalement, quand nous avons utilisé 5mg/L de THPS, nous avons observé une diminution de la concentration de 100 mg/l à 42 mg/l. Ceci met en évidence l'effet inhibiteur de la souche B21 sur la consommation du sulfate. Le même raisonnement peut être adopté pour les autres milieux (S1, S2, S3 et S4).

D'une part, selon les figures 3.14 et 3.15, nous avons noté que l'inhibition de la production de sulfure suivait une tendance opposée à l'inhibition de consommation du sulfate. La concentration produite en sulfures pendant le métabolisme des BSR faiblissait graduellement dans toutes les eaux comparées au témoin (figures 3.16 et 3.17). Ce ralentissement de production des sulfures est plus prononcé en présence de la souche B21 comparée au biocide (THPS). En interprétant les résultats portés sur les figures 3.16 et 3.17, nous obtenons le même résultat avec les milieux préparés avec les eaux contenant les concentrations S1, S2, S3 et S4 en sulfates.

L'eau ayant servi à l'isolement de l'inhibiteur biologique provenait du site pétrolier d'In-aménas. Ce gisement est assisté par l'injection d'eau pour la récupération du pétrole. La combinaison entre les donneurs d'électrons très abondants (composants du pétrole) et l'accepteur d'électrons (sulfate) peut conduire à la production de sulfure d'une manière significative par l'action des bactéries sulfato-réductrices (BSR) autochtones au gisement ou injectées avec l'eau [119, 168, 253]. Le sulfure est produit par les BSR, probablement là où les ions sulfate sont présents, c'est-à-dire dans l'eau injectée et/ou mélangée avec des composés organiques contenant de l'huile et de l'eau de gisement pétrolier [95].

Au cours de notre étude, nous avons constaté que quelle que soit la concentration en sulfate présente dans les eaux d'injection, la croissance des BSR est fortement inhibée par l'antagoniste bactérien (B21). La souche B21 identifiée comme étant une bactérie halophile extrême, Gram positif isolée à partir de l'eau de gisement du puits ZR#91 dans la région d'In Amenas.

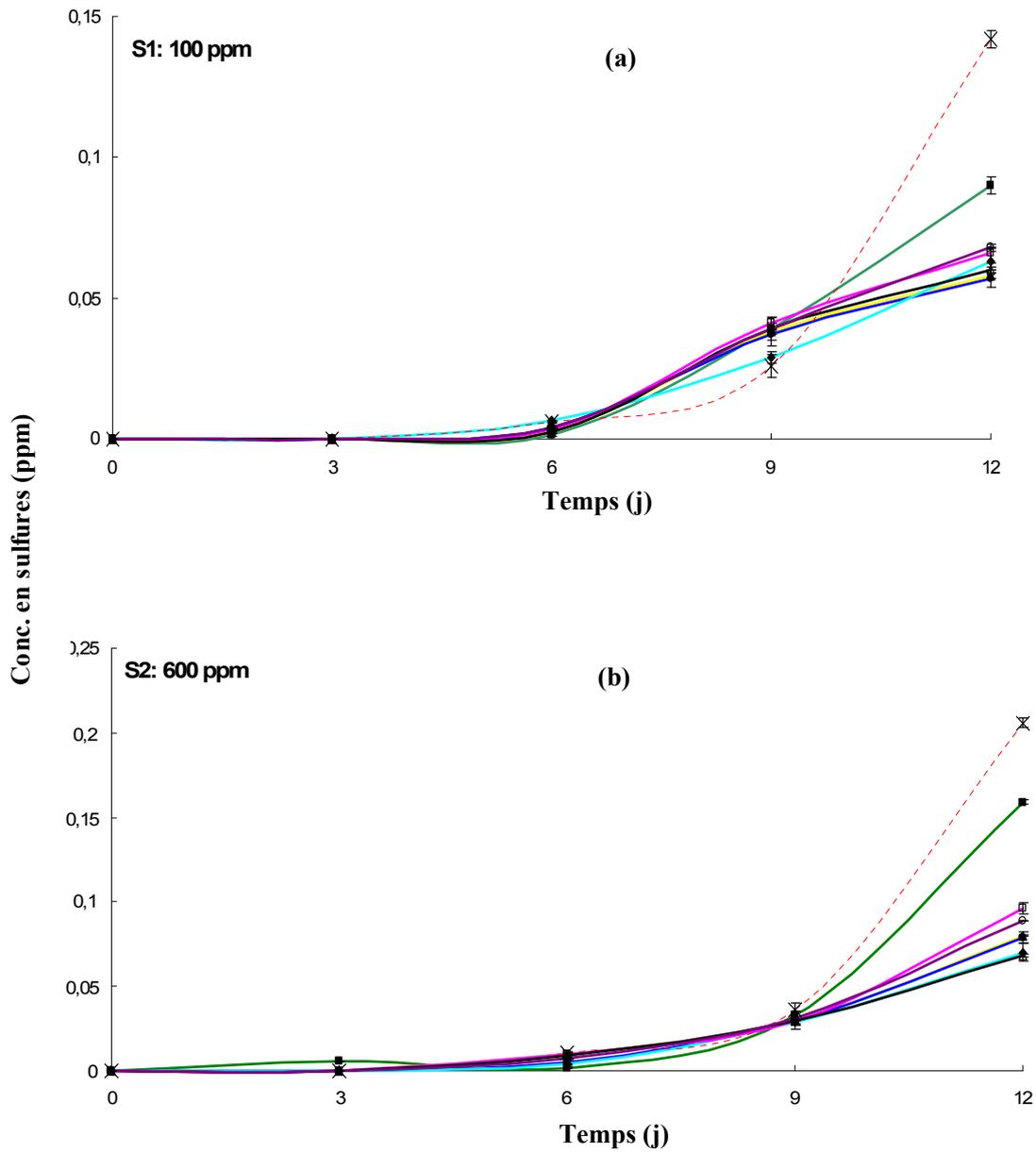


Fig.3.16: Cinétique de production du sulfure par le consortium de BSR et après l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différentes concentrations en inoculum : 2% (□), 5% (Δ) et 6% (○). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de production du même consortium bactérien, après l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5mg/L (■), 10mg/L (▲), 20mg/L (●) et 50mg/L (◆). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (x). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu aqueux contenant différentes concentrations en sulfate 100 mg/l (a), et 600 mg/l) (b). Les valeurs rapportées sont la moyenne de 3 répliques.

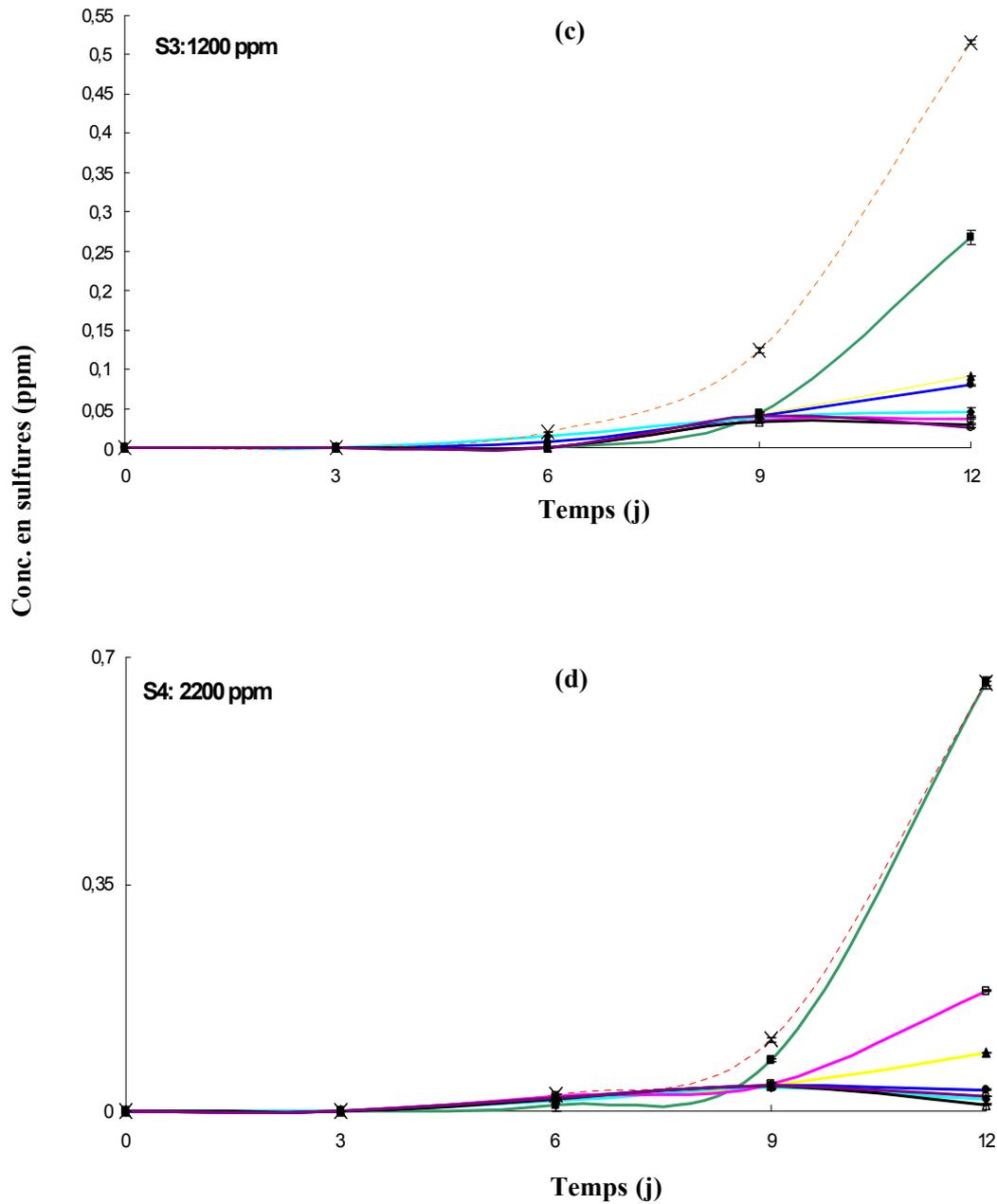


Fig 3.17: Cinétique de consommation du sulfate par le consortium de BSR et après l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différentes concentrations en inoculum : 2% (□), 5% (Δ) et 6% (○). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de production par le même consortium, après l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5mg/L (■), 10mg/L (▲), 20mg/L (●) et 50mg/L (◆). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (×). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu aqueux contenant différentes concentrations en sulfate 1200 mg/l (c), et 2200 mg/l (d). Les valeurs rapportées sont la moyenne de 3 répliques.

En outre, les biocides sont des composés synthétiques antimicrobiens qui sont utilisés pour protéger les installations pétrolières industrielles en contact avec les fluides [254]. Ainsi, dans l'industrie pétrolière algérienne, le biocide chimique THPS est utilisé à une concentration qui varie entre 5 à 50 mg/L pour le traitement en continu et 100 mg/l pour le traitement de choc. Ce dosage montre une excellente activité antimicrobienne contre les problèmes de corrosion due aux micro-organismes [6]. D'une manière particulière, ce biocide est extrêmement efficace contre les BSR qui constituent une cause majeure de la production du sulfure d'hydrogène [53, 54, 255]. Les formulations contenant le THPS sont largement utilisées pour la protection des systèmes de récupération d'huile utilisés dans l'injection des eaux, pour la protection des bacs de stockage et des systèmes de transport de pétrole [53].

Pour atténuer la biocorrosion, certaines méthodes ont été proposées et utilisées en exploitant le pouvoir de réduction des nitrates par les bactéries réduisant les nitrates (NRB) contre les BSR [159, 256]. Little et al, [256], ont rapporté des essais réussis d'exclusion bio-concurrentielles exercées sur les plates-formes pétrolières, où les taux de corrosion ont été réduits d'au moins 50% [256]. D'autre part, à l'égard de la bio-augmentation et bien que des chercheurs [14, 30, 205], tels que Hubert et al, [7], ont rapporté des échecs en ce qui concerne l'introduction de bactéries dans des cultures mixtes naturelles. Zhu et al, [257] ont rapporté l'application simultanée de nitrate et de bactéries dénitrifiantes comme moyen le plus efficace pour contrôler la biocorrosion induite par les BSR. Cependant, la recherche dans ce domaine est toujours en cours.

La souche B21 fait partie des bactéries modérément halophiles, elle se développe de façon optimale dans des milieux contenant 3-15% (p/v) de NaCl, ces espèces microbiennes sont largement répandues dans les habitats hypersalins. Ces organismes sont d'un intérêt considérable en raison de leur potentiel biotechnologique dans la production de solutés compatibles et/ou enzymes hydrolytiques ou hydrolases [258]. Les bactéries halophiles modérées constituent un groupe physiologique très hétérogène qui comprend à la fois des micro-organismes Gram- positif et Gram- négatif. Aérobie, sporulés ou non, modérément halophiles, les bacilles Gram-positives sont également très diversifiés sur le plan taxonomique. Ils ont été isolés à partir des environnements salins tels que les sols et les habitats aquatiques [259].

L'introduction des techniques de biologie moléculaires, en particulier l'utilisation du séquençage de gène de l'ARNr 16S, a un impact majeur sur la taxonomie des *Bacillus* et a abouti à une partition du genre. Sur la base de leur activité antagoniste contre les BSR en culture liquide, la souche B21 testée dans cette étude, semble être un inhibiteur biologique puissant à des concentrations comparables en inocula, si nous la comparons aux antibiotiques disponibles dans le commerce à l'exemple de la kanamycine, de l'acide nalidixique ou de la tétracycline et à peu près, aussi, efficace que les biocides [35].

Par ailleurs, il convient également de mentionner un autre type d'antagonisme, celui lié au substrat. Dans un environnement naturel, comme le sol et l'eau, qui est habitée par des

populations microbiennes mixtes, de nombreuses relations d'association et d'antagonisme se produisent. Tous les organismes vivants dans un tel milieu sont affectés, directement ou indirectement, par un ou plusieurs des autres membres constitutifs de cette population. Ces relations ont été d'abord expliquées comme dues, principalement, à la concurrence pour les éléments nutritifs, comme cela a été bien rapporté par Pfeffer [260]. Waksman [178] a suggéré qu'il s'agit d'un problème de concurrence nutritif pour un substrat. Lorsque deux organismes sont capables d'utiliser les mêmes éléments nutritifs, dans notre cas le sulfate, mais pouvant être affectés aussi par les conditions environnementales, telles que la réaction, la disponibilité en air et la température, l'organisme qui trouve les conditions les plus favorables à son développement, va croître plus rapidement que l'autre et ainsi, il est en mesure d'entraver son développement sinon le supprimer.

Toutefois, il est vite devenu évident que l'antagonisme entre les micro-organismes englobe des phénomènes autres que la concurrence pour l'épuisement des nutriments et les conditions environnementales. Donc, nous avons suggéré qu'il existe un certain nombre constant de cellules capables de vivre dans un espace donné. Lorsque cette concentration est atteinte, la multiplication s'arrête sans production de substances toxiques ou d'épuisement des nutriments. Le même phénomène est censé se produire lorsque deux bactéries vivent ensemble [178]. Si les concentrations limites des deux organismes sont différentes, l'un avec une valeur plus élevée réprime l'autre [178].

Il a été suggéré que, activité biologique et compétitive, doivent également être prises en considération [178]. L'antagonisme peut être unilatéral ou bilatéral, en d'autre terme, quand une seule bactérie réprime une autre, qui n'est pas hostile à elle, ou lorsque chaque organisme réprime l'autre [261]. Par conséquent, les expériences que nous avons conduites ont donné des résultats prometteurs quant à l'utilisation de la souche B21 comme agent antagoniste contre les agents de la corrosion les BSR. La souche *Bacillus* sp a été choisie pour les propriétés intéressantes. Elle est souvent associée avec les agents de lutte biologique et sa capacité à produire des métabolites souvent extracellulaires actifs contre les autres micro-organismes.

3.3.5 Simulation de l'inhibition biologique des bactéries de la corrosion dans une boucle de monitoring

3.3.5.1. Monitoring de la cinétique de croissance des BSR cultivées en absence et en présence de *Bacillus* sp (B21)

En circulant dans la boucle de corrosion, l'inoculation de l'eau d'injection d'In- Aménas par des souches mixtes de BSR, en absence et en présence de *Bacillus* sp, nous a permis d'avoir deux allures différentes de la croissance de ces bactéries. En effet, la figure 3.18 fait ressortir cette différence de croissance, représentée par l'évolution de la densité optique (DO) en fonction du temps d'incubation des BSR. Sur le graphe montrant la variation de la densité optique du milieu, nous remarquons que l'allure présente un pique au 4^{ème} jour de l'incubation correspondant à une densité optique égale à 1,9. Dans ce cas, une activité cellulaire élevée des

BSR mixtes est observée. En effet, durant cette période, la concentration cellulaire augmente de façon significative et le taux de croissance μ s'accroît régulièrement jusqu'à atteindre son maximum [109]. Pendant le dédoublement des BSR, il y a synthèse des métabolites primaires.

En suivant la mesure de la DO, nous avons obtenu une valeur égale à 0,3, après le 8^{ème} jour de culture des BSR mixtes. Les BSR sont en phase de déclin. Les bactéries ne se divisent plus ($\mu < 0$) et le taux de mortalité est important. Il est à noter que, pour une culture mixte de BSR, ce taux dépend de l'espèce bactérienne et des conditions d'environnement [109]. Cette DO reste pratiquement constante (DO = 0,3) jusqu'au 20^{ème} jour de l'incubation et un ralentissement ou un arrêt de la croissance survient.

Sur la même figure (fig.3.18), la densité optique du milieu inoculé par les BSR mixtes et par l'inhibiteur biologique est supérieurs (DO = 2,362) à celle du milieu de culture inoculé uniquement par les consortiums de BSR (DO = 1,85). Par la suite, la DO passe de 0,3 à 1,3 au bout de cinq jours d'incubation. Malgré le traitement de l'eau d'injection, la DO reste inférieur pendant 8 jours d'incubation, si nous la comparons à la DO obtenue avec une l'eau non traitée par l'inhibiteur biologique. D'après les données obtenues, nous constatons que les bactéries antagonistes influencent la division cellulaire des BSR ou elles interfèrent avec cette division. Durant la croissance des deux populations microbiennes (*Bacillus* sp et BSR) près l'une de l'autre, des effets antagonistes, indifférents ou favorables peuvent s'exercer. En effet, avant l'injection de l'inhibiteur biologique dans l'eau d'injection du puits ZR#643, le consortium de BSR est dans un état d'équilibre avec le milieu ; mais l'introduction de l'inhibiteur biologique a provoqué une modification de cet équilibre. Un changement à la fois qualitatif et quantitatif dans la densité microbienne de l'eau d'injection est obtenu [57,60]. Ceci est traduit par l'augmentation de l'allure de la courbe.

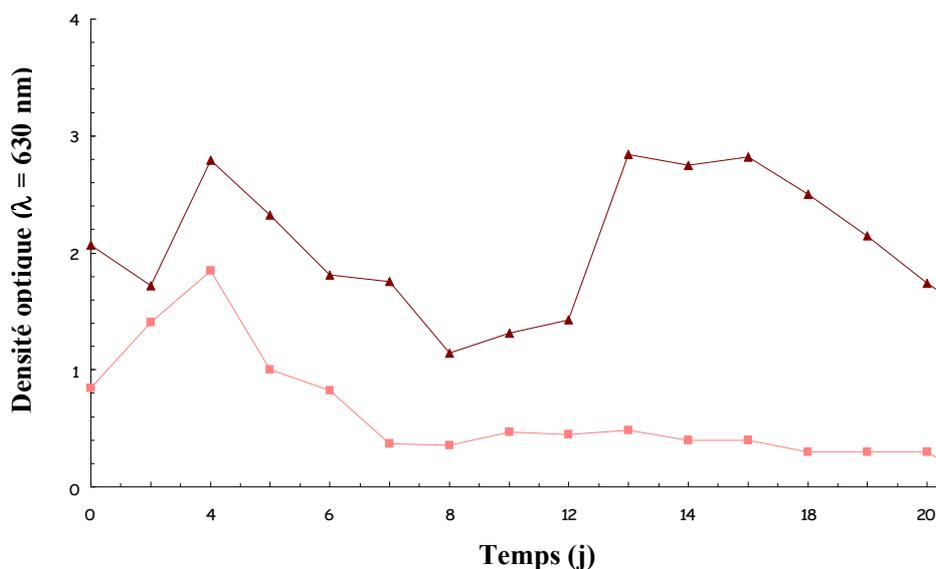


Fig. 3.18: Cinétique de croissance du consortium de BSR après l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) (▲). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de croissance pour le même consortium, sans l'addition de l'inhibiteur biologique (■). Dans tous les cas, le milieu utilisé est l'eau d'injection du puits ZR#643.

Seulement, cette inhibition cellulaire s'atténue si aucune nouvelle inoculation des bactéries antagonistes ne sera pas appliquée, ce qui explique l'augmentation de la DO du milieu contenant le consortium des BSR et les bactéries antagonistes, à partir du 12^{ème} jour d'incubation. Il faut noter que, les mêmes étapes d'évolution de la densité optique sont obtenues à chaque inoculation des bactéries antagonistes.

3.3.5.2. Dosage des sulfates dans l'eau d'injection

Quand deux microorganismes sont capables d'utiliser le même substrat, mais sont influencés différemment par les conditions du milieu, celui qui trouve les conditions favorables à sa croissance va se développer et inhiber la croissance de l'autre microorganisme. L'utilisation des sulfates par *Bacillus sp* (B21) et par le consortium de BSR corrosives entraîne une relation antagoniste entre les deux populations bactériennes pour ce même substrat. La variation de la concentration en sulfates, dans l'eau d'injection, a été suivie durant la co-culture de *Bacillus sp* et le consortium de BSR corrosives et la culture des BSR corrosives en absence de *Bacillus sp*. La figure 3.19 illustre les allures graphiques de la variation, en fonction du temps, de la concentration en sulfates dans l'eau d'injection.

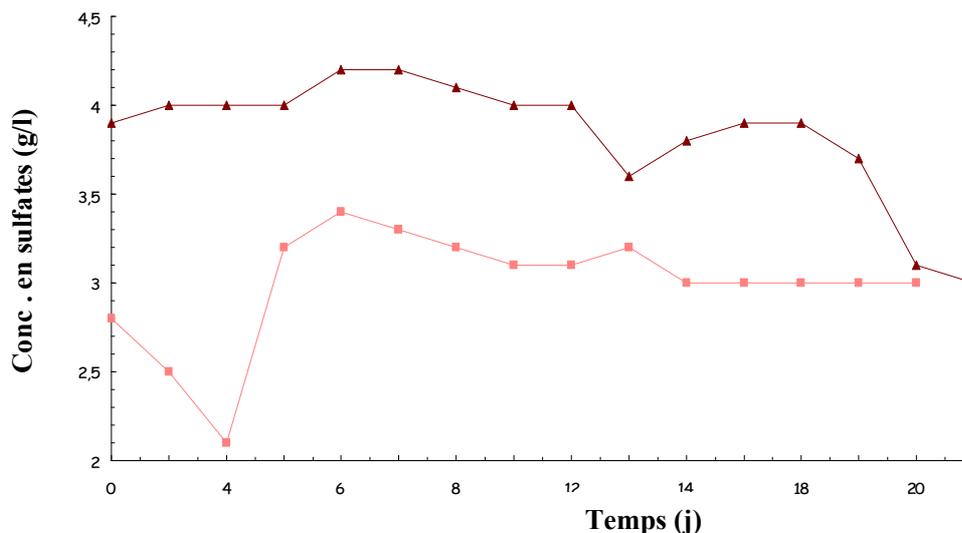


Fig. 3.19: Cinétique de consommation du sulfate par le consortium de BSR après l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus sp*) (▲). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de consommation par le même consortium, sans l'addition de l'inhibiteur biologique (■). Dans tous les cas, le milieu utilisé est l'eau d'injection du puits ZR#643.

Etant donné l'évolution de la concentration des sulfates dans le milieu naturel inoculé par une culture de souches de BSR mixtes sans antagonistes, nous remarquons que la concentration en sulfates passe de 2,8 g/l à 1,2 g/l; après 2 jours de fonctionnement de la boucle. La diminution de la concentration du substrat explique que les BSR sont en phase de croissance. Ensuite, nous notons une augmentation de la concentration du substrat est obtenue au 4^{ème} jour d'incubation. Ceci s'explique soit par le fait que les sulfates de baryum se fixent

sur les parois de la cuve de mesure, soit par un transport transmembranaire des ions SO_4^{2-} à travers les cellules bactérienne. Pour le reste du temps d'incubation, la concentration des sulfates reste constante.

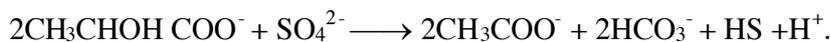
D'autre part, le dosage des SO_4^{2-} a été poursuivi, quand les bactéries antagonistes ont été ajoutées. Au moment de l'inoculation des *Bacillus* sp, la concentration en sulfate correspondante est de 3,9 g/l. En effet, la présence de *Bacillus* sp, dans le milieu, a provoquée une diminution régulière de la concentration du substrat en fonction du temps. Dès le deuxième jour, la concentration en sulfates passe de 4,4 g/l à 3 g/l au bout de 18 jours de co-culture.

D'après les études sur le métabolisme des *Bacillus* sp [261], il est montré que les bactéries antagonistes de la souche B21 utilisent les SO_4^{2-} dans les conditions d'anaérobiose exercent probablement un effet compétitif pour l'utilisation des sulfates comme substrat nutritionnel avec les BSR.

3.3.5.3. Evaluation de la concentration en sulfures dans l'eau d'injection

En général, la réaction biochimique substrat + enzyme entraîne la synthèse d'un produit métabolique [180]. Dans notre étude, la transformation des sulfates (SO_4^{2-}) par l'adénosine phosphosulfate réductase en sulfure extracellulaire est la réaction biochimique correspondante ($\text{SO}_4^{2-} + 4 \text{H}_2$ en présence des BSR donnent $\text{S}^{2-} + 4 \text{H}_2\text{O}$).

Le suivi de la libération, dans le milieu, des sulfures en tant que produit de synthèse des BSR a été étudié. Durant la période d'incubation, nous avons dosé les sulfures du milieu inoculé par les BSR seules et celles cultivées en présence de *Bacillus* sp. La figure 3.20 illustre les résultats des dosages des sulfures en fonction du temps. Effectivement, Mc Carty et al, [114], ont montré que les sulfures sont synthétisés par les BSR, après dégradation des lactates avec libération d'énergie cellulaire :



Nous constatons que dans le milieu naturel exempt de bactérie antagoniste et inoculé par les souches mixtes de BSR, la synthèse des sulfures croit de la valeur 0,129 mg/l à la valeur maximale de 8 mg/l. Dans ces conditions, le milieu devient défavorable et les BSR se trouvent en phase de déclin. Au 17^{ème} jour, on obtient 0,25 mg/l. En présence d'antagonistes bactériens, le graphe montre une augmentation de la libération des sulfures. Ainsi, la concentration en sulfures atteint une valeur de 89mg/l au bout du 13^{ème} jour et une valeur de 136mg/l au 20^{ème} jour d'incubation.

Il faut noter ici qu'une augmentation de la concentration en sulfures est obtenue à chaque fois qu'on inocule les antagonistes bactériens. En absence d'inhibiteur biologique, l'acidification du milieu due à l'excrétion de produits tels l'acide acétique par les BSR augmente la concentration en sulfures corrosifs (S^{2-} , H_2S , HS^-). Les sulfures attaquent le fer métallique qui s'oxyde en Fe^{2+} . Ainsi, la production d'acides par les biofilms garantit la

disponibilité de Fe^{2+} pour les BSR et par conséquent assure la persistance de la corrosion [8, 71, 87, 256, 262]. Le traitement de l'eau d'injection prélevée du puits ZR#643 par *Bacillus sp* a entraîné une diminution de la concentration en sulfures corrosifs (S^{2-} , H_2S , HS^-).

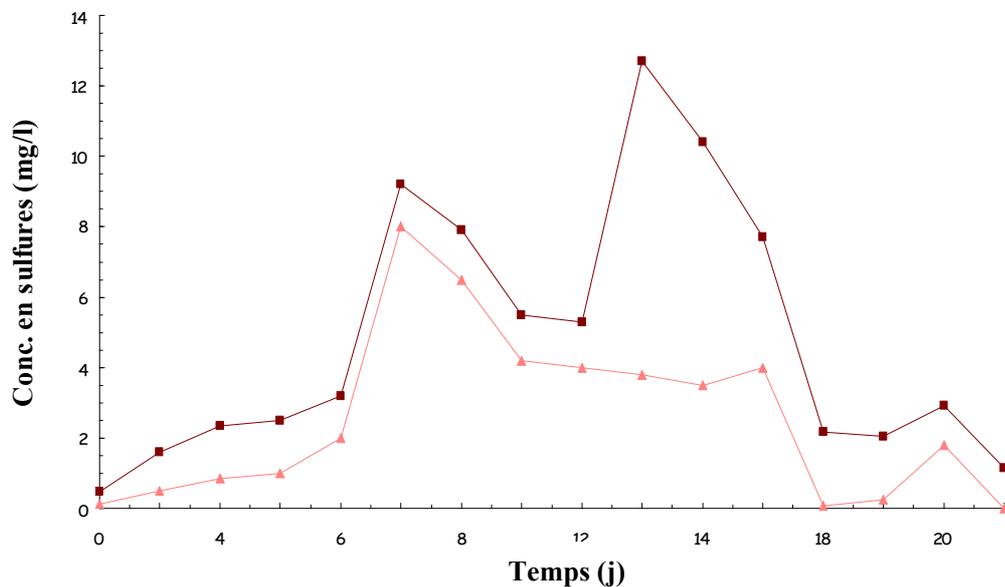


Fig 3.20 : Cinétique de production du sulfure par le consortium de BSR après l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus sp*) (▲). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de consommation par le même consortium, sans l'addition de l'inhibiteur biologique (■). Dans tous les cas, le milieu utilisé est l'eau d'injection du puits ZR#643.

3.3.5.4. Evolution du pH d'une eau d'injection utilisée pour le maintien de pression d'un champ pétrolier

La mesure du pH est un paramètre physico-chimique important, pour le suivi de la croissance des BSR en milieu de culture naturel, traité et non traité par les *Bacillus sp*. Les données expérimentales de la mesure du pH du milieu contaminé par une culture de BSR sans les bactéries antagonistes sont représentées sur la figure 3.21. Durant la période d'incubation, le pH du milieu de culture se situe entre 7,0 et 7,8. Selon Basalo et al, [9], un pH compris entre 5,50 et 8,50 favorise l'activité métabolique des bactéries sulfato-réductrices. Au-delà de ces limites, elles deviennent inactivées.

En absence de *Bacillus sp*, le pH du milieu est presque constant. Dans ce cas, les BSR excrètent soit les ions hydroxyles soit les protons et maintiennent un pH intracellulaire adéquat aux fonctions cellulaires [17]. Aucune perturbation dans le fonctionnement du métabolisme cellulaire n'est observée. Dans ce domaine, les BSR ont tendance à tolérer et/ou à métaboliser les acides organiques et minéraux présents dans le milieu [1, 17, 168, 174, 228]. Il est, évident, que l'augmentation de la vitesse de croissance (dX/dt) des bactéries est en relation avec la variation du pH du milieu.

D'autre part, le pH mesuré pour le milieu contenant des souches de *Bacillus sp*, a donné un intervalle compris entre 6,80 et 7,80. Nous constatons que, la valeur inférieure de cet intervalle est légèrement acide comparée à la valeur inférieure de l'intervalle de pH mesuré

pour un milieu contaminé uniquement par les BSR. L'augmentation du pH de l'eau d'injection du puits ZR#643 contaminée par les BSR, s'explique par un catabolisme faible des acides organiques. A l'opposée, ce catabolisme est plus remarquable en présence de *Bacillus* sp. Probablement, *Bacillus* sp est capable d'utiliser les acides organiques synthétisés par les BSR comme substrat nutritif pour sa croissance. Ce comportement s'observe dans le cas où les BSR excrètent ces acides à l'extérieur de la cellule. Ainsi, la croissance des BSR est influencée par la présence de *Bacillus* sp avec perturbation de la pompe cellulaire à protons.

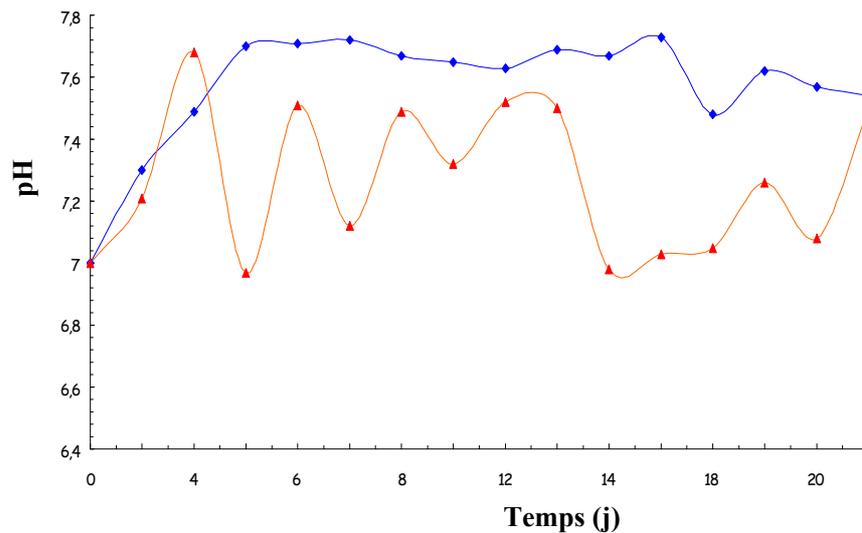


Fig.3.21: Evolution du pH du milieu naturel (eau d'injection du puits ZR#643) contaminé par les BSR. Nous avons utilisé un milieu témoin non traité (◆) et un autre traité (▲) par l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp).

Certains auteurs ont relevé la présence des BSR dans un milieu où le pH est compris entre 6,50 et 8,50, riche en sulfates, en produits carbonatés et en acides organiques [17, 168, 263]. D'autres auteurs ont remarqué que certains genres bactériens de BSR, exemple *Desulfovibrio gabonensis*, isolés à partir d'un pipeline corrodé ont besoin de Fe^{2+} pour leur croissance. Le remplacement dans le milieu des ions Fe^{2+} par un coupons d'acier doux permet à ces bactéries de croître à pH compris entre 6,0 et pH 7,4; mais aucune croissance n'étant observée à dans cet intervalle en absence de coupons [29, 147, 251, 238].

3.3.5.5. Etude de la variation de la concentration des BSR planctoniques (BSRp) en fonction du temps de circulation de la boucle

Durant le fonctionnement de cette boucle, nous avons fait circuler le milieu naturel (eau d'injection du puits ZR#643), le temps que la concentration en BSRp atteigne 10^4 germes/ml. Après la contamination de l'eau d'injection par ses bactéries, l'injection de *Bacillus* sp (souche B21) a été opérée. Sur le plan opérationnel d'un champ pétrolier, un circuit d'eau d'injection qui présente une concentration en BSRp comprise entre 10^3 et 10^6 germes de BSR/ml, le risque de corrosion bactérienne de ce circuit est majeur. A partir de 10^4 germes de BSR par millilitre, la corrosion de l'acier augmente avec le temps de contamination du milieu

[264]. Il est à noter que, lors des tests d'évaluation de l'efficacité des biocides dans un circuit de maintien de pression d'un gisement pétrolier, la concentration en BSRp retenue pour le démarrage de cette évaluation est comprise entre 10^3 et 10^4 germes de BSRp/ml.

Le suivi de la croissance des BSR non adsorbées (BSRp) à la surface de notre métal a débutée avec un inoculum de 10^4 germes de BSR/ml. La figure 3.22 présente l'évolution de la concentration en BSR planctoniques (BSRp) cultivées en présence et en absence de *Bacillus sp.*

En absence de *Bacillus sp.*, nous remarquons qu'au bout de 48 heures de circulation, la concentration initiale en BSRp planctoniques mise en évidence, à la sortie du monitoring, à de 10^3 germes/ml. Cette concentration reste constante durant le reste du temps d'incubation (21^{ème} jour).

Pour la suite, une étape de stabilité de la croissance des BSRp planctoniques a été observée. Cette stabilité dans la concentration en BSRp est maintenue par un appoint en eau d'injection. Ainsi, la concentration en BSRp a été ramenée à 10^4 germes/ml, au bout de deux mois de circulation. La concentration reste égale à 10^4 germes/ml. A cette concentration, l'injection de *Bacillus sp* a été opérée. Sur le graphe, il est montré que le traitement du milieu par les bactéries antagonistes inhibe la croissance des BSR planctoniques, pendant environ 8 jours de contact avec les BSRp. Durant ce temps, nous avons observé une diminution de la croissance des BSRp (10^4 germes/ml). Dans ce cas, le *Bacillus sp* exerce un effet bactériostatique sur les BSR planctoniques. Les bactéries antagonistes ont tendance à inhiber l'activité cellulaire en agissant probablement sur la paroi ou la membrane cytoplasmique [180].

3.3.5.6. Etude de la variation de la concentration des BSR sessiles (BSRs) en fonction du temps de circulation de la boucle de corrosion

Lors du fonctionnement de la boucle, certains des coupons d'acier ayant servi pour l'adhésion des BSR (BSRs), ont été récupérés à la fin de l'étude de la croissance des BSR en absence et en présence des souches antagonistes de *Bacillus sp.* D'autres coupons ont été récupérés pour dénombrer les BSRs, sur le milieu de culture Postgate B sulfate. Actuellement, il est connu qu'il existe une relation directe entre l'acier utilisé pour véhiculer l'eau d'injection d'un champ pétrolier la qualité bactériologique de cette eau [265].

Sur la figure 3.22, nous avons porté la variation de la concentration des BSR sessiles en fonction du temps de circulation de l'eau d'injection. Là, nous remarquons que, la croissance des BSR sessiles cultivées en absence d'antagonistes bactériens début dès le 1^{er} jour. Durant ce temps, la concentration en BSRs passe de 10^2 à 10^4 germes/ml. Au bout de quinze jours de circulation, elle atteint 10^6 germes/cm². A ce stade, il peut y avoir une formation d'un biofilm mature et homogène sur les coupons d'acier. Ce biofilm reste formé, durant la phase de déclin des BSR [11, 14, 36, 37, 186]. Dans certaines études expérimentales, il a été rapporté que les densités totales de bactéries corrosives en suspension dans une eau salée non traitée varient entre $7,1 \cdot 10^4$ et $8,5 \cdot 10^5$ germes/ml [37, 266] et un biofilm formé sur les surfaces de pipes peut renferme une densité bactérienne corrosive de 10^9 germes/ml [137]. Au moment de l'injection de la culture à 2% des souches de *Bacillus sp.*, la concentration en BSRs reste la même (10^6

germes/ml), pendant 4 jours à 10^6 germes /ml. Ensuite, elle chute à 10^3 germes de BSRs /ml à partir du 5^{ème} jour. En se référant à la courbe de croissance de l'antagoniste, nous constatons que ça correspond à sa croissance maximale $9,8 \cdot 10^7$ colonies/ml.

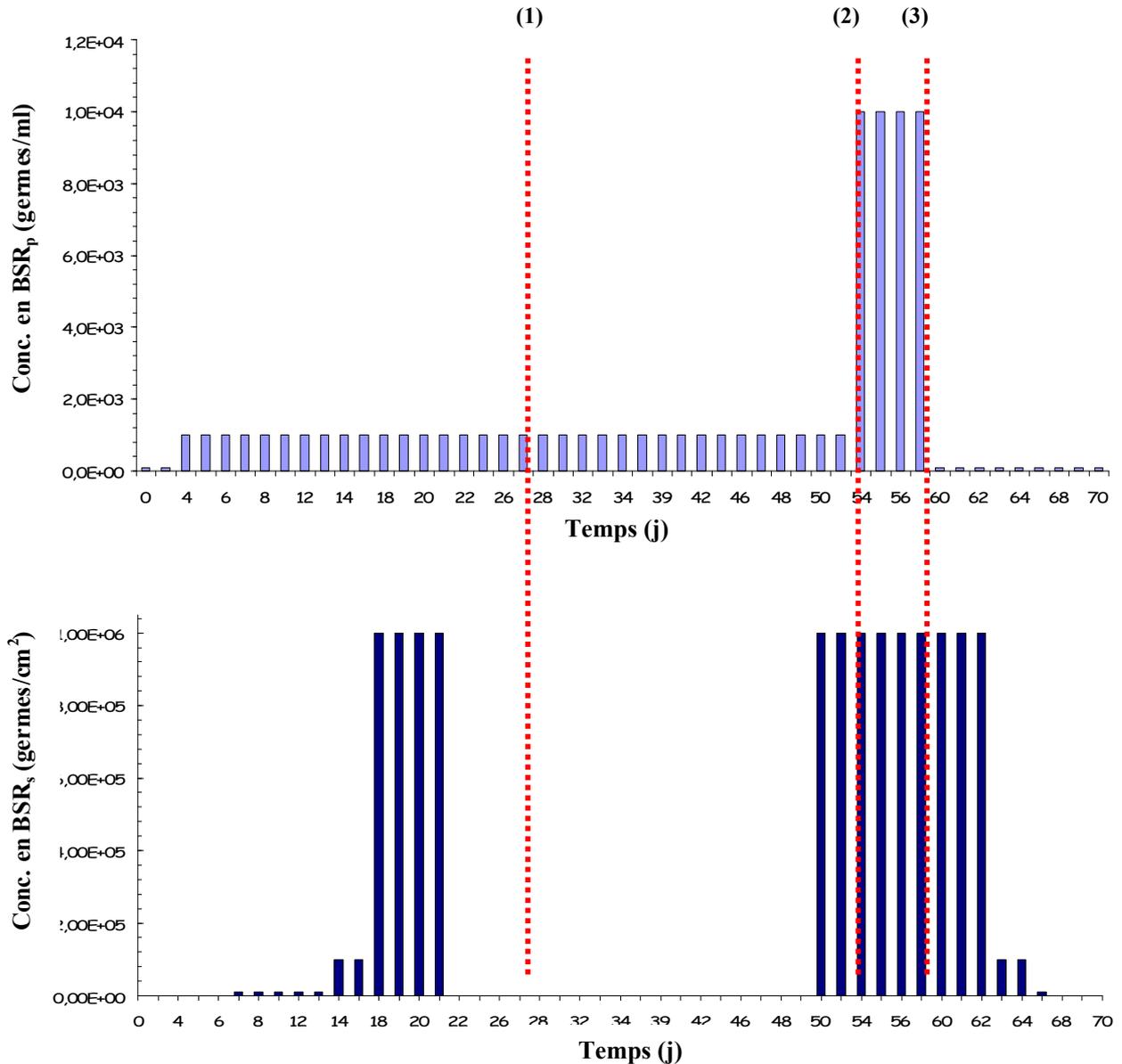


Fig 3.22 : Variation de la concentration en BSR planctoniques et sessiles cultivées en absence et en présence de l'inhibiteur biologique (*Bacillus sp*) dans un milieu naturel (eau d'injection du puits ZR#643), (1) : Après l'appoint en eau d'injection, (2) : Après contamination avec des bactéries de la corrosion (BSR) et (3) : Injection de l'inhibiteur biologique (*Bacillus sp*).

Après l'appoint en eau d'injection, le moment d'injection de *Bacillus sp* correspond à la phase exponentielle des BSR. De ces résultats, nous pouvons déduire que les *Bacillus sp* ont un effet bactéricide sur les BSR sessiles. Selon Costerton et al, [146] et Meyer et al, [243], une faible concentration en bactéries antagonistes peut exercer un effet bactériostatique et à

forte concentration l'effet est bactéricide. D'autre part, les études de Bail [247] et Waksman [178] ont montré que l'action d'un antagoniste est fonction de sa concentration.

Aussi, les biosurfactants, qui font partie des biofilms et produits par le genre *Bacillus*, sont des lipoprotéines ou des lipopeptides, comme la surfactine et la subtilisine [211]. Au cours de la fermentation, *Bacillus subtilis* secrète les biosurfactants dans les deux milieux solides et liquides [267]. Plusieurs expériences ont été réalisées dans le sens de l'optimisation des paramètres de croissance et de production de ces biosurfactants [268, 269, 270].

En outre, dans certaines conditions défavorables de nutrition, il a été montré que les souches de *Bacillus* rencontrées dans un biofilm survivent à ces conditions [42, 172, 211]. Les substances anti-bactériennes synthétisées par *Bacillus* sont plus inhibitrices et concurrentielles que des souches bactériennes non-productives de ces substances; dans notre cas, les BSR corrosives.

3. 4. Caractérisation des biofilms en microscopie électronique à balayage

Lorsqu'une surface initialement est vieillie en eau d'injection naturelle (eau d'injection du puits ZR#643), une couche des oxydes de fer se forme (fig. 3.23). Ce qui a pour conséquence de modifier les processus de la corrosion bactérienne. Le vieillissement de l'acier API 5LX 52 dans l'eau d'injection du puits ZR#643 circulante se traduit bien sûr par un développement bactérien sous la forme d'un biofilm à la surface du matériau, visiblement impliqué dans les modifications du comportement électrochimique de notre acier et de son état de surface. Il est donc important de caractériser ce biofilm.

Ainsi, avant le lancement de la boucle de corrosion, une observation au MEB d'un coupon d'acier non soumis à l'action des BSRp et BSRs, a été réalisée. Cette caractérisation est prise comme un témoin pour la suite des caractérisations des coupons au MEB (Photo. 3.7). Les coupons d'acier récupérés durant les différentes phases du fonctionnement de la boucle et observés au MEB ont montré une colonisation bactérienne des coupons d'aciers, immergés dans une eau d'injection naturelle (eau d'injection du puits ZR#643), traitée ou non traitée par les souches bactériennes inhibitrices de *Bacillus* sp (souche B21). La plupart des bactéries peuvent s'adsorber efficacement aux surfaces métalliques, quand elles sont viables et dans un état métaboliquement très actif [177]. Certaines espèces de *Bacillus* ont été trouvées dans les biofilms formés à la surface d'un métal [269].

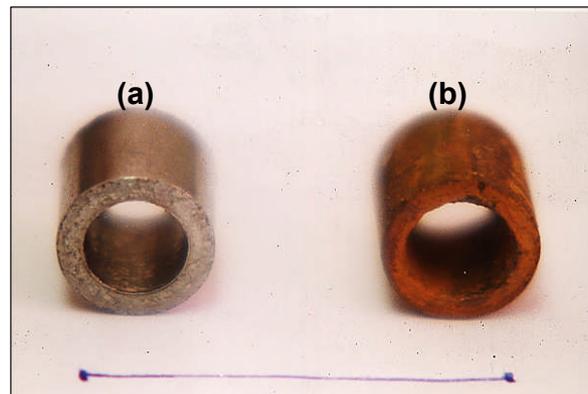


Fig.3.23: Observation des coupons en acier utilisés dans l'installation du monitoring, (a) : coupon avant son immersion et non soumis à l'action des BSR, (b) : coupon immergé dans l'eau et soumis à l'action des BSR en absence de *Bacillus* sp (B21).

Selon plusieurs auteurs [272- 275], les bactéries ont tendance à s'attacher à des surfaces métalliques et s'associer en communautés pour former un biofilm. Ce biofilm peut être homogène ou hétérogène [276, 278], selon qu'il s'agisse d'une culture de BSRp et/ou d'une culture de BSRp et des bactéries inhibitrices. Les observations au MEB de l'acier étudié et avant son immersion laissent apparaître une absence de colonisation bactérienne (fig.3.23). Par contre, son immersion dans l'eau d'injection non traitée par l'inhibiteur biologique montre sa colonisation par la microflore corrosive composée de types morphologiques variés de bactéries (photo 3.7). Des exopolysaccharides, polymères sécrétés par les bactéries sont également visibles sur la photographie de la photo 3.8.

Aussi, Guezennec [40] a montré que les supports métalliques dépourvus de biofilm, avant l'immersion dans une eau d'injection sont sensibles à la colonisation microbienne. Certains éléments métalliques de l'acier tels que le cuivre et le nickel constituent des nutriments pour ces bactéries [278], ce qui amplifie la colonisation des surfaces métalliques. La formation du biofilm, entraîne une corrosion localisée si le milieu n'est pas traité [279-281].

A partir de la boucle de corrosion, l'analyse au microscope électronique à balayage d'un coupon d'acier soumis à l'action des BSR cultivées en absence et en présence de *Bacillus* sp, a montré que, en plus des éléments non vivants fixés à la surface métallique (ions, éléments organiques et inorganiques, des exopolymères,...), des formes bactériennes polymorphes ont été révélées. Ces caractérisations microscopiques, nous a permis de mettre en évidence un biofilm homogène de bactéries corrosives et un biofilm hétérogène avec dominance de la forme bacillaire [253].

Sur la photographie 3.8, nous observons des formes de cocci et de bâtonnets entourés de bactéries à morphologie plus ou moins allongée. D'autre part, l'étude de la

caractérisation au MEB d'un autre coupon d'acier au carbone API 5LX52 exposé à l'action d'une culture de *Bacillus* sp a montré des formes bacillaires. Après 2 mois et demi d'immersion, il est indiqué la formation d'un biofilm hétérogène avec une dominance probable de la forme bacillaire caractéristique de la souche B21. Une photographie de cette surface est présentée sur la photographie 3.8.

Chantereau [65] et Compère [37] ont parlé des inter-relations des BSR avec d'autres groupes bactériens aérobies ou aérobies-anaérobies facultatifs. Les résultats de certaines observations au MEB d'un dépôt, prélevé d'une surface métallique d'un « pipe », ont indiqué la présence d'une population microbienne hétérogène composée de formes bacillaires et cocci [282].

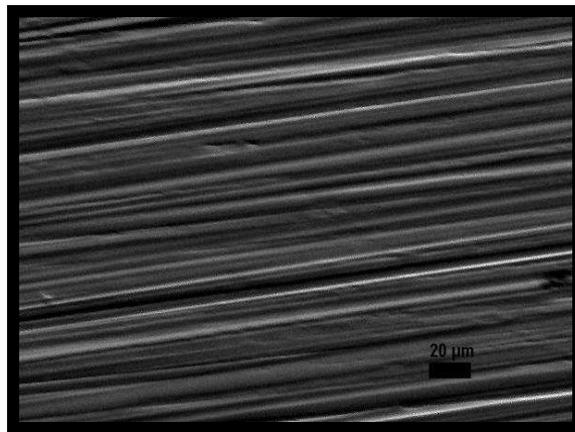


Photo .3.7: Etat de la surface des coupons en acier sans le biofilm (Gr x 2500).

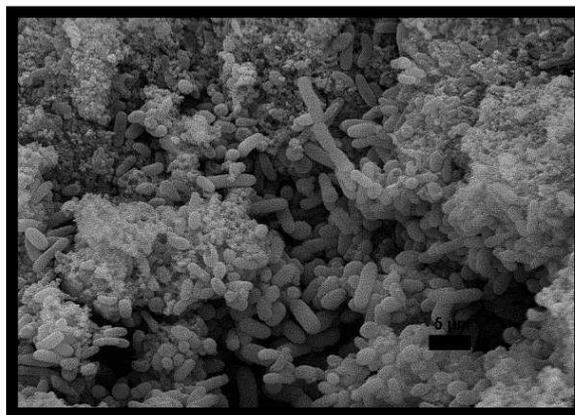


Photo.3.8: Etat de la surface des coupons d'acier avec le biofilm hétérogène (Gr x 2500), avant l'injection de *Bacillus* sp (B21).

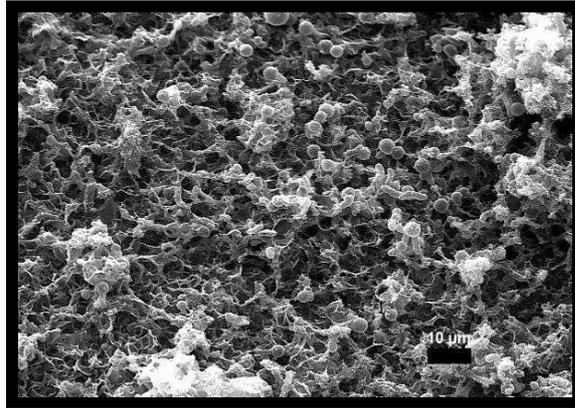


Photo.3.9 : Des exopolysaccharides, polymères sécrétés par les populations bactériennes présentes sur la surface de l'acier (Gr x 2000).

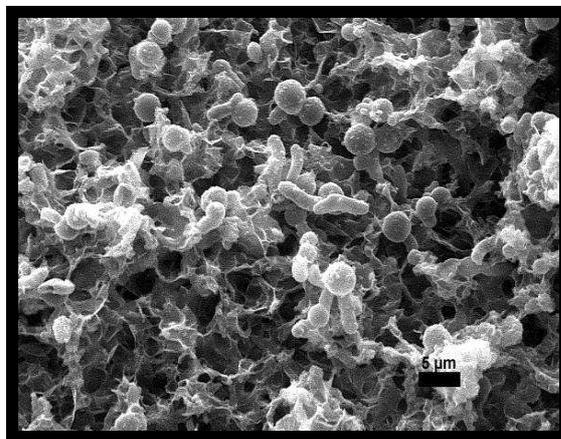


Photo 3.10 : Vue d'ensemble montrant la prédominance par des bacilles (Gr x 4000).

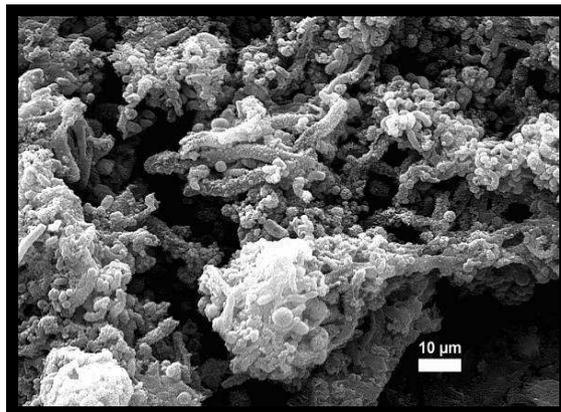


Photo.3.11 : Vue d'ensemble montrant une dominance de la présence de bacilles (très fréquente) (Gr x 4000)

CONCLUSION

Le comportement et l'évolution d'un acier immergé en milieu aqueux sont fonction non seulement des interactions chimiques de l'eau d'injection, mais également des facteurs biologiques liés à la présence de bactéries inductrices de la corrosion. Les nombreuses interrogations et controverses résultant des efforts déployés pour comprendre les interactions métal-bactéries, nous ont conduit à développer un traitement biologique pour la protection d'un acier utilisé dans les canalisations pétrolières et immergées dans des eaux d'injection.

La littérature a montré que la biocorrosion anaérobie est un phénomène complexe. Les bactéries sulfurogènes, intervenant dans ce phénomène, ont la possibilité de synthétiser du H₂S. Il en résulte de leur métabolisme. Même si les propriétés corrosives du H₂S sur un acier au carbone, notamment en milieu acide, sont bien connues, le problème de biocorrosion ne se résume pas à un simple problème de corrosion abiotique par ce composé. Une condition nécessaire et suffisante pour la production du H₂S porte sur la fonctionnalité de la cellule microbienne dans un milieu aqueux. Cet environnement est celui du biofilm au contact de la phase métallique. Ce n'est certainement pas la seule condition prédite. Un autre point très important relatif à la biocorrosion concerne l'interaction entre les différentes espèces bactérienne constituant les biofilms et notamment entre les espèces qui produisent des substances inhibitrices.

La démarche initiale était de présenter un travail axé essentiellement sur le potentiel antagoniste d'une souche non pathogène de *Bacillus* sp codée B21 contre un consortium corrosif constitué de BSR. Les travaux expérimentaux ont été portés sur la mise en place d'un processus biologique que peut offrir les micro-organismes à synthétiser les substances des produits qui devaient être utilisés comme antagonistes bactériens. Le choix a été conditionné par les caractéristiques du système de maintien de pression à traiter, par la nature du milieu récepteur de la substance biologique et de l'importance de l'installation.

Il a été question de mettre en œuvre et d'appliquer un nouveau moyen biotechnologique pour lutter contre la corrosion bactérienne. Ce procédé étant le premier rapport sur cette activité antagoniste dans le domaine pétrolier, bien que le rôle des antibiotiques est très bien connu. Dans le système proposé, les agents utilisés sont des micro-organismes (bactéries). Ces bactéries, isolées localement, sont probablement capables de produire des substances (toxines) ayant les mêmes effets que les biocides fabriqués par voie chimique et actuellement utilisés dans les champs pétroliers. Ce procédé de traitement est basé exclusivement sur un traitement biologique de la corrosion. En règle générale, les antagonistes microbiens sont largement utilisés dans certaines industries agroalimentaires et pharmaceutiques.

Dans notre cas d'étude, *Bacillus* a été choisi comme modèle biologique antagoniste contre l'organisme cible corrosif. Ce dernier, représenté par les bactéries de la corrosion, est l'un des contaminants les plus dominants des eaux d'injection véhiculées par des canalisations en acier. Ces eaux sont considérées comme des milieux nutritifs. Les effets de l'antagonisme ont été testés dans des conditions proches de l'exploitation pétrolière dans quatre échantillons

Références bibliographiques

d'eaux d'injection provenant de trois horizons géologiques différents (Lias, Albien et Zarzaitine) et échantillonnées à partir de cinq champs pétroliers différents du sud Algérien. Les effets inhibiteurs du genre *Bacillus*, ont été comparés avec ceux d'un biocide chimique biodégradable et formulé à base d'un THPS, généralement, utilisé dans l'industrie pétrolière. Les régions pétrolifères du sud algérien ont été sélectionnées vu que leurs installations sont affectées par la corrosion induite par les bactéries sulfurogènes.

Les résultats des échantillonnages effectués in situ ont révélé une contamination de toutes les eaux d'injection. Dans un premier volet de l'étude, nous avons testé l'effet antagoniste de deux souches de référence appartenant au genre *Bacillus* et fournies par l'Institut Pasteur d'Alger, sur les bactéries de la corrosion (BSR et BTR). Les résultats de la cinétique bactérienne de ces bactéries ont montré que les espèces du genre *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* ont exercé un effet inhibiteur sur ces bactéries.

Les résultats obtenus dans la partie inhibition de la croissance des bactéries de la corrosion, nous ont encouragé à isoler une souche antagoniste autochtone, à partir d'une eau de gisement. Cette souche a été isolée à partir du champ d'In Amenas, le plus affecté par la corrosion bactérienne comparé aux autres champs pétroliers. L'espèce isolée est une espèce dominante aérobie facultative, halophile, exigeant une concentration en NaCl supérieur à 5% (p/v). L'analyse phylogénétique basée sur le séquençage partiel de l'ARNr 16S a montré que la souche B21 est un membre du genre *Bacillus*, est étroitement liée au *Bacillus qingdaonensis* DQ115802 (94,0% de similarité de séquence), *Bacillus aidingensis* DQ504377 (94,0%) et *Bacillus Salarius* AY667494 (92,2%). Le nom de *Bacillus sp* (EMBL, FR671419) est donné à cette nouvelle souche. Les effets inhibiteurs de la souche B21 ont été comparés avec ceux d'un biocide chimique à base de THPS. L'inhibiteur biologique s'est montré plus efficace. La croissance du consortium corrosif de BSR en coculture avec des souches B21 a été mise en évidence. En effet, il a été obtenu une diminution de la croissance des BSR, accompagnée d'une réduction dans la production des sulfures.

Les travaux réalisés avec la souche de *Bacillus sp* ont porté sur l'étude de l'influence de cet inhibiteur biologique sur la corrosion anaérobie des aciers au carbone dans divers milieux à base d'eaux d'injection. Après la réalisation de l'inhibition biologique à l'échelle Erlenmeyer, il était nécessaire de faire une extrapolation vers une échelle pilote. Nous avons élaboré un plan de travail, qui consistait à évaluer en présence des substances produites par *Bacillus sp*, la concentration en bactéries corrosives présentes dans l'eau d'injection provenant du puits producteur d'eau ZR#643 du champ Zarzaitine de la région d'In-aménas.

Dans la boucle de monitoring de la biocorrosion, les résultats de la cinétique de croissance bactérienne ont démontré, encore une fois, une action inhibitrice sur les bactéries sessiles et planctoniques corrosives. Ils ont indiqué un potentiel d'application de la souche B21 comme agent de lutte biologique contre la corrosion au sein de l'industrie pétrolière. Les essais de comptage bactérien et des observations au MEB réalisées sur des coupons d'acier et prélevés à différents stades de monitoring de la corrosion ont révélé :

Références bibliographiques

- des structures différentes du biofilm développé en absence et en présence *Bacillus sp*,
- une diminution de la concentration en bactéries de la corrosion cultivées en présence de l'inhibiteur biologique. Cette diminution est comparable à celle obtenue par le biocide à base de THPS à 75%.

L'antagoniste bactérien utilisé présente l'avantage d'être plus économique, biodégradable, facilement cultivable localement et ne présente pas d'odeur désagréable comme c'est le cas des biocides chimiques. La concrétisation de ce projet à l'échelle industrielle donne lieu à des impacts économiques, scientifiques et environnementaux liés à la technique du traitement biologique proposé.

La mise en œuvre de ce traitement et au regard des résultats de l'efficacité projetés, l'impact sur l'environnement est appréciable sur certains aspects :

- La biodégradabilité qui est certaine parce que les cellules vivantes ont un temps de vie limité et meurent par la suite. Par cette action, la sauvegarde de l'environnement est assurée et/ou maintenue.
- Avec le maintien d'une bonne efficacité de protection, les fuites de produits pétroliers vers la nature seront réduites, et on peut contrôler la pollution des sols et de l'air.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Bahaj A.S., Campbell S.A., Walsh F.C., Stott J.F.D. (1992)** The importance of environmental factors in microbially influenced Corrosion Part 2, Magnetic field effects in microbial corrosion. Proceedings of the Second EFC Workshop, Portugal 1991.
2. **Borenstein S.W., Lindsay P.B. (1987)** MIC failure analyses. *Corrosion*, 13, 9th edition, ASM, Metals Park, USA.
3. **Brennenstuhl, A.M.; Doherty, P.E. (1990)** The economic impact of microbiologically influenced corrosion on Ontario Hydro's nuclear plants. Danko (eds.), University of Tennessee, Knoxville.
4. **Flemming H.C. (1996)** Microbially influenced corrosion of materials, Economical and technical overview. Heitz E, Flemming HC, Sand W (eds), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
5. **Koch JH , Brongers MPH, Thompson NG, Virmani YP, Payer JH (2002)** Corrosion Cost and Preventive Strategies in the United States, Federal Highway Administration, Washington, D.C. (Report no. FHWA-RD-01-156).
6. **Gana M.L., Kebbouche-Gana S., Touzi A., Zorgani M.A., Pauss A, Lounici H. and Mameri N. (2010)** Antagonistic activity of *Bacillus sp.* obtained from an Algerian oil field and chemical biocide THPS against Sulfate-Reducing Bacteria consortium inducing corrosion in the oil industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* , **38**: 391–404.
7. **Hubert C, Nemati M, Jenneman G, and Voordouw G. (2005)** Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**:272–282.
8. **Flemming HC (1996)**. Microbially influenced corrosion of materials, Biofouling and microbiologically influenced corrosion (MIC) an economical and technical overview, in: E. Heitz, W. Sand, H.-C. Flemming (Eds.), Springer, Heidelberg.
9. **Basalo C. et Batsch G., (1987)** “Les canalisations d'eau et de gaz (Corrosion, Dégradation et protection)”, Technique et documentation, Lavoisier.
10. **Beech I. B. (1999)** La corrosion bactérienne, *Biofutur*, (36-41)
11. **Beech I.B., Sunner J. (2004)** Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 81-186.
12. **Beranger G., Mazille H. (2002)** Corrosion et anticorrosion : pratique industrielle. Editions Hermès France.
13. **Féron D., Gubner R., Thierry D. (2002)** Biocorrosion : Méthodes et essais électrochimiques Biocorrosion, Matériaux et techniques. **90**, 13-22.
14. **Angell P., Urbanic K. (2000)** Sulphate-reducing bacterial activity as a parameter to predict localized corrosion of stainless alloys. *Corros. Sci.* **42**, 897-912.
15. **Archer E.D., Brook R., Edyvean R.G.J., Videla H.A. (2001)** Selection of Steels for use in SRB Environments, corrosion/2001, paper no.01261 (Houston, TX, NACE International, 2001).
16. **Rainha V.L., Fonseca I.T.E. (1997)** Kinetics studies on the SRB influenced corrosion of steel: A first approach. *Corrosion Science* **39**(4):807–813
17. **Boopathy R., Daniels L. (1991)** Effect of pH on anaerobic mild steel corrosion by methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2104-2108.
18. **Daniels L., Belay N., Rajagopal B.S., Weimer P.J. (1987)**. Bacterial Methanogenesis and Growth from CO₂ with Elemental Iron as the Sole Source of Electrons. *Science* **237**, 509- 511.

Références bibliographiques

19. **Sowers, K. R., and Gunsalus R. P (1988)** Adaptation for growth at various saline concentrations by the archaeobacterium *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* **170** :998–1002.
20. **Antonio M.R., Karet G.B., Guzowski Jr J.P. (2000)** Iron chemistry in petroleum production, *Fuel* **79** 37–45.
21. **Chamritski I.G., Burns G.R., Webster B.J., Laycock N.J. (2004)** Effect of iron-oxidizing bacteria on pitting old stainless steels. *Corrosion* **60** (7) 658-669.
22. **Feugas F., Magnin J.P., Cornet A., Rameau J.J. (1997)** Corrosion influencée par les microorganismes: influence du biofilm sur la corrosion des aciers, techniques et résultats récents. *Journal de Physique III*, **7**, (3), 631-663
23. **Dupont-Morral. (2004)** Les bactéries sulfato-réductrices et la corrosion bactérienne. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **19**, 108-115
24. **Scriban R. (1993).** Cinétique micrbienne, biotechnologie 4ème édition, techniques et documentation, Lavoisier.
25. **Rosenberg E., Ron E.Z. (1999)** Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new Markets. *Trends Biotechnol.* **11**: 419–424.
26. **Fontana M.G. (1986)** Corrosion Engineering, 3rd edn. McGraw-Hill, New York
27. **Franklin M.J., White D.C., Isaacs H. (1991)** Pitting Corrosion by Bacteria on Carbon Steel, Determined by the Scanning Vibrating Electrode Technique, *Corrosion Science*, **32**, (9). 945–952.
28. **Liu H., Xu L, Zeng J. (2000)** Role of corrosion products in biofilms in microbiologically induced corrosion of carbon steel. *Brit Corrosion J.* **35**(2):131–135
29. **Mansfeld. F. (2007)** The interaction of bacteria and metal surfaces. *Electrochim. Acta.* **52**,7670-7680.
30. **Marchal R. (1999)** Rôle des bactéries sulfurogènes dans la corrosion du fer. *Oil & Gas Science and Technology Rev. IFP*, **54** (5), 649-659
31. **Mueller, R.F., (1996)** “Microbial dynamics in souring oil reservoirs,” PhD thesis, Montana State University in Bozeman.
32. **Crolet J.L., Magot M. (1996)** Non-SRB sulfidogenic bacteria in oilfield production facilities, Mater. Select. Design.
33. **Booth GH, Mercer SG. (1964)** The effect of mimosa tannin on the corrosion of mild steel in the presence of sulphate reducing bacteria. *Corr. Sci.* **4**, 425-433.
34. **Walsh T.G. (1992)** Continuous On-Line Weld Corrosion Monitoring for the Oil and Gas Industry. International Conference on Pipeline Reliability, CANMET, Ottawa.
35. **Angell P., White D.C. (1995)** Is metabolic activity by biofilms with sulfate-reducing bacterial consortia essential for long-term propagation of pitting corrosion of stainless steel. *J Ind Microbiol* **15**: 329–332.
36. **Characklis W.G., Marshall K.C. (1990)** Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York.
37. **Compère C. (1999)**, biofilms en milieu marin, Techniques Sciences Méthodes, **11**: 48-54.
38. **Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999)** Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318– 1322.
39. **Geesey G.G. (1993)** Biofilm Formation, A Practical Manual on Microbiologically influenced Corrosion Kobrin G (ed), NACE, Houston, Texas, USA 68 4 Microbiologically Influenced Corrosion (MIC)
40. **Guezennec J. (1993)** "Le biofilm et ses conséquences sur le comportement des matériaux en milieu naturel", *Océanis*, **19**, (3), 1-9.

41. **Jayaraman A., Earthman J.C., Wood T.K. (1997)** Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:267–275.
42. **Kearns D.B., Chu F., Branda R.K., Losick R. (2004)** A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **55**:739–749
43. **Lee W., Characklis W.G. (1993)** Corrosion of mild steel under anaerobic biofilm. *Corrosion* **49**(3):186–198
44. **Lewandowski, Z. (2000)** Structure and function of biofilms. Biofilms: Recent advances in their Study and control, L. V. Evans (ed), Harwood Academic Publishers.
45. **Al-Hashem A.H., Carew J., Al-Borno A. (2004)** Screening tests for six dual biocide regimes against planktonic and sessile populations of bacteria., corrosion/2004, paper no.04748 (Houston, TX, NACE International, 2004).
46. **Arcy N. (2002)**, An Overview of the Biocides Market. In: D.R. Karsa and D. Ashworth (Ed), Industrial biocide: selection and application.edited by Royal Society of Chemistry.
47. **Campanac C., Pineau L., Payard A., Baziard-Mouysset G., Roques C. (2002)** Interactions between Biocide Cationic Agents and Bacterial Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.***46**: 1469-1474.
48. **Frey R. (1998)** Award-winning biocides are lean, mean and green. *Today's Chem. Work* **7**: 34-38.
49. **Gardner L.R., Stewart P.S. (2002)** Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **29**:354–360.
50. **Pfennig N. Widdel F, Trüper HG (1981)** The dissimilatory sulfate reducing bacteria. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows Schlegel HG (eds) The prokaryotes, vol 1. Springer, Berlin Heidelberg New York.
51. **Rodin V.B., Jigletsova S.K., Kobelev V.S., Akimova N.A., Aleksandrova N.V., Rasulova G.E., Kholodenko V.P. (2000)** Development of biological methods for controlling the aerobic microorganism-induced corrosion of carbon steel. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **36**, (6): 589–593.
52. **Thorstenson T., Boedtke G., Sunde E., Beeder J.J., (2002)** Biocide replacement by nitrate in seawater injection systems, *Corrosion* **33**:1–10.
53. **Downward B.L., Talbot R.E., Haack T.K. (1997)** Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS), a new industrial biocide with low environmental toxicity, corrosion/1997, paper no.401 (Houston, TX, NACE International, 1997).
54. **Larsen J., Sanders P.F. and Talbot R.E. (2000)** “Experience with the use of Tetrakis Hydroxymethyl Phosphonium Sulfate (THPS) for the control of downhole hydrogen sulfide,” Corrosion/2000, paper no.00123 (Houston, TX, NACE International, 2000).
55. **Benyagoub M., Benhamou N., Carisse O. (1998)** Cytochemical investigation of the antagonistic interaction between a *Microsphaeropsis* sp. (isolate P130A) and *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **88**:605– 613.
56. **Berger F., Li H., White D., Frazer R., Leifert C. (1996)** Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* Cot1 in high-humidity fogging glasshouse. *Phytopathology* **86**:428–433.
57. **Lasseur Ph ; et Marchal, J. G (1934)** Associations bactériennes. Antagonisme antibiose. *Trav. lab. microbiol. faculté pharm. Nancy* **7** :75 – 89.

Références bibliographiques

58. **Walsh D., Pope D., Danford M., Huff T. (1993)** The Effect of Microstructure on Microbiologically Influenced Corrosion, *Journal of Materials (JOM)*, **45**, (9):22–30.
59. **Väisänen O.M., EL Nurmiaho-Lassila, S.A. Marmo, M.S. Salkinoja – Salonen (1994)** Structure and composition of biological slimes on paper and board machines. *Appl Environ Microbiol* **60**:641– 653.
60. **Zeller S. M, et Schmitz H. (1919)** Studies on the physiology of fungi ; mixed culture *Ann. Missouri Bot. Garden* **6**: 183- 192
61. **Dzierzewicz Z., Cwalina B., Gawlik B., Wilczok T., Gonciarz Z. (1997)** Isolation and evaluation of susceptibility to sulphasalazine of *Desulfovibrio desulfuricans* strains from the human digestive tract. *Acta Microbiol. Pol.* **46**:175–187.
62. **Dunsmore B.C., Whitfield T.B., Lawson P.A., Collins M.D. (2004)** Corrosion by sulfate reducing bacteria that utilize nitrate. Corrosion/2004, paper no.04763 (Houston, TX, NACE International, 2004)
63. **Byars H.G. (1999)** Corrosion Control in Petroleum Production, Chapter 2, TPC Publications 5, second edition, NACE international
64. **King R.A. (2007)** Trends and developments in microbiologically induced corrosion in the oil and gas industry. MIC–An International Perspective Symposium, Extrin Corrosion Consultants, Curtin University, Perth, Australia, 14–15 February 2007
65. **Chantereau J. (1980)** Corrosion bactérienne. Edition Technique et documentation.
66. **Garret, J.H. (1891)** The Action of Water on Lead. London, England. H.K. Lewis.
67. **Garie R.H. (1910)** Bacterial activity as a corrosive influence in the soil. *Ind. Erg. Chem.* **2**: 128-130.
68. **Neveux M. (1968)** la corrosion des conduites d'eau et de gaz. Causes et remèdes, Ed. EYROLLES. Paris.
69. **Grabowski A., Nercessian O., Fayolle F., Blanchet D., and Jeanthon C. (2005).** Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**:427–443.
70. **Javaherdashti R., Singh Raman R.K., Panter C., Pereloma E.V (2006)** Microbiologically assisted stress corrosion cracking of carbon steel in mixed and pure cultures of sulphate reducing bacteria. *Int. Biodeter. Biodegr.* **58**:27-35.
71. **Lee W., Lewandowski Z., Nielsen P.H. et Hamilton W.A. (1995)** Role of Sulfate-Reducing Bacteria in Corrosion of Mild Steel: a Review. *Biofouling*, **8**:165-194.
72. **Xu C., Zhang Y., Cheng G., Zhu W. (2007)** Localized corrosion behavior of 316L stainless steel in the presence of sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria. *Mater. Sci. Eng.* **443**: 235-241.
73. **Magot M., Ravot, G., Campagnolle X., Ollivier B., Patel B.K.C., Fardeau M.-L., Thomas P., J.-L. Crolet, J.-L. Garcia. (1997)** *Dethiosulfovibrio peptidovorans* gen. nov., sp. nov., a New Anaerobic, Slightly Halophilic, Thiosulfate-Reducing Bacterium from Corroding Offshore Oil Wells. *Int. J. Systematic Bacteriol.* **47**:818-824.
74. **Rao T.S., Sairam T.N., Viswanathan B., Nair K.V.K. (2000)** Carbon steel corrosion by iron oxidising and sulphate reducing bacteria in a freshwater cooling system. *Corros Sci* **42**:1417–1431
75. **Videla H.A. (2001)** Microbially induced corrosion: an updated overview. *Inter. Biodeter. Biodegr.* **48**:176-201.
76. **Bryant, R.D., Jansen, W., Boivin, J., Laishley, E.J. and Costerton, J.W. (1991)** Effect of Hydrogenase and Mixed Sulfate-Reducing Bacterial Populations on the Corrosion of Steel. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2804-2809.

Références bibliographiques

77. **Da Silva S., Basséguy R., Bergel A. (2002)** The roles of hydrogenases in the anaerobic microbiologically influenced corrosion of steels. *Bioelectrochemistry* **56**: 77-82.
78. **Da Silva S., R. Basséguy A. Bergel (2004)** A. Electron transfer between hydrogenase and 316L stainless steel: identification of a hydrogenase-catalyzed cathodic reaction in anaerobic MIC. *J. Electroanal. Chem.* **561**: 93-97.
79. **Zadvorny O.A., Zorin N.A., Gogotov I. N., (2006)** Transformation of metals and metal ions by hydrogenases from phototrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* **184**:279.-285.
80. **Videla H.A. (1996)** Manual of Biocorrosion, Boca Raton: CRC Press.
81. **Lee A.K., Newman D.K. (2003)** Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes, *Appl Environmental Microbiol*, **7**:235-345.
82. **Degremont (1989)** Mometon technique de l'eau, ed. du cinquantenaire, 9ème ed. tome1, techniques et documentation, Lavoisier.
83. **Scully J.C. (1990)** Fundamentals of corrosion. Pergamen press, Oxford, New York, 3ème Ed.
84. **Leclerc H. et Mossel D.A.A. (1989).** Microbiologie de tube digestif, l'eau et les aliments. Paris, Ed. Doin.
85. **Haslay C. et Leclerc M. (1993)** Microbiologie des eaux d'alimentation : Mémento technique de l'eau. Technique et documentation.
86. **Stephenson M., Stickland L.H. (1931).** The Hydrogenase. *J. Biochem.* **25**, 215-220.
87. **Ostroff A.G. (1965)** Introduction to oil field water technology ".Prentice, Hall. Inc. Englewood cliffs N.J. Ed. Parentice. Hall.
88. **Jayaraman A., Hallock P.J., Carson R.M., Lee C.-C., Mansfeld F.B., Wood T.K. (1999)** Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated in situ. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**:267–275.
89. **Garcia J.L.; Patel B.K.C.; Fardeau , M.L.; Ravot , G.; Magot , M.; Cayol , J.L.; Ollivier B. (2000)** Thiosulfate reduction by non-sulfate-reducing anaerobic prokaryotes. *Recent Res. Devel. Microbiology*, **4**: 701-724.
90. **Jack R.F., Ringelberg D.B., White D.C. (1992)** Differential corrosion rates of carbon steel by combinations of *Bacillus sp*, *Hania alvei* and *Desulfovibrio gigas* established by phospholipid analysis of electrode biofilms. *Corrosion Science* **33** (12):1843–1853.
91. **Lopes F.A., Morin P., Oliveira R., Melo L.F. (2006)** *Desulfovibrio desulfuricans* biofilms with stainless steel surface and its impact on bacterial metabolism. *Appl. Microbiol.* **101**, 1087-1095.
92. **Pelmont J. (1993)** Bactéries et environnement- Adaptations physiologiques. Presses Universitaires de Grenoble.
93. **Bak F., Pfennig N. (1987)** Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov. by disproportionation of inorganic sulfur compounds, *Arch.Microbiol.* **147**:184–189.
94. **Kodama Y., and Watanabe K. (2003)** Isolation and characterization of a sulfur-oxidizing chemolithotroph growing on crude oil under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:107–112.
95. **Tang K., Baskaran V., Nemati M. (2009)** Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries *Biochemical Engineering Journal* **44**:73–94

Références bibliographiques

96. **Magot M., Ollivier B., Patel B.K.C. (2000)** Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**:103–116.
97. **Marchal R., Chaussepied B., Warzywoda M. (2001)** Effect of ferrous ion availability on growth of a corroding sulphate-reducing bacterium. *Inter. Biodeter. Biodegr.* **47**:125-131.
98. **Kleikemper J., Schroth M.H., Sigler W.V., Schmucki M., Bernasconi S.M., Zeyer J. (2002)** Activity and diversity of sulphate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1516-1523.
99. **Ravenschlang K., Sahn K., Knoblauch C., Jorgensen B.B., Amann R.(2000)** Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulphate-reducing bacteria in marine arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** :3592-3602.
100. **Neria-Gonzalez I., Wang E.T., Ramirez F., Romero J.M., Hernandez-Rodriguez C. (2006).** Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. *Anaerobe.* **12**:122-123.
101. **Zhang T., Fang H.H.P., Ko B.C.B. (2003).** Methanogen population in a marine biofilm corrosive to mild steel. *Appl Microbiol Biotechnol.* **63**:101-106.
102. **Ford T.E., Mitchell G.J. (1989)** Hydrogen embrittlement: a microbial perspective. Corrosion 89, paper 18, NACE, Houston.
103. **Borensteh S.W. (1988)** microbiologically influenced corrosion failures of austenitic stainless steel welds. Corrosion/1988, paper no.78 (Houston, TX, NACE International, 1988).
104. **Mah T.C, O'Toole G.A. (2001)** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agent. *Trends Microbiol.* **9**:34-39.
105. **Eisenmann E., Beuerle J., Sulger K., Kroneck P.M.H., and Schumacher W. (1995)** Lithotrophic growth of *Sulfurospirillum deleyianum* with sulfide as electron donor coupled to respiratory reduction of nitrate to ammonia. *Arch. Microbiol.***164**:180–185.
106. **Rinker K. D., and Kelly R. M. (1996)** Growth physiology of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: development of a sulfur-free defined medium, characterization of an exopolysaccharide, and evidence of biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4478–4485.
107. **Brown JR, et WF Doullittle (1997)** Archaea and prokaryote to eukaryote transition. *Microbiology and molecular Biology Reviews.* **61**: 456-502.
108. **Kushner D. J. (1985)** In: The Bacteria. Academic Press, London, vol. 8, p171.
109. **Leclerc H. (1995)** Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Ed. Doin, Paris.
110. **Larpent J.P. (1997)** Microbiologie Alimentaire: techniques de laboratoire. *Edition Tec & Doc.*
111. **Schmidt HG (1987)** Action of antimicrobial substances. *Parfumerie and Kosmetik* **68**:5-16.
112. **Brock T.D., Madigan M.T., Martinko J.M. and Parker J. (1994)** Biology of Microorganisms, 7th edition, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
113. **Landoulsi J., Pulvin S., Richard C, Sabot K. (2006)** Biocorrosion of Stainless Steel in Artificial Fresh Water: Role of Enzymatic Reactions, Proceedings of EuroCorr 2006, 24–28 September 2006, Maastricht, the Netherlands.
114. **McCarty P.L. (1971)** Energetics and kinetics of anaerobic treatment. In Anaerobic Biological Treatment Processes. RF Gould (ed.). Washington, DC: *American Chemical Society.*

115. **Simpson W.J. (1999)** Isolation and characterisation of thermophilic anaerobies from Bass Strait oil production waters. MA:Sci Thesis, School of Applied Sciences, Monash Universit
116. **Bonilla M., Fardeau M.L., Cayol J.L., Casalot L., Patel B., Thomas P., Garcia J.L., & Ollivier B. (2004)** *Petrobacter succinatimandens* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from an Australian oil well.. *J. Syst. Evol. Microbiol* **54** (3), 645 – 649.
117. **Boone D.R. et Castenholz R.W. (1989)** Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. New York: Springer.
118. **Von Wolzogen Kuhr C.A.H., Vander Klugt Water I.S. (1934)** The graphitization of cat iron as an electrochemical process in anaerobic solid. *Water* **18**:147–165.
119. **Castro H.F., Williams N.H., Ogram A. (2000)** Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **31**: 1 –9.
120. **Dong X.Z., Cai M.Y. (2001)** Manual of the Identification of General Bacteria. Beijing: Scientific Press.
121. **Eder W., Jahnke L. L., Schmidt M., Huber R. (2001)** Microbial diversity of the brine-seawater interface of the Kebrit Deep, Red Sea, studied via 16S rRNA gene sequences and cultivation methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(7), 3077-3085.
122. **Fauque G., Ollivier B. (2003)** Anaerobes: the sulfate-reducing as an example of the metabolic diversity, in: A.T. Bull (Ed.), Microbial Diversity and Bioprospecting, American Society for Microbiology. Press, Washington, USA:
123. **Gerhardt P., Murray R. G. E., Costilow R. N., Nester E. W., Wood W. A., Krieg N. R., & Philips G. B. (1981)** Manual of Methods for General Bacteriology. Washington, DC: American Society for Microbiology.
124. **Grant W. D., Kamekura M., McGenity T. J. & Ventosa A. (2001)** Class III. Halobacteria class. nov. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 1, Edited by D. R. Boone, R. W. Castenholz & G. M. Garrity. New York: Springer.
125. **Hamilton W.A. (1985)** Sulfate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Annu Rev Microbiol* **39**:195–217.
126. **Larsen J., Zwolle S., Kjellerup B.V., Frølund B., Nielsen J.P., Nielsen P.H. (2005)** Identification of bacteria causing souring and biocorrosion in the Halfdan field by application of new molecular techniques (Corrosion 2005, Paper 05629, Houston, TX: NACE International, 2005)
127. **Lopez M.A., De la Serna F.J.Z., Jan-Roblero JRomero J.M., Hernandez-Rodriguez C. (2006)** Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in a water pipeline in the Gulf of Mexico. *FEMS microbiol. Ecol.* **58**:145-154.
128. **Videla H.A. (2007)** Mechanisms of MIC: Yesterday, today and tomorrow. MIC – An International Perspective Symposium, Extrin Corrosion Consultants, Curtin University, Perth, Australia, 14–15 February 2007.
129. **Ollivier B., Magot M. (2005)** Petroleum Microbiology, ASM Press, Washington, DC.
130. **Stackebrandt E., Liesack W. (1993)** Nucleic acids and classification. In Handbook of New Bacterial Systematics, Edited by M. Goodfellow & A. G. O'Donnell. London: Academic Press.
131. **Watanabe K., Kodama Y., and Kaku N. (2002)** Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. *BMC Microbiol.* **2**:23-33.
132. **Watanabe K., Watanabe K., Kodama Y., Syutsubo K., and Harayama S. (2000)** Molecular characterization of bacterial populations in petroleumcontaminated

- groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4803–4809.
133. **Garcia G.M., Bell J.A., Lilburn T.G. (2004)** Taxonomic outline of the prokaryotes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, Release 5.0. New York: Springer.
 134. **Pfennig N. Widdel F, Trüper HG (1981)** The dissimilatory sulfate reducing bacteria. Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows Schlegel HG (eds) *The prokaryotes*, vol 1. Springer, Berlin Heidelberg New York.
 135. **Cooling F.B., Maloney C.L., Negel E., Tabinowski J., Odom J.M. (1996)** Inhibition of sulfate respiration by 1,8-dihydroxyanthraquinone and other anthraquinone derivatives. *Appl Environ Microbiol* **62**:2999–3004.
 136. **Ollivier B., Caumette P., Garcia J.L., Mah R.A0 (1994)** Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol. Rev.* **58**: 27– 38.
 137. **Olson B.H.**, Assessment and implication of bacterial regrowth in water distribution systems. EPA. 600/52-82-0272 U.S. Environmental Protection Agency.
 138. **Cabridenc R., Gatelier C., leclerc H. et Kaiser P. (1974)** Dégradation microbienne des matériaux. Collection, colloque et séminaire, publication de l'association des ingénieurs en anticorrosion, Ed. Technip.
 139. **Ferron D. et Thierry D. (1998)**. Corrosion bactérienne des métaux. Ecole thématique sur la biodétérioration des matériaux. EDP science.
 140. **Hilbert. L.R. (2000)** Monitoring microbially influenced corrosion. Thèse de doctorat. Technical University of Danemark.
 141. **Boivin J., Laishley E.J., Bryant R., Costerton J.W. (1990)** The hydrogenase test- A rapid enzyme based test for corrosion-causing bacteria. *Microbial Influenced Corr. Biodeter.* Knoxville, Tennessee, USA.
 142. **Campaignolle X, Caumette P, Dabosi F, Crolet JL (1996)** The role of thiosulfate on the microbially induced pitting of carbon steel, corrosion/1996, paper no.2 (Houston, TX, NACE International, 1996)
 143. **Regnault J.P. (1990)** Microbiologie générale, Décarie Éditeur inc., Montréal, Québec, Canada.
 144. **Perry J.J., Staley J.T. Lory S. (2004)** Microbiologie, coll. Dunod, Paris.
 145. **Hubert C., Nemati M., Jenneman G.E., Voordouw G. (2003)** Containment of biogenic sulfide production in continuous up-flow packed-bed bioreactors with nitrate or nitrite. *Biotechnol Prog* **19**:338–345.
 146. **Costerton J.W.; Lewandowski Z; Caldwell, D.; De Beer, D.; Korber, D et Lappin -Scott, H (1995)** Microbial biofilms. *Annal Reviews of Microbiology* **49**: 711-745.
 147. **March A.D., Evans L.V., Edyvean R.G.J. (1991)** Interactions between marine microbiological fouling and cathodic protection scale. In: *Microbial Corrosion Proceedings of the 2nd EFC Workshop, Portugal 1991* (Sequeira CAC, Tillere AK, eds) European Federation of Corrosion Publications, Number 8, The Institute of Materials.
 148. **Kalaji, M., et al. (1999)** Chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas sp.* NCIMB 2021 in continuous culture. *Microbiology*, **145**:1-7.
 149. **Donlan R.M., Costerton J.W. (2002)** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:167-193.
 150. **Lock. M.A. (1993)** Attached microbial communities in rivers. In: *Aquatic Microbiology*. T.E. Ford. (Eds.) Blackwell Scientific Publications, Cambridge.

Références bibliographiques

151. **Telang A.J., Ebert S., Foght J.M., Westlake D.W.S., Voordouw G., (1998)** Effect of two diamine biocides on the microbial community from an oil field, *Can. J. Microbiol.* **44**: 1060–1065.
152. **Leminor L. et Richard C (1993)** Méthodes de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries, Institut Pasteur, Paris-France.
153. **Frank J.F., Koffi R.A. (1990)** Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Protect.* **53**: 550-554.
154. **Fletcher M. et Floodgate G.D. (1973)** An Electron-Microscopic Demonstration of an Acidic Polysaccharide Involved in the Adhesion of a Marine Bacterium to Solid Surfaces. *Journal of General Microbiology*, **74**: 325-334.
155. **White D.C., (1986)** Environmental-effects testing with quantitative microbial analysis: Chemical signatures correlated with in situ biofilm analysis by FT/ IR. *Toxicity Assessment* **1**:315–338.
156. **Videla H.A. (1988)** Electrochemical Review Article on the Influence of Sulphide Inclusion on the Corrodibility of Fe and Steel. *Corros. Sci.*, **9**: 585-602.
157. **Beech I. B., Bergel A., Mollica A., Flemming H.-C. (Task Leader), Scotto V., Sand W. (2000)** Simple Methods for The Investigation of the Role of Biofilms in Corrosion, Brite Euram Thematic Network on MIC of Industrial Materials, Task Group 1, Biofilm Fundamentals, Brite Euram Thematic Network No. ERB BRRT-CT98-5084.
158. **Pirttijärvi T.S.M., Graeffe T.H., Salkinoja –Salonen M.S. (1996)** Bacterial contaminants in liquid packaging boards: Assessment of potential for food spoilage. *J Appl Bacteriol* **81**: 445– 458.
159. **Little B.J, Lee J., Ray R. (2007)** How marine conditions affect the severity of MIC of steels. MIC – An International Perspective Symposium; Extrin Corrosion Consultants, Curtin University, Perth, Australia, February 14–15, 2007.
160. **Newman R.C., Rumash K., Webster B.J. (1992)** The effect of pre-corrosion on the corrosion rate of steel in natural solutions containing sulphide: Relevance to microbially influenced corrosion. *Corrosion Science* **33** (12):1877–1884
161. **Dihn H.T., Kuever J., Mubmann M., Hassel A.W., Stratmann M., Widdel F. (2004)** Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms, *Nature* **427**:829–832.
162. **Obuekwe C.O., Westlake D.W., Plambeck J.A., Cook F.D. (1981)** Corrosion of mild steelin cultures of ferric iron reducing bacterium isolated from crude oil, polarisation characteristics. *Corrosion* **37**(8):461–467
163. **Obuekwe C.O., Westlake D.W.S., Cook F.D. (1981)** Effect of nitrate on reduction of ferric iron by a bacterium isolated from crude oil. *Can jou microbiol* **27**:692–697
164. **Panter C. (2007)** Ecology and characteristics of iron reducing bacteria-suspected agents in corrosion of steels. MIC – An International Perspective Symposium, Extrin Corrosion Consultants, Curtin University, Perth, Australia, 14–15 February 2007
165. **Rajasekar A., Babu T.G., Pandian S.K., Maruthamuthu S., Palaniswamy N., Rajendran A. (2007).** Biodegradation and corrosion behavior of manganese oxidizer *Bacillus cereus ACE4* in diesel transporting pipeline. *Corr. Sci.* **49**:2694-2710.
166. **Beech I.B., Gaylarde C.C., Smith J.J. and Geesey G.G. (1991)** Extracellular Polysaccharides from *Desulfovibrio Desulfuricans* and *Pseudomonas Fluorescens* in the Presence of Mild Steel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**:65-71.
167. **Akid R., Wang H., Smith T.J., Greenfield D., Earthman J.C. (2008)** Biological functionalization of a sol-gel coating for the mitigation of microbial-induced corrosion. *Adv. Functional Mater.* **18**: 203-211.

Références bibliographiques

168. **Bermond-Tilly D., Janvier M., Braisaz T., Dupont-Moral I. (2003)** Microbially influenced corrosion: studies on bacteria isolated from seawater environment. Eurocorr. Budapest, Hungary.
169. **Blackburn F.E. (2004)** Non-bioassy Techniques for Monitoring MIC, corrosion/2004, paper no.05480 (Houston, TX, NACE International, 2001).
170. **Dunne W.M. (2002)** Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately. *Clin Microbiol Rev.* **15**:155–166.
171. **Guiamet P.S., Gomez de Saravia S.G., Videla H.A. (1999)** An innovative method for preventing biocorrosion through microbial adhesion inhibition. *International Biodeterioration & Biodegradation* **43**:31–35
172. **Li B., Logan B.E. (2004)** Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloid Surf.* **36**:81–90
173. **Anton J., Meseguer I., Rodriguez-Valera F. (1988)** Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**: 2381-2386.
174. **Javaherdashti R., Singh Raman R.K. (2001)** Microbiologically influenced corrosion of stainless steels in marine environments: A materials engineering approach. In: Proceedings of engineering materials. The Institute of Materials Engineering, Australia, 23–26 September 2001
175. **Fera P. (1985)** Etude expérimentale de la colonisation par les bactéries de surfaces immergées en milieu marin. Sciences biologiques fondamentales et appliquées, psychologie. UBO, Brest.
176. **Tributsch H., Rojas-Chapana J.A., Bartels C.C., Ennaoui A., Hofmann W. (1998)** Role of Transient Iron Sulfide Films in Microbial Corrosion of Steels, *Corrosion*, **54**,(3),216–227.
177. **Jayaraman A., Cheng E.T., Earthman J.C., Wood T.K. (1997)** Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of SAE 1018 steel through oxygen depletion. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**:11–17.
178. **Waksman S.A. (1937)** Associative and antagonistic effects of microorganisms: I. Historical review of antagonistic relationships. *Soil Sci.*, **43**:51-68.
179. **Rincon J.R.T., Gomez D.M.C, Caraballo A.E.S., Alvarez J.H.P (2008)** Evaluation of molybdate and nitrate on sulphate-reducing bacteria related to corrosion processes in industrial systems. *Rev. Argentina de Microbiol.* **40**:52-62.
180. **Schwermer C.U., Lavik G., Abed R.M.M., Dunsmore B., Ferdelman T.G., Stoodley P., Gieseke A., de Beer D. (2008)** Impact of nitrate on the structure and function of bacterial biofilm communities in pipelines used for injection of seawater into oil fields. *Appl. Environm. Microbiol.* **74**:2841-2851.
181. **Rempel C.L., Evitts R.W., Nemati M. (2006)** Dynamics of corrosion rates associated with nitrite or nitrate mediated control of souring under biological conditions simulating an oil reservoir. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 878-886.
182. **Baena M.I., Marquez M.C., Matres V., Botella J., Ventosa. A (2006)** Bactericidal activity of copper and niobium-alloyed austenitic stainless steel. *Curr. Microbiol.* **53**: 491-495.
183. **Singleton, J.R. (1993)** The Sulfate-Reducing Bacteria, an Overview. In: The Sulfate-Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives, Oldom JM, Singleton JR (éd.), Springer-Verlag, New York.
184. **Franks A., Egan S., Holmström C., James S., Lappin-Scott H., Kjelleberg S. (2006)** Inhibition of Fungal Colonization by *Pseudoalteromonas tunicate* provides a Competitive Advantage during Surface Colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 6079–6087.

185. **Örnek D., Wood T.K., Hsu C.H, Mansfeld F. (2002)** Corrosion control using generative biofilms (CCURB) on brass in different media. *Corr. Sci.* **44**:2291-2302.
186. **Zuo R. (2007)** Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 1245–1253.
187. **Korenblum E., Sebastian G.V., Paiva M.M., Coutinho C.M.L, Magalhaes F.C.M., Peyton B.M., Seldin L. (2008)** Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir Bacillus strains against biofilm formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**:97-103.
188. **Stadler R., Fuerbeth W., Harneit K., Grooters M., Woellbrink M., Sand W. (2008)** First evaluation of the applicability of microbial extracellular polymeric substances for corrosion protection of metal substrates.. *Electrochim. Acta* **54**: 91-99.
189. **Rajasekar A., Babu T.G., Pandian S.K., Maruthamuthu S., Palaniswamy N., Rajendran A., Pandian S.T.K., Mohanan S, Palaniswamy N. (2007).** Biodegradation and corrosion behaviour of *Serratia marcescens* ACE2 isolated from an Indian diesel-transporting pipeline. *World J. Microbiol. & Biotechnol.* **23**:1065-1074.
190. **Carsten U. Schwermer Lavik G, Raeid Abed R.M.M., Dunsmore B., Ferdelman G.T., Stoodley P., Gieseke A., et de Beer D. (2008)** Impact of Nitrate on the Structure and Function of Bacterial Biofilm Communities in Pipelines Used for Injection of Seawater into Oil Fields. *App. Envi. Microbiology*: **74**, (9), 2841–2851.
191. **Davidova I., Hicks M.S., Fedorak P.M. et Suflita J.M. (2001)** The influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 80–86
192. **Eckford R.E., Fedorack P.M., (2002)** Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfatereducing bacteria in some western Canadian oil field waters, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**:83–92.
193. **Larsen J. (2002)** Downhole nitrate applications to control sulfate-reducing bacteria activity and reservoir souring (Corrosion 2002, paper 02025, NACE International).
194. **Jack T.R. (2002)** Biological Corrosion Failures, ASM International, March 2002
195. **Jenneman G. E., P. D. Moffitt, Bala G.A., et Webb R. H. (1999)** Sulfide removal in reservoir brine by indigenous bacteria. *Soc. Petroleum Eng. Prod. Facilities* **14**:219-225.
196. **Miranda-Tello E., Fardeau M.L., Sepúlveda J., Fernandez L., Cayol J.L., Thomas P., et Ollivier B. (2003).** *Garciella nitratreducens* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, nitrate- and thiosulfate-reducing bacterium isolated from an oilfield separator in the Gulf of Mexico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53** :1509-1514.
197. **Champiat D. et Larpent J.P. (1994)** Biologie des eaux, méthodes et techniques. Ed Masson, Paris.
198. **Bjorndalen N., Mustafiz S., Tango M., Islam A.R., (2003)** A novel technique for prevention of microbial corrosion, *Energy Sources* **25**: 945–951.
199. **Silva A.A., Morrell J.J. (1998)** Inhibition of wood-staining *Ophiostoma picea* by *Bacillus subtilis* on *Pinus ponderosa* sapwood *Material und Organismen* **32**:241–252
200. **Morton L.H.G., Greenway D.L.A., Gaylarde C.C., Surman S.B. (1998)** Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *Int. Biodet. & Biodeg.* **41**: 247-259.
201. **Lutey R.W. (1995)** Process cooling water. Section 3.2.4. In: Handbook of biocide and preservative use. Rossmore HW (ed) Blackie Academic & Professional (Chapman & Hall) Glasgow UK.
202. **Minz D., Green S.J., Flax J.L., Muyzer G., Cohen Y., Wagner M., Rittmann B.E., Stahl D.A. (1999)** Diversity in sulfate reducing bacteria in oxic and anoxic

Références bibliographiques

- regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4666–4671
203. **Williams T.M. (2004)** Isothiazolone biocides in water treatment application. corrosion/2004, paper no.04083 (Houston, TX, NACE International, 2004).
204. **American Public Health Association (2005)** Standard Methods for the examination of water and wastewater. 21th ed. American Waterworks Association and Water Pollution Control Federation, Baltimore, MD.
205. **Postgate J.R. (1984)** The Sulphate Reducing Bacteria, 2nd Edition. Cambridge University Press, Cambridge
206. **Seghal S.N., Gibbons N.E. (1960)** Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can J Microbiol.* **6**:165–169.
207. **Hurley M.A., Roscoe M.E. (1983)** Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *Journal of Applied Microbiology*, **55**:159–164.
208. **Guillaumin, D. (1980)** La pratique du microscope électronique à Balayage en Biologie Paris, Masson.
209. **Smirnov V.V., Kiprianova E.A. (1990)** Bakterii roda Pseudomonas, (Bacteria of the Genus Pseudomonas), Kiev: Naukova Dumka.
210. **Melo I.S. (1998)** Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: I.S. Melo & J.L. Azevedo (Eds.) Controle Biológico. *Embrapa: Jaguariúna*, v. **1**:17-30.
211. **Bernheimer A.W., Avigad L.S. (1970)** Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **61**:361–369.
212. **Leifert C., Li H., Chidburee S., Hampson S., Workman S, Sigee D., Epton H.A.S., Harbour A. (1995)** Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumillus* CL45. *J Appl Bacteriol* **78**:97–108.
213. **Rosnes J.T., Torsvik T. & Lien T. (1991)** Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2302–2307.
214. **Zuber P., Nakano M., Marahiel M. (1993)** Peptide antibiotics. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (Eds), *Bacillus Subtilis* and Other Gram- Positive Bacteria. American Society for Microbiology, Washington DC, USA.
215. **Chaudhary A., Gupta L.K., Gupta J.K., Banerjee U.C. (1997)** Studies on slime - forming organisms of a paper mill — slime production and its control. *J Ind Microbiol Biotechnol* **18**: 348–352.
216. **Mancinelli R.L., Hochstein L.I. (1986)** The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **35**: 55–58.
217. **Oren A., Ventosa A., Grant W.D. (1997)** Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. *Int J Syst Bacteriol* **47**:233–238.
218. **Dussault H.P. (1955)** An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J Bacteriol* **70**, 484–485.
219. **Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidelman J.G., Struhl KE (1988)** Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, New York.
220. **Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. (1991)** 16S ribosomal DNA for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697–703.
221. **Saitou N. et Nei M. (1987)** The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4** (4):406-25.
222. **Nemati M., Mazutinec T., Jenneman. G.E., Voordouw G. (2001)** Control of biogenic H₂S production by nitrite and molybdate. *J Ind Microbiol Biotechnol* **26**:350–355

Références bibliographiques

223. **Maxwell S., Devine C., Rooney F., Spark I. (2004)** Monitoring and Control of Bacterial Biofilms in Oilfield Water Handling Systems, corrosion/2004, paper no.04752, (Houston, TX, NACE International, 2004).
224. **Sanders P.F., (1988)** Control of microbiologically induced corrosion using field and laboratory methods, *International Biodeterioration*, **24**: 239-246.
225. **Stott J.F.D., Skerry B.S., King R.A. (1988)** Laboratory evaluation of materials for resistance to anaerobic corrosion caused by sulphate reducing bacteria: Philosophy and practical design, the use of synthetic environments for corrosion testing. ASTM STP 970, Francis PE and Lee TS (eds), ASTM
226. **Jass J., Costerton J.W. et Lappin -Scott H.M. (1995)** Assessment of a chemostat-coupled modified Robbins device to study biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **15**: 283-289.
227. **Hernandez G., Kucera V., Thierry D., Pedersen A., Hermansson M. (1994)** Corrosion Inhibition of Steel by Bacteria, *Corrosion*, **50**(8):603–608
228. **Javaherdashti R. (2005)** Microbiologically influenced corrosion and cracking of mild and stainless steels. PhD Thesis, Monash University, Australia
229. **Stainless Steel Selection Guide (2002)** Central States Industrial Equipment & Service, Inc, USA
230. **Gana M.L. (1998)** Etude de la corrosion bactérienne, thèse de Magistère Ecole nationale polytechnique Alger.
231. **Nemati M., Jenneman G.E., Voordouw G. (2001)** Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs, *Biotechnol. Bioeng.* **74** (5), 424–434.
232. **Perrsen K. (1982)** Method for studying microbial biofilms in flowing water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **3**: 6-13.
233. **Bitton G. (1999)** Wastewater Microbiology. 2ème Ed, Wiley-Liss, New York.
234. **Burgess J.E., Parsons S.A., Richard R.M., (2001)** Developments in odour control and waste gas treatment biotechnology: a review, *Adv. Biotechnol.* **19**: 35–63.
235. **Barton L.L., Tomei F.A. (1995)** Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria in sulfate-reducing bacteria, Barton LL (ed), *Biotechnology Handbooks*, Vol. 8, Plenum Press, New York
236. **Percheron G., Michaud S., Bernet N., Moletta R. (1998)** Nitrate and nitrite reduction of a sulphide-rich environment. *J Chem Technol Biotechnol* **72**:213–220
237. **Rohwerder T., Sand W. (2007)**, Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulfide oxidation, in: E.R. Donatti, W. Sands (Eds.), *Microbial Processing of Metal Sulphides*, Springer.
238. **Smith J.S. and Miller J.D.A., (1975)** Nature of Sulphides and Their Corrosive Effect on Ferrous Metals: A Review, *British Corrosion Journal*, **10**, (3), 136–143
239. **Hagen K.D. and Nelson D.C. (1996)** Organic carbon utilization by obligately and facultatively autotrophic *Beggiatoa* strains in homogeneous and gradient cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:947–953.
240. **Robertson L.A., and Kuenen J.G. (1983)** *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **129**:2847–2855.
241. **Rodier J. (1996)** L'Analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer.-. Editions Dunod, 8 ième édition, Paris.
242. **Kelly D.P. (1992)** The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, vol. 1. Springer-Verlag, New York, NY.

Références bibliographiques

-
243. **Meyer F.H., Riggs O.L., McGlasson R.L. and Sudbury J.D. (1958)** Corrosion Products of Mild Steel in Hydrogen Sulfide Environments. *Corrosion*, **14**:109-115.
244. **King R.A., Miller J.D.A. (1971)**, Corrosion by sulfate reducing bacteria. *Nature* **233**: 491-492.
245. **Podile A., Prakash A. (1996)** Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1. *Can J Microbiol* **42**:533–538
246. **Paulus W. (1993)** Microbicides for the Protection of Materials – A Handbook. Chapman & Hall, London, UK.
247. **Bail O. (1929)** Entatehung und Gesetze von Bakterien populationen; Soziologische Studien an Dysenteriebazillen. Arch. Hyg., 95, 1-39 (1925); Z. ges. exptl. Med., 50, 11-25, (1926); Z. Immunitats. **60**, 1-22.
248. **Wang Q., Li W., Liu Y., Cao H., Li Z.; Guo G. (2007)** *Bacillus qingdaonensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic bacterium isolated from a crude sea-salt sample collected near Qingdao in eastern China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:1143–1147.
249. **Xue Y., Ventosa A., Wang X., Ren P., Zhou P., Ma Y. (2008)** *Bacillus aidingensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from Ai-Ding salt lake in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 2828–2832.
250. **Lim J.M., Jeon C.O., Lee S.M., Lee J.C., Xu L.H., Jiang C.L., Kim C.J. (2006)** *Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, spore forming bacterium isolated from a salt lake in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 373–377.
251. **Nielsen P., Fritze D., Priest F.G. (1995)** Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology* **141**: 1745–1761.
252. **Stott J.F.D. (1993)** What progress in the understanding of microbially induced corrosion has been made in the last 25 years? (A Personal Viewpoint) *Corrosion Science* **35**(4):667–673
253. **Fera P. (1985)** Etude expérimentale de la colonisation par les bactéries de surface immergées en milieu marin, Thèse Université Bretagne Occidentale
254. **Block S.S. (1991)** Preservatives for industrial products. In: Disinfection, Sterilization, and Preservation Block, S.S. edition.
255. **Wielinga B., Lucy J.K., Moore J.N., Seastone O.F., Gannon J.E (1999)** Microbiological and geochemical characterization of alluvially deposited sulfidic mine tailings. *Appl Environ Microbiol* **65**:1548–1555.
256. **Little B Lee J Ray R. (2007)** New development in mitigation of microbiologically influenced corrosion MIC – an international perspective symposium. Extrin Corrosion Consultants, Curtin University, Perth, Australia, 14–15 Feb 2007.
257. **Zhu X.Y., Modi H., Kilbane II J.J. (2006)** Efficacy and risks of nitrate application for the mitigation of SRB-induced corrosion corrosion/2006, paper no.06524 (Houston, TX, NACE International, 2006)
258. **Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. (1998)** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**: 504–544.
259. **Arahal D.R., Ventosa A. (2002)** Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives, Edited by R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan and P. De Vos. Oxford: Blackwell.
260. **Pfeffer W. (1900)** The physiology of plants. A treatise upon the metabolism and sources of energy in plants. 2nd Ed. *Oxford*, **1** 512-514.
261. **Wagner P., Little B.J. (1993)** impact of alloying on microbiologically influenced corrosion – A review. *Mater Perform* **32**(9):65–68 99.
262. **Little B.J., Wagner P., Hart K., Ray R., Lavoie D., Nealson K., Aguilar C. (1997)** The role of metal reducing bacteria in microbiologically influenced corrosion, corrosion/1997, paper no.215 (Houston, TX, NACE International, 1997).

Références bibliographiques

263. **Cordonnier J. (1995)** Encrassement microbiologique, corrosion bactérienne et protection, Application au circuit d'eau de refroidissement.
264. **Booth, G.H., Elford, L. and Wakerley, D.S. (1968)** Corrosion of Mild Steel by Sulfate-Reducing Bacteria, an Alternative Mechanism. *Br. Corros. J.*, **3**, 242-245.
265. **Rogers J., Dowset A.B., Dennis P.J., Lee J.V. et Keevil C.W. (1994)** influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1832- 1851.
266. **Baskaran V., Nemati M., (2006)** Anaerobic reduction of sulfate in immobilized cell bioreactors, using a microbial culture originated from an oil reservoir, *Biochem. Eng. J* **31** (2): 148–159.
267. **Kosaric N., Cairns W.L., Gray Neil C.C. (1987)** Surfactant Science Series, Marcel Dekker Inc, New York.
268. **Bouchotroch S., Quesada E., del Moral A., Llamas I., Bejar V. (2001)** *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1625–1632.
269. **Branda S.S., González-Pastor J.E., Dervyn E., Ehrlich D., Losick R., Kolter R. (2004)** Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**:3970–3979
270. **Kebbouche-Gana S., Gana M.L., Khemili S., Fazouane-Naimi F., Bouanane N.A., Penninckx M., Hacene H. (2009)** Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**:727–738.
271. **Hamon M.A., Lazizzera B.A. (2001)** The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **42**:1199–1209
272. **Critchley M., Javaherdashti R. (2005)** Materials, micro-organisms and microbial corrosion – A review. *Corrosion and Materials* **30**(3):8–11
273. **Miller J.D.A., Tiller A.K. (1970)** Microbial aspects of metallurgy, Miller JDA (ed), American Elsevier Publishing, New York
274. **Nagiub A., Mansfeld F. (2002)** Microbiologically influenced corrosion inhibition observed in the presence of *Shewanella* micro-organisms. Proceedings of 15th International Corrosion Council, Spain
275. **Palraj S., Venkatachari G. (2006)** Corrosion and Biofouling Characteristics of Mild Steel in Mandapam Waters, *Materials Performance* **45**, (6), 46–50
276. **Obuekwe C.O., Westlake D.W.S., Cook F.D., Costerton J.W. (1981)** Surface changes in mild steel coupons from the action of corrosion-causing bacteria. *Appl Envir Microbiol.* **41** (3):766–774
277. **Potekhina J.S., Sherisheva N.G., Povetkina L.P., Pospelov A.P., Rakitina T.A., Warnecke F., Gottschalk G. (1999)** Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**:639–646.
278. **Lapaglia C. et Hartzell P. L. (1997)** Stress-Induced Production of Biofilm in the Hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, (8), 3158–3163
279. **Beranger G., Henry G. et Sanz G. (1994)** Le livre de l'acier, Technique et Documentation - Lavoisier, Paris.
280. **Wallinder D. J. Pan J. Leygraf C. Delblanc-Bauer A. (2000)** Electrochemical investigation of pickled and polished 304L stainless steel tubes. *Corr. Sci.*, **42**: 1457-1469.
281. **Pope D.H., Zintel T.P., Aldrich H., Duquette D. (1990)** Efficacy of biocides and corrosion inhibition in the control of microbiologically influenced corrosion. *Mater Perform* **29**(12):49–55

Références bibliographiques

282. **Emde K.M.E. (1992)**, initial investigation of microbially influenced corrosion in low temperature water distribution system, *Wat. Res.* **26** (2), 169-175.

Liste des Tableaux

	Page
CHAPITRE Un	
Tableau 1.1 : Genres bactériens sulfurogènes d'après Brock et al.	12
CHAPITRE Deux	
Tableau 2.1 : Origines des échantillons d'eaux.	38
Tableau 2.2 : Composition chimique des milieux de culture utilisés en (g/l).	42
Tableau 2.3: Cultures combinées entre les bactéries inhibitrices et les bactéries corrosives dans les différentes eaux d'injection.	45
Tableau 2.4 : Composition chimique de l'échantillon d'acier.	56
CHAPITRE Trois	
Tableau 3.1: Résultats des analyses physicochimiques des eaux échantillonnées.	63
Tableau 3.2 : Tableau comparatif des caractéristiques de la souche B21 avec les espèces rattachées : Souche : 1, <i>B21</i> ; Souche :2, <i>Bacillus qingdaonensis</i> DQ115802; Souche :3, <i>Bacillus aitingensis</i> DQ504377; Souche :4, <i>Bacillus salarius</i> AY667494; Souche :5, <i>Bacillus chagannorensis</i> AM492159. (+) : Positive; (-) : négative; ND : non définit.	76
Tableau 3.3 : Pourcentage de similitude de la séquence ARNr 16S de la souche B21 avec quelques espèces du genre <i>Bacillus</i> .	78

Liste des Figures

	Page
Fig. 0.1 : Exemples de corrosion induite par les microorganismes, (a) : coupe longitudinale d'un pipe présentant un dépôt bactérien, (b) : piqûration d'un tubing de production d'un puits.	3
 CHAPITRE Un	
Fig. 1.1: Biocorrosion ou biodétérioration des matériaux métalliques [12].	6
Fig. 1.2: Schéma 1 de la Cellule d'aération différentielle dans un biofilm [88].	8
Fig. 1.3: Schéma 2 de la Cellule d'aération différentielle [88].	8
Fig. 1.4: Cycle du soufre indiqué par Tang et al. [95].	9
Fig. 1.5: Cycle de consommation de la source de carbone dans la cellule des BSR [95]	15
Fig. 1.6: Mécanisme de la réduction des sulfates en sulfures chez les bactéries Sulfato-réductrices [92, 105, 109].	16
Fig. 1.7: Mécanisme de la corrosion par les BSR [95].	18
Fig. 1.8: Impact des nitrates sur le cycle du soufre présent dans un gisement de pétrole [7, 145].	20
Fig. 1.9: Visualisation schématique des hétérogénéités chimiques et biochimiques dans un biofilm [12].	22
Fig. 1.10: Etapes de formation du biofilm dans une canalisation. a): Adhésion des bactéries à la surface de l'acier, b): Amorçage du biofilm, c): Formation du biofilm, d): Formation de piqûre sur l'acier.	25
Fig. 1.11 : Représentation schématique des communautés bactériennes responsables de la corrosion métallique.- Développement de I à III d'un biofilm anaérobie avec des bactéries sulfato- réductrices (en noir) et d'autres espèces anaérobies (en blanc), les colonies mixtes (consortium) finissent par provoquer entre elles des potentiels de corrosion [85].	25
Fig. 1.12 : Photographies obtenues au microscope à balayage de biofilm formé sur acier inoxydable, (a) : après 9 jours d'immersion et (b) : après 21 jours d'immersion (Gr x 2000) [37].	28
Fig. 1.13: Réduction biologique des nitrates [85].	32
Fig. 1.14: Moyen de lutte contre les phénomènes de biocorrosion [12].	34
Fig. 1.15: Schéma des sites d'action de certains biocides au niveau de la cellule bactérienne.	36
 CHAPITRE Deux	
Fig. 2.1: Situation géographique des cinq (05) régions pétrolières (collins maps).	39
Fig. 2.2: Schéma représentatif de la procédure expérimentale de l'inhibition biologique par la souche B21 dans l'eau d'injection.	52

Fig. 2.3: Formule chimique du complexe THPS [53]. 52

Fig. 2.4: Schéma représentatif de la procédure expérimentale de l'inhibition chimique par le THPS dans l'eau d'injection. 53

Fig. 2.5: Schéma des coupons d'acier, (D: Diamètre intérieur = 7mm, d: Diamètre extérieur = 10mm, L: longueur = 10mm et e: épaisseur = 1,6mm). 56

Fig. 2.6: Installation de la boucle de monitoring de l'inhibition biologique. 57

CHAPITRE Trois

Fig. 3.1 : Croissance des BTR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (□), TFT#624 (■) et ST#203 (□). Ces essais sont réalisés avant l'injection (témoin) de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*. 69

Fig. 3.2 : Croissance des BTR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (□), TFT#624 (■) et ST#203 (□). Ces essais sont réalisés, après l'injection de *Bacillus cereus*. 70

Fig. 3.3 : Croissance des BTR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (□), TFT#624 (■) et ST#203 (□). Les essais sont réalisés après l'injection de *Bacillus subtilis*. 70

Fig. 3.4 : Croissance des BSR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (□), TFT#624 (■) et ST#203 (□). Ces essais sont réalisés avant l'injection (témoin) de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*. 72

Fig. 3.5 : Croissance des BTR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (□), TFT#624 (■) et ST#203 (□). Ces essais sont réalisés, après l'injection de *Bacillus cereus*. 72

Fig. 3.6 : Croissance des BSR cultivées dans les différentes eaux d'injection provenant des puits producteurs d'eau HBNS#112 (■); MDHA#1 (□), TFT#624 (■) et ST#203 (□). Les essais sont réalisés après l'injection de *Bacillus subtilis*. 73

Fig. 3.7: Croissance de la souche bactérienne B21 sur milieu ATCC 213 à différentes concentrations de NaCl % (p/v) à 37°C et pH 7. 74

Fig. 3.8: Influence du pH sur la cinétique de croissance de la souche bactérienne B21, croissance obtenue sur milieu ATCC 213 à 37°C. 75

Fig. 3.9: Influence de la température sur la cinétique de croissance de la souche bactérienne B21, croissance obtenue sur milieu ATCC 213 à 37°C. 75

Fig. 3.10: Cinétique de croissance des cellules de l'isolat B21 sur un milieu sulfaté. 77

Fig. 3.11: Dendrogramme de la souche B21 basé sur les séquences de l'ARNr 16S séquence indiquant sa position par rapport aux espèces proches. L'arbre a été construit en utilisant la méthode d'assemblage de «neighbour joining method». La séquence de données utilisées a été obtenue à partir de séquences collectées à partir de la banque des séquences nucléotidiques EMBL, *Escherichia coli* MS 119-7 a été utilisé comme outgroup. 79

Fig. 3.12: Cinétique croissance du consortium de BSR par l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différente concentration en inoculum : 2% (□), 5% (Δ) et 6% (○). Dans le deuxième essai, nous a estimé la cinétique de croissance du même consortium par 81

l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5 mg/l (■), 10 mg/l (▲), 20 mg/l (●) et 50 mg/l (◆). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (×). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu comme contenant la concentration en sulfate : 100 mg/l (a) et 600 mg/l (b).

Fig.3.13: Cinétique croissance du consortium de BSR par l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différente concentration en inoculum : 2% (□), 5% (Δ) et 6% (○). Dans le deuxième essai, nous a estimé la cinétique de croissance du même consortium par l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5 mg/l (■), 10 mg/l (▲), 20 mg/l (●) et 50 mg/l (◆). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (×). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu comme contenant différentes concentrations en sulfate 1200 mg/l (c), et 2200 mg/l (d). **82**

Fig. 3.14: Cinétique de consommation du sulfate par le consortium de BSR par l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différente concentration en inoculum : 2% (□), 5% (Δ) et 6% (○). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de consommation par le même consortium, après l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5mg/L (■), 10mg/L (▲), 20mg/L (●) et 50mg/L (◆). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (×). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu comme contenant différentes concentrations en sulfate 100 mg/l (a), et 600 mg/l (b). **85**

Fig.3.15: Cinétique de consommation du sulfate par le consortium de BSR par l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différente concentration en inoculum : 2% (□), 5% (Δ) et 6% (○). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de consommation par le même consortium bactérien, après l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5mg/L (■), 10mg/L (▲), 20mg/L (●) et 50mg/L (◆). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (×). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu comme contenant différentes concentrations en sulfate 1200 mg/l (c), et 2200 mg/l (d). **86**

Fig.3.16: Cinétique de production du sulfure par le consortium de BSR par l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différente concentration en inoculum : 2% (□), 5% (Δ) et 6% (○). Dans le deuxième essai, nous a estimé la cinétique de production du même consortium bactérien, après l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5mg/L (■), 10mg/L (▲), 20mg/L (●) et 50mg/L (◆). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (×). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu comme contenant différentes concentrations en sulfate 100 mg/l (a), et 600 mg/l (b). **88**

Fig 3.17: Cinétique de consommation du sulfate par le consortium de BSR par l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) à différente concentration en inoculum : 2% (□), 5% (Δ) et 6% (○). Dans le deuxième essai, nous a estimé la cinétique de production par le même consortium par, après l'addition de l'inhibiteur chimique (THPS) à différentes concentrations : 5mg/L (■), 10mg/L (▲), 20mg/L (●) et 50mg/L (◆). Dans tous les cas, un témoin du milieu sans inhibiteur est utilisé (×). Chaque culture est conduite à 37°C et à 100 t/mn dans le milieu comme contenant différentes concentrations en sulfate 1200 mg/l (c), et 2200 mg/l (d). **89**

Fig. 3.18: Cinétique de croissance du consortium de BSR après l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus* sp) (▲). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de croissance pour le même consortium, sans l'addition de l'inhibiteur biologique (■). Dans tous les cas, le milieu utilisé est l'eau d'injection du puits ZR#643. **92**

Fig. 3.19: Cinétique de consommation du sulfate par le consortium de BSR par l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus sp*) (▲). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de consommation par le même consortium, sans l'addition de l'inhibiteur biologique (■). Dans tous les cas, le milieu utilisé est l'eau d'injection du puits ZR#643. **93**

Fig 3.20: Cinétique de production du sulfure par le consortium de BSR par l'addition de l'inhibiteur biologique (*Bacillus sp*) (▲). Dans le deuxième essai, nous avons estimé la cinétique de consommation par le même consortium, sans l'addition de l'inhibiteur biologique (■). Dans tous les cas, le milieu utilisé est l'eau d'injection du puits ZR#643. **95**

Fig.3.21: Evolution du pH du milieu naturel (eau d'injection du puits ZR#643) contaminé par les BSR. Nous avons utilisé un milieu témoin non traité (◆) et un autre traité (▲) par l'inhibiteur biologique (*Bacillus sp*). **96**

Fig 3.22: Variation de la concentration en BSR planctoniques et sessiles cultivées en absence et en présence de l'inhibiteur biologique (*Bacillus sp*) dans un milieu naturel (eau d'injection du puits ZR#643), (1) : Après l'appoint en eau d'injection, (2) : Après contamination avec des bactéries de la corrosion (BSR) et (3) : Injection de l'inhibiteur biologique (*Bacillus sp*). **98**

Fig.3.23: Observation des coupons en acier utilisés dans l'installation du monitoring, (a) : coupon avant son immersion et non soumis à l'action des BSR, (b) : coupon immergé dans l'eau et soumis à l'action des BSR en absence de *Bacillus sp* (B21). **100**

Liste des Photographies

	Page
Photo 3.1 : Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits HBNS#112 (Gr x 4000).	65
Photo 3.2 : Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits TFT#624 (Gr x 8000).	65
Photo 3.3 : Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits MDHA#1 (Gr x 4000).	65
Photo 3.4 : Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits ST#203 (Gr x 8000).	66
Photo 3.5 : Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits ZR#643 (Gr x 4000).	66
Photo 3.6 : Illustration photographique au MEB des bactéries présentes dans l'eau du puits ZR#91 bis (Gr x 8000).	66
Photo 3.7: Etat de la surface des coupons en acier sans le biofilm (Gr x 2500).	101
Photo.3.8: Etat de la surface des coupons d'acier avec le biofilm hétérogène (Gr x 2500), avant l'injection de Bacillus sp (B21).	101
Photo.3.9 : Des exopolysaccharides, polymères sécrétés par les populations bactériennes présentes sur la surface de l'acier (Gr x 2000).	102
Photo 3.10 : Vue d'ensemble montrant la prédominance par des bacilles (Gr x 4000).	102
Photo.3.11: Vue d'ensemble montrant une dominance de la présence de bacilles (très fréquente) (Gr x 4000).	102

Liste des abbreviations

- APS:** Adénosine -5'phosphosulfate ou APS - Adenosine phosphosulfate.
- ARNr :** ARN des ribosomes
- ATP:** Adénosine triphosphate
- Bp:** Paire de base
- BSR:** Bactéries sulfato-réductrices
- BSRp:** Bactéries sulfato-réductrices planctoniques
- BSRs:** Bactéries sulfato-réductrices sessiles
- BTR:** Bactéries thiosulfato-réductrices
- DAPI:** 4', 6-diamidino-2-phenylindole
- DO:** Densité Optique
- EMBL:** European Molecular Biology Laboratory
- EPS:** Extracellular polymeric substance
- FISH:** Fluorescence in situ Hybridisation
- HBNS#112:** Puits Hassi berkine nord-sud,
- hNRB:** Heterotrophic nitrate reduicing bacteria
- MDHA#1:** Puits Hassi Messaoud
- MEB:** microscope électronique à balayage
- MIC:** microbiologically influenced corrosion
- NACE:** National Association of Corrosion Engineers
- NAD:** Nicotinamide adénine dinucléotide
- NR-SOB:** Nitrate-reduicing, sulfide oxydizing bacteria
- PAPS:** Phosphoadenosine phosphosulfate.
- PCR:** Polymerase chain-reaction.
- PgB:** milieu de culture Postgate B sulfate
- PPM :** partie par million (en unites de masse).
- S₂O₃²⁻:** thiosulfate
- S₃O₃²⁻:** tri- thionate
- ST#203:** Puits Stah
- TFT#624:** Puits Tin Foui Tabankourt,
- THPS:** Tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium sulfate

Antagonistic activity of *Bacillus* sp. obtained from an Algerian oilfield and chemical biocide THPS against sulfate-reducing bacteria consortium inducing corrosion in the oil industry

Mohamed Lamine Gana · Salima Kebbouche-Gana ·
Abdelkader Touzi · Mohamed Amine Zorgani ·
André Pauss · Hakim Lounici · Nabil Mameri

Received: 9 August 2010 / Accepted: 20 September 2010
© Society for Industrial Microbiology 2010

Abstract The present study enlightens the role of the antagonistic potential of nonpathogenic strain B21 against sulfate-reducing bacteria (SRB) consortium. The inhibitor effects of strain B21 were compared with those of the chemical biocide tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS), generally used in the petroleum industry. The biological inhibitor exhibited much better and effective performance. Growth of SRB in coculture with bacteria strain B21 antagonist exhibited decline in SRB growth, reduction in production of sulfides, with consumption of sulfate. The observed effect seems more important in comparison with the effect caused by the tested biocide (THPS). Strain B21, a dominant facultative aerobic species, has salt growth requirement always above 5% (w/v) salts with optimal concentration of 10–15%. Phylogenetic

analysis based on partial 16S rRNA gene sequences showed that strain B21 is a member of the genus *Bacillus*, being most closely related to *Bacillus qingdaonensis* DQ115802 (94.0% sequence similarity), *Bacillus aidingensis* DQ504377 (94.0%), and *Bacillus salarius* AY667494 (92.2%). Comparative analysis of partial 16S rRNA gene sequence data plus physiological, biochemical, and phenotypic features of the novel isolate and related species of *Bacillus* indicated that strain B21 may represent a novel species within the genus *Bacillus*, named *Bacillus* sp. (EMBL, FR671419). The results of this study indicate the application potential of *Bacillus* strain B21 as a biocontrol agent to fight corrosion in the oil industry.

Keywords *Bacillus* · Antagonist · SRB consortium · Injection water · Biocide

M. L. Gana
Centre of Research and Development,
Biocorrosion Laboratory, Sonatrach,
Avenue of 1st November, 35000 Boumerdes, Algeria
e-mail: aminegana@yahoo.fr

S. Kebbouche-Gana (✉) · M. A. Zorgani
Department of Biology, University M'Hamed Bougara of
Boumerdes, 1st November Avenue,
35000 Boumerdes, Algeria
e-mail: kebbouchesalima@yahoo.fr

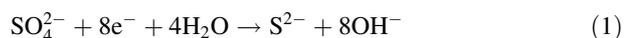
A. Touzi
Renewable Energy Research Unit in Saharan Area (URER.MS),
Route de Reggane, BP 478, 01000 Adrar, Algeria

A. Pauss
Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France

M. L. Gana · H. Lounici · N. Mameri
Laboratory of Environmental Biotechnologies,
10, Avenue Hacene Badi El-Harrach, Algiers, Algeria

Introduction

Souring is one of the main problems facing the petroleum industry, due to toxicity of sulfides (H₂S) and corrosiveness caused by sulfate-reducing bacteria (SRB). SRB are a ubiquitous group of anaerobes that reduce oxidized sulfur compounds, such as sulfate, sulfite, and thiosulfate, as well as sulfur, to H₂S. Although SRB are strictly anaerobic (obligate anaerobes), some genera tolerate oxygen and are even able to grow at low oxygen concentrations [6]. SRB utilize organic compounds or hydrogen as electron donor in sulfate reduction to sulfide according to Eq. (1) [62].



Beside sulfide production through sulfate reduction, SRB are also known to reduce thiosulfate to sulfide. This latter process, performed not only by SRB, was reported as

a major risk factor increasing biocorrosion processes [15, 21, 31]. SRB are a subject of concern and interest in the oil industry not only because of sulfide production, but also probably due to the ability of some of them to oxidize hydrogen and use O_2 and Fe^{3+} [22]. These bacteria could be responsible for H_2S production, which causes “souring” of crude oil, microbiologically influenced corrosion (MIC), and increased solids loading in water injection systems (iron sulfides, etc.), and can cause plugging of producer and injection wells with sulfide scale or biofilm proliferation.

In addition, souring lowers the economic value of produced oil and induces safety hazards [39, 52]. A number of methods for controlling sulfide production in different oil production facilities have been proposed to reduce microbial activity, including use of oxidizing (such as halogen and ozone) or nonoxidizing biocides (such as formaldehyde, glutaraldehyde, isothiazolones, and quaternary ammonia compounds) [73] and recently tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate (THPS) [18, 36, 46]. To prevent SRB growth, the Algerian oil industry spends up to US \$30 million annually on chemical products such as biocides. Among the oilfields worldwide that maintain their pressure by water injection are cited those located in the southern Algerian Sahara operated by Sonatrach Oil Company. These injection waters were treated with THPS biocide from start-up in 1999. The water injection pipeline system consists partly of carbon steel, and the amount of water injected varies between 13,000 and 15,000 m^3/day . Although biocide treatments are widely used to decrease biofouling and MIC in steel pipes [32, 35] and in closed systems [34], the results are far from satisfactory. This is because MIC occurs under adherent biofilms [20], and biocides are much less effective against sessile organisms within biofilms compared with against planktonic population [38] due to biofilm’s dramatically enhanced resistance to antimicrobial agents [25]. Besides the risk to human health, the efficacy of these biocides is questioned. In addition, microbial resistance to some of these products has been reported [36], where bacteria can change and modify their genetic features by undergoing periodic mutation and, after a period of time, become resistant to a given biocide. Al-Hashem et al. [1] differentiate between adaptation and developing resistance to a biocide from an antibiotic. It may be observed that bacteria would need to alter the structure of every protein in the cell to be able to resist a biocide. This would require the bacteria to undergo a large number of mutations at the same time, or in a short time, to become resistant to the biocide. Such patterns of mutations, however, must occur over time spans much longer than what is normally available in an industrial system. For these reasons, the search for biological methods has recently been started, based on two approaches. The first approach makes use of antagonistic interactions involving release of bactericidal substances

(antibiotics, lytic enzymes) by antagonist microorganisms [9, 69]. However, the success of such biocontrol and the yield increase achieved depend on the nature of the antagonistic properties and on the organism’s mechanisms of action. The modes of action vary widely and can include, for instance, nutrient competition and production of secondary metabolites [51]. For the second approach, the literature describes the antagonistic effects of several microorganisms, often referred to as potential biocontrol agents, against a variety of microorganisms [47]. Among microorganisms producing metabolites with antifungal activity, bacteria of the genera *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Bacillus* have been shown to be effective against wood blue-stain fungi [33, 68]. Secondary metabolites produced by certain species and strains of *Bacillus* show antifungal and antimicrobial activity against phytopathogenic microorganisms [61].

Many *Bacillus* species produce bacteriocins [79]. Bacilli grow quickly on nutrient-rich cultivation media such as tryptic soy agar (TSA), plate count agar, or nutrient agar at 37°C. Some physicochemical conditions are used for bacterial isolation in many studies [17, 71]. Some authors have suggested that the use of such strains or species, or their metabolites, may be an alternative to agrochemical plant protection [9, 47]. Other metabolites, such as biosurfactants and enzymes that degrade the cell wall, are also produced by *Bacillus* species [47]. Antibiotics produced by *Pseudomonas* and *Streptomyces* species have also been described; Benko [7] tested more than 200 bacteria of different genera for antibiosis and observed *Pseudomonas* and *Streptomyces* spp. to be the most active.

Another promising way of using microorganisms for this purpose employs protective biofilms formed by some microorganisms. It was shown that biofilms produced by *Escherichia coli* and *Pseudomonas fragi* reduced corrosion losses by a factor of 4 to 40 [42]. Examination of 42 organochemotrophic bacterial strains isolated from biofilms and water of industrial cooling systems demonstrated a decrease in metal corrosion in the presence of most of these microorganisms [63].

Furthermore, Rodin et al. [64] demonstrated that cocultivation of destructor microorganisms and their antagonists decreases the corrosion loss of carbon steel by 20% to 80%. It was found that a microorganism can either accelerate or inhibit corrosion, depending on the nutrients present. The magnitude of the effect on corrosion depends on the ability of the microorganism to respond to changes in the nutrient medium composition by releasing acidic or alkaline metabolites [64].

Moreover, Jayaraman et al. [43] studied the ability of genetically engineered *Bacillus* strains to inhibit SRB growth by secreting antimicrobials, characterized by using concentrated supernatant phases of the recombinant strains to inhibit exponential growth of SRB in suspension cultures

and by measuring the reduction of populations consisting of representative SRB (*Desulfovibrio vulgaris* and *D. gigas*) in biofilms, finding significantly reduced corrosion rates under continuous culture conditions. Jayaraman et al. [43] showed that antimicrobial peptides produced by the gramicidin-S-overproducing *Brevibacillus brevis* 18 strain inhibited formation of a corrosive biofilm on steel by sulfate-reducing *Desulfovibrio vulgaris* in modified Baar's medium. The same authors [43] suggested the production of a protective biofilm by an antimicrobial-producing primary colonizer (*B. brevis* 18) as an attractive alternative to conventional biocides for corrosion control.

Zuo [80] presents a review and summarizes recent progress using this novel strategy of corrosion control using beneficial bacterial biofilms. He explains that the possible mechanisms may involve: removal of corrosive agents (such as oxygen) by bacterial physiological activities (e.g., aerobic respiration), growth inhibition of corrosion-causing bacteria by antimicrobials generated within biofilms [e.g., inhibition of corrosion by sulfate-reducing bacteria (SRB) due to gramicidin-S-producing *Bacillus brevis* biofilm], and generation of protective biofilm layers (e.g., *Bacillus licheniformis* biofilm produces a sticky protective layer of γ -polyglutamate on aluminum surface). Zuo [80] confirmed that successful use of this novel strategy relies on advances in study at the interface between corrosion engineering and biofilm biology.

Generally, antagonist microorganisms have been successfully used in agriculture. This provides the basis for using this approach in other fields, such as combating MIC. In this study, we attempted to evaluate the potential for use of antagonists to reduce the activity of sulfate-reducing bacteria (SRB) and the corrosiveness of the resulting sulfides (H₂S) to protect metals from biocorrosion. The objectives of this study are to assess the feasibility of using microbial antagonists in the fight against biocorrosion, and to compare the results achieved with those of the effect of the last generation of THPS biocide on sulfate-reducing bacteria and thus to demonstrate importance and relevance of the biological treatment.

Materials and methods

Injected water samples and chemical analysis

Four water samples were collected from four different oilfields located in the southern Algerian Sahara: Hassi Berkine (sample 1), Hassi Messaoud (sample 2), Tin Fuin Tabankort (sample 3), and In-Amenas (sample 4). The injection water samples were collected in sterile glass bottles, which were filled completely to prevent contact with air, then sealed with rubber stoppers. They were

transported by ice box to the laboratory and stored at -20°C . The analytical method used in this study was based in detail on 4500-S⁻² F standard methods, as described elsewhere [2].

Water injection for flooding and pressure support is a key element of oilfield operation. Formation (reservoir) waters in most oil production fields are typically hypersaline chloride-type waters that contain alkaline cations such as calcium, strontium, and barium. Potable water injection, although an expensive option for onshore fields, could damage reservoir formation (incompatible salinity). Table 1 presents the chemical composition of injection and aquifer water samples from the Algerian Sahara oilfields.

Isolation of bacteria, media composition, and culture condition

Culture of the sulfate-reducing bacteria

For this purpose we used an SRB consortium, previously obtained in a modified Postgate's SRB medium, from sample 4. This was chosen because it contains the highest sulfate concentration; moreover, In-Amenas oilfield was more affected by a microbiological charge induced by the

Table 1 Chemical composition of injection water samples collected from four sites of oil areas in the southern Algerian Sahara

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Analyte (mg/L)				
Barium	0	0	0	0
Calcium	267.6	197.5	187.3	834
Iron	0.03	0	0.1	0
Magnesium	58.8	62.5	163.4	311
Potassium	68	52	39	65
Sodium	760	830	300	7,250
Strontium	3.1	4.3	2.1	/
Bicarbonate	164.1	178.1	165.9	198
Phosphorous	3.0	2.3	4.3	3.5
Ammonia nitrogen	11.5	12	11	12.75
Nitrate	41	23.2	33.5	45.5
Nitrite	14.3	12.3	11.65	15.5
Carbonate	0	0	0	0
Propionate	<5	<5	<5	<5
Chloride	1,428.2	926.1	670.9	11,275
Sulfate	100	1,200	600	2,200
pH in situ	6.90	7.00	7.30	7.00
Temperature in situ (°C)	45	46	50	35
Salinity (g/L)	3.54	0.92	2.51	2.07

SRB than other oilfields. It will promote optimal growth of these bacteria. Organisms issued from the fields were isolated in Postgate's medium and then diluted to extinction in a most probable number (MPN)-type serial dilution using the same medium. After 28 days of incubation at 37°C, the last positive vial in this initial dilution series was then used to inoculate a second MPN-type series of the same medium. This technique allowed isolation of the most dominant SRB species (able to grow in the medium) in the original sample.

Isolation and identification of antagonist bacteria

Complex medium (CM) [67] at pH 7.0 and containing 12% (w/v) NaCl was used for bacterial enrichment and growth. A reservoir water aliquot from the In-Amenas production oil reservoir was first inoculated into the liquid medium and cultured on a shaker (120 strokes min⁻¹) at 37°C in the dark until turbid, then streaked onto solid medium to obtain single colonies. The streaking was repeated several times to obtain pure single colonies. Morphologically dissimilar colonies were selected randomly from all plates, and isolated colonies were purified using appropriate medium by streaking methods. The pure cultures were maintained in slants for further analysis. Three genera were isolated and identified from In-Amenas injection water by biochemical tests: *Bacillus* sp. (strain B21), *Halomonas* sp., and *Vibrio* sp. Strain B21 was selected for further study and was identified by 16S rDNA gene analysis as *Bacillus* sp.

The purified strain B21 was cultured and maintained in liquid or solid American Type Culture Collection (ATCC) 213 medium [37] at pH 7.0, with 12% (w/v) NaCl, in the dark. Cell morphology was determined by using phase-contrast microscopy. Gram staining was performed according to Dussault [27], and electron microscopy was performed with negative staining according to Bouchotroch et al. [13]. Bacterial growth was determined by measuring absorbance at 600 nm at certain intervals during liquid culture. The effects of different NaCl concentrations on strain B21 growth were tested in liquid ATCC 213 medium by measuring absorbance at 600 nm after 7 days of incubation. Susceptibility of strain B21 to different antibiotics, including ampicillin, tetracycline, hygromycin, kanamycin, streptomycin, rifampicin, bacitracin, penicillin, chloramphenicol, neomycin, and erythromycin (Sigma), was tested on solid ATCC 213 medium after 3 days of incubation at 37°C.

Physiological and biochemical tests were performed as described by Buchanan and Gibbons [14] and Dong and Cai [23]. Strain B21 anaerobic growth with nitrate as electron acceptor was tested according to the method of Mancinelli and Hochstein [50]. Growth with dimethyl sulfoxide (DMSO) and by L-arginine fermentation

as alternative electron acceptors was tested as described by Oren et al. [57] and Oren and Trüper [56] using closed tubes fully filled with the growth medium and then kept in the dark for 3 weeks before comparison of growth with that found on medium lacking the test compounds.

Amplification, cloning, and sequencing of 16S rRNA gene

Genomic DNA was extracted according to Ausubel et al. [5]. Amplification of gene encoding for small subunit ribosomal RNA was done using eubacterial 16S rDNA primers [forward primer 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' (*Escherichia coli* positions 8–27), reverse primer 5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT3' (*E. coli* positions 1494–1513)] [76]. Polymerase chain reaction (PCR) was performed with a 50 µl reaction mixture containing 2 µl (10 ng) DNA as the template, each primer at concentration of 0.5 µM, 1.5 mM MgCl₂, and each deoxynucleoside triphosphate at concentration of 50 µM, as well as 1 µl Taq polymerase and buffer as recommended by the manufacturer (MBI Fermentas). PCR was carried out using a Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany) with the following program: initial denaturation at 95°C for 1 min; 40 cycles of denaturation (1 min at 95°C), annealing (1 min at 55°C), and extension (2 min at 72°C); followed by final extension at 72°C for 5 min.

The amplified product was purified using GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences) and cloned in pTZ57R/T vector according to the manufacturer's instruction (InsT/AcloneTM PCR Product Cloning Kit, MBI Fermentas), and transformants were selected on Luria-Bertani (LB) medium containing ampicillin (100 µg/ml) and X-gal (80 µg/ml).

Phylogenetic analysis was performed using the software package BioNumerics (Applied Maths, Belgium) after including the sequence as received in an alignment of small ribosomal subunit sequences collected from the international nucleotide sequence library EMBL. This alignment was calculated pairwise using an open gap penalty of 100% and a unit gap penalty of 0%. Similarity matrix was created by homology calculation with a gap penalty of 0% and after discarding unknown bases. A resulting tree was constructed.

Biological inhibition assay (coculture) and chemical inhibition

Preparation of different biocide concentrations

In the present study, commercially available inhibitor THPS, generally used to protect petroleum facilities, was

evaluated to determine the nature of inhibition. Tetra-kishydroxymethylphosphonium sulfate (THPS) is a quaternary phosphonium; it disrupts cell membrane with a rapid uptake mechanism through cell wall and inhibits lactate dehydrogenase activity [24, 34]. The biocide was obtained from Sigma (St. Louis, MO). From pure THPS solution, a stock solution of 10^4 mg/L was prepared. From this stock solution, serial dilutions were prepared to obtain THPS concentrations of 5, 10, 20, and 50 mg/L (v/v), which were used to perform the inhibition tests (chemical treatment).

Coculture tests

To compare difference between biological and chemical treatments, seven sets were conducted in Erlenmeyer flasks containing 100 ml injection water, each sample of the fourth contains respectively, 100, 600, 1,200, and 2,200 mg/L sulfate. These samples were inoculated with SRB. In each test the optical density of the first SRB inoculate was 0.055 at 600 nm (initial load $\sim 1.9 \times 10^5$ cells ml^{-1}). These preparations were further inoculated with strain B21 at different concentrations and secondly by biocide THPS at different concentrations as well.

The antagonist cultures of strain B21 inoculate were prepared by growth on medium M4, containing (w/v): 10.3% NaCl, 1.8% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.025% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.019 KCl, and 0.05% peptone (Difco). pH was adjusted to 7.2. Cultures were incubated at 37°C in an orbital shaker (New Brunswick Scientific) at 200 strokes min^{-1} . After reaching late exponential phase, which lasts about 18 h, cells were harvested under sterile conditions by centrifugation at 6,000 g, washed, and resuspended in small amounts of sterile peptone (0.05%, w/v) in water. The optical density of each strain B21 inoculate was 0.050 at 600 nm (initial load $\sim 1.8 \times 10^5$ cells ml^{-1}). After inoculating each medium with 2 ml cell suspension (2% concentration), the inoculants were added to the corresponding flasks (50 ml medium, each taken in 100-ml conical flasks). Subsequently, we followed the growth kinetics of SRB consortium with addition of the biological inhibitory (strain B21) at different inoculum concentrations of 2%, 5%, and 6%. In the second assay, we controlled the growth kinetics of SRB consortium by adding the chemical inhibitory THPS at different concentrations of 5, 10, 20, and 50 mg/L. All the Erlenmeyer flask medium sets (with and without inhibitor) were transferred to an anaerobic hood under 5% H_2 , 10% CO_2 , 85% N_2 atmosphere. Cultures (in triplicate) were incubated at 37°C on a rotary shaker (100 strokes min^{-1}). The SRB growth kinetics was followed for 12 days. At required intervals, the flasks from each test were removed and various analyses were carried out immediately. For each realized test, a control was also used.

Quantitative determinations

Enumeration of sulfate reducers and analytical procedures

SRB microbial counts were performed (following most experiments) using the five-tube most probable number (MPN) method [41] using mCSB. Medium was prepared, autoclaved, distributed into 10-ml open-capped glass tubes, inoculated, and transferred to an anaerobic hood (Coy Laboratory Products) under 5% H_2 , 10% CO_2 , 85% N_2 atmosphere. The tube sets were inoculated with liquid samples taken from the sets of cocultures with and without antagonist strain B21 or biocide (THPS). Following 3 weeks of incubation, tubes that became turbid were scored positive for growth. SRB enumeration by plate-counting used the same medium with 15 g/L agar. Following pouring, plates were air-dried and then transferred to the anaerobic hood. Plates were inoculated in the anaerobic hood by spreading 100 μl from each of the freshly prepared MPN dilutions onto the plates. Colonies were counted following 3 weeks of incubation.

Sulfide and sulfate concentrations were determined by spectrophotometry as described elsewhere [2, 40, 53]. A culture sample was collected daily from vials containing cocultures with and without biological and chemical antagonists.

Statistical analysis

Data are presented as arithmetic averages of at least three replicates, and error bars indicate standard deviation. Analyses were carried out using Microsoft Excel software, SMBios (version 2.4).

Results

Characterization of isolate

Sample 4 was used to enable isolation of antagonistic bacteria belonging to genus *Bacillus* (strain B21). This strain grew at salt concentrations in the range 5–25% (w/v) NaCl; optimum growth occurred on media containing 10–15% (w/v) NaCl. No growth was observed in the absence of NaCl. Colonies obtained were cream in color, smooth, low-convex, and circular/slightly irregular on the modified nutrient agar medium containing 15% (w/v) NaCl. Strain B21 grew at pH values in the range of 6.5–7.5 in 15% (w/v) NaCl-containing tryptic soy broth; optimal growth was observed at pH 7.1. Morphological and phenotypic characteristics suggested that the isolate is a halophilic member of the *Bacillus* genus. Growth was observed at temperatures between 25°C and 45°C ; optimum growth was at 37°C . Cells of the isolate

were Gram-positive, slender, short rods, 0.3–0.5 mm wide, and 1.3–1.9 mm long, and were facultatively anaerobic. Spherical terminal endospores were produced. The strain is oxidase negative and catalase positive, and negative for hydrolysis of soluble starch, gelatin, Tweens 20 and 80, production of H₂S, and indole. It is positive for hydrolysis of urea, arginine, and for nitrate reduction. It utilizes, and produces acid, from sucrose, D-glucose, D-fructose, D-galactose, cellobiose, D-mannose, D-mannitol, D-galactose, lactose, D-xylose, and dextran as sole carbon source. Voges–Proskauer and methyl red reactions were negative. Growth of strain B21 could be inhibited by the antibiotics rifampicin, penicillin, hygromycin, ampicillin, and bacitracin. No inhibition was observed when the strain was grown in the presence of kanamycin, erythromycin, streptomycin, tetracycline, chloramphenicol or neomycin. Comparison of the phenotypic and physiological properties of strain B21 with those of the type strains of three closely related *Bacillus* species is shown in Table 2.

A partial (529 bp) 16S rRNA gene sequence (EMBL, FR671419) was obtained for strain B21 and was used for initial BLAST searches in GenBank and for phylogenetic analysis. The phylogenetic tree was constructed using neighbor-joining [65] and revealed that strain B21 formed a phyletic group with *Bacillus qingdaonensis* DQ115802

(94.4% sequence similarity), *Bacillus aidingensis* DQ504377 (94.0%), *Bacillus salarius* AY667494 (92.2%), and *Bacillus chagannorensis* AM492159 (89.1%) (Fig. 1). Strain B21 shared very low 16S rRNA gene sequence similarities (<95%) with the closely related type strains of *Bacillus* species; this is sufficient to allow the classification of this strain as a different species [70].

Kinetic growth of SRB consortium with addition of biological and chemical inhibitor

All experiments were conducted and performed in culture medium consisting of injection waters collected as mentioned in oil areas in the south of Algeria. In our study, waters present a wide sulfate concentration, and SRB growth and biological activity depend on sulfate. Also, a variability of sulfate concentration depends on the nature and origin of water injection. In general, SRB tend to synthesize one or more metabolic products. Biochemically, SRB transform sulfate to sulfide, catalyzed by adenosine phosphosulfate reductase. According to Postgate [62], these bacteria produce sulfides, after carbohydrate substrate degradation and internal cellular energy release.

The SRB consortium growth is presented in Fig. 2, with and without addition of biological and chemical inhibitors.

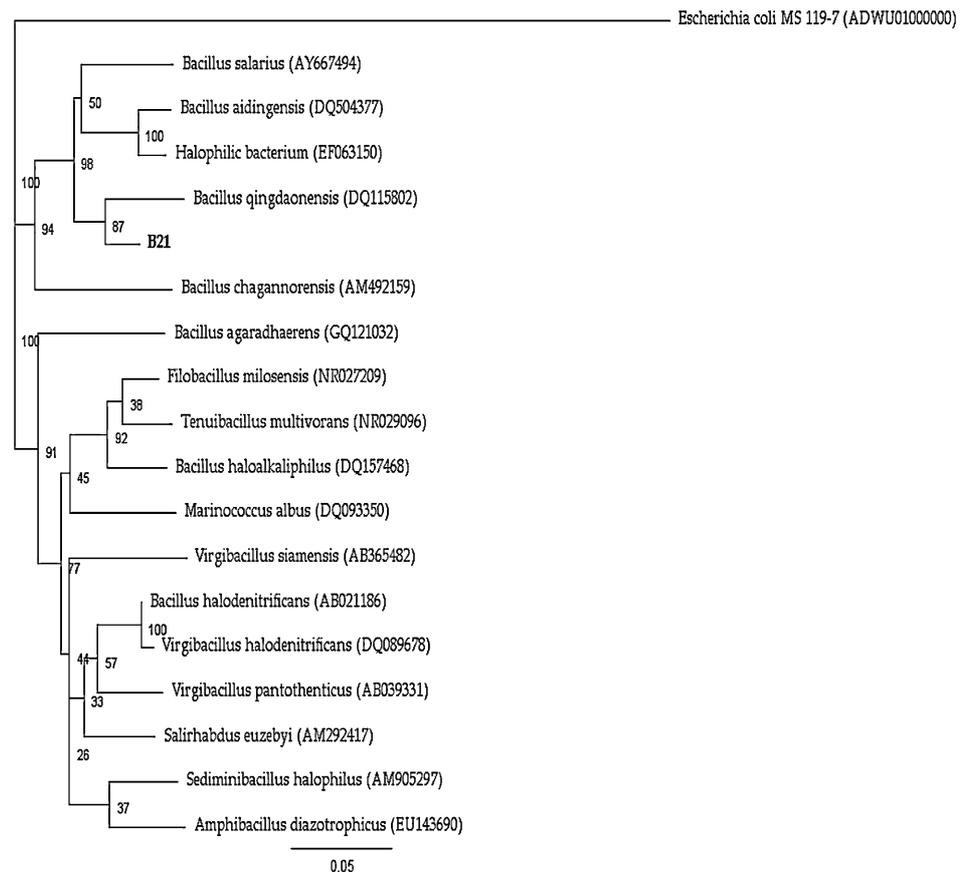
Table 2 Characteristics of strain B21 and related species

Characteristic	1	2	3	4	5
Cell morphology	Short rods	Rods	Short rods	Short-rod-shaped	Short rods
Colony color	Cream	Cream white to yellow	Cream white	Cream	Yellow–orange
Spore formation	+	–	+	+	+
Oxidase	–	–	–	+	–
Catalase	+	+	+	+	+
NaCl concentrations for growth (% w/v)	5–25	2.5–20	8–33	3–20	3–20
Minimum	5	2.5	8	3	3
Optimum	10–15	12	12	10–12	7
Maximum	25	20	33	20	20
Optimum temperature for growth (°C)	37	37	37	30	37
Nitrate reduction	+	+	+	–	+
H ₂ S production	–	–	+	ND	–
pH range	6.5–7.5	6.5–10.5	6.0–9.5	6.8–9.5	5.8–11.0
Optimum pH	7.0	9.0	7.2	8.0	8.5
Hydrolysis of					
Gelatin	–	–	+	ND	–
Urea	+	+	–	ND	ND
Tween 20	–	–	–	ND	ND
Tween 80	–	–	–	+	–

Strains: 1, B21; 2, *Bacillus qingdaonensis* DQ115802; 3, *Bacillus aidingensis* DQ504377; 4, *Bacillus salarius* AY667494; 5, *Bacillus chagannorensis* AM492159

Data from Wang et al. [75], Xue et al. [77], Lim et al. [48], Nielsen et al. [54], and this study. +, positive; –, negative; ND no data

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationships among strain B21 (*Bacillus* sp.) and related species. Bootstrap values are shown as percentages of 100 replicates. *Escherichia coli* MS 119-7 was used as an outgroup



The cell density evaluation revealed bacterial growth varying with time and for different injection water samples containing 100 mg/L (S1), 600 mg/L (S2), 1,200 mg/L (S3), and 2,200 mg/L (S4) sulfate. These waters were inoculated with the same concentration of SRB consortium (initial load $\sim 1.9 \times 10^5$ cells ml^{-1}). The curves in Fig. 2 reveal significant differences in cell growth behavior.

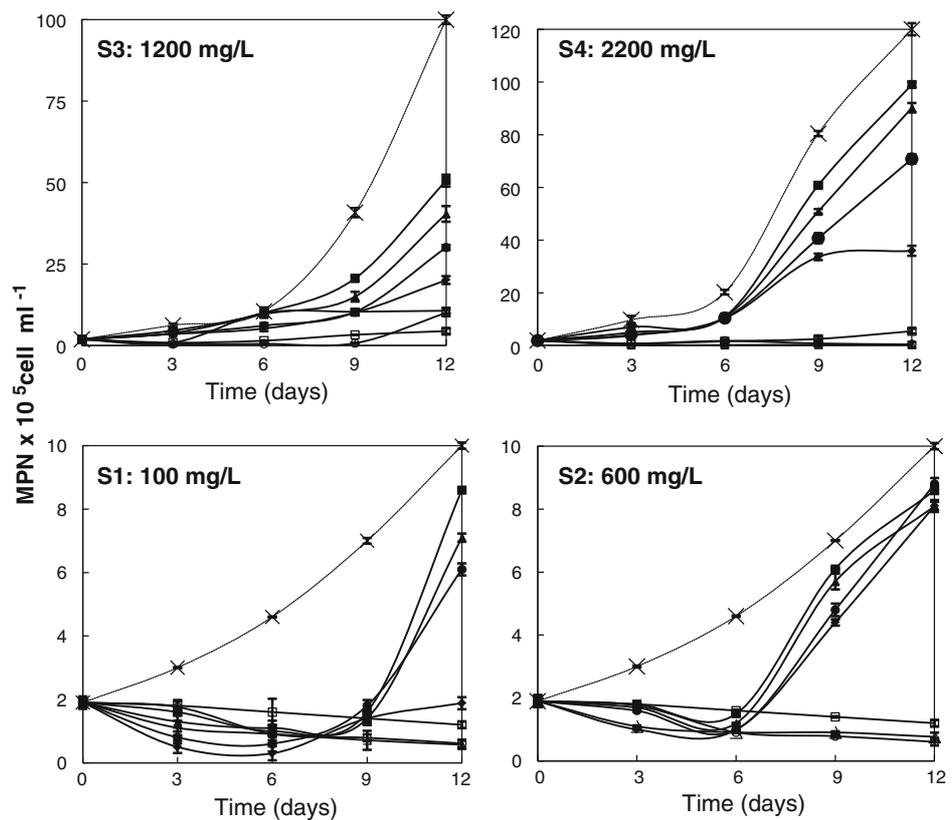
We also noticed that, during the incubation time, the cell density increased progressively in all injection waters and for each sulfate concentration considered. The lag phase was absent, having occurred during preculture. However, it is worth noting that growth was relatively dependent on the sulfate ion concentration present in the media, being largest (1.2×10^6 cells ml^{-1}) for the negative control medium containing 2,200 mg/L sulfate. Also, we noticed that, as the sulfate concentration decreased (from S4 to S1), the cell density decreased, reaching a minimum value (10^6 cells ml^{-1}) in all control tests, after 12 days of incubation.

During the cell density monitoring in the presence of biological and chemical inhibitors, we noticed that the cell density of the negative controls was higher than for cultures treated by either the bacterial antagonist or the biocide. We observed this phenomenon in all experiments. Thus, the cultures inoculated with the SRB showed higher

cell density compared with culture containing SRB and THPS. We found, also, that cell density values of waters treated by the biocide were much higher than those obtained in the cocultures containing SRB and strain B21, highlighting the inhibitor effect on the SRB consortium. The inhibition was remarkably strong. In the presence of biocide and in all experiments, SRB growth was reduced during the first 9 days, restarting thereafter. In the oil industry, the inhibition duration is generally considered important for optimization of THPS efficiency in injection waters contaminated by SRB [24].

On the other hand, in the presence of antagonistic bacteria cocultured with SRB, we noticed a significant decrease in cell density in all injection waters. We can explain this by the fact that the effect caused by the bacterial antagonist is of either bactericidal or bacteriostatic type as long as it is undergoing exponential growth. Furthermore, and after an incubation period exceeding just 3 days of coculture, we saw a decrease in SRB cell density in all tests of culture containing 2% and also in cocultures containing 5% and 6%. We observed that B21 inoculation reduced SRB growth during 12 days. Compared with THPS inhibition, strain B21 inhibition was very strong. For oilfield site efficiency tests, this is very advantageous.

Fig. 2 Growth kinetics of SRB consortium with addition of biological inhibitor (strain B21) at different concentration of inoculum: 2% (open squares), 5% (open triangles), and 6% (open circles). In the second assay, we estimated the growth kinetics of SRB consortium with addition of chemical inhibitor (THPS) at different concentrations: 5 mg/L (filled squares), 10 mg/L (filled triangles), 20 mg/L (filled circles), and 50 mg/L (filled diamonds). In all cases, a negative control was used (crosses). Each culture was grown at 37°C and 100 rpm in medium (sample of water) at different concentrations of sulfate (100, 600, 1,200, and 2,200 mg/L). Reported values are averages of three replicates



Moreover, Fig. 3 shows that the SRB reduced sulfate to sulfide, using ion sulfate as final electron acceptor. They are the only bacteria reducing sulfate ions present in waters. In the presence of the ions sulfates, the SRB synthesized ATP for their metabolism, according to the dissimilation of sulfate biochemical reaction. Thus, the enzyme ATP sulfurylase induced generation of hydrogen sulfide (H₂S).

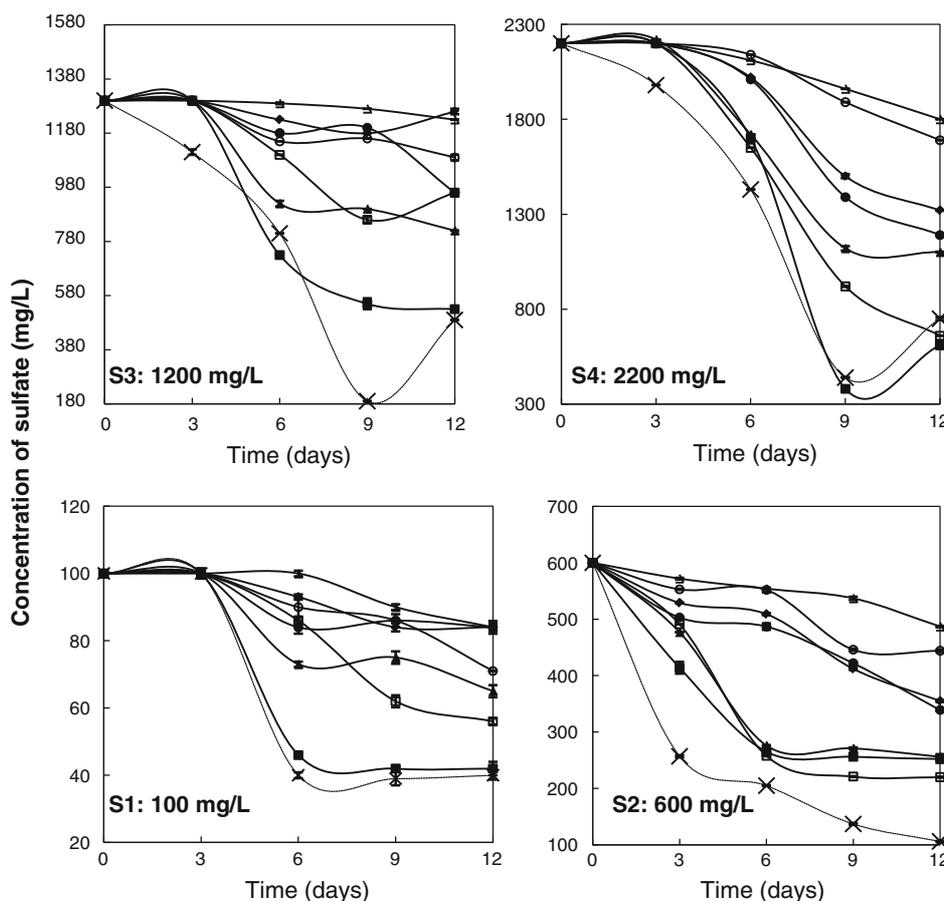
In agreement with Fig. 2, it was observed that the sulfate concentration evolution versus SRB consortium incubation time when cultivated without inhibitor in the four water media exhibited the same tendency. We also noticed that the sulfate concentration decreased with incubation time because it was used by SRB. Indeed, the amount of sulfate used was higher in water dosed at concentrations of 2,200 mg/L (S4) and 1,200 mg/L (S3) than at 600 mg/L (S2) and 100 mg/L (S1).

As shown in Fig. 3, the SRB degrade sulfate better in the presence of inhibitor, whatever its nature. In the biological treatment experiment, strain B21 probably tended to inhibit cellular activity by acting either on the wall or on the cytoplasmic membrane. There is competition for nutrients between the different microbial species in coculture. Figure 4 shows measurements of sulfide during the incubation of cocultures and controls to highlight the evolution of the sulfides in the four injection water samples. The rate of this phenomenon varies with time and

depends on the sulfate concentration in the medium. Adenosine phosphosulfate reductase is induced by SRB, but proportionally. At the end of the incubation time, the amount of sulfide released varied with the sulfate concentration; the highest sulfide concentration (0.66 mg/L) was obtained in the medium containing the highest sulfate concentration (S4, 2,200 mg/L), whereas the lowest (0.142 mg/L) sulfide concentration was founded in the medium containing less sulfate (S1, 100 mg/L). Regarding the other two media, sulfide concentrations were intermediate, corresponding to S2 and S3.

Comparison of the sulfide production kinetics in the injection waters used for SRB cultivation with and without chemical or biological inhibitor showed that SRB became less corrosive at low sulfide concentrations. In general, the inhibitor concentration has a direct influence on sulfide production. Indeed, the sulfide concentration decreased significantly with increasing inhibitor concentration. The presence of sulfate in the injection waters presents a number of problems due to the activity and growth of SRB. SRB use sulfate as terminal electron acceptor during organic matter oxidation, resulting in production of hydrogen sulfide. The presence of H₂S produces a wide range of biological and physicochemical problems, including precipitation of non-alkali metals, odor, and corrosion of pumps and pipes. In all cases, gradual consumption of sulfate by SRB was noted.

Fig. 3 Kinetics of consumption of sulfate by SRB consortium with addition of biological inhibitor (strain B21) at different concentration of inoculum: 2% (open squares), 5% (open triangles), and 6% (open circles), or addition of chemical inhibitory THPS at different concentrations: 5 mg/L (filled squares), 10 mg/L (filled triangles), 20 mg/L (filled circles), and 50 mg/L (filled diamonds). In all cases, a negative control was used (crosses). Each culture was grown at 37°C and 100 rpm in medium as sample of water at different concentration of sulfate (100, 600, 1,200, and 2,200 mg/L). Reported values are averages of three replicates



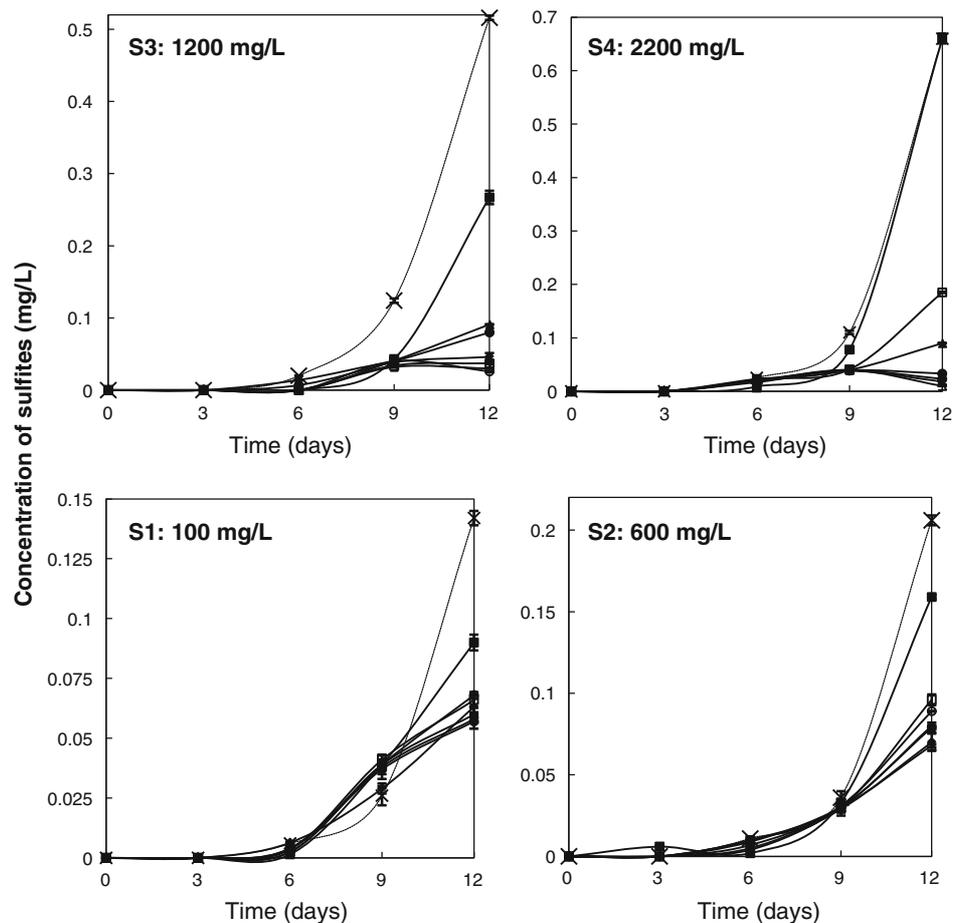
For instance, after 12 days of growth in medium S1, the residual sulfate reached 40 mg/L in control. Using 2% inoculum of strain B21 resulted in consumption of sulfate by SRB, with the sulfate concentration decreasing from 100 to 56 mg/L (Fig. 3). Similarly, when we used 5 mg/L THPS, we observed a decrease in this concentration from 100 to 42 mg/L. This shows the inhibitory effect of strain B21 on sulfate consumption. The same reasoning can be adopted with the other media (S1, S2, S3, and S4). On the other hand, Fig. 4 shows that the sulfide production inhibition follows an opposite argument to the inhibition of sulfate consumption. Sulfide production during metabolism of SRB was slower in all tested waters compared with the control. This decreased rate of sulfide production was more pronounced in the presence of strain B21 compared with the biocide THPS, for all medium (S1, S2, S3, and S4).

Discussion

Production of oil from subsurface reservoirs requires water or gas injection to maintain reservoir pressure, and water is usually injected at onshore Algerian sites. The

combination of abundant electron donors (selected oil components) and electron acceptors (sulfate) can lead to significant sulfide production in the subsurface through the action of resident or injected sulfate-reducing bacteria (SRB). However, identification of SRB is not easy, because of their diversity. Actually, SRB form a complex ecophysiological group of prokaryotes with the common property of using sulfate as the main electron acceptor during anaerobic metabolism [29, 55]. They are adapted to a great variety of environments and contribute to the mineralization of 50% of organic matter. SRB form an assemblage of more than 200 species with great variety of morphology and metabolism, including Gram-negative mesophilic SRB, Gram-positive spore-forming SRB, thermophilic bacterial SRB, and thermophilic archaeal SRB [16]. However, SRB are not the only bacteria found, as it has been shown [10, 30] that many bacteria isolated from marine biofilms are phylogenetically close to some type strain species that are members of the *Enterobacteriaceae* family. These isolated bacteria are able to produce sulfide ions in anaerobic conditions by sulfate reduction, so it is important to discriminate all bacteria able to reduce sulfate. Sulfide is produced by SRB, presumably in

Fig. 4 Production kinetics of sulfite by SRB consortium with addition of biological inhibitor (strain B21) at different concentration of inoculum: 2% (open squares), 5% (open triangles), and 6% (open circles), or addition of chemical inhibitory (THPS) at different concentrations: 5 mg/L (filled squares), 10 mg/L (filled triangles), 20 mg/L (filled circles), and 50 mg/L (filled diamonds). In all cases, a negative control was used (crosses). Each culture was grown at 37°C and 100 rpm in medium as sample of water at different concentration of sulfate (100, 600, 1,200, and 2,200 mg/L). Reported values are averages of three replicates



the zone where sulfate-containing injected water mixes with organic-containing formation water.

Biogenic production of H_2S in oil reservoirs subjected to water flooding (souring) is a serious concern in the oil industry, with the toxicity of H_2S , accelerated corrosion of pipelines, production, and processing equipment, decreased secondary oil recovery efficiency due to plugging of oil-bearing strata by biomass, and precipitation of metal sulfides being some of the associated problems. Furthermore, the necessity for H_2S removal prior to oil and gas use and before recycling of produced water increases production costs. Sulfate-reducing bacteria (SRB) are believed to be major players in souring of oil reservoirs. Our study has shown that, whatever the concentration of sulfate present in the culture media, growth of SRB is always optimal and favorable. This growth was strongly inhibited by the bacterial antagonist strain B21, identified as an extremely halophilic Gram-positive bacterium isolated from injection water collected in In-Amenas locality, Algeria.

Biocides are synthetic antimicrobial compounds that are used to protect industrial systems such as water-treatment or

metal-working-fluid systems [12]. So, in the Algerian petroleum industry, the chemical biocide THPS at concentrations of 5–50 mg/L exhibited excellent activity against problems caused by microorganisms. In particular, it is extremely effective against SRB, a major cause of hydrogen sulfide souring and corrosion. Formulations containing THPS may be used in many applications where microbiological contamination is present, and they have extensive use in enhanced oil recovery injection water systems, topside recovery systems, pipeline protection, and storage. However, these expensive products are toxic and not environmentally friendly. The mechanisms by which biocides and preservatives work have generally been classified as either membrane active or electrophilic [66]. This biocide acts on the bacterial cytoplasmic membrane, a very delicate organelle that is highly active metabolically and which acts mainly as a selective permeability barrier between the cytosol and the cell's external environment [24]. Any membrane-active agent can induce damage by action upon membrane potentials, bound enzymes or permeability. The results of some studies indicate that

pyrithione biocides are able to disrupt membrane function of Gram-negative bacteria. In addition to and simultaneously with this disruption, these compounds can also chelate potassium ions from the medium [24]. A combination of these two events may explain some of the inhibitory effects of this biocide upon bacterial cells [24].

Use of bacterial antagonists is rarely mentioned. From some reports, it is known that some SRB, such as *Desulfovibrio desulfuricans* [28] and *Desulfovibrio gracillis* [26], are capable of reducing nitrate. Some methods have been proposed and exercised to use nitrate-reducing bacteria (NRB) against SRB. Two examples of these methods are biocompetitive exclusion and bio-augmentation [49]. Little et al. reported successful trials of biocompetitive exclusion as exercised on oil platforms, where corrosion rates were reduced by at least 50% [49]. On the other hand, with respect to bio-augmentation, although researchers such as Hubert et al. [39] have reported failures regarding introduction of bacteria into natural mixed cultures, Zhu et al. [78] reported simultaneous application of nitrate and denitrifying bacteria as “the most effective way” for controlling MIC induced by SRB. However, research in this area remains incomplete. Use of *Bacillus* species is regarded very favorably, for example, in paper products, where they are frequently the dominant microbial contaminant [60] because their heat-resistant spores survive the hot drying process. Mechanisms by which the bacilli are retained in the industrial environment are not known. Some *Bacillus* species are resistant to several industrial biocides [58], and some form biofilms that offer protection against antimicrobial agents [19]. The biosurfactants produced by *Bacillus* genus are lipoproteins or lipopeptides, such as surfactin and subtilisin produced by *Bacillus subtilis* [11]. *Bacillus subtilis* excretes biosurfactant in both liquid- as well as solid-state fermentation systems [45]. The microbial surfactant produced by these organisms also shows properties of a good cleansing agent for dislodging pesticides from used containers, mixing tanks, cargo docks, etc. Attempts have also been made to standardize parameters for biosurfactant production in both liquid- and solid-state fermentations. Strain B21 has been mentioned as producing biosurfactants, although the nature of these biosurfactants has not been elucidated [44].

The strain B21 part of the moderately halophilic bacteria that grow in media containing 3–15% (w/v) salts are widely distributed in hypersaline habitats. These organisms are of considerable interest because of their biotechnological potential for production of compatible solutes and/or hydrolytic enzymes [72]. Moderate halophiles constitute a highly heterogeneous physiological group that includes both Gram-positive and Gram-negative microorganisms. Aerobic, spore-forming, moderately halophilic, and Gram-positive rods are also taxonomically diverse and have been

isolated from saline environments such as soils and aquatic habitats [4]. The introduction of molecular methods, especially the use of 16S rRNA gene sequencing, has had a major impact on *Bacillus* taxonomy and has resulted in a splitting up of the genus. Based on their activity against SRB in suspension cultures, the biological inhibitor strain B21 tested in this study seems to be more potent at comparable (inocula) concentrations than commercially available antibiotics (e.g., kanamycin, nalidixic acid, tetracycline) and about as effective as the tested biocide [3]. This inhibition, which may be due to the production of antimicrobial substances, was neither suspected nor sought. The genus *Bacillus* is known for its production of antibiotics and/or hydrolytic enzymes. Secretion of enzymes and antibiotics may interact synergistically in this process [8]. Thus, Postgate [62] compiled lists of antimicrobials which are inhibitory to various SRB, which include the peptide polymyxin B (that inhibits *Desulfovibrio vulgaris* at 100 mg ml⁻¹).

Moreover, it is also worth mentioning another antagonism class bonded to the substrate. In a natural environment, such as soil and water, which is inhabited by a mixed microbiological population, numerous relations of association and antagonism occur. All organisms inhabiting such a medium are affected, directly or indirectly, by one or more of the other constituent members of this population. These relationships were at first visualized as due primarily to competition for nutrients, as well expressed by Pfeffer [59]. Waksman [74] suggested that this is a problem of food competition. When two organisms are capable of utilizing the same nutrients (in this case, sulfate), but are differently affected by environmental conditions, such as reaction, air supply, and temperature, the one that finds conditions more suitable for its development will grow more rapidly, and in time be able to suppress the other. However, it soon became clear that antagonism among microorganisms embraces phenomena other than mere competition due to exhaustion of nutrients. So, we suggested that there exists a typical constant number of living cells capable of living in a given space. When this concentration is reached, multiplication comes to a standstill without the nutrients being exhausted or toxic substances being produced. The same is believed to hold true when two bacteria live together [74]. If the limiting concentrations of the two organisms are different, the one with a higher M value will repress the other; the weaker species may check the stronger one when present in sufficient excess [74]. It has been suggested that “biological activity” and “competitive capacity” must also be taken into consideration [74]. Antagonism may be either one-sided or two-sided, namely, when only one bacterium represses another, which is not antagonistic to it, or when each organism represses the other [74]. Therefore, the assay

showed promising results for use of strain B21 as an antagonistic agent against SRB responsible for MIC. Strain *Bacillus* sp. was selected for one trait often associated with biocontrol agents and for the probable ability to produce extracellular metabolites active against other microorganisms.

Conclusions

The present paper focuses on the antagonistic potential of a nonpathogenic *Bacillus* sp. strain against SRB consortium. Our study is the first such report from the petroleum industry; generally, the antagonist is used in the agriculture industry. *Bacillus* was chosen as the model target organism, because it is one of the important contaminants of injection water and has significant saline resistance and antagonism. The effects of the antagonism were studied at 37°C in four samples of injection water taken from four different oilfields in southern Algerian. The inhibitor effects of strain B21 were compared with those of the chemical biocide THPS, generally used in the petroleum industry. The biological inhibitor showed much better and effective performance.

References

- Al-Hashem AH, Carew J, Al-Borno A (2004) Screening test for six dual biocide regimes against planktonic and sessile populations of bacteria. Paper no. 04748. CORROSION 2004, NACE International, USA
- American Public Health Association (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st edn. American Waterworks Association and Water Pollution Control Federation, Baltimore, MD
- Angell P, White DC (1995) Is metabolic activity by biofilms with sulfate-reducing bacterial consortia essential for long-term propagation of pitting corrosion of stainless steel. *J Ind Microbiol* 15:329–332
- Arahal DR, Ventosa A (2002) Moderately halophilic and halotolerant species of *Bacillus* and related genera. In: Berkeley R, Heyndrickx M, Logan N, De Vos P (eds) Applications and systematics of *Bacillus* and relatives. Blackwell, Oxford, pp 83–99
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seideman JG, Struhl KE (1988) Current protocols in molecular biology. Wiley, New York
- Beech IR, Sunner J (2004) Biocorrosion, towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr Opin Biotechnol* 15:181–186
- Benko R (1988) Bacteria as possible organisms for biological control of blue stain. International research group on wood preservation. Doc. no IRG/WP/1339, pp 1–12
- Benyagoub M, Benhamou N, Carisse O (1998) Cytochemical investigation of the antagonistic interaction between a *Microspira* sp. (isolate P130A) and *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 88:605–613
- Berger F, Li H, White D, Frazer R, Leifert C (1996) Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* Cot1 in high-humidity fogging glasshouse. *Phytopathology* 86:428–433
- Bermond-Tilly D, Janvier M, Braisaz T, Dupont-Moral I (2003) Microbially influenced corrosion: studies on bacteria isolated from seawater environment. Eurocorr, Budapest, Hungary, p 198
- Bernheimer AW, Avigad LS (1970) Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 61:361–369
- Block SS (1991) Preservatives for industrial products. In: Block SS (ed) Disinfection, sterilization, and preservation. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, pp 608–655
- Bouchotroch S, Quesada E, del Moral A, Llamas I, Bejar V (2001) *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1625–1632
- Buchanan RG, Gibbons NE (1974) Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edn. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 269–272
- Campaignolle X, Caumette P, Dabosi F, Crolet JL (1996) The role of thiosulfate on the microbially induced pitting of carbon steel. In: Proceedings of corrosion/96, paper no. 2, NACE international, Houston, TX, pp 1–14
- Castro HF, Williams NH, Ogram A (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 31:1–9
- Chaudhary A, Gupta LK, Gupta JK, Banerjee UC (1997) Studies on slime-forming organisms of a paper mill—slime production and its control. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18:348–352
- Cooling FB, Maloney CL, Negel E, Tabinowski J, Odom JM (1996) Inhibition of sulfate respiration by 1, 8-dihydroxyanthraquinone and other anthraquinone derivatives. *Appl Environ Microbiol* 62:2999–3004
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711–745
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322
- Crolet JL, Magot M (1996) Non-SRB sulfidogenic bacteria in oilfield production facilities. Congrès CORROSION/95, Orlando, Florida, ETATS-UNIS, vol 35, no 3, pp 60–64
- Dihn HT, Kuever J, Mubmann M, Hassel AW, Stratmann M, Widdel F (2004) Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature* 427:829–832
- Dong XZ, Cai MY (2001) Manual of the identification of general bacteria. Scientific, Beijing
- Downward BL, Talbot RE, Haack TK (1997) Tetra-kishydroxymethylphosphonium sulfate (THPS), a new industrial biocide with low environmental toxicity, paper no. 401. In: Corrosion/97. NACE International, Houston, TX
- Dunne WM (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately. *Clin Microbiol Rev* 15:155–166
- Dunsmore BC, Whitfield TB, Lawson PA, Collins MD (2004) Corrosion by sulfatereducing bacteria that utilize nitrate. Paper no. 04763. CORROSION 2004, NACE International, USA
- Dussault HP (1955) An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J Bacteriol* 70:484–485
- Dzierzewicz Z, Cwalina B, Gawlik B, Wilczok T, Gonciarz Z (1997) Isolation and evaluation of susceptibility to sulfasalazine of *Desulfovibrio desulfuricans* strains from the human digestive tract. *Acta Microbiol Pol* 46:175–187
- Fauque G, Ollivier B (2003) Anaerobes: the sulfate-reducing as an example of the metabolic diversity. In: Bull AT (ed)

- Microbial diversity and bioprospecting. ASM, Washington, USA, pp 169–176
30. Fera P (1985) Etude expérimentale de la colonisation par les bactéries de surfaces immergées en milieu marin. Sciences biologiques fondamentales et appliquées, psychologie. UBO, Brest, p 212. A
 31. Fontana MG (1986) Corrosion engineering, 3rd edn. McGraw-Hill, New York
 32. Franklin MJ, Nivens DE, Vass AA, Mittelman MW, Jack RF, Dowling NJE, White DC (1991) Effect of chlorine and chlorine/bromine biocide treatments on the number and activity of biofilm bacteria and on carbon steel corrosion. *Corrosion* 47(2):128–134
 33. Freitas JR, Germida JJ (1991) *Pseudomonas cepacea* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Can J Microbiol* 37:780–784
 34. Frey R (1998) Award-winning biocides are lean, mean and green. *Today's Chem Work* 7(34–35):37–38
 35. Fusetani N (2004) Biofouling and antifouling. *Nat Prod Rep* 21:94–104
 36. Gardner LR, Stewart PS (2002) Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29:354–360
 37. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd edn, Release 5.0. New York, Springer. <http://141.150.157.80/bergeysoutline/main.htm>
 38. Hamilton WA (1985) Sulfate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Annu Rev Microbiol* 39:195–217
 39. Hubert C, Nemati M, Jenneman G, Voordouw G (2005) Corrosion risk associated with microbial souring control using nitrate or nitrite. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:272–282
 40. Hubert C, Nemati M, Jenneman GE, Voordouw G (2003) Containment of biogenic sulfide production in continuous up-flow packed-bed bioreactors with nitrate or nitrite. *Biotechnol Prog* 19:338–345
 41. Hurley MA, Roscoe ME (1983) Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *J Appl Microbiol* 55:159–164. doi:10.1111/j.1365-2672.1983.tb02660.x
 42. Jayaraman A, Cheng ET, Earthman JC, Wood TK (1997) Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of SAE 1018 steel through oxygen depletion. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:11–17
 43. Jayaraman A, Hallock PJ, Carson RM, Lee C-C, Mansfeld FB, Wood TK (1999) Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated in situ. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:267–275
 44. Kebbouche-Gana S, Gana ML, Khemili S, Fazouane-Naimi F, Bouanane NA, Penninckx M, Hacene H (2009) Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:727–738
 45. Kosaric N, Cairns WL, Gray Neil CC (1987) Surfactant science series, vol 25. Marcel Dekker, New York, pp 1–21
 46. Larsen J (2002) Downhole nitrate applications to control sulfate-reducing bacteria activity and reservoir souring, paper 02025. In: Corrosion/2002. NACE International, Houston, TX
 47. Leifert C, Li H, Chidburee S, Hampson S, Workman S, Sigeo D, Epton HAS, Harbour A (1995) Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumillus* CL45. *J Appl Bacteriol* 78:97–108
 48. Lim JM, Jeon CO, Lee SM, Lee JC, Xu LH, Jiang CL, Kim CJ (2006) *Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, spore forming bacterium isolated from a salt lake in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:373–377
 49. Little B, Lee J, Ray R (2007) New development in mitigation of microbiologically influenced corrosion MIC—an international perspective symposium. Extrin Corrosion Consultants, Curtin University, Perth, Australia, 14–15 Feb 2007
 50. Mancinelli RL, Hochstein LI (1986) The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 35:55–58
 51. Melo IS (1998) Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Azevedo JL, Melo IS (eds) Controle biológico, vol 1. Embrapa, Jaguariúna, pp 17–30
 52. Nemati M, Jenneman GE, Voordouw G (2001) Mechanistic study of microbial control of hydrogen sulfide production in oil reservoirs. *Biotechnol Bioeng* 74:424–434
 53. Nemati M, Mazutinec T, Jenneman GE, Voordouw G (2001) Control of biogenic H₂S production by nitrite and molybdate. *J Ind Microbiol Biotechnol* 26:350–355
 54. Nielsen P, Fritze D, Priest FG (1995) Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology* 141:1745–1761
 55. Ollivier B, Caumette P, Garcia JL, Mah RA (1994) Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol Rev* 58:27–38
 56. Oren A, Trüper HG (1990) Anaerobic growth of halophilic archaeobacteria by reduction of dimethylsulfoxide and trimethylamine N-oxide. *FEMS Microbiol Lett* 70:33–36
 57. Oren A, Ventosa A, Grant WD (1997) Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. *Int J Syst Bacteriol* 47:233–238
 58. Paulus W (1993) Microbicides for the protection of materials—a handbook. Chapman & Hall, London, UK
 59. Pfeffer W (1900) The physiology of plants. A treatise upon the metabolism and sources of energy in plants. 2nd edn. Oxford, 1: 512–514
 60. Pirttijärvi TSM, Graeffe TH, Salkinoja-Salonen MS (1996) Bacterial contaminants in liquid packaging boards: assessment of potential for food spoilage. *J Appl Bacteriol* 81:445–458
 61. Podile A, Prakash A (1996) Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1. *Can J Microbiol* 42:533–538
 62. Postgate JR (1984) The sulfate-reducing bacteria. Cambridge University Press, New York
 63. Potekhina JS, Sherisheva NG, Povetkina LP, Pospelov AP, Rakitina TA, Warnecke F, Gottschalk G (1999) Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:639–646
 64. Rodin VB, Jigletsova SK, Kobelev VS, Akimova NA, Aleksandrova NV, Rasulova GE, Kholodenko VP (2000) Development of biological methods for controlling the aerobic microorganism-induced corrosion of carbon steel. *Appl Biochem Microbiol* 36(6):589–593
 65. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
 66. Schmitt HG (1987) Action of antimicrobial substances. *Parfümerie und Kosmetik* 68:5–16 A71
 67. Seghal SN, Gibbons NE (1960) Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can J Microbiol* 6:165–169
 68. Silva AA, Morrell JJ (1998) Inhibition of wood-staining *Ophiostoma picea* by *Bacillus subtilis* on *Pinus ponderosa* sapwood. *Material und Organismen* 32:241–252
 69. Smirnov VV, Kiprianova EA (1990) Bakterii roda *Pseudomonas*, (Bacteria of the Genus *Pseudomonas*). *Naukova Dumka*, Kiev
 70. Stackebrandt E, Liesack W (1993) Nucleic acids and classification. In: Goodfellow M, O'Donnell AG (eds) Handbook of new bacterial systematics. Academic, London, pp 152–189
 71. Väisänen OM, Nurmiaho-Lassila EL, Marmo SA, Salkinoja-Salonen MS (1994) Structure and composition of biological slimes on paper and board machines. *Appl Environ Microbiol* 60:641–653

72. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:504–544
73. Videla HA, Herrera LK (2005) Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *Int Microbiol* 8:169–180
74. Waksman SA (1937) Associative and antagonistic effects of microorganisms: I. Historical review of antagonistic relationships. *Soil Sci* 43:51–68
75. Wang Q, Li W, Liu Y, Cao H, Li Z, Guo G (2007) *Bacillus qingdaoensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic bacterium isolated from a crude sea-salt sample collected near Qingdao in eastern China. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1143–1147
76. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703
77. Xue Y, Ventosa A, Wang X, Ren P, Zhou P, Ma Y (2008) *Bacillus aidingensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from Ai-Ding salt lake in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2828–2832
78. Zhu XY, Modi H, Kilbane II JJ (2006) Efficacy and risks of nitrate application for the mitigation of SRB-induced corrosion paper no. 06524. CORROSION 2006, NACE International, USA
79. Zuber P, Nakano M, Marahiel M (1993) Peptide antibiotics. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds) *Bacillus Subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, pp 897–916
80. Zuo R (2007) Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:1245–1253