

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Ecole Nationale Polytechnique**

**Département de Génie de L'environnement**

**Option: Biotechnologie**



**Thèse de Magister**

**Corrosion bactérienne:  
Etude de la corrosivité des souches de bactéries sulfatoréductrices et  
leurs inhibition par des bactéries antagonistes.**

*présenté par:*

**M<sup>r</sup> Mohamed Lamine GANA**

**Ingénieur d'état en Génie biologique**

**Devant le jury:**

M<sup>r</sup> R. KERBACHI.....Maître de conférence (ENP).....Président  
M<sup>r</sup> N. MAMERI.....Maître de conférence (ENP).....Promoteur  
M<sup>r</sup> M. BOUNOUGHAZ.....Maître de recherche (SH/CRD).....Co-promoteur  
M<sup>r</sup> A. TOUZI.....Maître de recherche (HCR/CDTN).....Examinateur  
M<sup>me</sup> K. MOUSSAOUI.....Maître de conférence (ENP).....Examinatrice  
M<sup>r</sup> A. MELZI.....Pharmacien biologiste (IPA).....Invité

**Juin -1998**

## Remerciements

La présente étude réalisée au Laboratoire de Corrosion du Centre de Recherche et Développement de la SONATRACH - Boumerdès avec la collaboration du Laboratoire des Biotechnologies du Département des Génies de l'Environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique -El-Harrach, a été facilitée par tous ceux et celles qui m'ont dirigé, orienté et soutenu. Je leur exprime ici ma gratitude et ma reconnaissance.

Ma gratitude et mes plus sincères remerciements vont à Monsieur **M. BOUNOUGHAZ**, Chef de Département Corrosion - CRD/SH, pour la bienveillante direction, les précieux conseils et orientations qui m'ont constamment accompagné et soutenu, durant l'élaboration de ce travail.

Mes remerciements vont, aussi, à Monsieur et à Madame **MAMERI** Maîtres de Conférence à l'ENP/EL-Harrach, pour avoir témoigné en moi leur confiance, leur recommandations et leur conseils forts intéressants.

Ma reconnaissance et mes remerciements vont, également, à Monsieur **R. N. ALLOUANI**, Directeur du CRD, pour toutes les facilités qu'il m'a accordé, après son prédécesseur Monsieur **A. BELHAOUES**.

Je remercie Monsieur **R. A. LONGOU**, Directeur du Laboratoire Traitement des Hydrocarbures au CRD, pour son encouragement à la réalisation de ce travail, sans oublier Madame **R. BOURENANE**.

Je ne saurais oublier de remercier Monsieur **N. MESSAOUDENE**, Chef de Département Assistantes aux Unités Industrielles; ainsi que Madame **C. BADACHE**.

Je remercie Monsieur **R. KERBACHI**, Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger pour avoir accepté de présider ce modeste travail.

Il m'est agréable d'exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur **A. TOUZI**, Responsable du Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Industrielle du Centre de Développement des Techniques Nucléaires ( CDTN/MESRS ), pour avoir accepté de participer à la critique de ce travail.

Mes remerciements s'adressent, également, à Monsieur **A. MELZI**, Responsable du Laboratoire de Préparation de Milieux de Culture de l'Institut Pasteur d'Alger; pour avoir accepté de faire partie du jury.

A Monsieur **N. MOUSSAOUI**, Maître de Conférences à Ecole Nationale Polytechnique, pour avoir gentiment accepté de faire partie du jury.

Je remercie ma femme **S. GANA** pour son encouragement à la réalisation de ce travail.

A tous mes collègues du Département Corrosion, du Département Assistances aux Unités Industrielles et du Département Produit TRH/CRD/SH. Ma profonde sympathie va à toutes les personnes et collègues du Département de Génie de l'Environnement de Ecole Nationale Polytechnique. Que tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin y trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.

**Mots clés:**

Corrosion bactérienne, bactéries de la corrosion, bactéries sulfatoréductrices ( BSR ), acier au carbone, techniques microbiologiques, sulfures, sulfates, techniques électrochimiques, pouvoir corrosif, antagonisme, bactéries antagonistes, culture discontinue.

ملخص

عملنا هذا يمثل في التعرف على فهم ظاهرة التآكل البكتيري. الجزء الأول لهذا العمل يتطرق الى دراسة قدرة التآكل للبكتريا المختزلة للسلفات بواسطة تقنيات ميكروبيولوجية و كهروكيميائية.

في الاجزاء الثاني حاولنا تطبيق تقنية تعطل نمو البكتريا المختزلة للسلفات ، تتمثل هذه التقنية في استعمال بكتريا مضادات لبكتريا المختزلة للسلفات.

في التجارب التي قمنا بها، أي عمليات زرع مختلطة غير متواصلة لبكتريا المختزلة للسلفات و بكتريا المضادة لها تم تحضرها. درسنا مدا تأثير تركيز البكتريا المضادة على تكاثر بكتريا المختزلة للسلفات حسب الزمن النتائج المحصل عليها. بينت إنخفاض يقدر بـ ٩٩ ٪ من عدد البكتريا المختزلة للسلفات.

### Résumé

*Ce travail consiste en une contribution à la compréhension du phénomène de la corrosion bactérienne. La première partie a porté sur l'étude du pouvoir corrosif des bactéries sulfatoréductrices ( BSR ) vis à vis de l'acier au carbone, par des techniques microbiologiques et électrochimiques.*

*Dans la deuxième partie, nous avons tenté de mettre en oeuvre une technique microbiologique d'inhibition de la croissance des BSR, basée sur l'utilisation des bactéries antagonistes.*

*Les essais ont été réalisés avec des cultures mixtes en discontinu ( batch ) de BSR et d'antagonistes bactériens. L'influence de la concentrations de l'inoculum en antagonistes bactériens sur le réduction du nombre des BSR, en fonctions du temps, a été étudiée. Les résultats obtenus des cinétiques de croissance des BSR ont montré une diminution de l'ordre de 99% du nombre de bactéries sulfatoréductrices en présence des antagonistes bactériens.*

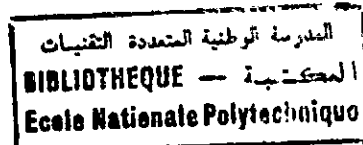
### Abstract:

*This investigation represents a contribution to the microbiologically induced corrosion knowledge ( M.I.C). In first part, the influence of sulfate reducing bacteria ( SRB ) on mild steel corrosion was studied by using electrochemical and microbiological technics.*

*In order to attemp a technic of inhibiting a growth of SRB was realised. An antagonists bacteria against SRB were developped. Antagonist exert using a batch culture process of SRB and antagonists bacteria was used.*

*The influence of antagonists bactreria concentration on the SRB developpment versus a time was established. An measurments of growth cinetic have been used to show a decrease number of SRB. The results were showed to decrease a 99 % of SRB.*

# SOMMAIRE



<b>PRESENTATION DE LA REGION D'IN AMENAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES FIGURES PAR CHAPITRE.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX PAR CHAPITRE.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES GRECS.....</b>	<b>viii</b>

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

## CHAPITRE I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. La corrosion bactérienne

1. 1. Rappels théorie sur la corrosion bactérienne.....	3
1. 2. Influence des bactéries corrosives.....	3
1. 3. Influence des constituants du milieu.....	4
1. 4. Mécanisme de la corrosion bactérienne.....	5
1. 4. 1. Production des métabolites corrosifs.....	6
1. 4. 2. Dépolarisation cathodique et anodique.....	7
1. 4. 3. Effet de l'aération différentielle.....	7
1. 4. 4. Influence du soufre sur le développement de la corrosion.....	8

### 2. Méthodes utilisées pour l'étude de la corrosion bactérienne

2. 1. Méthodes d'évaluation électrochimiques.....	12
2. 1. 1. Mesure du potentiel libre de l'acier.....	12
2. 1. 2. Polarisation potentiodynamique.....	13
2. 1. 3. Impédance électrochimique.....	14
2. 2. Méthodes d'évaluation microbiologiques.....	17
2. 2. 1. Rappels sommaires sur la croissance bactérienne.....	17
2. 2. 2. Phénomènes de la croissance des bactéries.....	17

### 3. Traitement par les antagonistes bactériens

3. 1. Introduction.....	20
3. 2. Interrelations entre les micro-organismes.....	21
3. 2. 1. Interrelations associatives.....	21
3. 2. 2. Interrelations de compétition.....	22
3. 2. 3. Interrelations antagonistes.....	22

3. 3. L'antagonisme bactérien.....	23
3. 3. 1. Définition.....	23
3. 3. 2. Méthodes d'études de l'antagonisme.....	23

## CHAPITRE II - CONDITIONS EXPERIMENTALES

1. Etude microbiologique.....	25
1. 1. Echantillonnage et analyse chimique de l'eau.....	25
1. 2. Analyse microbiologique de échantillon.....	25
1. 3. Identification macroscopique des BSR.....	26
1. 4. Purification.....	26
1. 5. Conservation.....	27
1. 6. Etude du métabolisme des bactéries sulfatoréductrices.....	27
1. 7. Identification microscopique des BSR.....	28
2. Etude de la croissance des bactéries sulfatoréductrices	
2. 1. En culture mixte.....	28
2. 1. 1. Origine des bactéries sulfatoréductrices.....	29
2. 1. 2. Milieux utilisés.....	29
2. 1. 3. Préculture.....	29
2. 1. 4. Culture.....	29
2. 2. En culture pure.....	30
2. 2. 1. Souches utilisées.....	30
2. 2. 2. Milieu utilisé.....	30
2. 2. 3. Préculture.....	30
2. 2. 4. Culture.....	30
3. Etude électrochimique.....	31
3. 1. Nature de l'acier.....	31
3. 2. Préparation de la cellule électrochimique.....	31
3. 3. Conditions des essais électrochimiques.....	31
3. 3. 1. Essais de mesure du potentiel libre de corrosion.....	32
3. 3. 2. Essais de mesure de la polarisation potentiodynamique.....	33
3. 3. 3. Essais de mesure de l'impédance électrochimique.....	33
3. 4. Conduite des essais électrochimiques.....	34

<b>4. Etude de l'inhibition des BSR par les antagonistes bactériens.....</b>	<b>34</b>
4. 1. Origine des bactéries antagonistes.....	34
4. 2. Isolement et identification.....	34
4. 3. Conduite des essais d'antagonisme.....	34
4. 3. 1. Préculture.....	35
4. 4. Evaluation de l'efficacité des antagonistes bactériens.....	35
4. 4. 1. Mesure de la croissance bactérienne.....	35



### **CHAPITRE III - RESULTATS ET DISCUSSIONS**

<b>1. Evaluation de la flore microbienne de l'échantillon.....</b>	<b>36</b>
<b>2. Etude de l'identification des BSR.....</b>	<b>37</b>
<b>3. Etude de la croissance des BSR sur différents milieux de culture...44</b>	<b>44</b>
3. 1. Influence de la composition chimique.....	44
<b>4. Caractérisation électrochimique de l'acier.....</b>	<b>49</b>
4. 1. Tracé du potentiel libre de l'acier en fonction du temps.....	49
<b>5. Caractérisation microbiologique des BSR.....</b>	<b>52</b>
5. 1. Etude de l'activité biologique des BSR purifiées.....	52
<b>6. Etude du pouvoir corrosif des BSR purifiées.....</b>	<b>56</b>
6. 1. Courbes de polarisation potentiodynamique de l'acier.....	56
6. 2. Influence des BSR purifiées sur $E_{corr}$ de l'acier.....	58
6. 3. Influence des BSR purifiées sur $I_{corr}$ et $V_{corr}$ de l'acier.....	60
6. 4. Influence des BSR purifiées sur les pentes de TAFEL.....	62
<b>7. Caractérisation de l'interface métal-solution par la technique d'impédance électrochimique.....</b>	<b>64</b>
<b>8. Caractérisation microbiologique des antagonistes bactériens.....</b>	<b>71</b>
8. 1. Etude de l'effet des antagonistes bactériens sur la croissance des bactéries sulfatoréductrices.....	75
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>85</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>92</b>

## AVANT PROPOS

Il arrive, souvent, que la pression statique absolue en tête de puits de pétrole diminue rapidement au cours de l'exploitation d'un gisement. L'extrapolation de la relation: pression - production cumulée, montre que la récupération de pétrole n'atteint qu'un très faible pourcentage des réserves estimées. Dans certains cas, un procédé artificiel, permettant d'améliorer le drainage naturel, est utilisé.

Il s'agit de l'injection d'eau sous pression dans la formation géologique; pour réaliser la récupération secondaire de pétrole. Cette technique permet des récupérations qui dépassent souvent le double de celles obtenues par voie primaire. Cette opération dépend évidemment en premier lieu de la perméabilité de la roche réservoir du gisement pétrolier et de la nature de l'eau d'injection.

L'injection d'eau a pour but:

- d'éliminer l'eau souvent salée produite avec le pétrole, quand son élimination est impossible en surface;
- d'améliorer le balayage latérale ou verticale des zones productrices et d'éliminer les tensions interfaciales qui sont responsables de la saturation résiduelle de la roche réservoir en pétrole;
- d'améliorer la récupération du pétrole par poussée radicale à partir des puits d'injection vers les puits de production. Ceci permet le maintien de pression pour favoriser une récupération suffisante de pétrole.

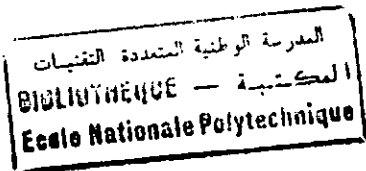
La production de pétrole, dans le champ de Zarzaitine ( Région d'In Aménas ), est assurée grâce au maintien de pression due à l'eau injectée (récupération secondaire). Le champ est doté de 26 puits producteurs d'eau dont la production quotidienne est évaluée à environ  $15.10^6 \text{ m}^3$ .

L'eau arrivant des centres de séparation rentre dans les bacs de stockage du centre principal d'injection d'eau ( CPIE ). Après un traitement chimique préliminaire (injection d'oxygène scavanger ) et une filtration, l'eau est acheminée vers la station de pompage. Grâce à deux dorsales d'injection, l'eau est desservie vers les puits injecteurs du champ. Les bactéries sulfatoreductrices ( BSR ) responsables de la corrosion de ces dorsales ne sont pas originaires des réservoirs d'eau. Elles sont introduites au cours des opérations de forage ou de work-over (récupération de puits).

L'intervention des BSR dans le processus de corrosion a donné naissance à la biocorrosion ou la corrosion microbienne ou encore la corrosion bactérienne. Quand les conditions de milieu sont favorables ( pH, température et substances nutritives ), les bactéries commencent à proliférer, en constituant des colonies bactériennes aux alentours des puits producteurs. Elles envahissent tous les réseaux où l'eau circule et se retrouvent dans les équipements de production de pétrole et les installations de surface.



## Liste des figures par chapitre



### CHAPITRE I

**Fig. 1: Principe de la réduction des sulfates ( $SO_4^{2-}$ ) en présence des bactéries.**

**Fig. 2: Formation de la cellule d'aération différentielle.**

**Fig. 3: Courbe de polarisation potentiodynamique d'une électrode en acier.**

**Fig. 4: Circuit électrique équivalent et diagramme d'impédance de Nyquist en présence d'un biofilm bactérien et en absence un de diffusion.**

**Fig. 4a: Diagramme de Nyquist en absence de biofilm.**

**Fig. 4b: Diagramme de Bode en absence de biofilm.**

**Fig. 5: Courbe de croissance bactérienne.**

### CHAPITRE II

**Fig. 6 : Schéma de l'électrode de travail.**

**Fig. 7: Schéma de la cellule électrochimique.**

**Fig. 8: Schéma de l'équipement utilisé pour les mesures électrochimiques**

### CHAPITRE III.

**Fig. 9: Variation de la concentration en BSR dans les milieux de culture MC1 et MC2 inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation.**

**Fig. 10: Variation de la densité optique des milieux de culture MC1 et MC2 inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation.**

**Fig. 11: Evolution du pH des milieux de culture MC1 et MC2 inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation.**

**Fig. 12: Variation de la concentration en sulfates dans les milieux de culture MC1 et MC2 inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation.**

**Fig. 13: Variation de la concentration en sulfures dans les milieux de culture MC1 et MC2 inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation.**

**Fig. 14: Comparaison de la variation de la concentration en BSR dans les milieux naturel et synthétique inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation.**

**Fig. 15: Principales formes de la variation du potentiel libre d'un acier en fonction du temps.**

**Fig. 16: Variation du potentiel libre de l'acier en fonction du temps d'exposition et en fonction de milieu utilise. Le milieu contaminé contient 1% de l'inoculum de la préculture mixte des BSR.**

**Fig. 17: Evolution du pH du milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoredutrices isolées de l'eau de Zarzaitine, en fonction du temps d'incubation.**

**Fig. 18: Evolution de la concentration bactérienne dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoredutrices isolées de l'eau de Zarzaitine, en fonction du temps d'incubation.**

**Fig. 19: Variation de la densité optique du milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoredutrices isolées de l'eau de Zarzaitine en fonction du temps.**

**Fig. 20: Variation de la concentration en sulfates dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoredutrices isolées de l'eau de Zarzaitine, en fonction du temps.**

**Fig. 21: Variation de la concentration des sulfures dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoredutrices isolées de l'eau de Zarzaitine, en fonction du temps.**

**Fig. 22: Voltampérogrammes de l'acier au carbone plongé dans le milieu de culture non inoculé et inoculé par la BSR la plus corrosive.**

**Fig. 23: Voltampérogrammes de l'acier au carbone plongé dans le milieu de culture non inoculé et inoculé par la BSR la moins corrosive.**

**Fig. 24: Evolution, en fonction du temps, du potentiel de corrosion de l'acier plongé dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoredutrices isolées de l'eau de Zarzaitine.**

**Fig. 25: Variation de la vitesse de corrosion en fonction du temps dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches de bactéries sulfatoredutrices isolées de l'eau de Zarzaitine.**

**Fig. 26:** Variation du courant de corrosion en fonction du temps dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches de bactéries sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine.

**Fig. 27:** Evolution de la pente anodique des droites de TAFEL en fonction du temps d'exposition de l'acier plongé dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine.

**Fig. 28:** Evolution de la pente cathodique des droites de TAFEL en fonction du temps d'exposition de l'acier plongé dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine.

**Fig. 29:** Evolution des diagrammes d'impédance de l'électrode de travail plongée dans le milieu de culture inoculé par *Desulfovibrio sp1* durant le 1<sup>er</sup>, le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour d'incubation.

**Fig. 30:** Suite de l'évolution des diagrammes d'impédance de l'électrode de travail plongée dans le milieu de culture inoculé par *Desulfovibrio sp1* durant le 5<sup>ème</sup>, le 6<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour d'incubation.

**Fig. 31:** Evolution des diagrammes d'impédance de l'électrode de travail plongée dans le milieu de culture inoculé par *Desulfovibrio sp2* durant le 1<sup>er</sup>, le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour d'incubation.

**Fig. 32:** Suite de l'évolution des diagrammes d'impédance de l'électrode de travail plongée dans le milieu de culture inoculé par *Desulfovibrio sp2* durant le 5<sup>ème</sup>, le 6<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour d'incubation.

**Fig.33:** Evolution de la concentration en bactéries sulfatoréductrices provenant de la souche bactérienne *Desulfovibrio sp1* cultivée dans le milieu naturel en absence, en présence des antagonistes et en fonction du temps.

**Fig. 34:** Evolution de la concentration en bactéries sulfatoréductrices provenant de la souche bactérienne *Desulfovibrio sp1* cultivée dans le milieu naturel en présence des antagonistes et en fonction du temps.

**Fig.35:** Evolution de la concentration en bactéries sulfatoréductrices provenant de la souche bactérienne *Desulfovibrio sp1* cultivée dans le milieu naturel en absence, en présence des antagonistes et en fonction du temps.

**Fig. 36:** Evolution de la concentration en bactéries sulfatoréductrices provenant de la souche bactérienne *Desulfovibrio sp1* cultivée dans le milieu naturel en présence des antagonistes et en fonction du temps.

**Tableau 14: Résultats des caractéristiques électrochimiques de l'interface de l'acier plongé dans le milieu de culture MC2 inoculé par la souche *Desulfovibrio sp1*.**

**Tableau 15: Résultats des caractéristiques électrochimiques de l'interface de l'acier plongé dans le milieu de culture MC2 inoculé par la souche *Desulfovibrio sp2*.**

**Tableau 16: Identification macroscopique des bactéries antagonistes isolées sur gélose nutritive à partir de l'eau d'injection ZR-641.**

**Tableau 17: Résultats de l'identification microscopique des bactéries antagonistes isolées sur gélose nutritive à partir de l'eau d'injection de Zarzaitine ZR-641.**

**Tableau 18: Identification systématique de la bactérie antagoniste A203 isolée à partir de l'eau ZR-641.**

**Tableau 19: Identification systématique de la bactérie antagoniste A232 isolée à partir de l'eau ZR-641.**

**Tableau 20: Résultats des taux d'élimination des BSR corrosives en présence des inoculums des antagonistes bactériens isolés de l'eau d'injection de Zarzaitne ( ZR -641 ).**

**Tableau 21: Résultats des dénombrements de la bactérie corrosive en présence et en absence des antagonistes bactériens de *Staphylococcus* utilisés aux concentrations en inoculum de 2%, 4% et 10%.**

**Tableau 22: Résultats des dénombrements de la bactérie corrosive en présence et en absence des antagonistes bactériens de *Pseudomonas* utilisés aux concentrations en inoculum de 2%, 4% et 10%.**

## *Liste des histogrammes et des planches par chapitre*

### **CHAPITRE I**

*Planche 1: Mécanisme de la réduction des sulfates en sulfures chez les bactéries sulfatoréductrices.*

### **CHAPITRE III**

*Histogramme 1: Répartition des colonies de BSR isolées à partir de l'échantillon d'eau ZR- 641 sur le milieu de culture solide.*

*Planche 2: Observation microscopique des bactéries sulfatoréductrices isolées de l'eau d'injection (Grossissement x1000).*

*Histogramme 2: Variation du taux d'élimination des BSR corrosive en fonction de la concentration en inoculum de l'antagoniste( = ): Desulfovibrio sp1 + Pseudomonas ( # ); Desulfovibrio sp1 + Staphylococcus.*

*Planche 3: Isolement et observation morphologique des bactéries antagonistes.*

## Liste des symboles et abréviations

- A = Absorbance  
 A.P.S = Adénosine phosphosulfate  
 A.T.P = Adénosine triphosphate  
 BSR = Bactéries sulfatoréductrices  
 $C_{dl}$  = Capacité de la double couche électronique  
 $C_f$  = Capacité d'un biofilm  
 $dX/dt$  = Vitesse de croissance  
 E = Potentiel au repos ou potentiel libre d'une électrode ( mV ou V )  
 $E_{rev}$  = Potentiel réversible d'une électrode ( mV ou V )  
 $E_{corr}$  = Potentiel de corrosion d'une électrode  
 E.N.H = Electrode normale d'hydrogène  
 E.C.S = Electrode de Calomel saturée  
 F = Nombre de Faraday ( 96500 C )  
 G = Temps de génération ( h )  
 $G^-$  = Gram négatif  
 $G^+$  = Gram positif  
 G.N = Gélose nutritif  
 $i_{corr}$  = courant de corrosion (  $\mu$  A/cm<sup>2</sup> )  
 $i_c$  = Courant cathodique ( mA )  
 $i_a$  = Courant anodique ( mA )  
 $I_t$  = lumière transmise  
 $I_o$  = lumière incidente  
 j = Nombre imaginaire (  $\sqrt{-1}$  )  
 n = Nombre d'électrons mis en jeu  
 O.N.P.G = Ortho- nitrophényl-  $\beta$ - D- galactopyranoside  
 P.A.P.S = Phosphoadénosine 5' phosphosulfate  
 $R_t$  = Résistance de transfert de charges (  $\Omega$  )  
 $R_s$  = Résistance de la solution ou d'un milieu de culture (  $\Omega$  )  
 $R_f$  = Résistance d'un biofilm (  $\Omega$  )  
 T = Transmittance  
 $V_{corr}$  = Vitesse de corrosion ( mV/s )  
 V.F = Viande de foie  
 V.P = Voges- Prokauer  
 X = Concentration cellulaire à  $t \neq 0$   
 $X_o$  = Concentration cellulaire à  $t = 0$   
 Z = Impédance (  $\Omega.cm^2$  )  
 $Z_{im}$  = Partie imaginaire de l'impédance (  $\Omega.cm^2$  )  
 $Z_{rel}$  = Partie réelle de l'impédance (  $\Omega.cm^2$  )

## Liste des symboles Grecs

- $\eta$  = Sutation ( mV ou V )  
 $\mu$  A/cm<sup>2</sup> = Densité du courant  
 $\beta_a$  = Coefficient de Tafel anodique  
 $\beta_c$  = Coefficient de Tafel cathodique  
 $\omega$  = Vitesse angulaire ou pulsation ( rd/s )  
 $\phi$  = Angle de déphasage ( degré )  
 $\xi$  = Polarisation ( mV )  
 $\alpha$  = Coefficient molaire d'adsorption  
 $\mu$  = Vitesse spécifique de croissance ( h<sup>-1</sup> )  
 $\mu_{max}$  = Vitesse spécifique de croissance maximale ( h<sup>-1</sup> )  
 $\Omega$  = Ohm  
nm = nanomètre

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
المكتبة — BIBLIOTHEQUE  
Ecole Nationale Polytechnique

## INTRODUCTION



## INTRODUCTION

L'impact de la corrosion sur l'économie en général et l'environnement en particulier est important. En effet, les pertes engendrées peuvent aller de 1 à 4% du PNB dans les pays industrialisés (**Cabrillac- 1995** ). Les divers analyses effectuées dans ce domaine montre qu'il est possible de réduire de 40% les pertes attribuées à la corrosion. D'autre part, l'essor industriel entrepris par l'Algérie font que les problèmes de corrosion et la protection des matériaux prennent de plus en plus d'importance, tout particulièrement dans le domaine pétrolier.

En effet, l'industrie pétrolière utilise des installations métalliques de surface et des canalisations (près de 14000 Km ) confrontée à la corrosion bactérienne. D'autant plus qu'on estime, aujourd'hui, qu'au moins un tiers de l'ensemble de la corrosion est attribué aux micro-organismes. Ces derniers habitent des milieux variés; ils sont ubiquistes ( **Degrement - 1993, Pelment -1993** ). Il faut savoir que l'estimation de la perte due à la corrosion bactérienne a été évaluée entre 500 et 2000 millions de dollars/an ( **Lonchay -1979** ). D'autre part, les besoins toujours croissants en eau, aussi bien sur le plan domestique qu'industriel n'ont fait qu'augmenter la prolifération des réseaux de canalisations. Ces réseaux véhiculent des eaux de différentes origines. On retrouve les eaux souterraines et les eaux de surface. Dans ces conditions, la présence de certaines bactéries caractéristiques à chaque eau est inévitable. La prolifération de ces micro-organismes nécessite la présence d'un environnement contenant toutes les substances utiles pour la synthèse du matériel cellulaire et la génération de l'énergie cellulaire. Parmi ces micro-organismes, on trouve les bactéries de la corrosion ou bactéries sulfatoréductrices (BSR). En effet, la croissance des BSR dans les canalisations en acier à pour conséquences nuisibles à plusieurs niveaux entraînant des coûts supplémentaires:

- Les opérations d'exploitation: les fuites fréquentes de produits obligent à des arrêts et à des interventions des équipes techniques pour le remplacement des pièces corrodées.
- Les investissements: pertes d'équipements, reprise de tubings, colmatage et obstruction totale ou partielle des tuyauteries.
- L'environnement: odeurs nauséabondes dues à des produits de la corrosion causant la contamination des nappes phréatiques par infiltration des eaux de surfaces.

La connaissance de l'origine de l'eau, la nature des installations, l'usage prévu, les paramètres physico-chimiques et microbiologiques de l'eau permet d'envisager un traitement adéquat (**Berger -1981** ). Les traitements les plus utilisés sont de nature physique ( décantations, filtrations, chauffages...) et chimique ( utilisation de biocides de nature soit bactériostatiques ou bactéricides ). Seulement, les coûts des traitements physiques, les phénomènes d'accoutumance et l'action sélective de ces produits chimiques sur les espèces bactériennes limitent l'efficacité de ces traitements.

Vu la persistance de la biocorrosion et suite à la découverte de relations antagonistes entre les bactéries, on s'est demandé s'il n'est pas possible d'utiliser des traitements biologiques. Ils sont basés sur un processus d'inhibition ou de compétition intuitive entre les différentes bactéries d'un équilibre biologique. Cette compétition peut se faire pour la source de carbone, les composés azotés et les facteurs de croissance ( **Selman et al., 1948** ).

Son concept est basé sur l'hypothèse de changements dans la communauté biologique de l'eau en provoquant l'établissement et la prédominance de micro-organisme. Ces derniers par leur effets direct ou indirect diminuent la croissance ou l'activité des BSR.

La bibliographie n'est pas assez riche. Seulement, ces dernières années des travaux ont été entrepris; comme ceux de **White et al. ( Leclerc et al., 1993 )** qui ont présenté une étude sur le pouvoir corrosif de mélange de trois bactéries *Desulfovibrio gigas* ( BSR ), *Bacillus sp* et *Hafnia alvei* prises deux à deux vis à vis de l'acier. Ainsi, les connaissances en écologie microbienne, en particulier, les interactions antagonistes entre les micro-organismes de l'eau, ont poussé les chercheurs du CRD - SONATRACH en collaboration avec le département de Génie de l'Environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique ( El -Harrach ) à initier un travail portant sur l'utilisation de micro-organismes antagonistes en vue de réduire l'activité des bactéries sulfatoréductrices.

Le plan de ce travail consiste à étudier le complexe eau - acier. Ce complexe a fait l'objet de nombreux travaux visant à comprendre l'action corrosive des BSR présentes dans l'eau. Nous avons commencé par des isolements et des identifications de BSR sur des milieux de culture spécifiques. Ensuite, nous avons évalué les cinétiques biologiques par la mesure de la croissance bactérienne, de la variations des concentrations du substrat ( sulfates ), du produit final corrosif (sulfures ), du pH et de la densité ). Dans la deuxième partie, nous avons utilisé des techniques électrochimiques telles que la polarisation potentiodynamique et l'impédance pour l'étude du pouvoir corrosif des BSR. La première permet de mesurer le potentiel de corrosion, la vitesse de corrosion et le courant de corrosion de l'acier exposé à l'activité des BSR. La seconde permet la détermination des résistances et des capacités.

Ces travaux sont complétés par la comparaison des différents pouvoirs corrosifs des BSR purifiées. Cette comparaison, nous permettra de choisir la bactérie la plus corrosive et d'étudier la biocorrosion en absence et en présence des antagonistes bactériens isolés du même échantillon d'eau. Nous compléterons ce travail par l'étude de l'antagonisme bactérien vis à vis des bactéries sulfatoréductrices.

**CHAPITRE I**  
**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1. La corrosion bactérienne**

### **1. 1. Rappels théoriques sur la corrosion bactérienne**

De nombreuses études ont été réalisées sur la biocorrosion. **Garret (1891)** suggérait que les bactéries pouvaient avoir une influence sur la corrosion des métaux. Depuis, le concept de corrosion biologique est adopté. Ce n'est pas un type particulier de corrosion, mais un procédé de détérioration de métaux résultant de l'activité des micro-organismes vivants.

Par la suite, **Wieland (1974)** a démontré que dans les processus biologiques la mobilisation de l'hydrogène par les bactéries était un facteur des réactions d'oxydations. Un peu plus tard, **Gaines (Wieland -1974)** a montré le rôle et la responsabilité des bactéries sulfatoréductrices, des bactéries oxydantes du soufre et des bactéries ferrugineuses sur le processus de biocorrosion.

En 1934, la théorie de la biocorrosion a été formulée par **Van Wolzogen Kuhr et Van Dervlugt** suite à la découverte, par **Stephenson et al., (1931)** d'une hydrogénase permettant aux bactéries sulfatoréductrices d'utiliser l'hydrogène moléculaire pour la réduction des sulfates présents dans le milieu.

### **1. 2. Influence des bactéries corrosives**

La sensibilité d'un matériau à la corrosion dépend de sa composition chimique et de sa microstructure, ainsi que de la composition chimique et microbiologique de l'environnement où il se trouve. Les paramètres physiques ( température, convection, irradiation...) et mécaniques (contraintes, chocs, frottements ) affectent le matériau. La résistance à la corrosion n'est pas une propriété intrinsèque du métal, mais une propriété de l'interface métal/milieu (**Landolt -1993** ).

Selon le même chercheur, la corrosion est similaire aux réactions d'une pile. Quand un métal actif ( anode ) est mis électriquement en contact avec un autre métal noble par l'intermédiaire d'un milieu électrolytique; le transfert d'électrons vers le métal noble se fait en causant un phénomène d'oxydation et de détérioration du métal moins noble. Cette oxydation est accélérée en présence des bactéries.

**Daumas et al. (1988)** ont utilisé deux piles électrochimiques pour étudier l'influence des bactéries sulfatoréductrices sur la corrosion de l'acier. Par des mesures de corrosion du potentiel en fonction du temps, ces chercheurs ont noté une différence de potentiel de -15 mV entre les électrodes, après contamination bactérienne.

Tenant compte de leur méthodologie expérimentale, l'électrode plongée dans le compartiment non contaminé se comporte comme un pôle négatif (cathode ). Simultanément, l'autre électrode devient anode entraînant la dissolution du métal.

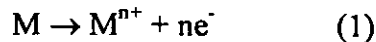
Il peut y avoir une corrosion de métaux même en absence de micro-organismes, mais avec un caractère électrochimique. **Crolet (1975)** a expliqué, que cette origine électrochimique est liée à:

- la structure atomique et électronique de la phase métallique solide constituée des ions métalliques, disposés dans un réseau cristallin. Les électrons de conductance électrique libres se déplacent dans le réseau.
- la phase aqueuse formée de molécules d'eau, de composés non dissociés et d'ions positifs ou négatifs.

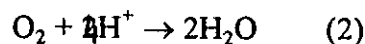
D'après de nombreux chercheurs ( **Faulkner et al., 1983, Benard et al., 1984, Landolt -1993** ) les ions métalliques sont des constituants de la phase métallique et de la phase aqueuse et ils peuvent passer indifféremment d'une phase à une autre. Ce transfert correspond à un transport de charges électriques. Un courant électrique anodique ou cathodique circulant d'une phase à une autre est généré par les réactions d'oxydations.

L'intensité des courants de corrosion sont sous les contrôles de ces électrodes. Cependant, l'influence des bactéries se limite à un effet d'aération différentielle causé par la présence hétérogène d'amas bactérien sur la surface métallique.

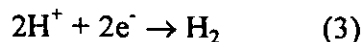
Les bactéries ne modifient pas le caractère électrochimique de la corrosion. Ainsi, la réaction partielle anodique qui correspond à l'oxydation du métal se fait selon la réaction suivante ( **Haslay et Leclerc -1993** ) :



alors que, la réaction partielle cathodique implique la réduction d'un composé du milieu aqueux aéré ( aérobiose ), selon la réaction suivante:



ou désaéré ( anaérobiose ), selon la réaction:



Les vitesses des réactions anodiques et cathodiques partielles sont équilibrées pour préserver l'électro-neutralité. Seulement, l'étape limitante peut être liée:

- soit au transport de masse de l'oxydant ou des produits de la réaction contrôlé anodiquement ou cathodiquement ou au transfert de charge anodique ou cathodique;
- soit aux propriétés du film passif qui est sous contrôle anodique.

Lorsque cette étape est accélérée, la dépolarisation cathodique ou anodique suit la réaction partielle considérée. La présence des micro-organismes vient modifier ou accélérer une de ces réactions ( **Feron et Thierry -1995** ).

### **1. 3. Influence des constituants du milieu**

**Ostroff (1965)** a expliqué que la présence des bactéries, dans l'eau, cause la corrosion de l'acier. Selon **Cordonnier et al., (1984)**, l'eau est un milieu en évolution.

Des échanges s'établissent entre l'eau et l'acier. Souvent, il y a formation d'un biofilm ou d'un dépôt discontinu sur la surface métallique constituée de biomasse microbienne fixée. Les échanges s'établissent entre le film du dépôt interne, le matériau support et l'eau.

Les résultats de comptages bactériens effectués sur des dépôts, ont amené **Mouchet et al., (1992)** à démontrer que l'eau est un milieu favorable pour les réactions physico-chimiques et biochimiques.

**Goudiakas et al., (1995)** ont remarqué que la prolifération des micro-organismes est fréquente dans les réseaux de distribution et dans les circuits d'eau. Souvent, l'analyse d'une eau d'injection est nécessaire pour évaluer l'existence des agents corrosifs.

D'après **Peng et Park (1994)**, la vitesse de corrosion de l'acier est modifiée en présence de micro-organismes et de sels dissous tels que les carbonates de calcium et les sulfates de sodium. En outre, l'effet des bactéries sulfatoréductrices sur la corrosion est insignifiant, quand 1,5 mM de  $\text{CaCO}_3$  sont ajoutés dans le milieu.

Certains sels minéraux constituent des sources d'oligo-éléments nécessaires aux métabolismes bactériens. La présence des chlorures dans l'eau, augmente sa corrosivité et conduit à des attaques localisées dans les canalisations en acier.

L'eau rentrant dans la constitution des bactéries, est chargée d'un ensemble de substrats organiques, d'anions et de cations en équilibre électrique tels que :  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{HS}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  .... Ces derniers sont utilisés par les bactéries au cours des processus de biodégradation.

Par ailleurs, certains auteurs comme **Cordonnier et al., 1984** ont montré que la présence de gaz carbonique dans l'eau favorise le développement des bactéries autotrophes. Par contre, la présence de l'oxygène favorise le développement des micro-organismes aérobies et conduit ainsi à une corrosion par l'oxygène.

En effet, la présence de certaines bactéries en liaison avec certaines substances chimiques de l'eau peut augmenter localement la vitesse de corrosion de l'acier et provoque une dépolarisation accrue des cathodes. Cette corrosion se caractérise par la formation de concrétions en présence des bactéries sulfatoréductrices et de ferrobactéries.

#### **1. 4. Mécanisme de la corrosion bactérienne**

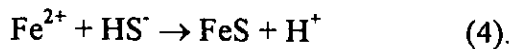
La corrosion bactérienne est définie comme étant une corrosion qui rassemble tous les phénomènes de la corrosion où les micro-organismes agissent directement ou par l'intermédiaire des substances provenant de leur métabolisme. Ces substances jouent un rôle primordial soit en accélérant un processus déjà établi ou en créant les conditions favorables à son établissement (**Chantereau -1980**).

**Feron et Thierry (1995)** définissent les biomécanismes d'attaque des métaux par les moyens avec lesquels les bactéries peuvent accélérer la vitesse de corrosion ou déclencher des corrosions localisées. Le mécanisme de corrosion comprend plusieurs étapes:

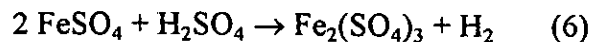
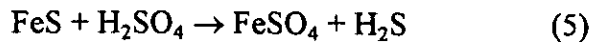
### 1. 4. 1. Production de métabolites corrosives

Lors de la croissance, de nombreuses bactéries produisent des métabolites corrosifs vis à vis des matériaux métalliques tels que les acides organiques, les acides minéraux, l'ammoniaque et les sulfures. Des études ( Werren -1983, Feron et al., 1995 ) ont montré qu'en présence de sulfures, il y a la corrosion métallique. De plus, l'action agressive de ces métabolites sur le métal est connue.

Cabridenc et al., (1974) ont démontré que cette action se déroule au niveau de l'anode et s'accompagne de la formation d'hydroxyde ferrique gélatineux. Au début, il est compact et par la suite il devient dur. L'hydroxyde ferrique (  $Fe(OH)_3$  ) est transformé en oxyde moins hydraté. La masse de l'oxyde ferreux devient rapidement perméable et favorise la diffusion d'air vers l'intérieur ( Fig. 1). Ce qui occasionne la corrosion de l'acier. En milieu anaérobie, les ions ferreux réagissent avec l'hydrogène sulfidrique(  $H_2S$  ) pour former du sulfure de fer (  $FeS$  ). De ce fait, la corrosion de l'acier est accélérée.



Le principe de réduction des sulfates en présence des BSR est donnée dans la figure 1. La production d'acides par les bactéries fait diminuer le pH du milieu. Ce qui favorise la corrosion de l'acier ( Cubicciotti et al., 1990 ). Par contre, les métabolites corrosifs agissent sur les composés oxydés tels que  $FeO$ ,  $Fe_2O_3$  et  $FeS$ , selon les réactions:



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

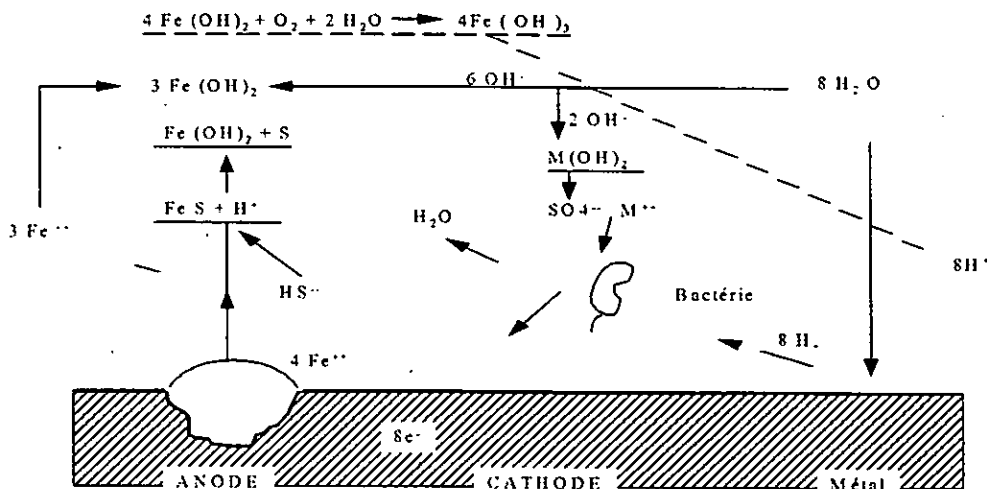
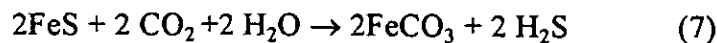
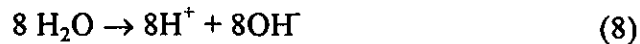


Fig. 1: Principe de la réduction des sulfates (  $SO_4^{2-}$  ) par les bactéries sulfatoréductrices.

## 1. 4. 2. Dépolarisation anodique et cathodique

D'après la théorie de la corrosion basée sur le phénomène de l'aération différentielle, un couple électrochimique est créé suite à une hétérogénéité du milieu constitué d'eau et de dépôt bactérien. Sur la surface anodique, le fer se dissout tandis qu'un film d'hydrogène se forme au niveau de la cathode. Le processus tendrait vers un état d'équilibre. Pour que l'électrolyse puisse se poursuivre, la pile est dépolarisée. Les bactéries sulfatoréductrices interviennent à ce niveau. **Stephensen et al. (1931)** ont démontré que ces bactéries sont capables, par des réactions enzymatiques, d'utiliser l'hydrogène et d'entraîner la reprise des réactions anodiques et cathodiques par le pompage de l'hydrogène cathodique. Le mécanisme proposé par **Von Wolzogen et al. (1934)** est décrit par les équations suivantes :

Dissociation de l'eau:



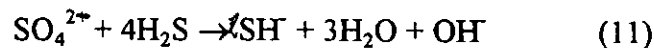
Réaction anodique:



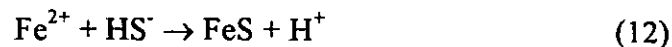
Réaction cathodique:



Dépolarisation cathodique correspondant aux réactions du métabolisme des BSR:



Formation des produits de corrosion:



Corrosion à l'anode:



Il est à noter que le mécanisme reste inchangé, si l'on admet que les BSR utilisent l'hydrogène adsorbé à la cathode ou l'hydrogène moléculaire de la solution. **Both et Tiller (1962)** ont étudié la corrosion de l'acier au carbone par les BSR.

Les résultats obtenus, des mesures électrochimiques, ont révélé la présence d'une relation directe entre l'activité de l'enzyme hydrogénase des BSR et l'activité de dépolarisation anodique et/ou cathodique.

## 1. 4. 3. Effet de l'aération différentielle

La consommation locale de l'oxygène par les bactéries aérobies provoque une déficience en cet élément, dans différentes zones du biofilm ( Fig. 2). Le biofilm et les dépôts de corrosion limitent la diffusion de l'oxygène. La partie profonde située au contact du support devient pauvre en oxygène et facilite la croissance des BSR avec production d'acides.



Degrément (1993) et d'autres auteurs ( Coulter et al., -1976, Costerton et al., -1979 ) ont expliqué que la diffusion non uniforme de l'oxygène vers la surface du métal conduit à une dépolarisation partielle des zones cathodiques, en accélérant le processus de corrosion.

Dans un milieu aqueux proche de la neutralité, Feron et Thierry (1995) ont remarqué qu'en absence de l'oxygène, la vitesse de corrosion de l'acier au carbone est faible. Elle est limitée par la réaction cathodique:  $2 H^+ + 2e \rightarrow H_2$

Cependant, la corrosion de l'acier a été mise en évidence dans les milieux désaérés, que ce soit dans les canalisations enterrées destinée au transport de pétrole (eau + pétrole ). Dans ce cas, la corrosion est localisée et la vitesse de corrosion peut atteindre plusieurs millimètres par an. Par la suite, il a été admis que cette corrosion est attribuée aux bactéries sulfatoréductrices.

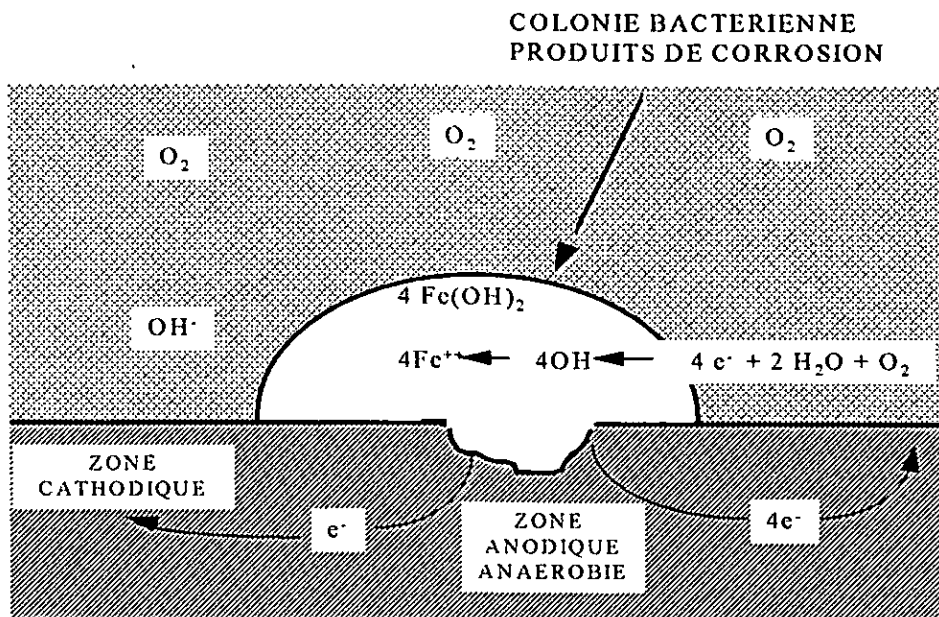


Fig. 2: Formation de la cellule d'aération différentielle.

#### 1. 4. 4. Influence du soufre sur le développement des bactéries sulfatoréductrices

Le soufre constitue une part restreinte dans la composition des micro-organismes et ne dépasse pas 1 ou 2 % de leur masse. La plus grande partie est contenue dans les acides aminés soufrés ( cystéine, méthionine ) des protéines, les facteurs de croissance (thiamine, biotine, coenzyme A, acide lipoïque ) et dans certains métabolites comme le glutathion et la glutamylcystéineglycine. Il est introduit dans la structure moléculaire des bactéries sous la forme réduite de sulfure.

Dans le milieu aqueux contaminé par les bactéries, il est oxydé sous forme de sulfates. La bioconversion entre les sulfures, les sulfates et les formes intermédiaires d'oxydoréductions du soufre constitue le cycle du soufre ( Pelment -1993 ).

Dans ce cycle, les sulfates sont utilisés par des micro-organismes sulfatoréducteurs pour être transformés en sulfure ou en soufre élémentaire.

Certains dépôts de soufre peuvent avoir une origine biologique ( **Pelment -1993** ). La réduction des sulfates peut être expliquée de deux manières:

- 1 - La génération d'ions sulfures nécessaires à l'anabolisme cellulaire. D'après des auteurs, cet anabolisme est la réduction assimilatrice des composés soufrés.
- 2 - Les sulfates et les composés soufrés servent d'accepteurs d'électrons dans les oxydations génératrices d'énergie cellulaire. Cette réduction est la dissimulation des sulfates.

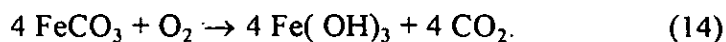
Selon **Riviere (1981)** et **Degrement (1993)**, l'identification des micro-organismes faisant partie du cycle du soufre a révélé la présence de bactéries sulfatoréductrices. Certains non spécialisés sont capables d'utiliser du soufre minéral en anaérobie pour leur croissance. D'autres micro-organismes spécialisés sont responsables de l'oxydation du soufre et de la sulfatoréduction. Cette dernière catégorie de micro-organismes est la cause de la corrosion bactérienne.

**Hadley (1961)** a montré que les micro-organismes aérobies et anaérobies associées aux BSR, contribuent par leur propriétés physiologiques à modifier les vitesses des réactions anodiques et/ou cathodiques. En outre, ils changent l'état de surface de l'acier ou créent un environnement de croissance pour les BSR. Ces bactéries produisent des capsules boueuses, dans certaines conditions d'environnement, appelées slime forming.

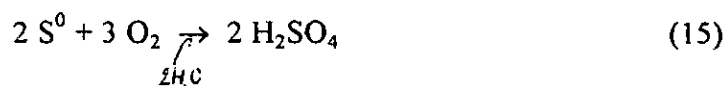
#### **1. 4. 4. 1. Les bactéries ferrugineuses ( Ceca -1975 )**

Les bactéries ayant une affinité pour le fer peuvent oxyder le fer ferreux contenu dans les milieux aqueux et produisent le fer ferrique. Ce dernier est un précipité de consistance mucilagineuse. L'oxygène est un facteur de croissance pour ces bactéries.

Il a été remarqué que ces micro-organismes contribuent dans la prolifération des BSR suite à la consommation de l'oxygène et provoquent en retour la précipitation d'hydroxyde ferrique. Ces précipités créent des zones désaérées où les BSR vont se développer, selon la réaction suivante:



En plus des ferrobactéries, des bactéries métabolisant le soufre en acide sulfurique à partir de l'hydrogène sulfuré ou du sulfure coexistent avec les bactéries sulfatoréductrices. Les sulfobactéries libèrent l'acide sulfurique, dans les effluents ou l'emmagasinent dans la cellule bactérienne, selon la réaction ci-dessous:



## 1. 4. 4. 2. Les bactéries sulfatoréductrices ( BSR )

### 1. 4. 4. 2. 1. Définition

D'après **Bergey (1984)**, les bactéries sulfatoréductrices ( BSR ) constituent un groupe très diversifié, formé d'une quinzaine de genres différents et appartenant à une soixantaine d'espèces.

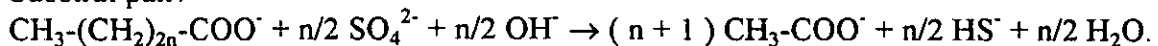
Taxonomiquement, elles appartiennent à la famille des Spirillaceae, règne des Eubactéries. Elles sont anaérobies strictes, Gram négative et ont le pouvoir d'utiliser le sulfate comme accepteur terminal d'électrons. Flagellées ou non, de taille variant de 1 à 5 µm de long et de 0.5 à 1 µm d'épaisseur, ces bactéries réalisent le couplage de l'oxydation d'un substrat organique donneur d'électrons avec réduction des sulfates en sulfures ( **Magot -1995** ).

### 1. 4. 4. 2. 2. Métabolisme des BSR

Pour l'identification des BSR, **Pfennig et al., (1981)** ont proposé deux classes métaboliques pour les BSR:

- 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'électrons soit pair ou impair:

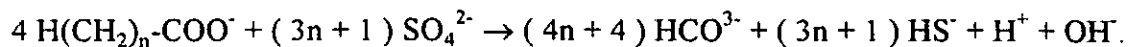
Substrat pair:



Substrat impair:



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



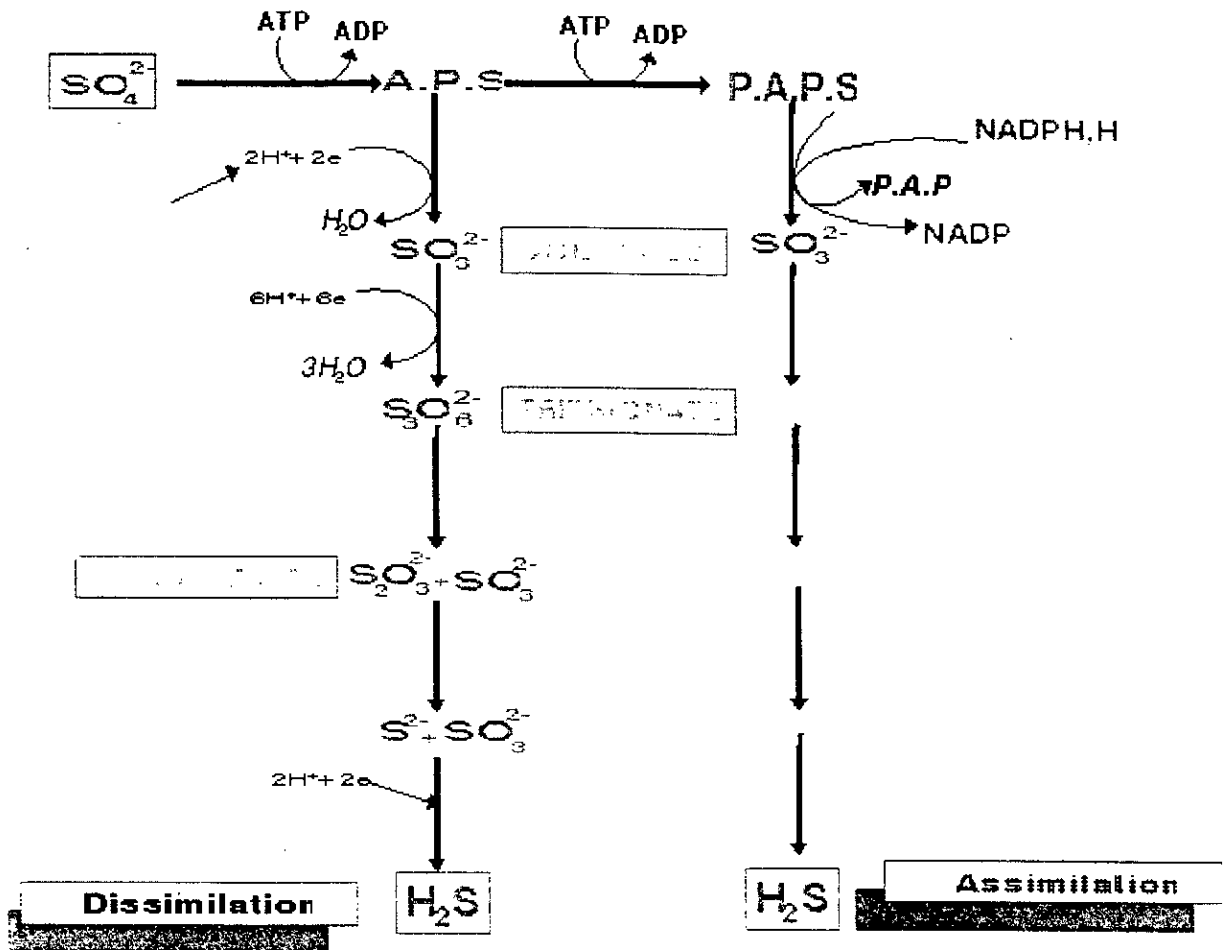
**Pelment (1993)** a expliqué que la réduction des sulfates ( accepteur d'électrons ), en sulfures se fait, selon deux mécanismes ( Planche 1 ).

Le premier mécanisme consiste en une réaction de réduction assimilatrice. Au cours de cette dernière, les sulfates sont réduits en sulfures par les BSR. Elle se fait en plusieurs étapes catalysées par des enzymes spécifiques et nécessite 8 électrons.

- La première étape correspond à l'activation des sulfates par une ATP sulfurylase en adénosine phosphosulfate (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 soufrés.

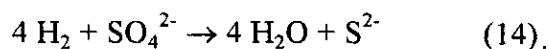
- La deuxième étape est propre à l'assimilation. Elle correspond à une deuxième activation de l'APS en phosphoadénosine 5' phosphosulfate (PAPS) par l'enzyme APS kinase.
- La troisième étape est le passage aux sulfites, catalysée par la PAPS sulfotransférase (passage de PAPS en sulfite) et l'adénosine phosphosulfite réductase (passage de l'APS en sulfite).

Le deuxième mécanisme correspond à la dissimulation des sulfates avec libération de grandes quantités de sulfures et permet aux BSR de se procurer l'énergie nécessaire à leur métabolisme. Cette opération s'effectue en anaérobiose. L'assimilation du soufre par les BSR ne peut se faire qu'à l'état de sulfures (**Pelment -1993**).



**Planche 1: Mécanisme de la réduction des sulfates en sulfures chez les bactéries sulfatoréductrices ( Pelment -1993 ).**

Chez certaines BSR, la réduction des sulfates peut être couplée à l'oxydation de l'hydrogène moléculaire. Cette propriété physiologique est due à la présence d'hydrogénases. La réaction globale se fait selon la réaction de réduction des sulfates suivante:



## 2. Méthodes utilisées pour l'étude de la corrosion bactérienne

### 2. 1. Méthodes d'évaluations électrochimiques

#### 2. 1. 1. Mesure du potentiel libre

La mesure du potentiel de corrosion est très utilisée dans les études sur la corrosion bactérienne ( Hadley -1943 ). Dans un système métal-milieu contaminé ou non contaminé par les bactéries, lorsqu'une seule réaction se produit à la surface du métal, le système se comporte comme une électrode simple. Le potentiel au repos (  $E$  ) correspond au potentiel que prend spontanément une électrode, en l'absence d'un courant externe. Quand le potentiel d'une électrode diffère du potentiel au repos, un courant électrique traverse l'interface électrode-électrolyte. La surtension  $\eta$  correspond à l'écart entre le potentiel d'électrode et le potentiel réversible d'une réaction d'électrode ( Landolt -1993).

$$\eta = E - E_{\text{rév}} \quad (15)$$

Une surtension positive indique qu'un courant anodique (  $i_a$  ) traverse l'interface, et une surtension négative signifie la présence d'un courant cathodique (  $i_c$  ). Souvent, plusieurs réactions peuvent avoir lieu simultanément à la surface de l'électrode. Ce système est considéré comme une électrode mixte. Le potentiel au repos de l'électrode mixte subissant une corrosion correspond au potentiel de corrosion. La corrosion des métaux en milieu aqueux est de nature électrochimique.

Deux réactions partielles apparaissent au potentiel de repos. Une réaction partielle anodique correspondant à l'oxydation du métal et une réaction partielle cathodique correspondant à la réduction d'une espèce chimique présente dans le milieu aqueux. Le plus souvent, dans une solution désaérée ( en anaérobiose pour les BSR ), il y a réduction des ions  $H^+$ .

A l'équilibre, les courants des réactions partielles anodiques et cathodiques, en valeurs absolues, doivent être égales afin de préserver l'électroneutralité:

$$E = E_{\text{rév.}} \text{ et } i = i_a = i_c = 0 \quad (16)$$

Par conséquent: 
$$i_a ( E_{\text{rév.}} ) = -i_{\text{corr}} ( E_{\text{rév.}} ) = 0 \quad (17)$$

L'étape limitante des réactions partielles de corrosion peut être liée aux:

- transports de masses de l'oxydant ou des produits de la réaction ;
- transferts de charges anodiques ou cathodiques ;
- propriétés du film passif (contrôlé anodique) ( Feron et Thierry -1995 ).

Ainsi, la polarisation  $\zeta$  exprime l'écart entre le potentiel d'une électrode mixte polarisée et son potentiel de corrosion (  $E_{\text{corr.}}$  ).

$$\zeta = E - E_{\text{corr.}} \quad (18)$$

L'équation (17) définit la densité du courant d'échange  $i_{corr}$  d'une réaction d'électrode. Elle caractérise la vitesse de transfert de charges à l'équilibre. La présence des BSR modifie ou accélère une des réactions partielles ( Feron et Thierry -1995 ).

### 2. 1. 2. Courbe de Polarisation potentiodynamique

La vitesse de réaction de l'électrode dépend de son potentiel. Elle varie linéairement avec la densité de courant, selon la loi de Faraday :

$$I = n \cdot F \cdot dn_i / dt \quad (19)$$

$I = dQ / dt$  correspond à l'intensité du courant électrique,  $dn_i / dt$  est la vitesse de réaction,  $F$  est la constante de Faraday et  $Q$  la quantité d'électricité présente dans la solution.

La densité du courant mesurée en fonction du potentiel donne une courbe de polarisation qui renseigne sur la cinétique des réactions se produisant à la surface de l'électrode. Plus récemment, des mesures de polarisation sont utilisées pour établir les variations de l'effet de polarisation et de dépolarisation des BSR ( Westlake et al., 1986).

Pour déterminer une courbe de polarisation potentiodynamique ( Bard et Faulker -1983 ) (Fig. 3 ), on applique à l'aide d'un potentiostat, différents potentiels entre l'électrode de travail à étudier et une électrode de référence ( électrode de calomel saturée, ECS ). Le courant stationnaire qui s'établit est mesuré, après un certain temps, dans le circuit électrique entre l'électrode de travail et une contre électrode. Le potentiostat maintient le potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence constant et la densité du courant  $i$  est égale au courant mesuré  $I$  par la surface  $A$  de l'électrode de travail :

$$i = I/A \quad (20)$$

Avec:  $i$  = densité du courant (  $\mu A/cm^2$  ),  
 $A$  = surface de l'électrode (  $cm^2$  ).

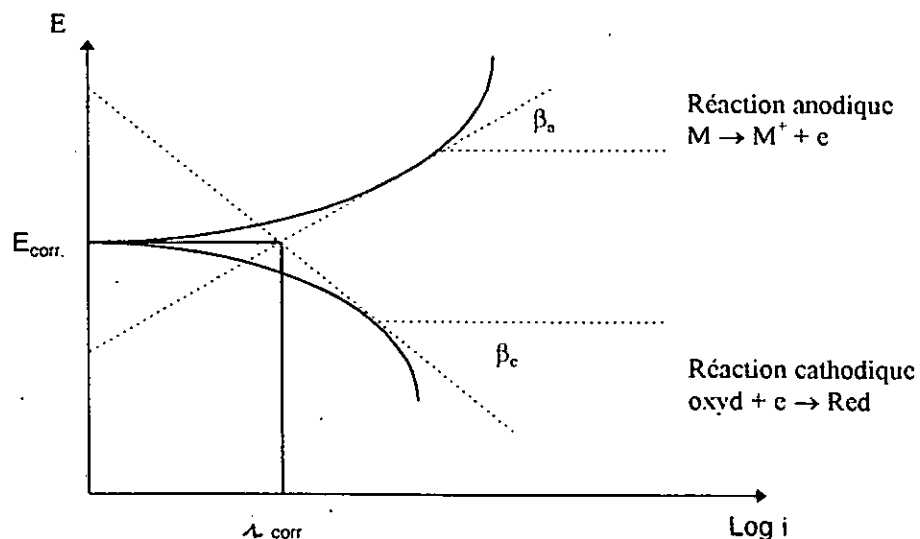


Fig. 3: Courbe de polarisation potentiodynamique d'une électrode en acier ( Bard et Faulker -1983 ).

### 2. 1. 2. 1. Droites de Tafel

Les réactions électrochimiques sont contrôlées par la polarisation d'activation. Les courbes correspondantes peuvent être assimilées à des portions exponentielles ( Fig. 3). La cinétique de ces réactions obéit aux lois de Tafel, en se basant sur l'équation de Butler- Volmer :

$$i = i_{\text{corr}} \exp [ \alpha n F / R T ( E - E_{\text{rév.}} ) ] - i_{\text{corr}} [ - (1-\alpha) n F / R T ( E - E_{\text{rév.}} ) ] \quad (21)$$

avec:  $\beta_a = R T / \alpha n F$  et  $\beta_c = R T / (1-\alpha) n F$

La détermination expérimentale des paramètres de la vitesse de corrosion ( $v_{\text{corr.}}$ ) et du courant de corrosion ( $i_{\text{corr.}}$ ) et les constantes de Tafel anodique  $\beta_a$  et cathodique  $\beta_c$  se fait à partir d'une représentation semi-logarithmique de la courbe de polarisation potentiodynamique. Elle met en évidence la relation linéaire entre  $\log i$  et la surtension  $\eta$ . Le domaine de Tafel anodique correspond à la plage de potentiel de:  $\eta / \beta_a \gg 1$ .

L'équation (9) devient, alors:

$$i = i_a = i_{\text{corr.}} \cdot \exp( \eta / \beta_a ) \quad (22)$$

Le logarithme de l'équation 10 donne  $\eta = -\beta_a \text{Ln } i_{\text{corr.}} + \beta_a \text{Ln } i$ . En passant au logarithme décimal et en définissant les constantes de Tafel anodique  $a_a$  et  $b_a$ , on obtient l'équation de Tafel d'une réaction anodique:

$$\eta = a_a + b_a \text{Log } i \quad (23)$$

De façon analogue, le domaine de Tafel cathodique correspond à :  $\eta / \beta_c \ll 1$ , l'équation 10 devient:

$$i = i_c = -i_{\text{corr.}} \cdot \exp ( -\eta / \beta_c ) \quad (24)$$

L'équation de Tafel cathodique est:

$$\eta = a_c - b_c \text{Log } i \quad (25)$$

La cinétique électrochimique permet d'étudier la variation de la densité du courant en fonction du potentiel de l'électrode ou réciproquement. Par contre, l'interprétation de la courbe de polarisation globale, en présence et en absence de bactéries, permet de mettre en évidence les différents processus se produisant à l'interface métal/solution.

### 2. 1. 3. Impédance électrochimique

#### 2. 1. 3. 1. Définition

La méthode d'impédance consiste à mesurer la réponse de l'électrode face à une modulation sinusoïdale de faible amplitude du potentiel en fonction de la fréquence. On peut superposer une telle modulation à un potentiel anodique ou cathodique imposé ou au potentiel de corrosion ( $E_{\text{corr}}$ ) ( Bard et al. -1983, Landolt -1993 ).

### 2. 1. 3. 2. Rappels théoriques sur l'impédance

Une modulation sinusoïdale de faible amplitude  $\Delta E = E - E_{lib}$  est superposée au potentiel ( $E_{lib}$ ) d'une électrode.

$$\Delta E = |\Delta E| \sin(\omega t) \quad (26)$$

$|\Delta E|$  désigne l'amplitude,  $\omega = 2\pi f$  la pulsation en rad/s proportionnelle à la fréquence  $f$  (Hz). La perturbation sinusoïdale du potentiel induit un courant  $\Delta I$ , superposé au courant stationnaire  $I$  et déphasé d'un angle  $\varphi$  par rapport au potentiel.

$$\Delta I = |\Delta I| \sin(\omega t') = |\Delta I| \sin(\omega t' - \varphi) \quad (27)$$

avec:  $\varphi = \omega \cdot (t - t')$

Les fonctions décrites s'expriment plus facilement en nombres complexes. Dans un plan complexe, on présente une perturbation sinusoïdale du potentiel par un vecteur  $\Delta E$  qui correspond à la somme d'un terme réel et d'un terme imaginaire. Cette perturbation est:

$$\Delta E = \Delta E_{re} + j \Delta E_{im} = |\Delta E| \cos(\omega t) + j |\Delta E| \sin(\omega t) \quad (28)$$

Avec  $j = \sqrt{-1}$ . D'une façon analogue, on trouve :

$$\Delta I = \Delta I_{re} + j \Delta I_{im} = |\Delta I| \cos(\omega t') + j |\Delta I| \sin(\omega t') \quad (29)$$

D'où l'impédance qui représente le rapport :

$$Z = \Delta E / \Delta I \quad (30)$$

Dans un plan complexe, l'impédance  $Z$  représente un vecteur caractérisé par le module  $|\Delta Z|$  et l'angle de déphasage  $\varphi$ . On peut représenter  $Z$ , comme une somme vectorielle d'une partie réelle et d'une partie imaginaire.

### 2. 1. 3. 3. Circuit équivalent d'un système électrochimique

L'impédance d'un circuit électrique est constituée de trois éléments essentiels: la résistance  $R$ , la capacité  $C$  et l'inductance  $L$ .

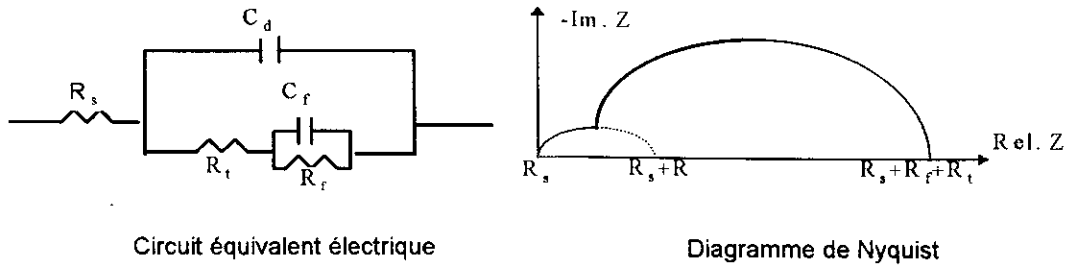
L'impédance d'un système électrochimique correspond à un circuit électrique équivalent composé d'éléments passifs. Ce circuit, dans certaines conditions, est composé d'une capacité  $C$  et d'une résistance  $R_c$ , résistance aux transferts de charge dans un électrolyte. Il décrit le comportement électrique de l'interface électrode-électrolyte. Quand un courant passe entre l'électrode de travail et l'électrolyte, on ajoute la résistance Ohmique de la solution  $R_s$ .

D'autre part, la spectroscopie d'impédance peut mettre en évidence la présence d'un biofilm; si celui-ci se traduit par l'addition d'une résistance électrique et d'une capacité électrique, dans le modèle de circuit équivalent de l'interface métal-solution. La figure 4 représente un tel modèle.



Les grandeurs électriques du circuit électrique équivalent peuvent être classées en trois catégories:

- celles qui se rapportent à la corrosion de l'électrode: il s'agit de la résistance de transfert de charge  $R_t$  et de la capacité de la double couche électrique  $C_{dl}$ ;
- celles qui caractérisent le biofilm d'un groupe de bactéries donné: la résistance du biofilm,  $R_f$  et sa capacité  $C_f$ ;
- la résistance de la solution  $R_s$ , entre l'électrode de travail et l'électrode de référence ( **Feron -1990** ).



**Fig. 4: Circuit électrique équivalent et diagramme d'impédance de Nyquist en présence d'un biofilm bactérien et en absence de la diffusion ( Feron -1990 ).**

**Boudrani, Corrieur et Coulet (1994)** ont montré que la présence des micro-organismes dans un milieu biologique modifiait les éléments passifs d'un circuit électrochimique. Les graphes d'impédance peuvent être représentés par :

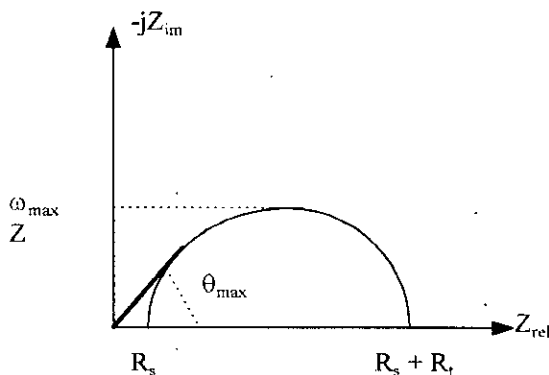
- Le diagramme de Nyquist qui correspond à la représentation complexe ( partie réelle de l'impédance en fonction de sa partie imaginaire ) ( Figure 4 a ), Selon:

$$Z = Z_{re} + j Z_{im} \quad (31)$$

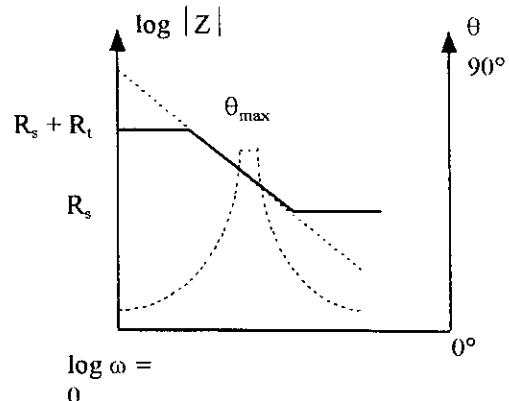
Cette représentation permet de déterminer  $R_t$ ,  $R_s$  et  $C_{dl}$ .

- Le diagramme de Bode correspond au  $\text{Log } |Z|$  en fonction de  $\log f$  et  $\varphi$  en fonction de  $\log f$  (Figure 4 b ). L'angle de déphasage  $\varphi$  est donné par :

$$\varphi = \text{Arc tg} . Z_{im} / Z_{re} \quad (32)$$



**Fig. 4a: Diagramme de Nyquist en absence de biofilm**



**Fig 4b: Diagramme de Bode en absence de biofilm.**

## **2. 2. Méthodes d'évaluations microbiologiques**

### **2. 2. 1. Rappels sommaires sur la croissance bactérienne**

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

- La croissance ou l'augmentation de la concentration cellulaire ( biomasse ).
- Le micro-organisme excrète, à travers ses enveloppes cellulaires, des substances corrosives tels que les sulfures et les acides organiques.

### **2. 2. 2. Phénomènes de la croissance des bactéries**

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

#### **2. 2. 2. 1. Méthodes directes**

##### **i). Comptage au microscope optique**

Les avantages de la microscopie optique sont la rapidité et la simplicité. Elle permet une observation directe des micro-organismes, en utilisant des cellules de numération de type cellule de Mallassez.

##### **ii). Dénombrement bactérien**

Le dénombrement consiste à ensemercer des suspensions bactériennes diluées à partir de l'échantillon mère sur un milieu de culture stérile spécifique au micro-organisme à évaluer. **Rodier et al. (1978)** ont réalisé le dénombrement sur un milieu solide dans des boîtes de Pétri. Après incubation, le nombre de colonies obtenues serait égale au nombre de micro-organismes présents lors de l'ensemencement.

##### **iii). Mesure de la densité optique**

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

$$-dI_t / dL = \alpha \cdot I_t \cdot C \quad (33)$$

$L$  : distance parcourue par la lumière  
 $\alpha$  : coefficient molaire d'absorption

L'intégration de l'équation (33) permet d'obtenir:

$$\ln I_t / I_0 = \alpha \cdot C \cdot L \quad (34)$$

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

$$A = \text{Log}_{10}. 1/T \quad (35)$$

### **2. 2. 2. Méthodes indirectes**

La croissance microbienne est un ensemble de réactions biochimiques, conduisant à la synthèse de constituants cellulaires. L'évolution, en fonction du temps, de la biomasse est corrélée à la transformation d'un ou plusieurs constituants du milieu et à la synthèse de métabolites. Les BSR sont capables de réduire les sulfates en sulfures ( **Riviere -1981, Pelment -1993** ). Ces composés sont dosés en fonction du temps et permettent de suivre l'évolution de la population des bactéries de la corrosion.

### **2. 2. 3. Courbe de croissance**

L'étude consiste à suivre, en fonction du temps, l'évolution de la concentration cellulaire ( Fig. 5 ). Dans un milieu de culture non renouvelé et dans des conditions de température et de pH déterminés, la croissance d'un micro-organisme passe par quatre grandes phases distinctes.

L'activité bactérienne est évaluée graphiquement et elle quantifie la concentration cellulaire X et/ou son logarithme en fonction du temps. Les quatre grandes phases de croissance sont les suivantes:

#### ***ij. Phase de latence***

Elle commence immédiatement après l'ensemencement du micro-organisme, dans le milieu de culture. Il s'agit d'une période d'adaptation du micro-organisme au milieu. Au cours de cette période, la cellule bactérienne synthétise les enzymes nécessaires pour métaboliser le substrat présent.

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

$$X = C^{te} = X_0 \quad (36)$$

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

Durant cette phase, la vitesse de croissance et la vitesse spécifique de croissance  $\mu$ . sont nulles.

### ii). Phase d'accélération

Après l'adaptation du micro-organisme, cette phase correspond au commencement de la multiplication cellulaire. La concentration cellulaire  $X$  et la vitesse spécifique de croissance  $\mu$  augmentent, suite au début de la reproduction cellulaire.

### iii). Phase de croissance

Quand la vitesse de reproduction cellulaire atteint son maximum, on assiste à une phase exponentielle de croissance. Elle dure tant que la vitesse de reproduction  $dX/dt$  est constante. Elle est évaluée par le temps de doublement de la population microbienne ou par le temps de génération de la bactérie "G". Durant la phase de croissance logarithmique:

- la valeur de  $G$  prend sa valeur minimale,
- la vitesse de croissance  $dX/dt$  augmente proportionnellement à  $X$ ,
- la vitesse spécifique est constante et maximale.

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

$$dX/dt \cdot 1/X = \mu_{\text{max}} \quad (37)$$

Plusieurs auteurs ( Scriban -1993 et Pelment -1993, Boudrant et al., 1994 ) ont remarqué que la composition cellulaire d'une bactérie est constante même avec la variation de la composition du milieu de culture qui favorise la synthèse cellulaire.

### iv). Phase de ralentissement

A un moment donné, la courbe de croissance tracée en coordonnées ordinaires présente un point d'inflexion. En biochimie, cette inflexion correspond à l'épuisement du milieu de culture. Il y a, alors, disparition de un ou de plusieurs composés nécessaires à la croissance. La concentration  $X$  continue d'augmenter, alors que les rapports  $dX/dt$  et  $dX/dt \cdot 1/X$  diminuent.

### v). Phase stationnaire

La concentration cellulaire  $X$  atteint son maximum et la croissance s'arrête. Les cellules bactériennes conservent une activité métabolique et leur structure biochimique subit des modifications

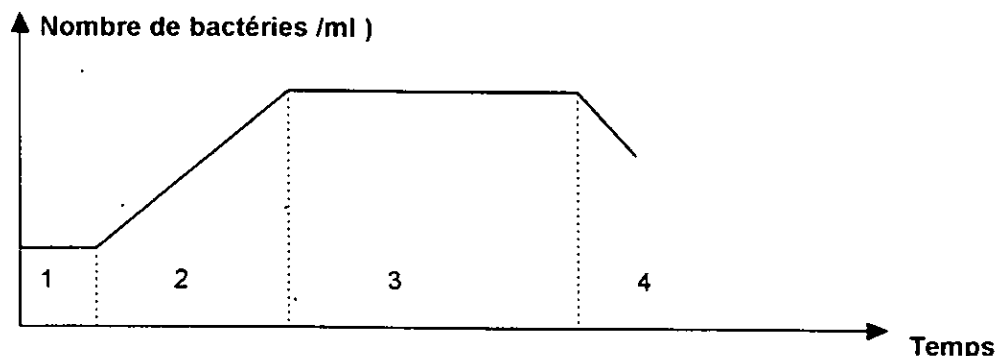


Fig. 5: Courbe de croissance bactérienne ( Scriban -1993 )

(1): phase de latence, (2): phase de croissance, (3): phase stationnaire, (4): phase de déclin

### **vi). Phase de décroissance**

Le nombre de cellules viables diminue du fait de la mortalité. Le taux de croissance augmente progressivement et parallèlement la concentration en biomasse décroît par suite de l'autolyse. Certaines bactéries de la corrosion peuvent résister aux conditions défavorables du milieu et entrent en sporulation.

## **3. Traitement par les antagonistes bactériens**

### **3. 1. Introduction**

Dans la nature, les bactéries sont nombreuses, variées et variables. Les réactions biochimiques d'une communauté bactérienne ne sont jamais la somme des propriétés de chacune des populations bactérienne ( **Guillaume et al., 1977** ).

Dans la flore microbienne, il y a des rapports coopératifs et bénéfiques ou compétitifs et antagonistes. Dans les conditions naturelles, les populations bactérienne varient en fonction de la nature et de la concentration des produits nutritifs présents dans le milieu.

D'une manière générale, les effets qu'une micropopulation bactérienne donnée peut exercer sur une autre, sont de trois types:

- un effet positif : la synergie
- un effet négatif : l'antagonisme
- aucun effet : la neutralité

Ces différents types d'interactions microbiennes font partie de ce qu'on appelle en écologie la dynamique des populations. En effet, les micro-organismes habitant l'eau sont dans un état d'équilibre.

Toute modification de cet équilibre provoque des changements à la fois qualitatif et quantitatif dans la population microbienne d'un milieu. Cet équilibre peut être modifié par l'introduction soit de composés nutritifs stimulant ou inhibant la croissance des bactéries, soit de bactéries associatives, concurrentielles ou antagonistes.

La nature et la concentration des différents micro-organismes constituant une population microbienne dans un milieu naturel ( eau, air...) dépend de nombreux facteurs. Ces facteurs sont:

- la nature physique du milieu dans lequel vit la population microbienne,
- la nature, la concentration et les possibilités métaboliques d'utilisation des constituants chimiques du milieu nécessaires à la nutrition des micro-organismes, tels les substances utilisées comme source d'énergie ou comme éléments pour les synthèses cellulaires,
- les conditions du milieu favorables ou défavorables au développement des micro-organismes donnés,
- la présence et la concentration des micro-organismes qui produisent des substances favorables, stimulantes ou toxiques pour les micro-organismes.

### 3. 2. Interrelations entre les micro-organismes

#### 3. 2. 1. Interrelations associatives

De nombreux exemples de relations associatives entre les micro-organismes ont été trouvés dans les milieux naturels. **Waksman ( Selman -1948)** a montré que la synthèse ou la modification d'un substrat présent dans le milieu par un micro-organisme rendait son assimilation facile pour un autre micro-organisme. D'autre part, le même auteur explique l'influence de l'oxygène sur la croissance bactérienne. La consommation de l'oxygène par les bactéries aérobies favorise souvent le développement des bactéries anaérobies favorable.

C'est ainsi que **Guillaume et al. (1977)** ont remarqué qu'en présence de *Desulfovibrio*, bactérie sulfatoréductrice et de thiobacilles, bactérie sulforéductrice, le phénomène de corrosion a lieu. La bactérie sulfato-réductrice réduit les sulfates en sulfures et le thiobacillus oxyde le soufre en acide sulfurique. Il y a, alors, création de conditions anaérobiques favorables à la croissance des BSR.

Dans certains cas, l'interaction associative fait intervenir plus de deux bactéries. Parmi les études effectuées sur ce type d'interactions, figurent les travaux de **Tuovinen et al., (1982)** et **Hasley et al (1993)**. En faisant des dénombrements bactériens à partir de tubercules de corrosion, ces chercheurs ont montré que les parties anaérobiques des tubercules sont contaminées par les bactéries sulfato-réductrices et les bactéries dénitrifiantes. Par contre, les parties aérobiques sont contaminées par des germes hétérotrophes aérobies-anaérobies facultatifs.

D'autres travaux, (**Enp -1983**) considèrent que l'association des bactéries hétérofermentatives (*Escherichia coli*), et photosynthétique (*Chromatium vinosum*) avec les bactéries sulfato-réductrice (*Desulfovibrio vulgaris*) induit la croissance de cette dernière. Le milieu de culture contient une source de carbone ( glucose ) et des sulfates comme source de soufre. Les résultats ont montré que les bactéries *Escherichia coli* en fermentant le glucose produit de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'acide formique, de l'acide succinique et de l'éthanol.

D'autre part, *Desulfovibrio vulgaris* utilise comme source de carbone et d'électrons les acides lactique, formique et l'éthanol couplée à la réduction des sulfates en sulfures. Ces derniers sont utilisés par les bactéries photosynthétiques. Ceci diminuera la corrosion provoqué par *Desulfovibrio vulgaris*. Dans les conditions expérimentales précédentes, le milieu de culture de composition chimique déterminée contient un substrat utilisable par une souche de bactérie. Les produits de son métabolisme permettent directement ou indirectement la croissance des autres souches de bactéries.

Une autre étude proposée par **Dowling et al. (1990)** (**Hasley -1993**), a élucidé le phénomène de l'interaction entre les bactérie de *Desulfovibrio* ou *Desulfobacter* et *Eubacterium linosum*. Les BSR proposées ne se développent pas en autotrophie (présence de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>). Elles ont besoin d'acétate comme source de carbone. Les souches bactériennes d'*Eubacterium linosum* produisent de l'acétate en présence du dioxyde de carbone ( CO<sub>2</sub> ) et d'hydrogène (H<sub>2</sub>).

Les résultats de leurs travaux ont montré que la corrosion était très faible en présence des souches d'*Eubacterium linosum* et nulle avec les BSR. Par contre, l'association en coculture des bactéries *Eubacterium linosum* et les bactéries *Desulfovibrio* ou *Desulfobacter* entraînent une corrosion intense.

### **3. 2. 2. Interrelations de compétition**

Théoriquement, les mécanismes de compétition existent entre les micro-organismes dans les milieux naturels. Le nombre des micro-organismes pourrait être modifiés par l'introduction, dans le milieu, de matières organiques ou inorganiques.

Ces nutriments constituent des facteurs limitants pour les micro-organismes. Il est admis, que la compétition nutritive est essentielle dans le milieu de culture. Par ailleurs, une compétition pour l'espace peut apparaître, lorsque des micro-environnements deviennent riches en substances nutritives.

Allen (1939) ( Selman -1948 ) ont remarqué que le soufre et le phosphore constituent des facteurs limitants pour la croissance des micro-organismes en compétition dans un milieu contenant des concentrations élevées en carbone et en azote. Cependant, une compétition nutritive peut avoir lieu pour ces mêmes facteurs de croissance.

### **3. 2. 3. Interrelations antagonistes :**

Il a été remarqué qu'en présence de deux ou plusieurs souches de micro-organismes l'un d'eux peut se comporter comme un antagoniste. La composition du milieu et les conditions de culture influent sur l'action de l'antagoniste. Dmitrevskaya et al., (1936) explique cette action par une modification dans le métabolisme et dans la structure cellulaire. Différents types d'antagonismes sont connus.

Nakhilovskaia (1938) a démontré que tous les phénomènes d'antagonismes entre les micro-organismes pouvaient être classés en quatre groupes:

- antagonismes in vivo et in vitro,
- les formes inhibitrices, bactéricides ou lytique d'antagonisme,
- antagonisme direct et indirect,
- antagonisme monolatéral ( entre souches de mêmes espèces ) et bilatéral ( entre souches de différentes espèces ).

En outre, de nombreux micro-organismes sont capables de produire des substances possédant un effet inhibiteur sur leur propre développement ( iso-antagonisme ) ou sur les différents micro-organismes ( hétéro-antagonisme ) par:

- un ralentissement et l'inhibition de l'activité bactérienne,
- une action bactéricide,
- une action bactériostatique

Il a été démontré que l'inoculation d'un milieu contenant une souche bactérienne par une autre souche bactérienne, fait souvent ralentir la croissance de la deuxième souche de bactérie par rapport à une culture témoin.

Selon Nakhilovskaia (1938), ce ralentissement est dû au changement des conditions de milieu tels que le pH et l'appauvrissement en constituants nutritifs. Il peut être dû aussi à l'action des produits métaboliques formés par l'antagoniste.

D'autre part, les études de Bail (1929) ( Selman -1948) ont montré que l'action d'un antagoniste est fonction de sa concentration. Cet auteur suggère que chaque bactérie possède un nombre constant "M" de cellules capable de vivre dans un espace donné. Quand cette concentration est atteinte, la multiplication s'arrête.

Les mêmes observations sont obtenues avec deux bactéries cultivées dans un même milieu. La souche bactérienne possédant la plus grande valeur de M arrête la multiplication des bactéries de l'autre souche.

Les différentes théories proposées pour expliquer le mécanisme des interactions antagonistes entre les micro-organismes, considèrent les facteurs suivants:

- la disparition des substances nutritives,
- la changement physico-chimiques du milieu,
- l'action à distance,
- l'antagonisme pour l'espace bactérien dans le milieu,
- l'action enzymatique directe ou indirecte résultant de l'autolyse, sous l'action de l'antagoniste.

### **3. 3. l'antagonisme bactérien**

#### **3. 3. 1. Définition**

Waksman ( Selman -1948) définit l'antagonisme comme étant le phénomène par lequel un micro-organisme vivant inhibe le développement ou interfère avec les activités d'un autre micro-organisme vivant, par la création de conditions défavorables ou par la production de substances antimicrobiennes spécifiques.

#### **3. 3. 2. Méthodes d'études de l'antagonisme bactérien**

Dans les travaux de recherche réalisés sur les propriétés antagonistes des micro-organismes et la production des substances antimicrobiennes, deux procédés sont employés:

- l'essai des effets antagonistes de cultures pures prises au hasard, les unes sur les autres soit sur des bactéries connues ou sur les bactéries inconnues.
- l'isolement des micro-organismes provenant de l'eau, sur des boîtes à effets antagonistes.

En utilisant ces procédés et pour tester l'action antagoniste, plusieurs méthodes, ont été utilisées ( Garre ( Selman -1948) et Gamard et al., 1995 ). Elles sont basées sur le développement des micro-organismes test, telles que les BSR en présence des antagonistes isolés. Un temps de contact est nécessaire pour évaluer l'antagonisme d'une souche bactérienne au dépend de l'autre.



**CHAPITRE II**  
**MATERIELS & METHODES**

## 1. Etude microbiologique

### 1. 1. Echantillonnage et analyse chimique de l'eau

Pour notre travail, nous avons utilisé une eau d'injection provenant du puits producteur d'eau ZR-647 du champs pétrolier de Zarzaitine, région d'In -Aménas. La température in situ de l'échantillon est de 37°C et le pH mesuré est de 7,45. Le tableau 1 donne la composition chimique de l'eau.

Tableau 1: Composition chimique de l'échantillon d'eau de Zarzaitine.

Eléments	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Conc.(ppm)	2640	938	35	240	14700	27840	229	1695,8

### 1. 2. Analyse microbiologique de l'échantillon

En raison de la présence dans l'échantillon d'une microflore de physiologie nutritionnelle hétérogène, les isolements sont effectués par des techniques classiques. Ainsi, la culture et le dénombrement des bactéries présentes dans l'eau sont réalisés sur des milieux de culture spécifiques. Avant d'effectuer les différents isolements de bactéries, des dilutions ont été préparées. L'échantillon est dilué dans de l'eau physiologique à 9 ‰ ( Maury -1987) et des dilutions décimales allant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup> ont été préparées.

#### 1. 2. 1. Isolement des germes totaux

L'isolement est effectuée sur de la gélose nutritive ( G.N ) contenant par litre ( Rodier et al., 1978 ): 5g de bio-gélytone, 3g d'extrait de viande de boeuf et 15g de gélose. Le pH est ajusté à 6,8 et le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

#### 1. 2. 2. Isolement des bactéries anaérobies strictes

L'isolement des bactéries anaérobies strictes est effectué sur un milieu à base de viande de foie (V.F) composé de 30 g de peptone pepsique de viande et de foie, 2 g de glucose et 6 g d'agar. Le milieu est autoclavé pendant 20 minutes, après avoir ajusté le pH à 7,4 ( Marechal -1981 ). Une fois la préparation des milieux terminée, deux types d'isolement en boîte de Pétri ont été réalisés ( Rodier et al., 1978, Biomerieux -1980 ):

En surface, il s'agit de prélever 0,1 ml de chaque dilution, avec une pipette Pasteur stérile et de l'étaler avec un râteau stérile à la surface de la gélose nutritive solidifiée. Ensuite, les boîtes sont incubées à 37°C pendant deux jours.

Ce temps est nécessaire à la croissance des germes totaux. Les germes qui ont poussé en surface sont dénombrés. Ce type d'isolement met en évidence les bactéries aérobies strictes.

En profondeur, il met en évidence les bactéries anaérobies strictes. Dans des boîtes de Pétri, un volume de 1 ml de chaque dilution est mélangé avec la gélose nutritive fondue et refroidie à 45 °C.

On homogénéise le milieu et après solidification, les boîtes sont incubées à 37°C pendant deux à trois jours. Après l'incubation, les colonies qui se développent dans la gélose sont dénombrées.

### **1. 2. 3. Culture des bactéries sulfatoréductrices**

Afin d'entamer la culture des BSR, nous avons utilisé le milieu de culture solide suivant. Sa composition en g/l est comme suit: MgSO<sub>4</sub> 1,00, acide ascorbique 0,10, citrate de sodium 0,50, NH<sub>4</sub>Cl 0,50, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,50, extrait de levure 0,10, agar 15 et le lactate de sodium 4 ml (Gatellier et al., -1966). Ce milieu est constitué d'une source de carbone (le lactate), d'une source d'azote provenant de l'extrait de levure, des sources de facteurs de croissance et de sels minéraux. Son pH est ajusté à 7,00.

La procédure de culture consiste à faire un isolement en boîte de Pétri. Pour cela, un volume de 1 ml de l'échantillon et de ses différentes dilutions sont étalés sur le milieu de culture solidifié. On procède au dénombrement, après une incubation à 37°C en anaérobie pendant 21 jours. Pour créer les conditions d'anaérobiose, les boîtes sont introduites dans une jarre.

### **1. 3. Identification macroscopique des B.S.R**

Après une incubation de 21 jours, on procède à l'observation à l'oeil nu des colonies bactériennes qui ont poussées dans les boîtes de Pétri. Les éléments d'identification suivants sont notés (Thomas et al., 1970, Carbonelle et al., 1985):

- la forme des colonies bactérienne qui peut être punctiforme circulaire, ondulaire régulière ou irrégulière.
- le diamètre des colonies qui peut être inférieur ou supérieur à 1 mm.
- la chromogénèse (couleur): on note la présence ou l'absence de pigments solubles ou insolubles.
- l'opacité si elle est transparente, translucide ou opaque.
- l'élévation qui peut être plate, convexe ou concave.
- la surface qui peut être lisse, sèche, rugueuse, plissée, brillante ou emoussée.
- la consistance: visqueuse, ferme ou granulaire.
- la présence ou l'absence de l'odeur et sa nature.

Les colonies ayant la même morphologie sont rassemblées dans un groupe et chaque groupe de même nature est codifié. Le dénombrement se fait pour chaque groupe de colonies bactériennes différentes morphologiquement et bien isolées.

### **1. 4. Purification**

Elle se fait par striation à la surface du milieu utilisé pour l'isolement. A partir des boîtes ayant présenté un développement, des colonies bactériennes différentes par l'aspect morphologique sont prélevées. Ces colonies seront repiquées sur des boîtes de Pétri et incubées à 37°C en anaérobiose pendant 21 jours.

Après une première purification, les boîtes sont examinées et un deuxième repiquage est effectué jusqu'à l'obtention de colonies identiques.

## **1. 5. Conservation**

Après la purification, on procède à la conservation des colonies bactériennes dans un milieu à base de viande de foie (V.F) ayant la composition suivante ( **Prevot et al., -1977**): 30g peptone pepsique de V.F, 3 g de glucose et 15 g de gélose pour une quantité suffisante en eau distillée de 1000 ml.

Chaque souche est introduite dans un tube de conservation au moyen d'une pipette Pasteur. Les tubes sont bouchés et conservés à une température de 4°C. La conservation finale est réalisée sur le milieu utilisé pour l'isolement des BSR.

## **1. 6. Etude du métabolisme des bactéries sulfatoréductrices**

Cette étude consiste en une série de tests biochimiques:

### **1. 6. 1. Production de sulfures**

Le test de la synthèse des sulfures est réalisé, selon la méthode du Test -Kit ( **Servo -1988**). Le milieu de culture utilisé a la même composition que celui utilisé pour l'isolement, mais exempt d'agar. Il est réparti dans des flacons de type pénicilline à raison de 9 ml par flacon. Ces flacons sont scellés, barbotés à l'azote et stérilisés à 120°C pendant 20 minutes. En parallèle, on prépare des suspensions de bactéries purifiées, en diluant chaque colonie bactérienne dans de l'eau physiologique stérile.

Par la suite, les flacons sont ensemencés avec 1 ml de chaque suspension bactérienne et sont incubés à 37°C pendant 21 jours. Il ne sera considéré comme positifs que les flacons présentant un dépôt noir (production de H<sub>2</sub>S ).

### **1. 6. 2. Etude de la dégradation des acides organiques**

Les essais sont réalisés dans des milieux de culture en présence deux sels d'acides organiques: le lactate de sodium et l'acétate de sodium à base de peptone contenant 10 ml de peptone, 8.5 ml de soude à 0,1 N et 12 ml de bleu de méthylène dilué à 1/500 (**Marechal -1981**). Ce milieu est réparti dans des tubes de 16 x 160mm à raison de 10 ml par tube et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes.

La dégradation de la source de carbone est réalisée en ensemençant des séries de cinq tubes de ce milieu par des suspensions de bactéries retenues, lors de l'identification. Dans chaque flacon, 0,2 ml de chaque acide organique préparé à 1% est ajouté. Par la suite, les tubes ensemencés avec trois gouttes de chaque suspension bactérienne sont incubés à 37°C en anaérobiose. Après la période d'incubation, 0,5 ml d'une solution saturée d'acétate de plomb (5g d'acétate de plomb + 25ml d'eau distillée ) sont additionnés.

Le milieu est agité à l'aide du vortex. On laisse se déposer pendant 10 minutes. La lecture des tubes se fait, selon les deux cas suivants:

- l'obtention d'un faible précipité au fond du tube indique la dégradation de la source de carbone,
- Il n'y a pas de dégradation de source de carbone, si un précipité occupe le 2/3 du tube.

## **1. 7. Identification microscopique des BSR**

L'examen microbiologique se déroule en plusieurs étapes dont chacune doit apporter un certain nombre d'informations utiles pour l'élaboration du résultat final. Parmi ces étapes, il y a l'identification des souches bactériennes. Chaque souche purifiée a subi les tests d'observation et de coloration suivants ( Thomas et al -1970, Carbonelle et al -1985):

### **1. 7. 1. Observation microscopique à l'état frais**

A partir de la boîte de Pétri qui a donné des colonies bien isolées, un prélèvement à l'aide de la pipette Pasteur est réalisé. Les bactéries prélevées sont mises en suspension dans de l'eau physiologique stérile. On dépose une goutte de la suspension bactérienne sur une lame; puis on observe entre lame et lamelle au microscope optique ( Mettalux- 3, Leitz) avec l'objectif 40. Cette observation, nous permet de déceler l'absence ou la présence de spore. Cette dernière est réfringente.

### **1. 7. 2. Coloration au bleu de méthylène**

Sur un frottis bactérien correctement fixé, on fait couler la solution de bleu de méthylène phéniqué jusqu'à ce que toute la lame soit couverte. Après un temps de réaction d'une minute, on rince abondamment à l'eau. Ensuite, le frottis bactérien est séché, puis observé au microscope à l'immersion dans 3 gouttes d'huile de vaseline à l'aide de l'objectif x100.

### **1. 7. 3. Coloration Gram**

Il a été prouvé que la consistance et la valeur de la réaction de GRAM correspondent à des différences chimiques fondamentales entre la paroi des bactéries GRAM positif ( $G^+$ ) et les bactéries GRAM négatif ( $G^-$ ).

Le frottis bactérien fixé sur une lame propre est recouvert avec la solution de cristal violet. On laisse agir pendant une minute, puis on rince à l'eau. La lame est, ensuite, recouverte d'une solution de lugol pendant une minute.

Un deuxième rinçage à l'eau est effectué. Après décoloration avec de l'alcool éthylique absolu, la lame est recouverte avec de la fuschine, pendant un temps réactionnel de 30 secondes. Passé ce temps, la lame est rincée, séchée et observée au microscope optique et à l'immersion.

## **2. Etude de la croissance des BSR**

### **2. 1. En culture mixte**

L'objectif est le choix et la mise au point d'un milieu de culture, en vue d'étudier la croissance des souches pures de BSR. La préculture et la culture en Erlenmeyers des BSR sont effectuées, selon la méthode de Miller et Wolin ( Canivez -1990 ).

### 2. 1. 1. Origine des BSR

Pour les essais de croissance en milieu liquide, une culture mixte de BSR est utilisée. Cette dernière est obtenue par la technique du Test-Kit ( Servo -1988 ).

### 2. 1. 2. Milieux utilisés

Pour l'étude de l'activité des BSR, deux milieux de culture rapportés par la littérature ont été utilisés. Ce sont des milieux liquides contenant une base de sels minéraux et une source de carbone et d'énergie. La composition des deux milieux appelés respectivement MC1 et MC2 est donnée dans le tableau 2.

*Tableau 2: Composition chimique des milieux de culture spécifiques à la culture et à l'isolement des BSR.*

MC1 ( Posgate -1973 )	Conc. g/l	MC2 ( Gatellier et al -1966)	Conc. g/l
Chlorures de calcium	1,0	Phosphate dipotassique	0,5
Chlorures d'ammonium	1,0	Chlorures d'ammonium	0,5
Sulfate de sodium	1,0	Sulfate de magnésium	1,0
Phosphate monopotassique	0,5	Citrate de sodium	0,5
Lactate de sodium	3,5	Acide ascorbique	0,5
Extrait de levure	1,0	Extrait de levure	0,5
Agar	15,0	Lactate de sodium	4,8 ml
Eau distillée q. s. p.	1000 ml	Agar	15,0
		Eau distillée q. s. p.	1000 ml

### 2. 1. 3. Préculture

Les BSR sont cultivées dans des Erlenmeyers de 100 ml et remplis avec 100 ml du milieu de culture stérile MC1 et MC2. Les précultures inoculées sont incubées à 37°C pendant 48 heures, temps nécessaire pour atteindre la phase exponentielle. Elles vont permettre, lors du repiquage à partir du même milieu et dans les mêmes conditions de culture, de maintenir la croissance en pleine phase exponentielle. Elles serviront d'inoculum pour les essais de culture en Erlenmeyers.

### 2. 1. 4. Culture en Erlenmeyers

Les cultures sont conduites dans des Erlenmeyers de 500 ml remplis avec 500 ml de milieux MC1 et MC2. Ensuite, ils sont inoculés par les précultures à raison de 1% ( API -1965 ). Les paramètres physico-chimiques de culture sont donnés dans le tableau 3.

Durant la culture en batch, les sulfates qui serviront comme accepteur d'électrons pour les bactéries, sont dosées par spectrophotométrie ( méthode Hach-Use -1993 ) à la longueur d'onde de 450 nm. Le produit corrosif issu du métabolisme des BSR, soit les sulfures, est dosé à 665 nm par la méthode Hach-Use -1993.

**Tableau 3: Paramètres physico-chimiques de culture en batch des BSR dans un Erlenmeyer.**

<b>Paramètres</b>	<b>MC1</b>	<b>MC2</b>
<i>Température</i>	<i>30°C</i>	<i>37°C</i>
<i>pH</i>	<i>7,60</i>	<i>7,00</i>
<i>Aération</i>	<i>anaérobiose</i>	<i>anaérobiose</i>
<i>Agitation</i>	<i>modérée</i>	<i>modérée</i>
<i>Temps d'incubation (jour)</i>	<i>15</i>	<i>21</i>

La croissance bactérienne des souches pures est donnée par la densité optique à 630 nm. Elle traduit la concentration cellulaire ( **Pelment -1993** ). La variation du pH est mesurée par un pH-mètre ( Hach- Use ) préalablement étalonné. Le dénombrement des B.S.R est effectué par la méthode de Mallasez sur une lame quadrillée.

## **2. 2. Etude de la croissance des BSR en culture pure**

### **2. 2. 1. Souches utilisées**

Les souches que nous avons isolées à partir de l'eau et conservées en tubes, sont utilisées pour les essais de croissance en vue de déterminer les cinétiques biologiques et électrochimiques.

### **2. 2. 2. Milieu utilisé**

Le milieu ayant donné les meilleurs résultats, lors de la culture mixte des BSR en Erlenmeyers est choisi pour entamer l'étude de la croissance des souches purifiées.

### **2. 2. 3. Préculture**

Chacune des souches est cultivée dans un Erlenmeyer de 100 ml et rempli avec 100 ml du milieu de culture stérile choisi. Les précultures inoculées sont incubées à 37°C pendant 48 heures, le temps nécessaire pour atteindre la phase exponentielle. Elles permettent, lors du repiquage, dans le même milieu et dans les mêmes conditions de culture de maintenir la croissance sans ralentissement. Seulement dans ce cas, ces précultures servent d'inoculum pour les essais de croissance en Erlenmeyers et les essais électrochimiques de voltampérométries et d'impédance électrochimiques.

### **2. 2. 4. Culture en Erlenmeyers**

Comme pour la culture mixte des BSR, les cultures des souches pures sont, également, conduites dans des Erlenmeyers de 500 ml remplis avec 500 ml de milieu de culture choisi. Ensuite, ils sont inoculés par les précultures à raison de 1% et incubés à 37°C, pendant 21 jours.

Durant la fermentation, les mêmes cinétiques effectuées avec une culture mixte sont refaites avec les cultures bactériennes purifiées. La cinétique de la croissance bactérienne est suivie par la variation de la concentration des sulfates, la variation de la concentration des sulfures, la variation du pH et la densité optique en fonction du temps.

La variation de la concentration bactérienne est obtenue par la méthode de dénombrement sur le milieu de culture solide avec un compteur de colonies ( réf. Gallenkamp, colony counter ).

### 3. Etude électrochimique

#### 3. 1. Nature de l'acier utilisé

L'échantillon d'acier utilisé est un acier au carbone de nuance API 5LX52. L'analyse chimique de l'acier est donnée dans le tableau 4.

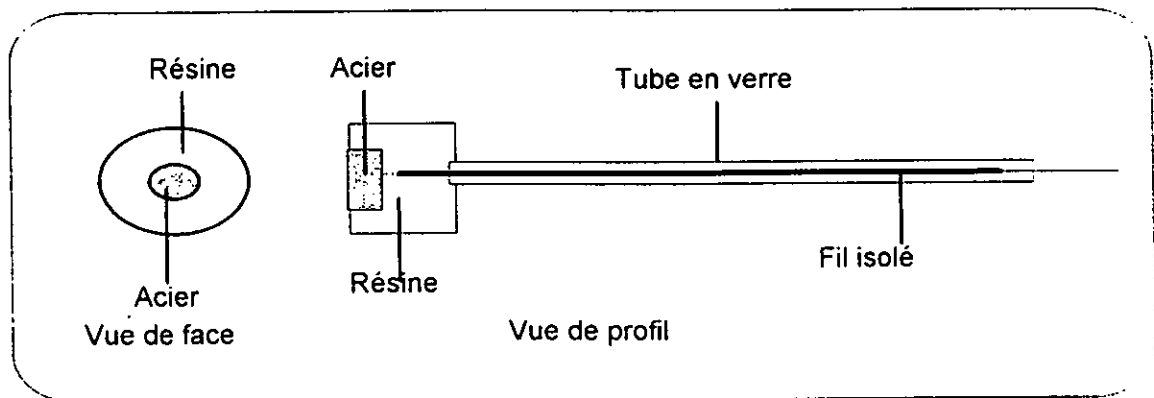
*Tableau 4: Composition chimique de l'échantillon d'acier*

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

Avant d'entreprendre les mesures électrochimiques, des électrodes de travail en acier (éprouvettes ) sont préparées. Elles sont découpées à l'atelier mécanique.

Chaque électrode, de forme circulaire de 1 cm de diamètre, 2 mm d'épaisseur et 0.785 cm<sup>2</sup> de surface est soudée à un fil électrique. L'extrémité de l'éprouvette est enrobée dans une résine thermodurcissable, Araldit mélangé avec un durcisseur à raison de 5 volumes pour un volume (Fig. 6 ).

Toutes les électrodes de travail sont polies sous un filet d'eau avec du papier abrasif de granulométrie décroissante ( 600, 800 et 1200 mesh ) sur une polisseuse ( réf. Prest mecapople 2B ). Après, elles sont lavées à grande eau et rincées à l'eau distillée, nettoyées à l'acétone et séchées à la température ambiante. Elles sont immédiatement utilisées.



*Fig. 6 : Schéma de l'électrode de travail*

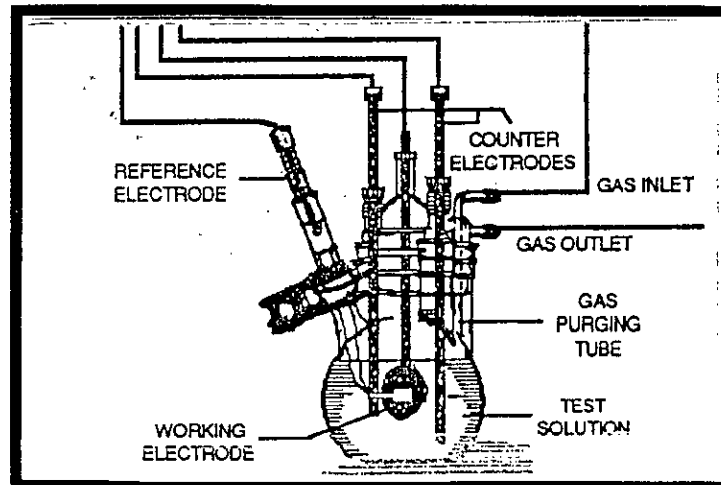
#### 3. 2. Préparation de la cellule électrochimique

La cellule de travail utilisée pour les essais électrochimiques est présentée dans la figure 7. C'est une cellule en Pyrex de type EGG, modèle K47, de forme sphérique et munie de cinq orifices permettant de fixer les différentes électrodes ( travail, auxiliaire et référence ).



Pour tous les essais électrochimiques, un montage à trois électrodes a été utilisé; soit une électrode de travail ( acier au carbone ), une contre électrode en graphite de 5 mm de diamètre et une électrode de référence au Calomel saturée (ECS- Hg/ Hg<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>) dont le potentiel est de -242 mV / ENH.

L'électrode de référence est reliée au milieu de culture par l'intermédiaire d'un pont rempli d'une solution saturée de chlorure de potassium (KCl ). L'extrémité du pont est placée à une distance d'environ un mm de l'électrode de travail.



*Fig. 7: Schéma de la cellule électrochimique, ( Peng et al.,-1994 ).*

### **3. 3. Conditions des essais électrochimiques**

Les mesures du potentiel libre de l'acier, de voltampérométrie ( polarisation potentiodynamique ) et d'impédance électrochimique ont été réalisées dans la cellule décrite plus haut et à l'aide de l'équipement suivant ( Fig. 8 ):

Une chaîne électrochimique est destinée à mesurer le potentiel libre de l'acier en fonction du temps et les courbes de polarisation potentiodynamique. Elle est composée:

- d'un potentiostat /galvanostat type EGG Modèle 273,
- d'un micro-ordinateur IBM modèle PS/2 pour l'acquisition des données,
- d'un logiciel M342C1 pour le traitement des données.

Une seconde chaîne est destinée aux mesures d'impédance électrochimique est composée:

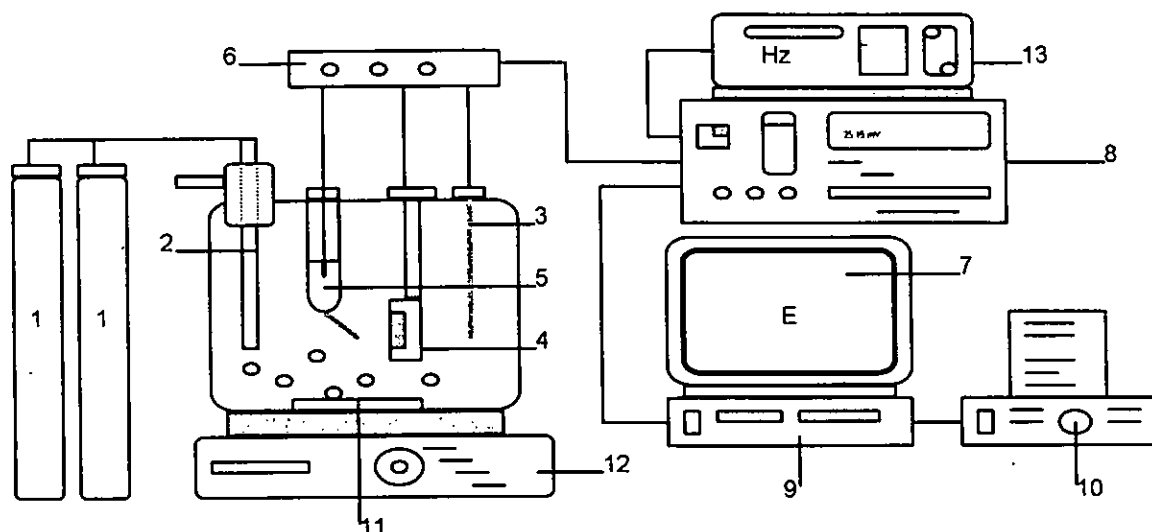
- d'un potentiostat / galvanostat type EGG 273 A,
- d'un analyseur de réponse en fréquence modèle SI 1255,
- d'un micro-ordinateur modèle ( H.P )
- d'un logiciel Z PLOT et Z VIEW

#### **3. 3. 1. Essais de mesure du potentiel libre de l'acier**

Afin de mettre en évidence l'effet des BSR obtenues en culture mixte vis à vis de la corrosion de l'acier, des mesures du potentiel de corrosion de l'acier en fonction du temps sont effectuées.

L'essai dure six heures, temps nécessaire pour suivre l'évolution de  $E_{corr}$ . en absence, en présence de BSR et lors d'un traitement par un biocide. Dans la cellule électrochimique contenant 500 ml de milieu de culture stérile, on mesure le potentiel de corrosion de l'acier, pendant deux autres heures.

Passé ce temps, le milieu est inoculé avec 500 ml de culture bactérienne de BSR et la variation du potentiel de corrosion ( $E_{corr}$ ) est suivie durant deux heures. Après l'injection du biocide, on enregistre de nouveau l'évolution du potentiel pris par le métal.



**Fig. 8: Schéma de l'équipement utilisé pour les mesures électrochimiques**

1-Bouteille d'azote, 2-Barboteur, 3-Electrode auxiliaire, 4-Electrode de travail 5-Electrode de référence. 6-Electromètre, 7-Ecran, 8-Potentiostat-Galvanostat, 9-Unité centrale, 10-Imprimante, 11-Barreau magnétique. 12-Agitateur, 13-Analyseur de fréquence

### 3. 3. 2. Essais de Polarisation potentiodynamique

Les essais de voltampérométrie, en absence et en présence des bactéries purifiées, sont réalisés à température ambiante. Le potentiel a été balayé à une vitesse de 0,16 mV/s. La plage de potentiel est située entre -250 mV ( potentiel initial ) à +250 mV ( potentiel final ) par rapport au potentiel de corrosion. Au préalable, l'électrode est laissée dans le milieu pendant 30 mn pour permettre la stabilisation du potentiel. Ces essais vont permettre de déterminer le potentiel dynamique de corrosion ( $E_{corr}$ ), la vitesse de corrosion ( $V_{corr}$ ), le courant de corrosion ( $I_{corr}$ ) de l'acier et les coefficients de Tafel anodiques  $\beta_a$  et cathodiques  $\beta_c$ .

### 3. 3. 3. Essais de mesure de l'impédance électrochimique :

Les mesures d'impédance électrochimique sont réalisées au potentiel de corrosion. L'amplitude de signal sinusoïdale est fixée à 10 mV.

La gamme de fréquence balayée varie de 0,01 Hz ( fréquence finale ) à 60 KHz (fréquence initiale). L'interface métal- solution ou métal-film et/ou film-solution se comporte comme un circuit électrique.

Le passage du courant entre l'électrode de travail vers l'électrolyte s'accompagne le plus souvent de phénomènes physico-chimiques non instantanés. Les processus de charge, d'adsorption ou de transfert (diffusion, migration et convection) qui interviennent à l'interface, soit séparément, soit couplés induisent un comportement non linéaire. De ce fait, l'excitation à l'aide d'un signal alternatif de fréquence donnée produit un courant  $I$  déphasé d'un angle  $\theta$ .

### **3. 3. 4. Conduite des essais électrochimiques**

L'étude de l'activité corrosive des souches bactériennes identifiées vis à vis de l'acier est réalisée dans des Erlenmeyers. Cinq séries de culture bactériennes composées de 7 Erlenmeyers de 250 ml chacune sont préparées. Dans chaque Erlenmeyer contenant 250 ml du milieu de culture MC2, une électrode de travail est plongée.

Après les avoir barbotés à l'azote et autoclavés à 120°C, pendant 20 min, ils sont inoculés par les précultures et incubées à 37°C, pendant 7 jours, temps correspondant à la phase de croissance des bactéries. Durant la période d'incubation, des tracés quotidiens de courbes de polarisation potentiodynamiques  $\log I = f^i(E)$  et des diagrammes d'impédance électrochimique sont effectués.

Au moment des mesures, la cellule stérilisée est remplie avec 500 ml de milieu de culture stérile, puis additionné de 250 ml de culture bactérienne. Dans la cellule, l'anaérobiose est obtenue par un barbotage à l'azote, grâce à un diffuseur préalablement désinfecté à l'alcool 95° et plongé dans une eau bouillante.

## **4. Etude de l'inhibition des BSR par des antagonistes bactériens**

### **4. 1. Origine des bactéries antagonistes**

Afin d'entreprendre le test d'antagonisme, des bactéries provenant du puits producteur d'eau ZR- 641 du champs pétrolier de Zarzaitine ont été isolées.

### **4. 2. Isolement et identification**

Les bactéries antagonistes sont cultivées sur de la gélose nutritive ( Gratia et al., 1926 ), après une incubation de 48 heures à 37°C. Les souches purifiées, subissent les mêmes tests d'identification macroscopiques et microscopiques effectués sur les souches pures de BSR. L'identification microscopique, nous a permis d'orienter l'étude du métabolisme cellulaire des bactéries antagonistes. Les galeries classiques d'identification des staphylocoques et des non-entérobactéries ont été utilisées ( Larpent -1985, Leminore et al., -1989 ).

### **4. 3. Conduite de l'essai de l'antagonisme**

Avant d'entamer cet essai, une étude de la comparaison de la cinétique de croissance des BSR sur le milieu de culture naturel ( eau d'injection de Zarzaitine ) et sur le milieu de culture synthétique ( MC2 ) a été réalisée.

Les cultures sur ces deux milieux sont conduites dans des Erlenmeyers de 500 ml, selon les étapes mentionnées dans la partie 2 de ce chapitre. Ces mêmes cultures sont contaminées directement avec une culture mixte de BSR. Des dénombrements quotidiens de BSR par la technique du Test-Kit sont effectués.

On désignera par le micro-organisme test, la souche de la BSR la plus corrosive et le micro-organisme antagoniste, les souches aérobies - anaérobies facultatives ou anaérobies strictes isolées à partir de la boîte gélose nutritive. Cette caractéristique respiratoire permettra de maintenir les deux micro-organismes en vie, lorsqu'elles sont en coculture submergée dans les Erlenmeyers. Une eau d'injection de Zarzaitne stérilisée à l'autoclave est utilisée.

#### **4. 3. 1. Préparation des précultures**

Pour évaluer l'efficacité des antagonistes bactériens, des précultures de la souche bactérienne test et des souches antagonistes sont préparées séparément. Dans des Erlenmeyers de capacité de 100 ml, un volume de 100 ml d'eau d'injection de Zarzaitine stérile (milieu naturel) est ajouté. Ces Erlenmeyers sont inoculés à partir des tubes de conservation contenant les micro-organismes test et les antagonistes.

Après l'incubation à 37°C pendant 48 heures et 12 heures respectivement pour le micro-organisme test et antagoniste, les précultures servent comme inoculum pour les co-cultures des antagonistes et de la bactérie test en Erlenmeyers de 500 ml. Pour déterminer la concentration inhibitrice en antagonistes des BSR, trois concentrations 2%, 4% et 10% (V/V) en antagonistes sont utilisées.

#### **4. 4. Evaluation de l'efficacité de l'antagonisme**

##### **4. 4. 1. Mesure de la croissance bactérienne**

Cette mesure nous permet d'établir la courbe  $[X] = f^{ct}(t)$  de la souche test en absence et en présence de la souche bactérienne antagoniste. Ainsi, des cultures en Erlenmeyers de capacité 500 ml contenant 500 ml d'eau de Zarzaitine sont réalisées.

Dans un premier temps, le contenu d'un Erlenmeyer est inoculé par la préculture de la souche test. Ce dernier constituera le témoin. Les autres Erlenmeyers sont inoculés par la souche test suivi par celle de l'antagoniste utilisé à différentes concentrations en inoculum (2%, 4% et 10%). Le temps séparant les deux inoculations est de 48 heures (Waksman et al., -1948). La croissance dure 10 jours, durant laquelle, les colonies bactériennes du micro-organisme test sont dénombrées sur le milieu de culture de Gattelier et al., (1966). Ainsi, les courbes de croissance,  $N = f^{ct}(t)$ , de la souche bactérienne sulfatoréductrice en absence et en présence des antagonistes seront tracées.

**CHAPITRE III**  
**RESULTATS & DISCUSSIONS**

#### 4. 1. Evaluation de la flore microbienne de l'échantillon

Le dénombrement de la flore microbienne totale présente dans l'échantillon d'eau d'injection a été réalisé sur des boîtes de Pétri. Les boîtes contiennent des compositions spécifiques à chaque groupes de bactéries. La présence d'une teneur de particules en suspension dans l'échantillon tels que les anions, les cations et les substances organiques, peut constituer les facteurs nutritifs pour le métabolisme cellulaire des bactéries isolées (Magot -1995 ).

Dans les milieux de culture spécifiques utilisés, les bactéries ont tendance à s'agréger aux particules nutritives présentes dans ce milieu. Le tableau 5 donne la composition microbiologique de l'eau d'injection. Il résume les groupes de bactéries présentes dans l'échantillon et isolées sur les milieux décrits dans la partie expérimentale.

*Tableau 5: Composition bactérienne de l'eau de Zarzaitine ZR- 641.*

<i>Colonies bactériennes isolées</i>	<i>Nombre de bactéries contenu dans un ml d'eau</i>
<b>Bactéries aérobies strictes ( en surface )</b>	<b>80</b>
<b>Bactéries anaérobies strictes ( en profondeur )</b>	<b>10<sup>4</sup></b>
<b>Bactéries sulfatoréductrices ( B.S.R)</b>	<b>1,6x10<sup>3</sup></b>

L'ensemble des bactéries isolées se développent à la température de 37°C. Cette dernière est optimale à la croissance de l'ensemble des micro-organismes présents dans l'eau.

La flore microbienne est composée essentiellement de bactéries aérobies strictes, aérobies-anaérobies facultatives avec une dominance de bactéries anaérobies strictes. Cette composition est la même que celle obtenue par **Hadley ( 1948 )**. A l'exception des bactéries aérobies ( 80 colonies/ml ), l'échantillon d'eau d'injection présente une concentration élevée en bactéries anaérobies ( 10<sup>4</sup> colonies/ml ).

Ces dernières renferment les bactéries sulfato-réductrices. Les valeurs numériques des concentrations bactériennes obtenues ne peuvent pas être interprétées de façon stricte. En effet, les proportions des populations bactériennes sont relatives car les caractéristiques physiologiques des germes bactériens présents sont très variables.

Leur sélection sur le même milieu de culture n'est pas la même. Par ailleurs, l'utilisation de milieux diffère par la composition chimique permettra d'isoler un nombre élevé de groupe de bactéries. Il faut noter que, la population bactérienne augmente lorsque l'activité bactérienne liée à la corrosion augmente ( **Peng et al., 1994** ).

**Jones (1988)** a remarqué qu'en présence d'une concentration située entre 10<sup>3</sup> et 10<sup>4</sup> de BSR/ml, la corrosion tend à augmenter avec le temps de contamination du milieu.

En parallèle, la présence de  $10^1$  à  $10^4$  de bactéries aérobies par ml favorisera le développement des BSR ( Jones -1988). Par évidence, la flore microbienne mésophile nécessitant une température de croissance entre 25°C et 40°C constitue un facteur favorable au développement des BSR.

Dans les travaux de Hamilton ( 1995 ) réalisé sur l'isolement des germes corrosifs, il a été mis en évidence des bactéries aérobies et anaérobies-aérobies facultatives. Ces derniers participent à la création de conditions anaérobiques par consommation d'oxygène. Ceci entraîne une prolifération de BSR.

Par ailleurs, le résultats de travaux effectués sur l'isolements et le dénombrement des bactéries des eaux de profondes en utilisant les techniques classiques de dénombrement, ont permis à Bianchi (1973) de remarquer l'association des bactéries hétérotrophes aux BSR. La concentration était comprise entre une et quelques dizaines de cellules par ml.

Aussi, dans des travaux antécédents et qui ont porté sur la caractérisation microbiologique de l'eau de distribution, Emde et al., (1992) ont rapporté que, la population microbienne est constituée des bactéries aérobies, aérobies-anaérobies facultatives et des micro-aérophiles.

Ces micro-organismes influencent le processus de corrosion par la dégradation cellulaire des inhibiteurs de la croissance des BSR ( Costerton et al., 1987 ). Par conséquent, ces micro-organismes vont adhérer à la surface de l'acier en formant un biofilm ( Ford et al., 1990, Tiller -1982).

#### **4. 2. Etude de l'identification des BSR**

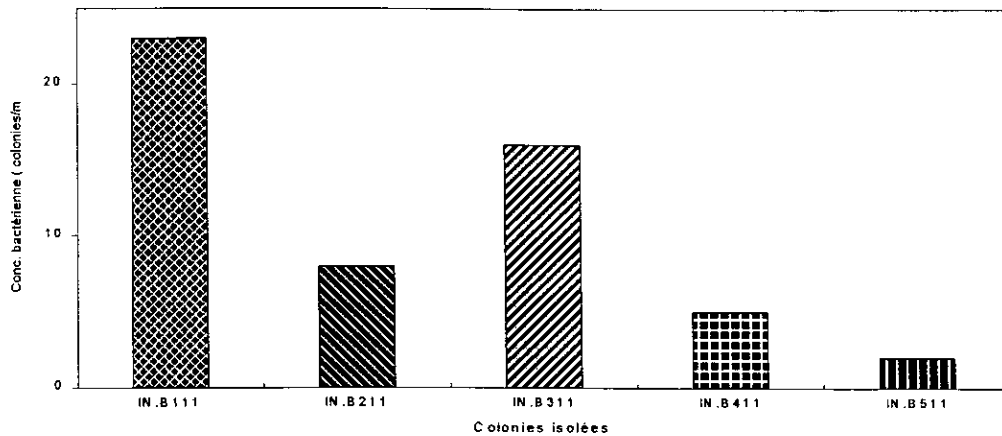
L'étude a porté sur la caractérisation de cinq bactéries isolées à partir de l'eau d'injection. Les enrichissements anaérobiques, dans des Erlenmeyers contenant le milieu de culture MC2 et inoculé par les souches, ont tous montré un développement bactérien. Les colonies bactériennes obtenues sur des boîtes de Pétri, après des repiquages, présentaient des morphologies différentes.

Cinq souches codifiées IN-B111, IN-B211, IN-B311, IN-B411 et IN-B511 ont été isolées et identifiées. La répartition quantitative des colonies bactériennes isolées est montrée sur l'histogramme 1. D'autre part, le tableau 6 rassemble les résultats des tests d'identification macroscopiques réalisés sur les cinq souches de BSR.

Après deux semaines d'incubation, la lecture des boîtes de Pétri, nous a permis de distinguer des colonies bactériennes caractéristiques des cinq souches. Ces dernières présentent des morphologies différentes.

De plus, l'observation macroscopique a mis en évidence des colonies à bords réguliers et/ou irréguliers, de chromogénèse blanche à centre noir, jaune et marron.

Quatre souches ont une consistance visqueuse, seule la souche IN -B511 présente une consistance granulaire. En fin d'incubation, les colonies ont l'aspect plat convexe, ou plats tout simplement.



***Histogramme 1: Répartition des colonies de BSR isolées à partir de l'échantillon d'eau ZR- 641 sur le milieu de culture solide.***

Il ressort de cet histogramme que l'isolement sur un milieu de culture à base de sulfate et de lactate favorise un développement bactérien sélectif pour les souches bactériennes IN-B111. L'observation à l'état frais des bactéries montre qu'elles sont mobiles. D'autre part, ces formes microscopiques cellulaires observées varient d'une souche à une autre.

Pour approfondir l'identification, des techniques de colorations différentielles de GRAM et au bleu de méthylène ont été utilisées. Les souches bactériennes IN-B111 et IN-B511 sont des bacilles droits, GRAM négatif.

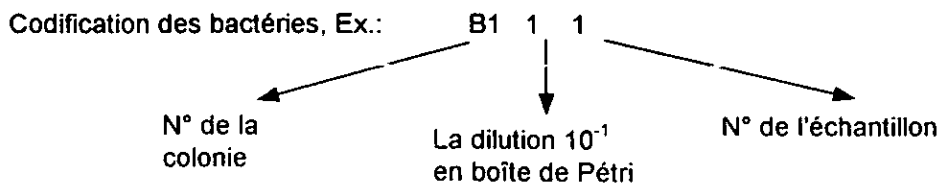
Les bactéries provenant des colonies IN-B211 et IN-B311 se présentent sous forme de bacilles, légèrement incurvés. En plus, l'observation microscopique des frottis bactériens de la souche IN-B411 révèle la présence de bacilles incurvés regroupés en tétrades.

Le tableau 7 résume les différents résultats de l'identification microscopique des bactéries sulfatoréductrices isolées de l'eau d'injection. Il est à noter, la présence d'un nombre prédominant de bactéries appartenant à la souche bactérienne IN- B111 dans l'échantillon.



**Tableau 6: Identification macroscopique des bactéries sulfatoréductrices isolées sur le milieu solide Gatellier à partir de l'eau d'injection de Zarzaitine.**

Code	IN. B <sub>111</sub>	IN. B <sub>211</sub>	IN. B <sub>311</sub>	IN. B <sub>411</sub>	IN. B <sub>511</sub>
Nombre	23	8	16	5	2
Couleur	Blanche à centre noir	Jaune	Blanche	Marron blanche	Marron
Consistance	Visqueuse	Visqueuse	Visqueuse	Visqueuse	Granulaire
Forme	Ronde à bords régulier	Ronde à bords régulier	Ronde à bords régulier	Ronde à bords régulier	Ronde à bords irrégulier
Opacité	Translucide	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque
surface	Brillante	Brillante	Lisse brillante	Brillante	Visqueuse
Elévation	Plate convexe	convexe	Plate convexe	Plate	Plate
Colonic	B1	B2	B3	B4	B5



**Tableau 7: Résultats de l'identification microscopique des bactéries sulfatoréductrices isolées à partir de l'eau d'injection de Zarzaitine.**

Bactéries	IN. B <sub>111</sub>	IN. B <sub>211</sub>	IN. B <sub>311</sub>	IN. B <sub>411</sub>	IN. B <sub>511</sub>
Tests					
Mobilité	+	+	+	-	+
Coloration au bleu de méthylène	Petits bacilles	Petits bacilles légèrement incurvés	petits bacilles légèrement incurvés	Bacilles incurvés regroupés en tétrades	Bacilles
Coloration GRAM	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>

De plus, les différentes formes cellulaires des souches de BSR isolées et observées au microscope optique avec le grossissement  $\times 100$  sont regroupées sur la Planche 2. La culture des BSR a été discutée par de nombreux auteurs ( **Postgate -1979**, **Widdel -1980**, **Chantereau -1980**). L'identification des BSR a été, également, détaillée dans le manuel de **Bergey (1980)**. Les souches de *Desulfovibrio* sont identifiées comme étant des réducteurs de sulfates en sulfures, dans un milieu riche en lactate.

Dans un milieu contenant du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , de l'extrait de levure et enrichi avec du sulfate de fer ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), les colonies de *Desulfovibrio* observées au microscope optique sont des bacilles droits, mobiles, Gram négatif et anaérobie stricte (**Bergey -1980**, **Postgate -1979**). Ces souches oxydent le lactate en acétate et en dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$ . Dans certains cas, l'acétate est oxydé complètement en dioxyde de carbone et leur isolement s'effectue à partir d'une eau salée.

D'autres références bibliographiques sur la caractérisations de BSR ont confirmé les résultats obtenus ( **Zobell -1930** ). En outre, **Rubentschik (1928)** obtient des cultures de BSR oxydantes d'acétate en dioxyde de carbone. **Widdel (1980)** a mis en évidence des bactéries sulfatoréductrices présentant des morphologies sous forme de vibrio, de cocci, de sarcina, de bacilles ou de petits bacilles.

D'autre part, pour déterminer les autres critères d'identification, **Bergey (1984)** a proposé une classification des BSR. Dans son manuel ( **Bergey -1984** ), les souches de *Desulfuromonas* ont une forme bacillaire droite et Gram négatif. Elles sont cultivées sur différents milieux de culture contenant de l'acétate comme source de carbone. En anaérobie stricte, le genre *Desulfuromonas* peut être cultivée sur un milieu contenant du lactate comme source de carbone et d'électrons. Les colonies isolées sont opaques de chromogénèse jaune.

**Truper et al. (1981)** ont exposé deux modes nutritionnels pour les BSR. Il y a les bactéries sulfatoréductrices qui oxydent incomplètement le lactate. Dans ce cas, les genres identifiés sont *Desulfovibrio* et *Desulfatamaculum*. D'autres effectuent l'oxydation incomplète de l'acétate ou complété en dioxyde de carbone. Les BSR affiliées à ce groupe sont *Desulfabacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* et certaines espèces de *Desulfovibrio* et de *Desulfatamaculum*. Le tableau 8 rassemble les résultats des tests biochimiques effectués sur les colonies de BSR isolées.

D'après les résultats obtenus, le test de la synthèse de l'hydrogène sulfuré ( $\text{H}_2\text{S}$ ) effectué sur les souches décrites dans cette étude, est positif dans un milieu contenant une source de  $\text{Fe}^{2+}$  (**Hamilton -1980**, **Bergey -1980**, et **Pfennig et al., 1981** ).

La synthèse des sulfures, révélée par l'apparition de la coloration noir due à la formation de sulfure de fer (  $\text{FeS}$  ), est plus rapide dans le milieu MC2 inoculé avec des souches IN-B111 et IN-B211. La composition du milieu choisi pour l'isolement des BSR est sélectif pour la culture de ces souches.

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

**Tableau 8: Résultats des tests biochimiques effectués sur les bactéries sulfato-réductrices isolées à partir de l'eau d'injection de Zarzaitine.**

Bactéries Tests	IN. B <sub>111</sub>	IN. B <sub>211</sub>	IN. B <sub>311</sub>	IN. B <sub>411</sub>	IN. B <sub>511</sub>
Test de H <sub>2</sub> S	+	+	+	+	+
Lactate	+	+	+	+	+
Acétate	+	+	+	+	+

\* Plus rapide

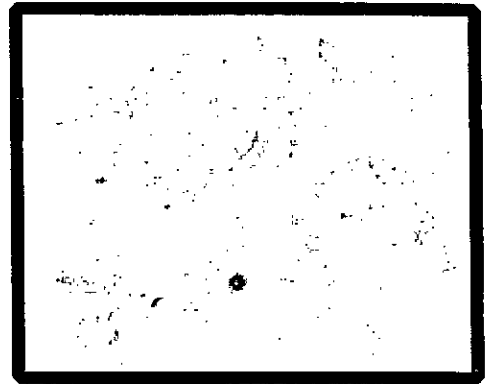
L'identification des souches isolées, nous a permis de mettre en évidence un autre genre de bactéries sulfatoréductrices. Ces bactéries codifiées IN-B311 croissent à la température de 37°C et à un pH qui se situe entre 6,20 et 8,50.

Les souches bactériennes ont développées des formes bacillaires, GRAM négatif, anaérobies strictes et mobiles. La réaction d'oxydation du lactate et/ou de l'acétate produit du CO<sub>2</sub>. Ayant un type respiratoire anaérobique, le métabolisme des sulfates comme accepteur d'élections conduit à la synthèse des sulfures.

Dans le milieu de culture, les colonies isolées sont blanches. D'après **Widdel et al., (1980)**, la souche type est le genre *Desulfobacter*. Dans le manuel de **Bergey (1984)**, la taxonomie de ces souches isolées est établie. L'identification systématique des BSR isolées de l'eau de Zarzaitine est donnée dans les tableaux 9 à 10.



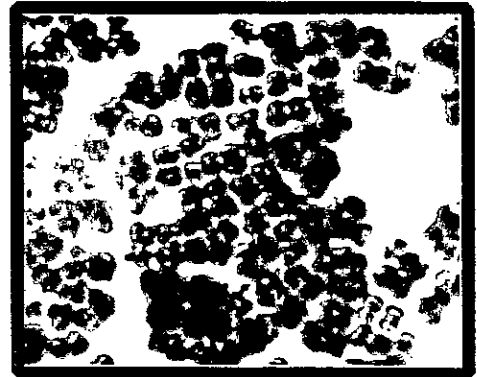
a



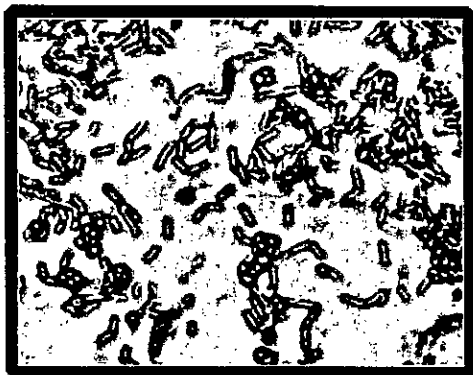
b



c



d



e

- (a): *Desulfovibrio* sp1. ( G x 1000 ).  
(b): *Desulfuromonas*. ( G x 1000 ).  
(c): *Desulfobacter*. ( G x 1000 ).  
(d): *Desulfosarcina* ( G x 1000 ).  
(e): *Desulfovibrio* sp2. ( G x 1000 ).

*Planche 2: Observation microscopique des bactéries sulfatoréductrices isolées de l'eau d'injection ( Grossissement x1000 ).*

**Tableau 9: Identification systématique de la souche IN.B111 isolée de l'eau de Zarzaitine ZR-641, selon le manuel de Bergey (1984).**

Tests effectués	Souche IN.B111 isolée de l'échantillon d'eau	Genre <i>Desulfovibrio</i> sp1: Souche référence (Bergey -1984).
Test de mobilité	+	+
Morphologie cellulaire	Petits bacilles droits	Bacilles droits
Chromogénèse	Blanche à centre noir	Présence d'inclusions noir
Type respiratoire	Anaérobie stricte	Anaérobie stricte
Opacité	Translucide	Translucide
Synthèse de H <sub>2</sub> S	+	+
Dégradation du lactate	+	+
Dégradation de l'acétate	+	+/-
Coloration Gram	-	-

**Tableau 10: Identification systématique de la souche IN.B211 isolée de l'eau de Zarzaitine ZR-641, selon le manuel de Bergey (1984).**

Tests effectués	Souche IN.B211 isolée de l'échantillon d'eau	Genre <i>Desulfuromonas</i> : Souche référence (Bergey -1984).
Test de mobilité	+	+
Morphologie cellulaire	Petits bacilles minces légèrement incurvés	Bacilles minces légèrement incurvés
Chromogénèse	Jaune	Jaune
Type respiratoire	Anaérobie stricte	Anaérobie stricte
Opacité	Opaque	Opaque
Synthèse de H <sub>2</sub> S	+	+
Dégradation du lactate	+	+
Dégradation de l'acétate	+	+
Coloration Gram	-	-

**Tableau 11: Identification systématique de la souche IN.B311 isolée de l'eau de Zarzaitine ZR-641, selon le manuel de Bergey (1984).**

Tests effectués	Souche IN.B311 isolée de l'échantillon d'eau	Genre <i>Desulfobacter</i> : Souche référence (Bergey -1984).
Test de mobilité	+	+
Morphologie cellulaire	Petits bacilles légèrement incurvés	Petits bacilles minces légèrement incurvés
Chromogénèse	Blanche	Blanche
Type respiratoire	Anaérobie stricte	Anaérobie stricte
Opacité	Opaque	Opaque
Synthèse de H <sub>2</sub> S	+	+
Dégradation du lactate	+	+
Dégradation de l'acétate	+	+
Coloration Gram	-	-

**Tableau 12: Identification systématique de la souche IN.B411 isolée de l'eau de Zarzaitine ZR-641, selon le manuel de Bergey (1984).**

Tests effectués	Souche IN.B411 isolée de l'échantillon d'eau	Genre <i>Desulfosarcina</i> : souche référence (Bergey -1984).
Test de mobilité	-	-
Morphologie cellulaire	Bacilles regroupés en tétrades	Bacilles regroupés en tétrades
Chromogénèse	Marron -Blanche	Grise
Type respiratoire	Anaérobie stricte	Anaérobie stricte
Opacité	+	+
Synthèse de H <sub>2</sub> S	+	+
Dégradation du lactate	+	+
Dégradation de l'acétate	+	+
Coloration Gram	-	-

**Tableau 13: Identification systématique de la souche IN.B511 isolée de l'eau de Zarzaitine ZR-641, selon le manuel de Bergey (1984).**

Tests effectués	Souche IN.B511 isolée de l'échantillon d'eau	Genre <i>Desulfovibrio sp2</i> : Souche référence (Bergey -1984).
Test de mobilité	+	+
Morphologie cellulaire	Bacilles droits	Bacilles droits
Chromogénèse	Marron noir	Marron noir
Type respiratoire	Anaérobie stricte	Anaérobie stricte
Opacité	Opaque	Opaque
Synthèse de H <sub>2</sub> S	+	+
Dégradation du lactate	+	+
Dégradation de l'acétate	+	+/-
Coloration Gram	-	-

#### **4. 3. Etude de croissance des BSR sur différents milieux de culture**

##### **4. 3. 1. Influence de la composition chimique**

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

Dans la plus part des études effectuées sur la croissance des BSR, les milieux synthétiques renferment des composés nutritifs, représentant les sources d'énergie, de carbone, d'azote, de soufre et d'oligo-éléments.

Riviere (1981), Bergey (1984) et d'autres ( Pfennig et al., 1981, Harry et al., 1984, Teske et al., 1981 et Beller et al., 1996 ) ont démontré que le milieu de culture doit contenir des sulfates comme source de soufre et comme donneur d'électrons. De plus, ces chercheurs ont constaté que ces bactéries ne peuvent coloniser le milieu de culture que s'il existe un facteur de croissance indispensable à leur multiplication.

L'addition de l'acide ascorbique ( vitamine C ) en quantité suffisante ( 0.1 g/l ) stimule la formation de colonie de BSR ( Zobell -1943 et Bergey -1984 ). Concernant l'étude de la croissance des BSR, les publications décrivent un grand nombre de milieu de culture. Notre choix a porté sur deux milieux. Parmi lesquels, nous retiendrons celui qui donne la concentration la plus élevée en BSR.

Les courbes de croissance des BSR, en culture mixte, sont illustrées sur la figure 9 et 10. Le milieu MC1 se caractérise par la présence d'ions phosphatés. Selon Beerstecher (1954), ces ions stimulent la multiplication cellulaire.

En plus des phosphates, le milieu de culture contient, aussi des chlorures d'ammonium comme source d'azote, des facteurs de croissance, une sources de carbone, de soufre et oligo-éléments.

Il a été montré, également que, l'activité des enzymes catalysant les réactions biochimiques du mécanisme de la réduction des sulfates en sulfures faisait intervenir des ions de magnésium ( $Mg^{2+}$ ). Ces derniers sont fournis par le sulfate de magnésium (Akashi et al., 1962 ). Au début de l'incubation, les deux milieux sont inoculés avec  $3 \times 10^5$  germes de BSR/ml. Seulement, en analysant la cinétique de croissance obtenue sur les deux milieux, on constate que l'évolution de la concentration en BSR en fonction du temps est différente.

D'après la figure 9, la croissance des BSR cultivées dans le milieu vitaminé passe par une phase d'adaptation (phase de latence). Elle est plus longue comparée à celle obtenue, lorsque les mêmes bactéries sont cultivées dans le milieu avitaminé ( Fig. 10). La phase de latence dure 72 heures sur MC2, alors qu'elle est de 24 heures sur le milieu MC1.

Cette différence, dans la durée de la phase d'adaptation, est en relation avec l'activité des bactéries inoculées. L'inoculum bactérien peut contenir soit des cellules en phase de déclin soit un faible taux de cellules vivantes.

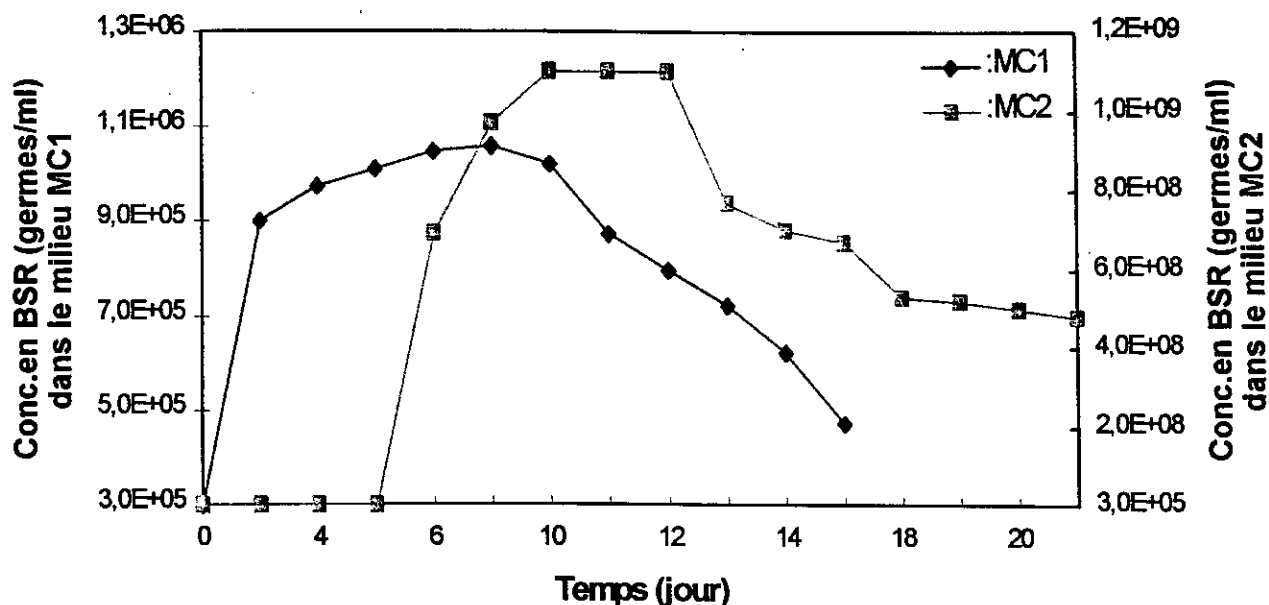


Fig. 9: Variation de la concentration en BSR dans les milieux de culture MC1 et MC2 inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation des cultures, (Conc. de l'inoculum =  $3 \times 10^5$  cellules/ml).

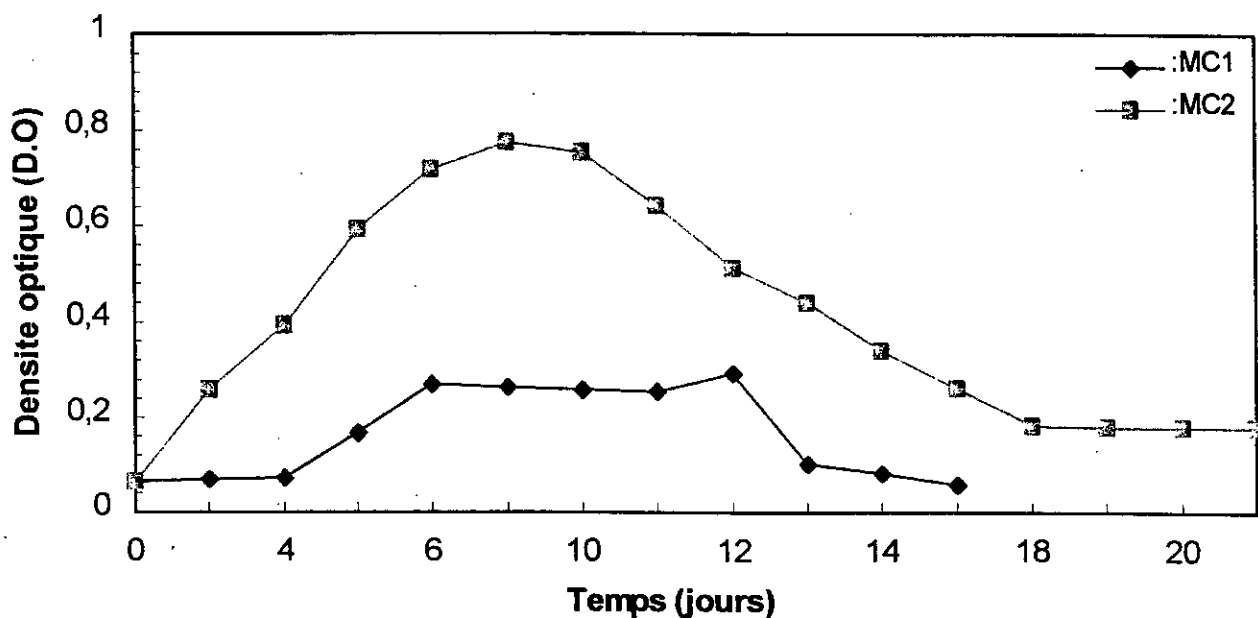


Fig. 10: Variation de la densité optique des milieux de culture MC1 et MC2 inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation des cultures, (Conc. de l'inoculum =  $3 \times 10^5$  cellules/ml).

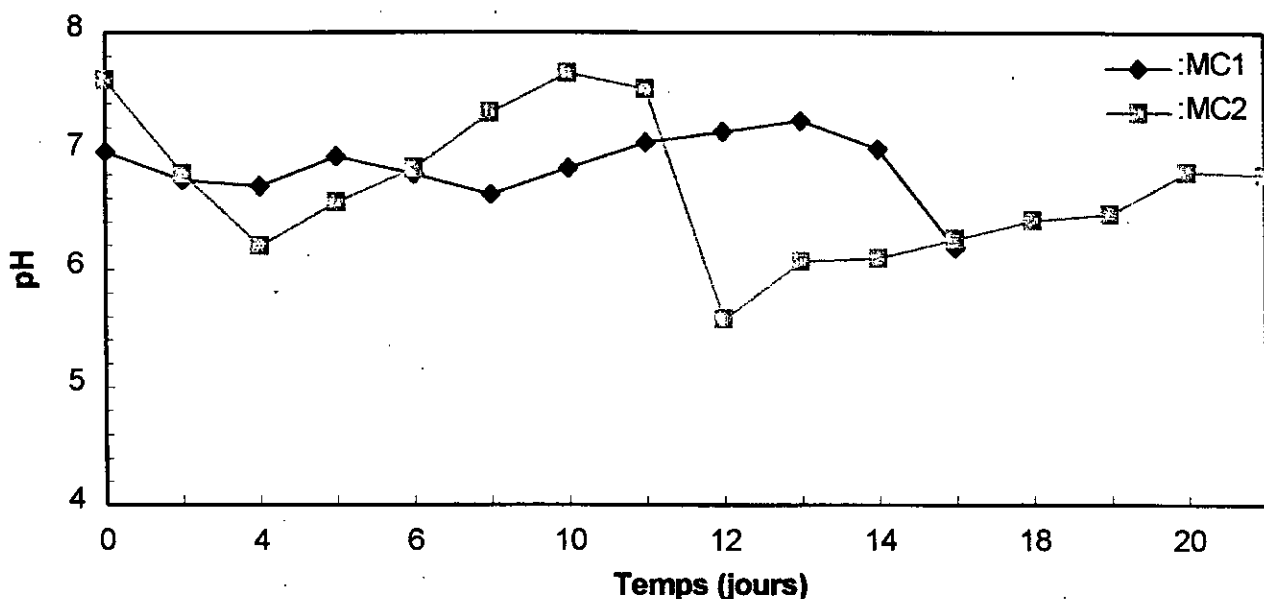
Dans le milieu MC2, les cellules se divisent plusieurs fois et synthétisent plus d'enzymes pour le métabolisme des constituants du milieu extracellulaire (Duga -1973 et Leclerc -1975). Sur les mêmes courbes de croissance ( Fig. 9 et 10), les trois autres phases: phase exponentielle, phase stationnaire et une phase de décroissance sont représentées.



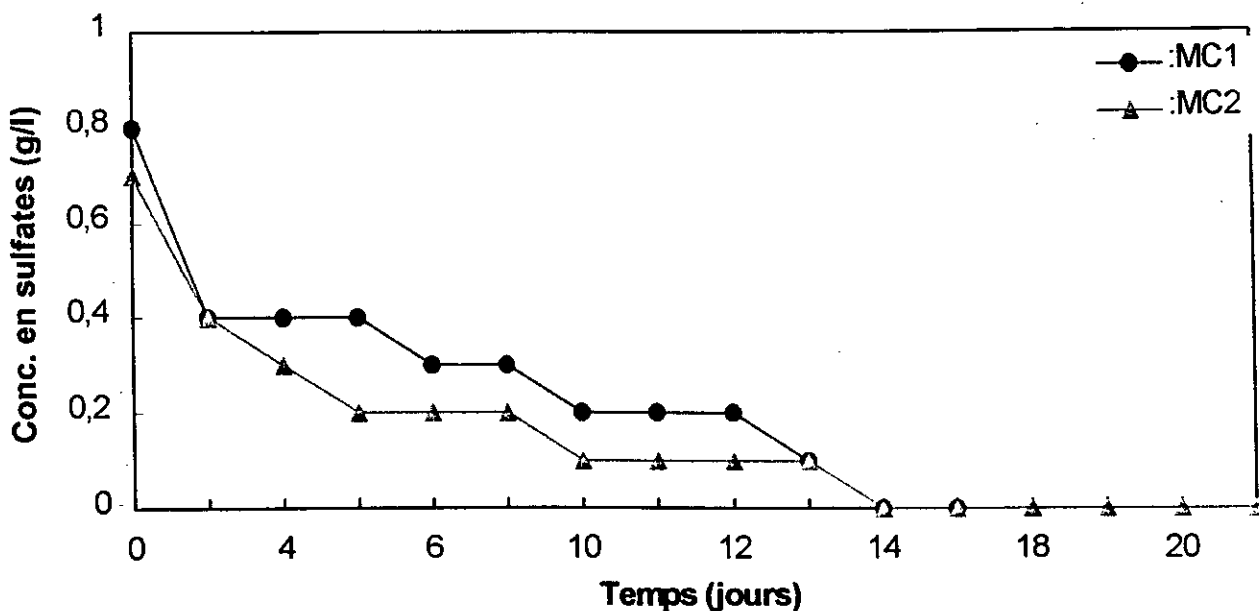
Seulement, en analysant les résultats des dénombrements sur le milieu de culture liquide, on remarque que la concentration en BSR est élevée dans le milieu MC2. Elle passe de  $3 \times 10^5$  germes/ml à  $11 \times 10^8$  germes/ml en coordonnées normales ( $N = f^{ct}(t)$ ), après une semaine d'incubation ( **Bowers et al. -1964 et Duga -1973** ). Par contre, les dénombrements effectués à partir de MC1 ont engendré une concentration de  $10^6$  germes/ml.

L'addition au milieu de culture de vitamine, d'oligo-éléments et d'extrait de levure augmente considérablement la croissance des BSR ( **Senez -1951, Botton -1975 et Bergey -1984** ). La phase de croissance est suivie de l'apparition des phases stationnaires et de décroissance dans les deux milieux de culture.

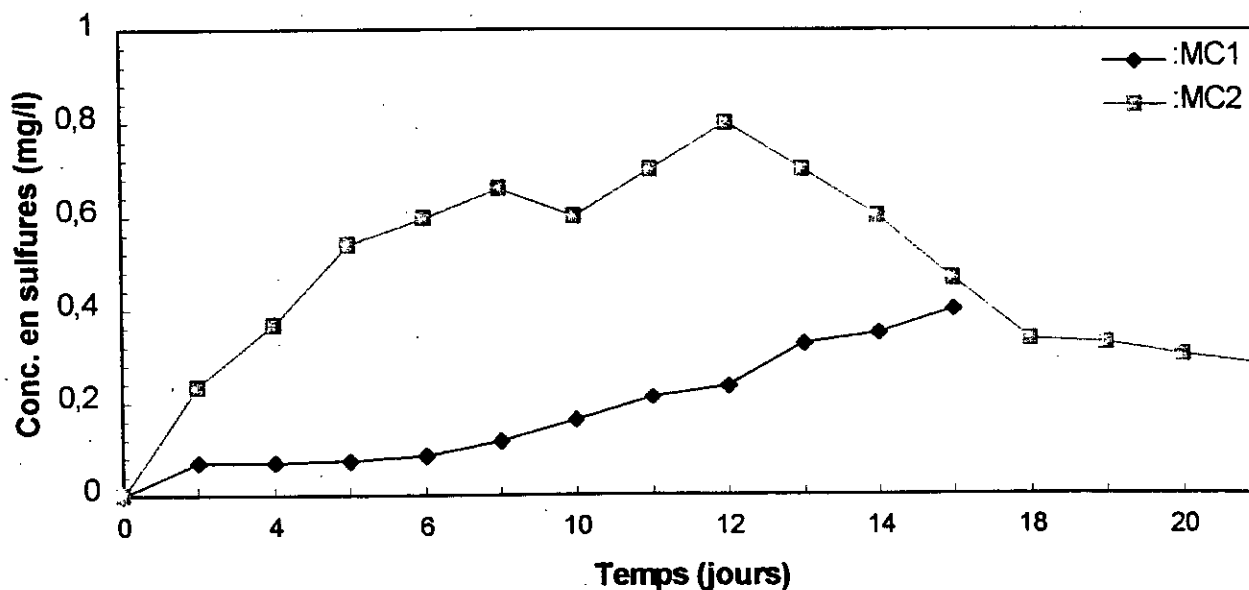
La décroissance est plus importante dans le milieu MC1 que dans le milieu MC2. Ceci s'explique par une consommation plus importante des constituants du milieu MC1. Toutefois, la croissance bactérienne est liée à l'activité bactérienne. Les figures 11, 12 et 13 illustrent les résultats de l'activité des BSR dans les milieux de culture MC1 et MC2. On a constaté, que les BSR pouvaient réduire les sulfates en sulfure; quant elles sont cultivées sur un milieu à base de lactate et de sulfate.



**Fig. 11: Evolution du pH des milieux de culture MC1 et MC2 inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation, ( Conc. de l'inoculum =  $3 \times 10^5$  cellules/ml,  $pH_{initial}$  de MC1 = 7,00 et  $pH_{initial}$  = 7,60 ).**



**Fig. 12:** Variation de la concentration en sulfates dans les milieux de culture MC1 et MC2 inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation, ( $[SO_4^{2-}]_{initiale}$  dans MC1 = 0,8 g/l et  $[SO_4^{2-}]_{initiale}$  dans MC2 = 0,7 g/l, Conc. de l'inoculum =  $3 \times 10^5$  cellules/ml).



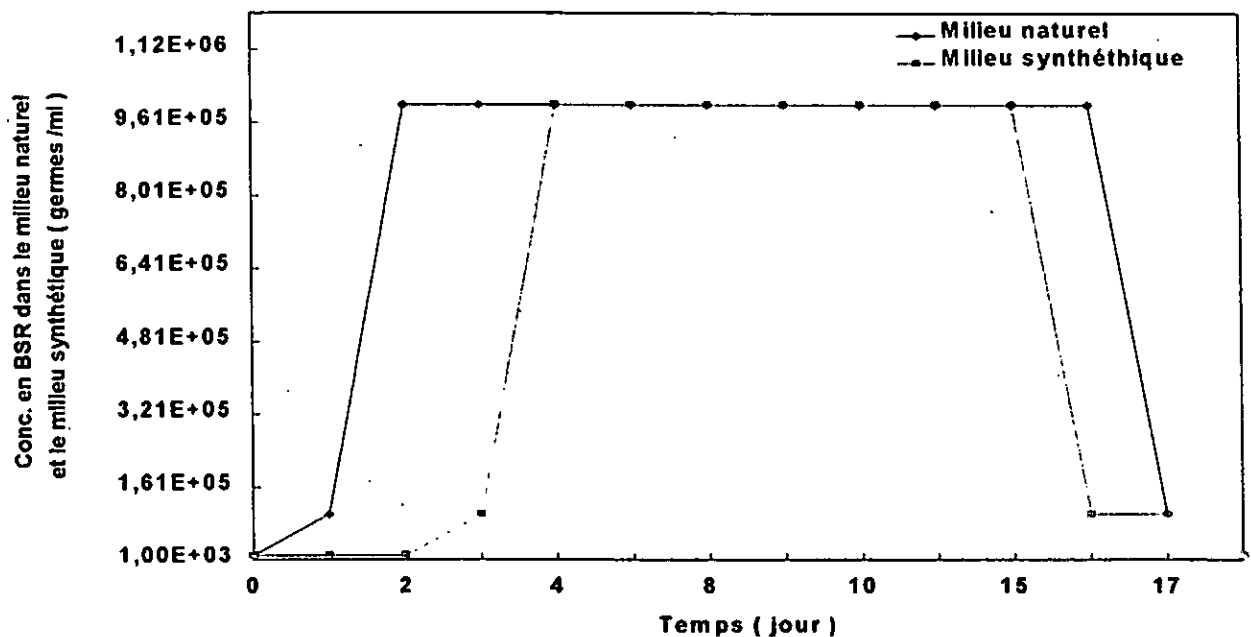
**Fig. 13:** Variation de la concentration en sulfures dans les milieux de culture MC1 et MC2 inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation, (Conc. de l'inoculum =  $3 \times 10^5$  cellules/ml).

Les résultats de la comparaison de la croissance des BSR sur le milieu naturel et le milieu synthétique sont représentés sur la figure 14. En observant les courbes de croissance obtenues on remarque que la phase de latence est absente sur le milieu naturel. Contrairement aux BSR développés sur le milieu synthétique, une adaptation de 72 heures est nécessaire.

Le transfert de BSR provenant de l'eau d'injection et inoculées directement dans un milieu de composition identique à cette eau évite la phase d'adaptation.

Par la suite, on assiste à une évolution normale de développement des BSR avec un décalage entre les deux phases exponentielles obtenues sur les deux milieux. Par contre, les phases stationnaires se superposent, après sept jours d'incubation. Ceci confirme les résultats de certains auteurs relatifs à la durée de la croissance des BSR.

Suite à cette comparaison, il est à constater que le milieu naturel ( eau d'injection ) favorise mieux la croissance des BSR comparée à celle obtenue avec le milieu synthétique.



**Fig. 14: Comparaison de la variation de la concentration en BSR dans les milieux naturel et synthétique inoculés par une culture mixte de BSR en fonction du temps d'incubation.**

#### **4. Caractérisations électrochimiques de l'acier**

##### **4. 1. Tracé du potentiel de corrosion de l'acier en fonction du temps**

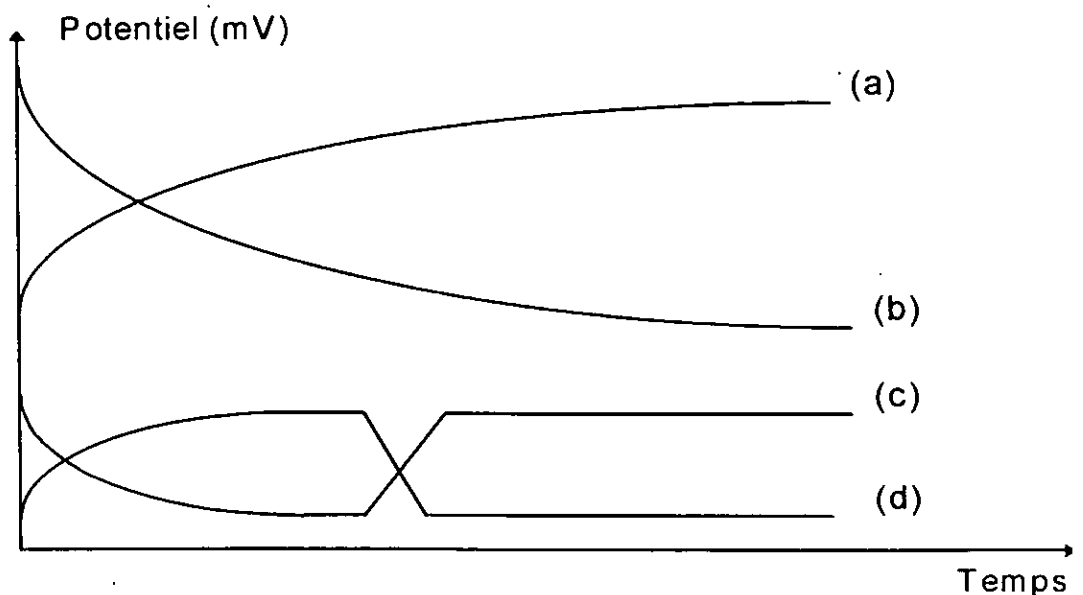
L'influence d'une culture mixte de BSR sur l'acier est étudiée. Lorsqu'on mesure le potentiel de corrosion d'un métal en fonction du temps, on observe qu'il n'atteint pas immédiatement une valeur stationnaire. En effet, au moment où le métal est plongé dans le milieu de culture spécifique aux BSR, celui-ci ne contient pas d'ions du métal. Le potentiel stationnaire de l'acier est long à atteindre. D'autre part, l'interface métal-milieu de culture peut être modifiée par la formation d'un produit de corrosion insoluble.

Pour mieux appréhender l'influence des BSR sur l'acier, l'allure générale des courbes du potentiel obtenues en fonction du temps pour un acier, peuvent présenter quatre aspects différents (Fig. 15) ( Benard -1984 ).

Le potentiel de l'acier devient de plus en plus noble. Il y a une protection ( passivation ) du métal par la formation à sa surface d'un produit de corrosion insoluble ou d'un biofilm (Fig. 15a ). Ce même potentiel peut devenir plus négatif ou de moins en moins noble. Ceci conduit à une dissolution continue du métal ( Fig. 15b ). Dans un troisième cas, le potentiel devient d'abord plus négatif, puis tend vers des valeurs plus positives.

Dans ce cas, le métal subi une attaque suivie d'une passivation ( Fig. 15c ). Le quatrième cas, le potentiel devient plus noble, puis sa valeur se déplace vers des valeurs plus négatives. Le métal se recouvre d'une couche protectrice.

Celle-ci se développe pendant un temps plus au moins long, puis elle est détruite. Le métal est dépourvu de la couche. Ceci explique la tendance des valeurs du potentiel vers des valeurs négatives ( Fig. 15d ).



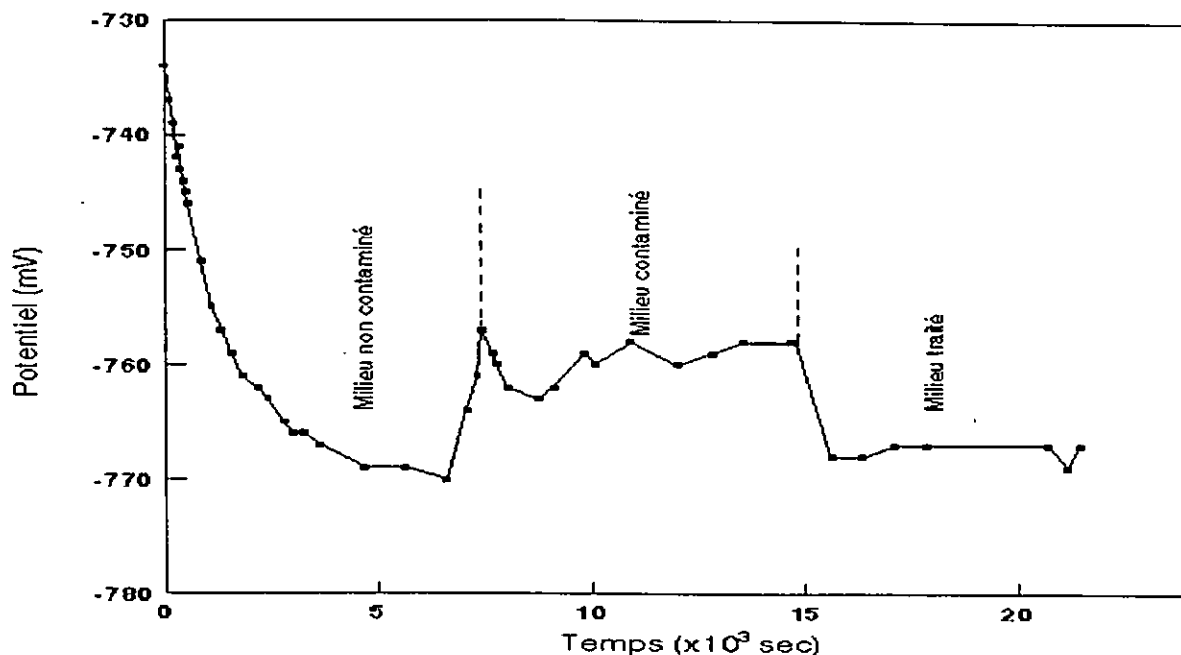
*Fig. 15: Principales formes de la variation du potentiel libre d'un acier en fonction du temps ( Benard -1984 ).*

Tenant compte des cinétiques de croissance obtenues sur les milieux MC1, MC2 et à afin d'étudier l'influence des BSR sur le comportement de l'acier, le choix a porté sur le milieu MC2.

Lorsque le milieu de culture est inoculé par une préculture mixte de BSR, nous avons enregistré les données du potentiel libre de l'acier obtenues avant, durant et après incubation bactérienne. L'évolution du Ecorr en fonction du temps des trois phases citées précédemment est représentée dans la figure 16.

Avant l'inoculation du milieu, le potentiel de corrosion de l'acier plongé dans le milieu de culture stérile passe de -734 mV à -770 mV. Lors de l'inoculation bactérienne, le même potentiel passe de -770 mV à -766 mV. On constate que, le potentiel ( $E_{\text{corr.}}$ ) passe d'une valeur moins anodique vers une valeur plus anodique par rapport au potentiel initial (-734 mV). L'acier est devenu moins noble dû à l'action corrosive des BSR sur le métal.

Cette activité bactérienne est couplée à la consommation des ions hydrogène par les souches de BSR. La présence de bactéries possédant une hydrogénase positive capable de réaliser la réaction  $\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ , accélère la dissolution de l'acier. Les BSR synthétisent leur ATP en oxydant l'hydrogène donneurs d'électrons et la réduction des sulfates en sulfures.



**Fig. 16: Variation du potentiel libre de l'acier en fonction du temps d'exposition et en fonction de milieu utilise. Le milieu contaminé contient 1% de l'inoculum de la préculture mixte des BSR.**

Quand, la culture en batch des BSR est réalisée dans un milieu sans oxygène et modérément agité, une dépolarisation de la cathode est obtenue ( Daumas et al., 1988). Cette action corrosive a été confirmé par Wormwell et al., (1952). Dans leur expérience, l'acier composé de  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Si}^{2+}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{P}^{3-}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Mo}^{2+}$  est plongé dans un milieu inoculé par les BSR. Ils ont remarqué un noircissement du milieu dû à la formation de  $\text{FeS}$  avec une dissolution accrue de l'acier. Les potentiels mesurés étaient compris entre -730 mV et -580 mV. Ils ont expliqué ces changements de potentiels par la variation de la composition chimique du milieu, au cours du développement bactérien.

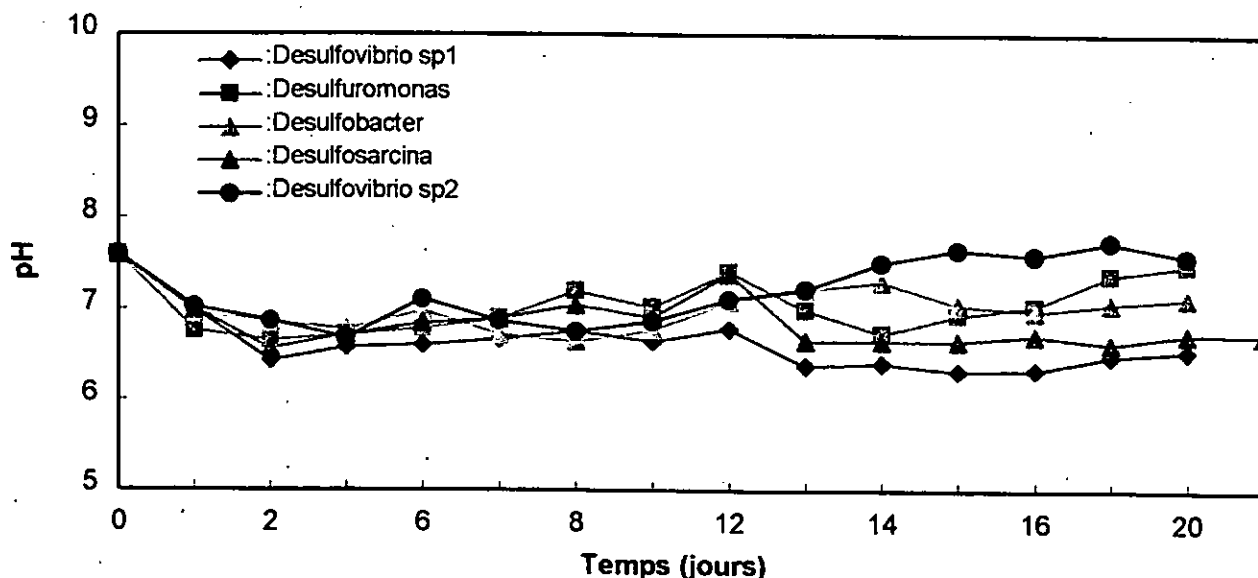
D'autre part, la culture discontinue ( en batch ) des BSR, nous a permis de faire une relation directe entre l'activité hydrogénase et la dépolarisation cathodique ( Booth et al., 1983 ). Cette activité enzymatique est modifiée, lorsque le milieu de culture est additionné d'un biocide organique. Son injection a provoqué un changement de la direction du tracé de la courbe, après six heures de culture. La valeur de  $E_{\text{corr}}$  devient cathodique proche de  $E_{\text{corr}}$  initial.

On suppose que le biocide a ralenti et/ou inhibé la croissance des BSR en agissant sur la paroi ou la membrane cytoplasmique ( **Portier -1990** ). Cette interprétation mettant en évidence la consommation de l'hydrogène et du lactate par les BSR a été proposée par **Odom et al., (1981)**. Leurs résultats ont montré que les BSR oxydent les sulfates en sulfures avec production de l'hydrogène et de l'acétate.

### 5. Mesure de l'activité biologique des souches de BSR purifiées

L'activité des bactéries isolées à partir de l'échantillon d'eau est évaluée par le dosage spectrophotométrique du substrat donneur d'électrons, les sulfates, et l'apparition du produit final du métabolisme cellulaire, les sulfures ( $S^{2-}$ ), dans le milieu de culture. Ces transformations catalysées par des enzymes s'effectuent dans des conditions de température et de pH donnés. La figure 17 illustre l'évolution du pH, du milieu de culture inoculé par les cinq souches de bactéries sulfatoréductrices isolées à partir de l'eau, en fonction du temps d'incubation.

Durant la période d'incubation des bactéries, le pH du milieu de culture se situe entre 8,00 et 6,00. Dans ce domaine les BSR ont tendance à tolérer et/ou à métaboliser les acides organiques ou minéraux présents dans le milieu ( **Scriban -1993** ). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par certains auteurs. Ces derniers ont constaté la présence des BSR dans une eau où le pH est compris entre 6,50 à 8,50, riche en sulfates et en produits carbonatés ( **Kroder et al., 1991, Cordonnier et al., 1996** ).



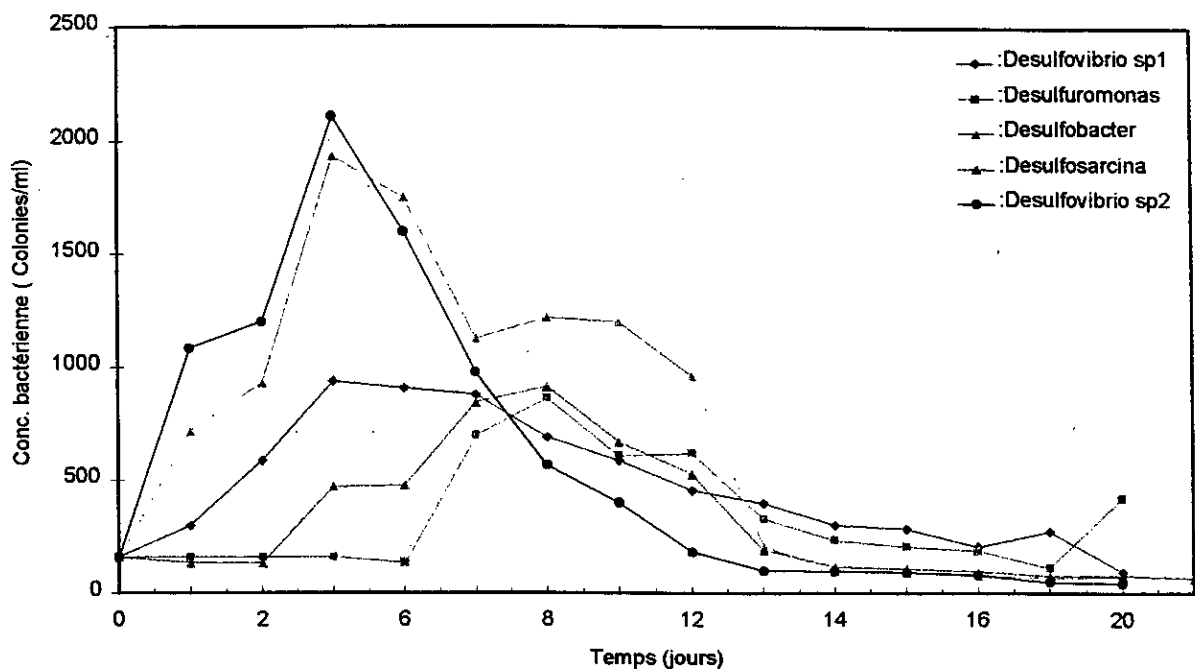
**Fig. 17: Evolution du pH du milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine, en fonction du temps d'incubation**

Un pH compris entre 5,50 et 8,50 favorise l'activité métabolique des bactéries réductrices des sulfates. Au delà de ces limites, elles deviennent inactivées ( **Basalo et al., 1987** ). Il est évident que l'augmentation de la vitesse de croissance ( $dX/dt$ ) des bactéries est en relation avec le pH du milieu.

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

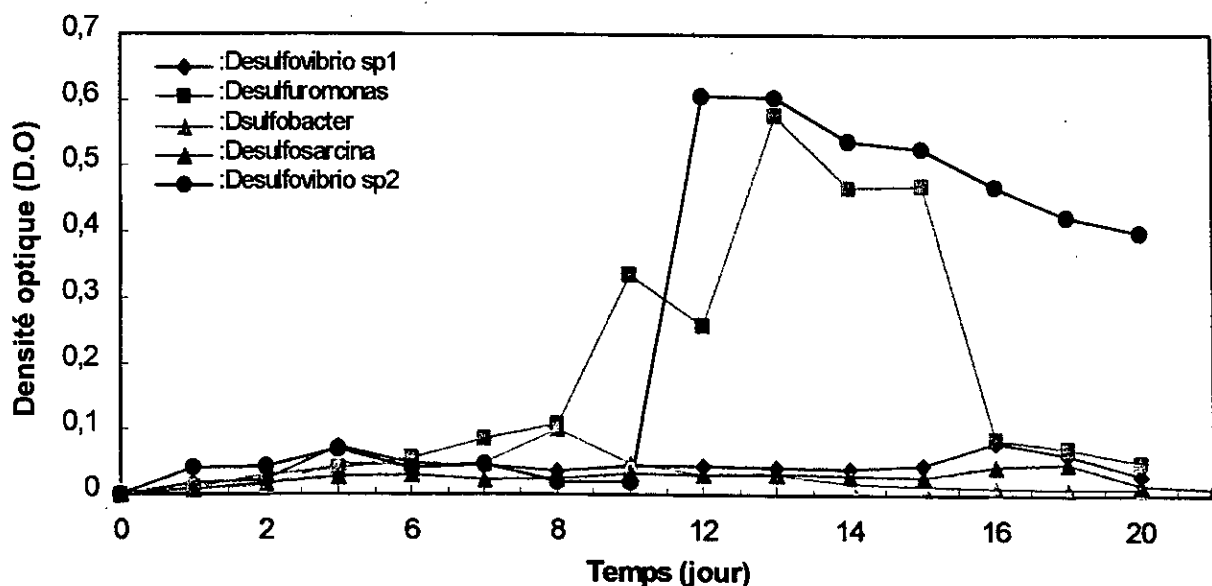
Le transport transmembranaire de ces éléments augmente avec la multiplication cellulaire. Par ailleurs, l'énergie cellulaire libérée par les réactions d'oxydoréduction des ions sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) présents dans le milieu de culture est utilisée par les cellules. Dans ce cas, le rendement en biomasse augmente.

La figure 18 donne l'évolution de la concentration bactérienne des cinq souches isolées de l'échantillon d'eau de Zarzaitine en fonction du temps d'incubation. Il a été montré que cette concentration en bactéries est en relation avec la densité optique du milieu ( Fig. 19 ).



**Fig. 18: Evolution de la concentration bactérienne dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine, en fonction du temps d'incubation.**

D'après l'allure de ces graphes, la vitesse de consommation ou de dissimulation ( $dS/dt$ ) des sulfates est fonction du genre bactérien cultivé dans le milieu. Durant la phase de latence, la vitesse de croissance ( $dX/dt$ ) et la vitesse spécifique de croissance  $\mu$  sont nulles. Sur la Planche 2 donnée dans la partie théorique, on constate que les cinq souches isolées effectuent la réaction de dissimulation des sulfates.



**Fig. 19:** Variation de la densité optique du milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine en fonction du temps.

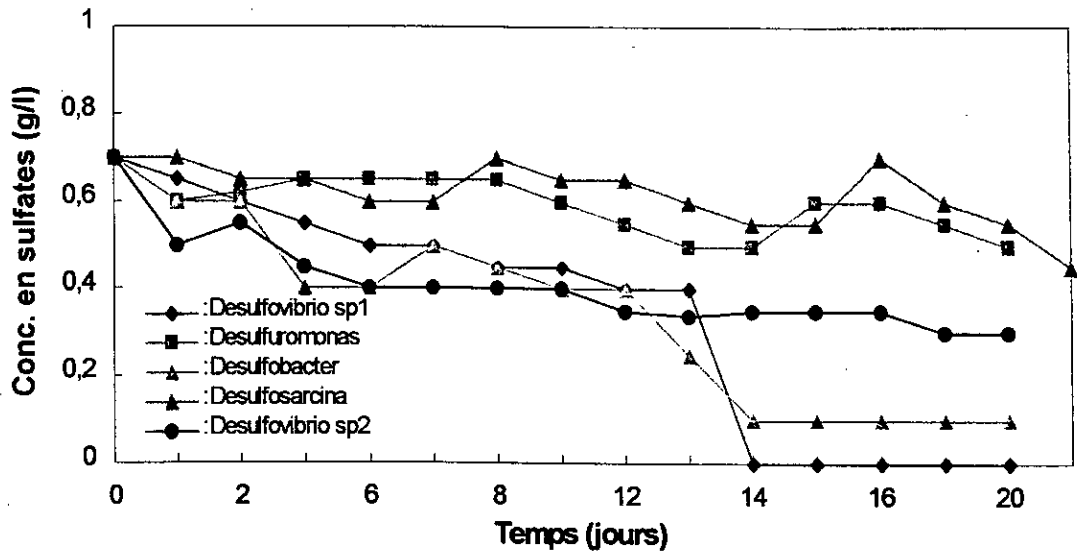
Au moment de l'inoculation du milieu, les bactéries entament la synthèse de l'ATP au cours des réactions biochimiques de dissimulation des ions sulfates. Ces observations montrent que l'enzyme ATP sulfurylase est induite avec génération d'ions sulfures.

Tenant compte de la variation de la concentration cellulaire des cinq souches isolées ( Fig. 18 et 19 ) en fonction du temps et de la figure 20, on constate que, la dégradation des sulfates s'effectue même lorsque les bactéries se trouvent en phase de déclin. Le milieu se concentre en produits toxiques et les cellules s'autolysent. Selon la réaction du substrat (S) + enzyme (E)  $\leftrightarrow$  enzyme-substrat (ES)  $\rightarrow$  produit (P), les données du dosage des sulfures ont conduit aux tracés figurant dans la figure 21.

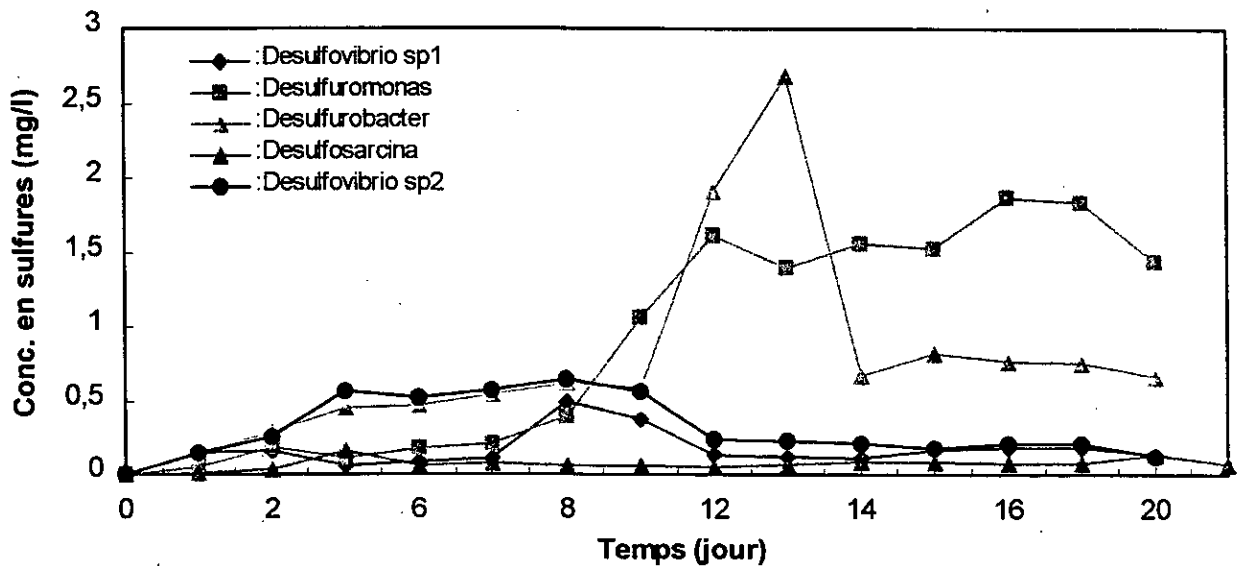
Elle montre l'évolution de la concentration des sulfures en fonction du temps dans le milieu MC2 inoculé par les cinq souches. La vitesse d'apparition du produit (dP/dt) varie, également, en fonction de la souche de BSR inoculée. Durant la phase d'adaptation, l'adénosine phosphosulfite réductase serait induite pour l'ensemble des souches. Le passage de l'adénosine phosphosulfate en ions sulfites ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) ( Planche 2 ) provoque une libération extracellulaire élevée en sulfures. A partir du 3<sup>ème</sup> jour d'incubation, la réaction de dissimulation des sulfures est nettement entamée dans le milieu. La concentration la plus élevée en sulfures est obtenue dans le milieu inoculé par *Desulfovibrio sp2* et *Desulfosarcina*.

Contrairement aux résultats portés dans le tableau 8, on déduit que les cellules des souches *Desulfovibrio sp1* et *Desulfuromonas* sont physiologiquement âgées ou lysées. Ceci nous laisse penser que, ces souches sont moins corrosives. Seulement, il a été exposé qu'une bactérie morte est plus corrosive qu'une bactérie viable.





**Fig. 20:** Variation de la concentration en sulfates dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine, en fonction du temps.



**Fig. 21:** Variation de la concentration des sulfures dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine, en fonction du temps.

L'élaboration de l'hydrogène sulfuré par les cellules mortes accélèrent la corrosion du métal (Guillaume et al., 1977). A la suite de ces interprétations, nous avons distingué deux groupes de BSR. Un contenant les BSR les plus corrosives représentées par *Desulfovibrio sp1* et *Desulfuromonas*. Le deuxième groupe comprenant *Desulfobacter*, *Desulfosarcina* et *Desulfovibrio sp2* représente les BSR les moins corrosives.

## 6. Etude du pouvoir corrosif des BSR purifiées

### 6. 1. Courbes de polarisation potentiodynamique de l'acier

Les courbes de polarisation anodiques et cathodiques des coupons d'acier plongés dans le milieu de culture stérile et inoculé par les bactéries des cinq souches pures de BSR ont été tracées. Comme il a été mentionné dans la partie expérimentale, les mesures de voltampérométrie sont effectuées sur une période de sept jours. Durant ce temps d'incubation, des voltampérogrammes de l'acier sont tracés. La comparaison entre les deux groupes de BSR, nous a permis de sélectionner deux voltampérogrammes obtenus en fin de l'incubation. Les tracés de ces courbes, par rapport à un témoin, sont représentés sur les figures 22 et 23. La figure 22 est obtenue avec la culture en batch des BSR plus corrosives (*Desulfuromonas*). La figure 23 correspond à l'acier plongé dans la culture en batch de la BSR, moins corrosive (*Desulfovibrio sp2*).

D'après les courbes de croissance obtenues, lors de la caractérisation microbiologique des cinq souches bactériennes de BSR, le temps d'incubation est de 7 jours. Ce temps correspondant à la phase exponentielle pour l'ensemble des souches de bactéries purifiées.

Au cours du développement bactérien, des modifications dans les branches anodiques et cathodiques des courbes de polarisation potentiodynamiques sont apparues.

Ces changements sont accompagnés par une variation dans les valeurs de la densité du courant et du potentiel de corrosion en fonction du temps d'incubation et par rapport au milieu non inoculé (témoin). Il semble que la présence des bactéries provoque la corrosion de l'acier. Les bactéries se multiplient dans le milieu en puisant l'énergie libérée au cours des étapes biochimiques de la réduction des sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) en sulfures ( $\text{S}^{2-}$ ). Cette réduction est couplée à la consommation de l'hydrogène cathodique (Daumas et al., 1988).

Par ailleurs, Videla (1989) a expliqué que les effets anodiques de la corrosion provoqués par les bactéries sont dues à la synthèse de métabolites corrosifs. La production de ces composés cellulaires exalte le pouvoir corrosifs d'entités chimiques présentes dans le milieu.

Le même auteur attribue les modifications dans les branches cathodiques à la production de réactifs cathodiques, à la complexion ou la dégradation de ces réactifs ou/et par l'accélération indirecte de la réaction cathodique causée par les bactéries.

D'autre part, le déplacement du potentiel de corrosion dans le sens des valeurs négatives est en relation avec les réactions anodiques et cathodiques. Dans ces conditions, une diminution de la vitesse de la réaction cathodique suivie par un accroissement de la vitesse de la réaction anodique ou inversement sont obtenues (Mansfeld -1991).

Les conditions de culture facilitent la prolifération des bactéries au voisinage de la cathode avec une augmentation de la corrosion de l'acier. On pense que les bactéries isolées accélèrent la dissolution de l'acier (libération des ions  $\text{Fe}^{2+}$ ).

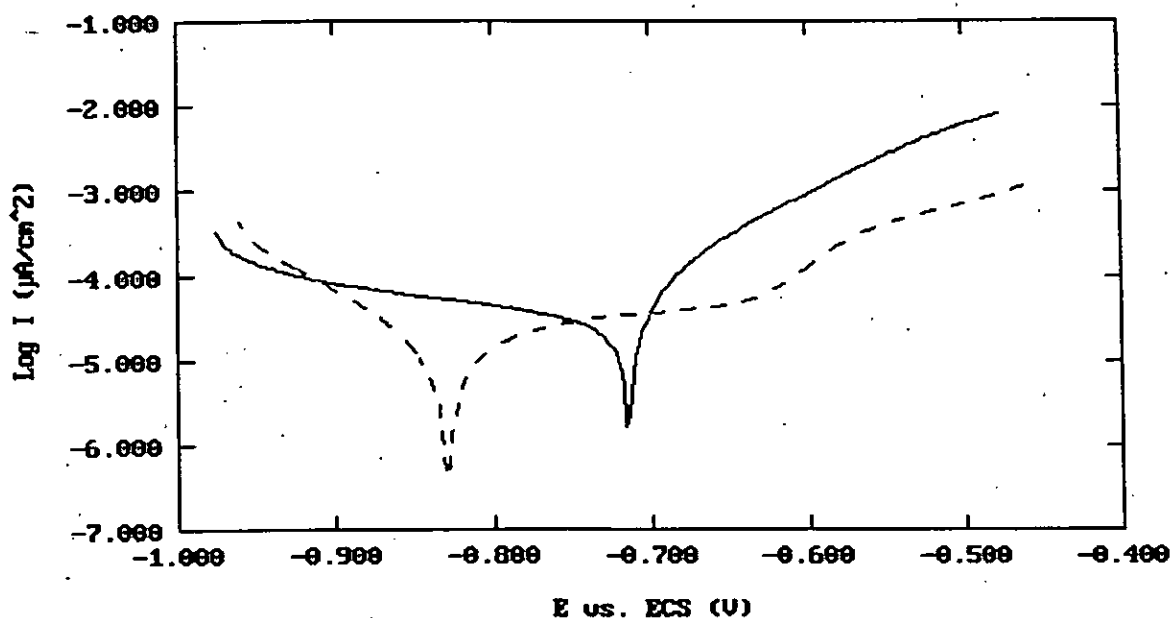


Fig. 22: Voltampérogrammes de l'acier au carbone plongé dans le milieu de culture non inoculé (—: témoin) et inoculé par la BSR la plus corrosive (---: *Desulfuromonas*).

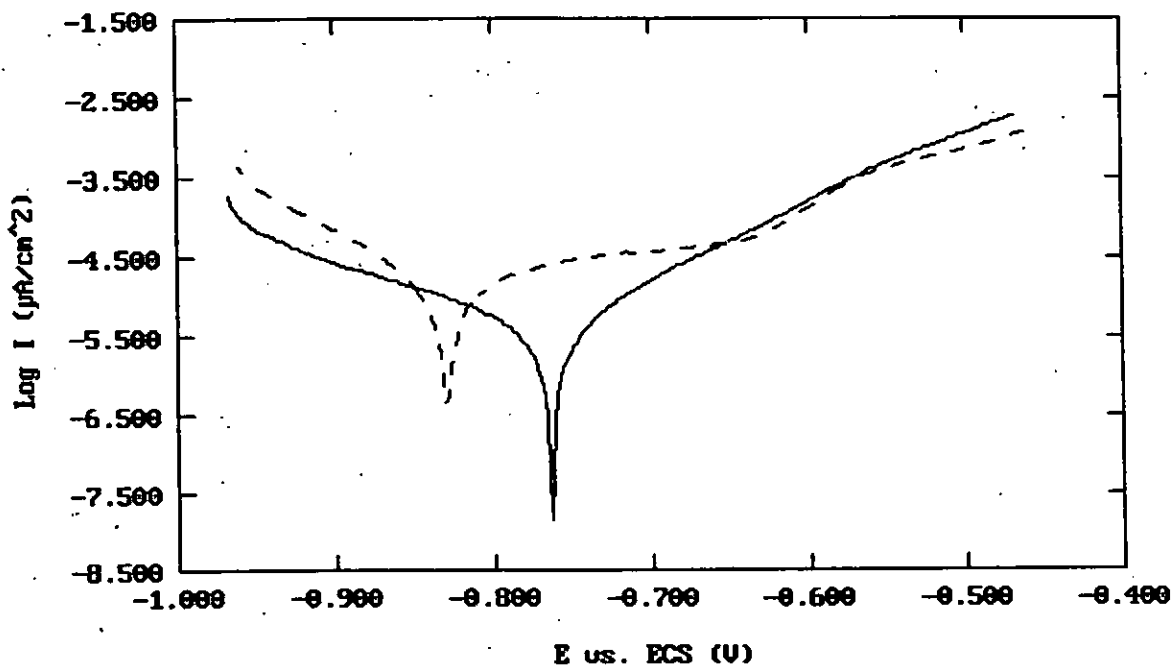


Fig. 23: Voltampérogrammes de l'acier au carbone plongé dans le milieu de culture non inoculé (—: témoin) et inoculé par la BSR la moins corrosive (---: *Desulfovibrio sp2*).

D'autre part, la dépolarisation anodique augmente suite à la réaction entre les sulfures synthétisés par les bactéries et les ions  $\text{Fe}^{2+}$ . Un précipité de  $\text{FeS}$  se forme au voisinage de l'anode (Duga -1973). Le mécanisme de dépolarisation anodique et cathodique créé par des BSR n'a pas fait l'objet d'études poussées. Seulement, la littérature indique que la corrosion par les bactéries peut être due à une acidification localisée (Crolet -1995).

Sur les figures 22 et 23, on remarque que le point d'intersection des pentes des branches, correspondant au potentiel de corrosion et au courant de corrosion sur le voltampérogramme de l'acier exposé aux souches de *Desulfuromonas* s'est déplacé dans le sens des valeurs de potentiels anodiques et par rapport au témoin.

Aussi, avec le milieu inoculé par les souches bactériennes de *Desulfovibrio sp2* ( Fig. 23 ), la valeur de  $E_{corr}$  est plus anodique par rapport au  $E_{corr}$  tiré du voltampérogramme de l'acier immergé dans la culture sans bactéries ( témoin ). Mais, ce même  $E_{corr}$  ( Fig. 22 ) reste moins anodique comparé à celui tiré de la figure 23.

Ceci nous laisse supposer que, certaines bactéries s'adsorbent à la surface de l'acier. **Mollica et al., 1984.** et **Johnsen et al., 1986** ont montré que, durant le développement bactérien, l'activité microbiologique modifie les propriétés cathodiques de l'acier. Ce qui induit un déplacement des valeurs de  $E_{corr}$  dans le sens positif et sans qu'il ait changement dans la nature des éléments chimiques de l'acier ( **Feron et al., 1995** ).

## 6. 2. Influence des BSR purifiées sur le potentiel de corrosion de l'acier

Le potentiel de corrosion (  $E_{corr}$  ) correspond au potentiel de l'électrode de travail qui se corrode dans un milieu aqueux. L'évolution en fonction du temps des valeurs du potentiel de corrosion de l'acier plongé, dans un milieu de culture MC2 non inoculé et inoculé par les bactéries sulfatoréductrices purifiées, est illustrée dans la figure 24. Les données de  $E_{corr}$  sont relevées sur les voltampérogrammes tracés durant sept jours d'incubation.

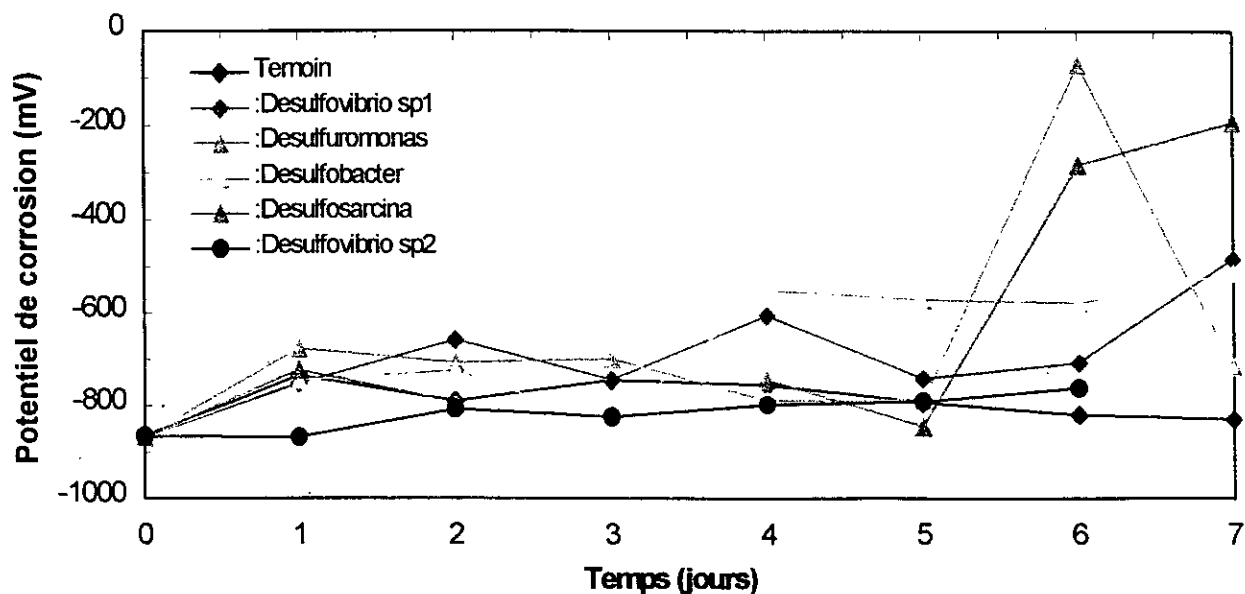


Fig. 24: Evolution, en fonction du temps, du potentiel de corrosion de l'acier plongé dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine.

Dans le milieu non inoculé, le potentiel de corrosion de l'acier ne varie pas beaucoup. Les valeurs enregistrées fluctuent entre -730 mV/ECS et -866 mV/ECS. En présence des bactéries, les nouvelles valeurs obtenues après 24 heures de cultures, restent proches de celles obtenues avec le milieu non inoculé. En effet, le potentiel de corrosion de l'électrode de travail passe de -866 mV/ECS vers des valeurs anodiques égales à -751, -675, -725 et -723 mV/ECS respectivement en présence des deux souches, les plus corrosives (*Desulfobacter* et de *Desulfosarcina*).

Ce déplacement de  $E_{\text{corr}}$  indique un début de croissance bactérienne pour les quatre souches avec une légère modification des propriétés cathodiques de l'acier (Peng et al., 1994).

D'après la figure 19, nous avons déduit que le milieu MC2 favorisait la croissance des cellules issues de la souche *Desulfovibrio sp1*. Ce qui explique, qu'après 48 heures de culture, la valeur de  $E_{\text{corr}}$  enregistrée avec le milieu inoculé par ces cellules est plus anodique (-657 mV/ECS); que celles obtenues avec les cultures inoculées par les autres souches bactériennes.

L'action corrosive de la souche *Desulfovibrio sp1* est également obtenue au bout de quatre jours de culture. Les cellules bactériennes de *Desulfovibrio sp1* sont en pleine phase exponentielle et leur action corrosive est au maximum (-606 mV/ECS). Contrairement, au milieu inoculé par les souches de *Desulfovibrio sp1*, le suivi de la croissance de *Desulfovibrio sp2* en fonction du temps, nous a permis de tracer l'évolution des données du potentiel de corrosion de l'acier. Durant trois jours de culture, les valeurs de  $E_{\text{corr}}$  relevées sur les voltampérogrammes sont cathodiques par rapport au potentiel témoin (-866mV/ECS).

A partir du quatrième jour, l'électrode de travail prend des valeurs de potentiel de corrosion plus anodiques. Mais on a constaté que, l'ensemble de ces valeurs obtenues avec l'acier plongé dans le milieu inoculé par *Desulfovibrio sp2* restent inférieurs, comparées à celles du milieu non inoculé. Dans le cas de la culture de *Desulfobacter*, on enregistre une évolution de  $E_{\text{corr}}$  anodique dès le premier jour d'incubation. On pense que l'activité microbiologique due à la division rapide des cellules de *Desulfobacter* est à l'origine de la variation du potentiel de corrosion de l'acier. En fin d'incubation de la souche *Desulfobacter*, le potentiel de corrosion ( $E_{\text{corr}}$ ) atteint une valeur de -274 mV/ECS.

D'autre part et d'après la même courbe ( Fig. 24 ), l'allure des valeurs de  $E_{\text{corr}}$  prises par l'électrode, plongée dans le milieu inoculé par les cellules de la souche *Desulfosarcina* montre que l'électrode de travail est affectée par l'activité de ces bactéries. Le potentiel de corrosion passe de -866 mV/ECS vers une valeurs plus anodique (-744 mV/ECS).

En reliant les courbes de  $N=f^{\text{ct}}(t)$  ( fig. 18 ) ou  $D.O = f^{\text{ct}}(t)$  ( Fig. 19 ) de cette souche, à la courbe de  $E_{\text{corr}}=f^{\text{ct}}(t)$ , on constate que la faible croissance explique les valeurs de  $E_{\text{corr}}$  enregistrées.

Ces données se rapprochent de celles du témoin. L'action corrosive n'est obtenue qu'à partir du 6<sup>ème</sup> jour, le  $E_{\text{corr}}$  est égale à -283 mV/ECS. En fin d'incubation, correspondant au début de la phase stationnaire, le potentiel de corrosion enregistré est de -193 mV/ECS.

Les changements des valeurs de  $E_{\text{corr}}$  dans le sens négatif par rapport au potentiel de corrosion initial (activation) des coupons d'acier plongés dans le milieu MC2 inoculé peut être attribué à l'effet de la dépolarisation cathodique causée par les BSR. En parallèle, une augmentation des réactions anodiques dues à l'apparition l'hydrogène sulfuré est obtenue. Les courbes de polarisation potentiodynamiques confirment ces résultats.

### 6. 3. Influence des BSR sur le courant de corrosion et la vitesse de corrosion

Les mesures du potentiel de corrosion sont insuffisantes pour évaluer l'action corrosive des BSR. Il est nécessaire de déterminer, en parallèle, le courant de corrosion ( $I_{\text{corr}}$ ) et la vitesse de corrosion ( $V_{\text{corr}}$ ) (Peng et al., 1994). Pour chaque mesure effectuée, la vitesse de corrosion est proportionnelle à la densité de courant de corrosion. Les variations dans les données de  $I_{\text{corr}}$  et  $V_{\text{corr}}$  de l'acier plongé dans le milieu non inoculé et inoculé par les cinq souches de BSR sont représentées sur les figures 25 et 26. Au début de l'expérience, le courant traversant l'acier immergé dans le milieu non inoculé par les BSR passe de la valeur  $1,63 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  à  $25,23 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Quantitativement, cette augmentation rapide de la densité du courant montre une dissolution importante de l'électrode de travail. Pour le reste du temps d'exposition, la densité du courant reste approximativement stable.

Iverson (1983) rapporte dans ses travaux sur l'effet corrosif des BSR vis à vis d'un acier doux (concentration en carbone  $<0.25\%$ ), que le courant de corrosion peut atteindre de très basses valeurs ( $0,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) et reste stable aux alentours de ces valeurs. Ces données sont obtenues, lorsque les bactéries se trouvent en phase de latence. Dans certains cas de culture de BSR, le courant de corrosion ( $I_{\text{corr}}$ ) diminue jusqu'à  $0.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , puis augmente autour de  $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Ces résultats sont associés soit à la rupture du film de sulfure de fer ou à la rupture du biofilm. Par ailleurs, la présence d'ions de sulfate de fer et d'ammonium provoque l'augmentation de la vitesse de corrosion ( $V_{\text{corr}}$ ) suivie d'une diminution (Adams et al., 1953).

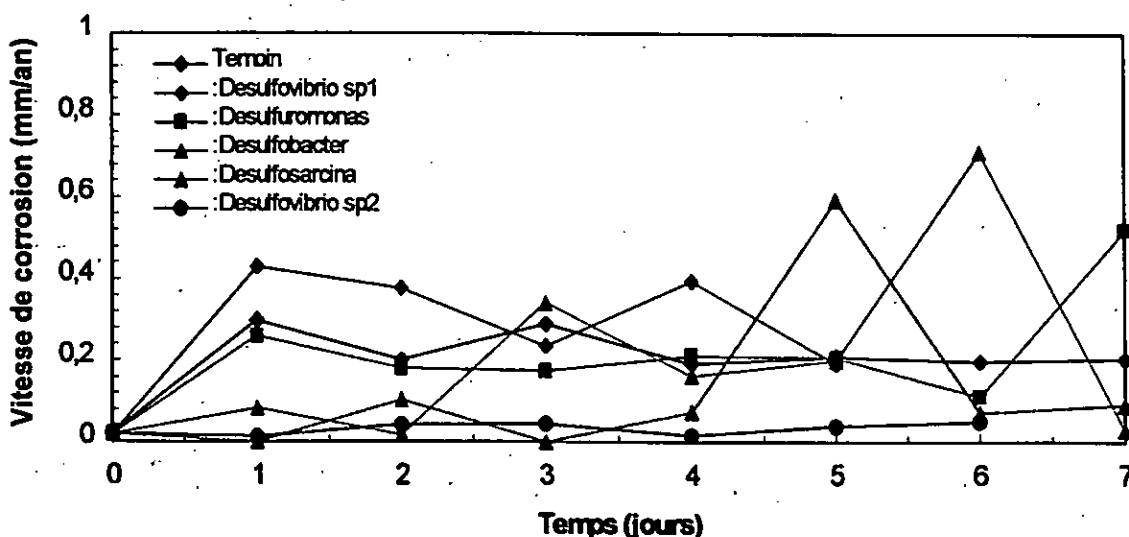


Fig. 25: Variation de la vitesse de corrosion en fonction du temps dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches de bactéries sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine.

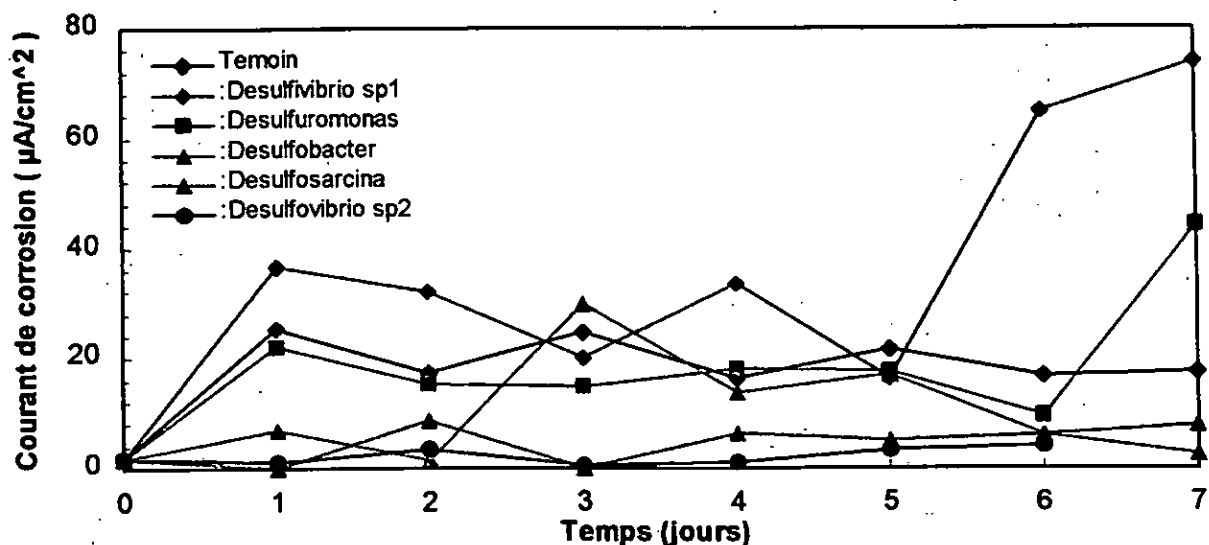


Fig. 26: Variation du courant de corrosion en fonction du temps dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches de bactéries sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine.

Ces observations suggèrent que les ions ferreux ont inhibés la formation du film de FeS. Ceci permettra à certains métabolites corrosives de s'adsorber à la surface de l'acier avec une initiation de la corrosion. Le même chercheur a confirmé l'action corrosive, lorsqu'une culture pure et en batch de BSR est utilisée. Les valeurs de  $V_{\text{corr}}$  obtenues sont élevées, après 72 heures de culture.

Dans le milieu inoculé, on a constaté que les plus grandes valeurs de  $V_{\text{corr}}$  et de  $I_{\text{corr}}$  sont obtenues; lorsque l'électrode de travail est immergée dans le milieu inoculé par les souches bactériennes de *Desulfivibrio sp1* et de *Desulfuromonas*. Après 24 heures de culture, la vitesse de corrosion est passée de  $1,93 \times 10^{-3}$  mm/an à 0,43 mm/an et 0,25 mm/an respectivement en présence des souches de *Desulfivibrio sp1* et de *Desulfuromonas*. Les deux paramètres ont tendance à augmenter rapidement, lorsque le milieu de culture MC2 est inoculé par la souche *Desulfovibrio sp1*. La vitesse de corrosion enregistrée au bout de 4 jours de culture est de 0,39 mm/an. Ce qui correspond à un  $I_{\text{corr}}$  égale à  $33,53 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Cette densité atteint  $73,85 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  à la fin de la phase de croissance. Par contre, avec la culture de *Desulfuromonas*, on enregistre une densité de  $44,31 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  et une vitesse de corrosion égale à 0,51 mm/an.

En comparant les résultats électrochimiques obtenus avec des coupons d'acier immergés dans le milieu et exposés à l'action corrosive des souches bactériennes de *Desulfobacter*, *Desulfosarcina* et *Desulfovibrio sp2*, on remarque que l'allure des courbes  $dV/dt$  et  $dI/dE$  en fonction du temps augmentent. Avec la culture de *Desulfobacter* et après six jours de culture, la densité du courant est de  $60,72 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Alors que la vitesse de corrosion prend la valeur 0,71 mm/an. Dans ce cas, on observe un accroissement de l'allure des courbes suivi d'une diminution.

De même pour l'acier exposé aux bactéries *Desulfosarcina* et *Desulfovibrio sp2*. Les valeurs enregistrées sont  $7,87 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  et  $0,09 \text{ mm}/\text{an}$ , en présence *Desulfosarcina*, après sept jours d'incubation. Avec l'électrode plongée dans le milieu inoculé par les souches bactériennes de *Desulfovibrio sp2*, on a obtenu  $4,24 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  et  $0,04 \text{ mm}/\text{an}$ .

Hardey et al. -1984 ont obtenu des vitesses de corrosion très faibles avec un acier exposé aux souches bactériennes pures de BSR. Néanmoins, et d'après les figures 18 et 19, les souches bactériennes *Desulfovibrio sp1* possèdent l'activité cellulaire la plus élevée. Ceci a engendré une plus grande action corrosive vis à vis de l'acier au carbone par rapport aux autres bactéries isolées.

D'autres explications peuvent être apportées pour interpréter les effets de diminution de la vitesse de corrosion et du courant de corrosion. Selon Peng et al., 1994, la précipitation de dépôts chimiques tels que le  $\text{CaCO}_3$  à la surface de l'acier plongé dans un milieu inoculé par les BSR empêche la dissolution métallique.

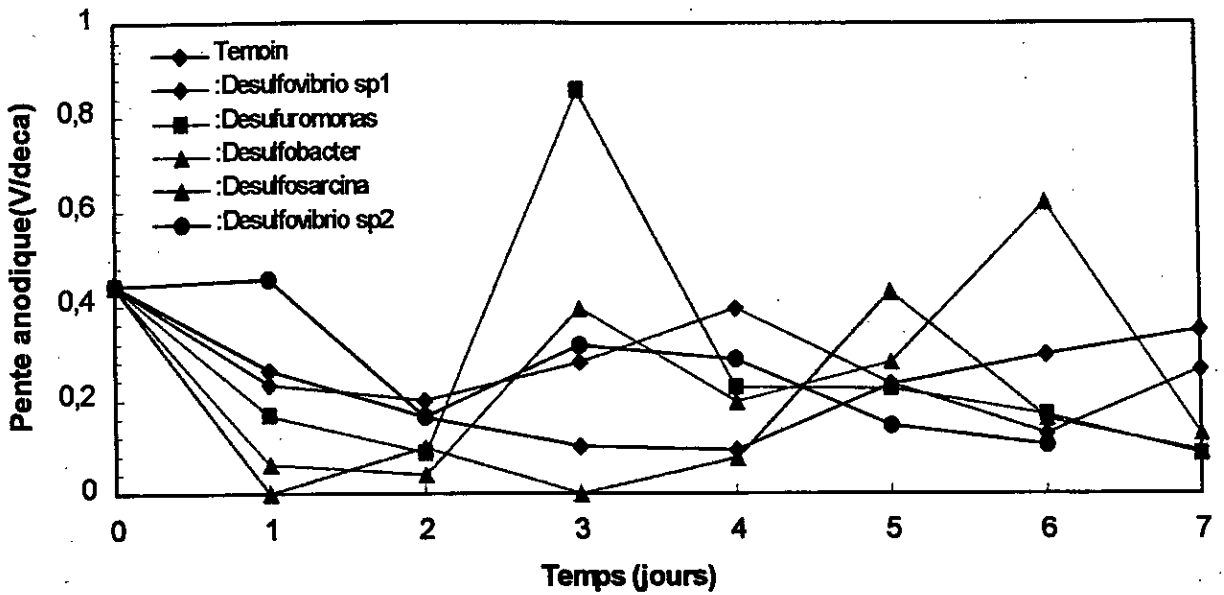
#### **6. 4. Influence des BSR sur les pentes des courbes de TAFEL**

La variation, en fonction du temps, dans les constantes des pentes anodiques et cathodiques de Tafel des courbes de polarisation de l'acier plongé, dans le milieu de culture non inoculé et inoculé par les cinq bactéries purifiées, est illustrée sur les figures 27 et 28. Après 24 heures d'incubation, on constate que la pente anodique de la courbe de polarisation du témoin est, nettement, supérieure aux pentes des courbes obtenues avec le milieu inoculé par *Desulfovibrio sp1*, *Desulfuromonas* et *Desulfobacter*.

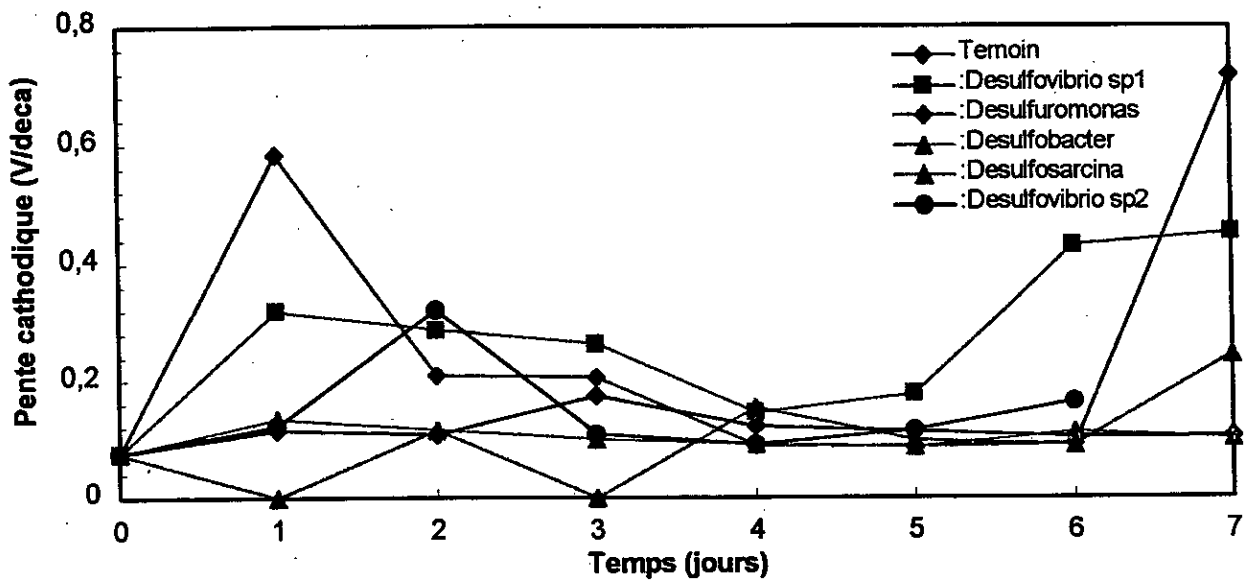
Cependant, avec le milieu de culture de *Desulfosarcina* et *Desulfovibrio sp2*, la pente anodique tirée des courbes de polarisation correspondantes est supérieure à celle du témoin. L'électrode subit une dépolarisation anodique sous l'effet de l'action corrosive des BSR les plus corrosives. Si on se réfère à la figure 3, on constate que la réaction anodique est prédominante ( Bard et al., 1983 ). Dans le cas des électrodes exposées aux BSR les moins corrosives, c'est la réaction cathodique qui domine.

Sur la figure 28, on constate que la pente cathodique du témoin est inférieure à celles obtenues avec des électrodes plongées dans les milieux inoculés par les bactéries *Desulfosarcina* et *Desulfovibrio sp2*.





**Fig. 27:** Evolution de la pente anodique des droites de TAFEL en fonction du temps d'exposition de l'acier plongé dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine.



**Fig. 28:** Evolution de la pente cathodique des droites de TAFEL en fonction du temps d'exposition de l'acier plongé dans le milieu de culture MC2 inoculé par les bactéries provenant des souches sulfatoreductrices isolées de l'eau de Zarzaitine.

## 7. Caractérisation de l'interface métal/solution par la technique d'impédance électrochimique

Lorsque des éprouvettes d'acier sont plongées dans le milieu de culture spécifique aux BSR, la surface métallique se couvre d'une pellicule de matière constituée par des micro-organismes. Le biofilm formé affecte le transfert de charge et modifie le processus de la corrosion de l'acier.

En interprétant les résultats des études effectuées sur le développement des biofilms bactériens, Feron (1990) a constaté que le biofilm est souvent considéré comme le facteur responsable de la corrosivité du milieu. D'autre part, sa mise en évidence et son suivi sont nécessaires. C'est ainsi que des mesures d'impédance permettant d'évaluer la variation de la résistance de transfert de charge ( $R_{ct}$ ), la résistance de la solution ( $R_s$ ), la capacité de la double couche électrique ( $C_d$ ) et l'impédance de Warburg pour les systèmes diffusionnels ont été effectuées ( Tableaux 14 et 15 ).

Les diagrammes d'impédance obtenus pour l'ensemble des échantillons d'acier sont présentés dans les figures 29 et 30, pour la souche la plus corrosive *Desulfovibrio sp1* et les figures 31 et 32, pour la souche la moins corrosive *Desulfovibrio sp2*. La caractérisation des interfaces métal/solution en présence de deux souches de bactéries isolées à partir de l'eau d'injection a été réalisée par des mesures d'impédance.

Le but de ce travail est de vérifier l'activité de ces deux souches de bactéries. En effet, il a été remarqué que l'impédance d'un milieu inoculé par des bactéries tend à diminuer au cours de la culture en batch. Cette diminution est d'autant plus rapide, pour le milieu de culture, que les cellules se développent plus rapidement ( Scriban et al. -1993 ).

Les mesures ont été réalisées au potentiel de corrosion. La gamme de fréquence utilisée varie de 60 KHz à 0,01 Hz. L'amplitude du potentiel sinusoïdal utilisé est de 10 mV. Les mesures ont été réalisées après un temps d'immersion de 5 minutes. L'électrode en acier au carbone utilisée est introduite dans le milieu de culture contaminé par les deux souches de bactéries sulfatoréductrices.

**Tableau 14: Résultats des caractéristiques électrochimiques de l'interface de l'acier plongé dans le milieu de culture MC2 inoculé par la souche *Desulfovibrio sp1*.**

Temps (jour)	Résistance de polarisation, $R_p$ ( $\Omega/cm^2$ )	Résistance de transfert de charge, $R_{ct}$ ( $\Omega/cm^2$ )	Capacité de la double couche, $C_d$ (F/cm <sup>2</sup> )
1	8,18	1073,66	$13,54 \times 10^{-4}$
2	7,68	1754,02	$2,86 \times 10^{-4}$
3	/	/	/
4	15,75	2331,43	$4,4 \times 10^{-4}$
5	15,93	45,21	$2,22 \times 10^{-4}$
6	12,83	74,44	$70,56 \times 10^{-4}$
7	13,93	4481,79	$3,14 \times 10^{-4}$

**Tableau 15: Résultats des caractéristiques électrochimiques de l'interface de l'acier plongé dans le milieu de culture MC2 inoculé par la souche *Desulfovibrio sp2*.**

Temps (jour)	Résistance de polarisation, $R_p$ ( $\Omega/cm^2$ )	Résistance de transfert de charge, $R_c$ ( $\Omega/cm^2$ )	Capacité de la double couche, $C_d$ (F/cm)
1	8,53	954,72	$8,44 \times 10^{-3}$
2	12,83	323,69	$1,91 \times 10^{-4}$
3	/	/	/
4	10,76	718,59	$5,15 \times 10^{-3}$
5	9,24	1579,48	$1,34 \times 10^{-3}$
6	13,40	5,41	$8,26 \times 10^{-6}$
7	1,84	888,10	$1,79 \times 10^{-7}$

La réponse d'une interface formée d'un biofilm peut être représentée par le diagramme de Nyquist où deux demi cercles sont tracés. Le premier est caractéristique du biofilm et le second caractérise les processus de corrosion de l'électrode (Feron -1990). Ceci reproduit le modèle obtenu dans la partie théorique ( figure 4 ).

Le diagramme de Nyquist obtenu avec le milieu de culture contaminé pendant une journée d'incubation par la souche *Desulfovibrio sp1* est un demi cercle. La résistance de la solution est de 8,18 Ohm.cm<sup>2</sup>. Celle obtenue à basse fréquence, due à la résistance de polarisation du système, est de 1073,66  $\Omega/cm^2$ .

Le diagramme de Bode ( log |Z| en fonction du log de la fréquence ) montre un comportement résistif à haute fréquence. Le comportement capacitif est obtenu à basse fréquence. Ce comportement est due à la résistance de polarisation du système.

Cette résistance représente la somme de plusieurs résistances tels que la résistance au transport de masse et de la résistance au transfert de charge. La capacité de l'interface est de  $13,54 \times 10^{-4}$  Faraday/cm. Après deux jours d'incubation du milieu inoculé par la souche *Desulfovibrio sp1*, le diagramme d'impédance de Nyquist obtenu est similaire au précédent. La valeur de la résistance de polarisation obtenue à basse fréquence est plus grande. Elle est de 1754,52 Ohm.cm<sup>2</sup> et l'interface devient moins capacitive avec une valeur de  $2.865 \times 10^{-4}$  Faraday/cm.

Pour le milieu de culture inoculé par la souche *Desulfovibrio sp1* et incubé pendant quatre jours, le diagramme de Nyquist obtenu est plus large. La résistance de polarisation est passée à 2331,43 Ohm.cm<sup>2</sup> et la capacité de cette interface est de  $5,48.10^{-4}$  Faraday/cm. La capacité a légèrement augmenté à cause du centrage du demi cercle dans le premier quadrant du diagramme d'impédance.

Le diagramme d'impédance obtenu après une contamination de cinq jours par la souche bactérienne *Desulfovibrio sp1* est composé de deux demi cercles. Le premier obtenu à haute fréquence peut être attribué à la résistance d'un film composé de FeS et du biofilm en cours de destruction sous l'effet de sa masse.

La résistance mesurée à haute fréquence est de  $45,21 \text{ Ohm.cm}^2$ . Le second demi-cercle obtenu à basse fréquence possède la forme d'une branche. L'analyse de cette branche a permis de calculer la résistance qui est de  $7008,12 \text{ Ohm.cm}^2$ . La résistance au transfert de charge croît entre le premier et le cinquième jour. Cette augmentation est due probablement à l'accumulation du dépôt et à l'élargissement du film. Il semble que ces résistances sont liées à l'interface film-solution. Costerton et al. (1987) ont expliqué ces données par le fait que les micro-organismes constituant le biofilm excrètent des polysaccharides extracellulaires et forment le glycocalyx. Ces derniers leur confèrent une adhérence à la surface métallique.

Pour le milieu du culture contaminé pendant six jours, on remarque que le demi-cercle d'impédance obtenu sur le diagramme de Nyquist est devenu plus petit. La valeur de la résistance mesurée à haute fréquence est de l'ordre de  $74,44 \text{ Ohm.cm}^2$ . Ceci montre que, le film est détruit et ne présente aucune résistance à la pénétration des ions de la solution à la surface du métal. Le temps de contact (milieu de culture -bactérie) correspond à une phase de croissance maximale. On a constaté, aussi, que le diagramme d'impédance est caractérisé par une impédance faradique liée à un processus diffusionnel. L'activité importante des bactéries a participé activement à la production des ions  $\text{S}^{2-}$ . Ces derniers ont formé une couche de FeS adhérente à la surface du métal et qui de nouveau a bloqué l'échange entre le métal et la solution.

La résistance de transfert de charge, pour le septième jour, a augmenté et est passée à  $4481,79 \text{ Ohm.cm}^2$ . L'examen des diagrammes d'impédance obtenus montre que ces bactéries n'ont pas contribué au blocage de l'interface.

Ces diagrammes sont caractérisés, à basse fréquence, par une impédance faradique traduisant le processus de diffusion.

En présence de la souche bactérienne *Desulfovibrio sp2*, le diagramme de Nyquist révèle la formation d'une boucle, lors du premier jour de croissance en milieu de culture contaminé.

Ce qui correspond à une résistance de polarisation égale à  $954,72 \text{ Ohm.cm}^2$  et une résistance de la solution de  $8,53 \text{ Ohm.cm}^2$  avec un comportement capacitif de  $1,86 \times 10^{-4}$  Faraday. Lors de la croissance durant le deuxième jour de culture, la résistance de la solution passe de  $8,53 \text{ Ohm.cm}^2$  à  $12,83 \text{ Ohm.cm}^2$ .

Alors que la résistance de polarisation diminue pour atteindre une valeur de  $323,69 \text{ Ohm.cm}^2$ . Le processus d'adsorption de charge a diminué. Ce phénomène est illustré sur la figure 32 où on a une diffusion.

Par contre les mesures effectuées au quatrième jour de croissance, nous ont permis de constater que la résistance de la solution chute légèrement par rapport au dixième jour et atteint une valeur de  $10,76 \text{ Ohm.cm}^2$ . En parallèle, la résistance de polarisation augmente et atteint  $718,58 \text{ Ohm.cm}^2$ . On peut attribuer cette augmentation à la formation d'un film à la surface du métal. Entre le cinquième et le sixième jour, on assiste à un processus diffusionnel qui peut correspondre à la destruction du film composé d'un biofilm et des dépôts de FeS.

Au septième jour, le diagramme de Nyquist révèle les mêmes phénomènes obtenus, lors du premier jour de croissance bactérienne avec la formation d'un biofilm dont la résistance est égale à  $888,10 \text{ Ohm.cm}^2$ . La résistance de la solution est de  $1,840 \text{ Ohm.cm}^2$  moins importante que celle obtenue au premier jour, malgré qu'on assiste à un processus diffusionnel important durant le septième jour de croissance. En conclusion, il en ressort de l'examen des résultats obtenus (tableaux 14 et 15) par les mesures d'impédance que les bactéries de la souche *Desulfovibrio sp1* sont plus actives que celles de la souche *Desulfovibrio sp2*.

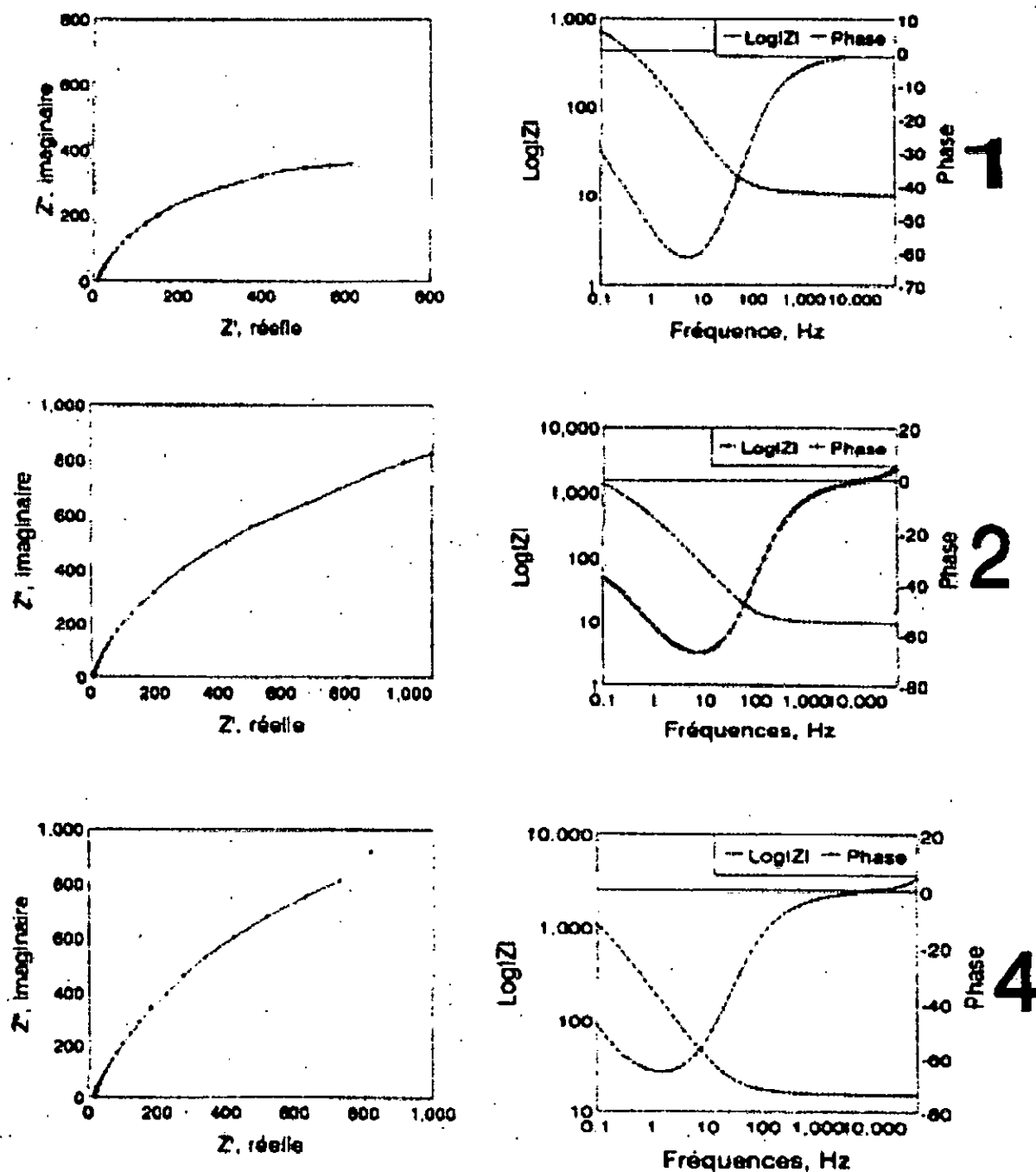
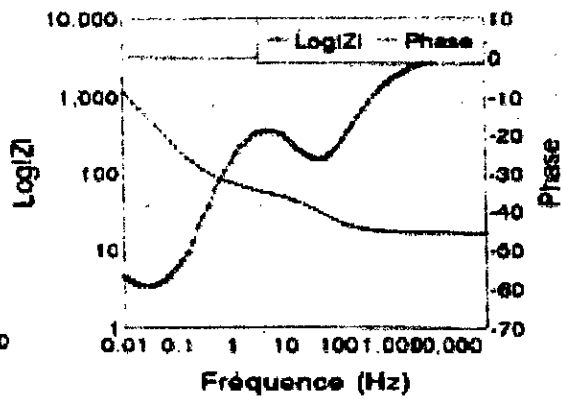
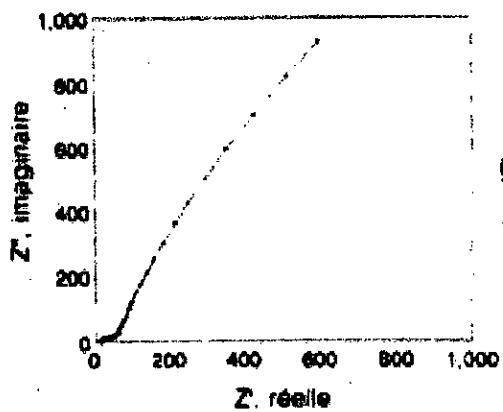
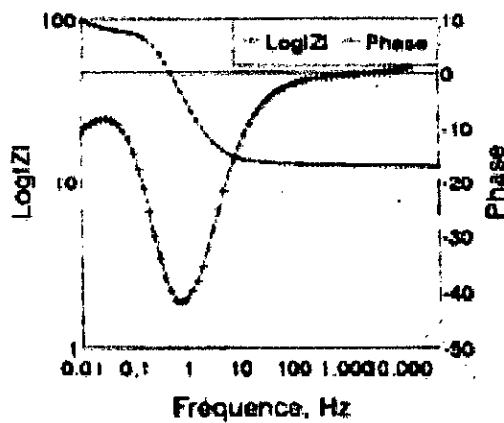
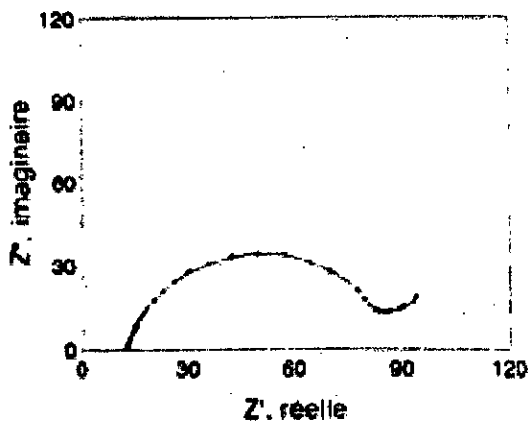


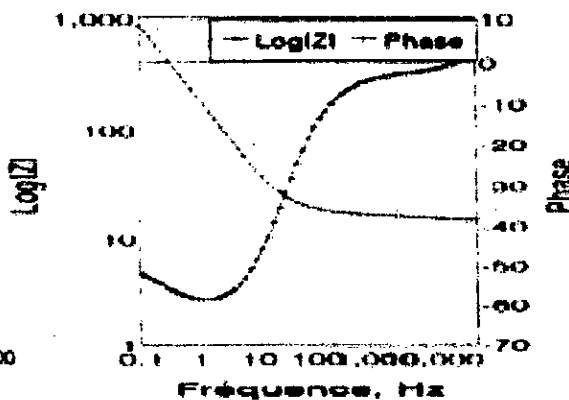
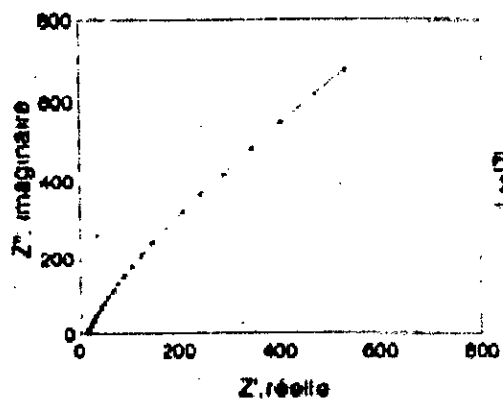
Fig. 29: Evolution des diagrammes d'impédance de l'électrode de travail plongée dans le milieu de culture inoculé par *Desulfovibrio sp1* durant le 1<sup>er</sup>, le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour d'incubation.



5



6



7

Fig. 30: Suite de l'évolution des diagrammes d'impédance de l'électrode de travail plongée dans le milieu de culture inoculé par *Desulfovibrio sp1* durant le 5<sup>ème</sup>, le 6<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour d'incubation.

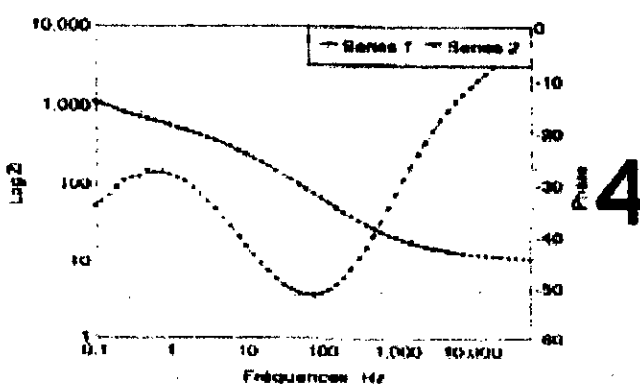
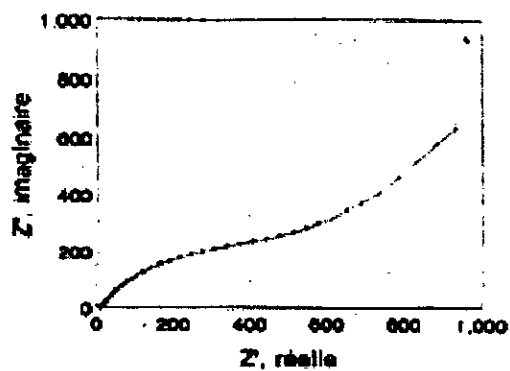
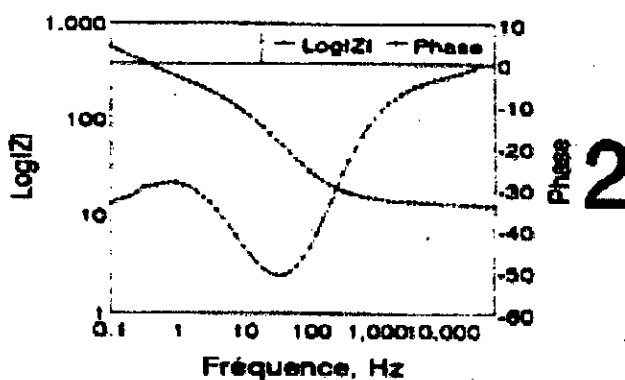
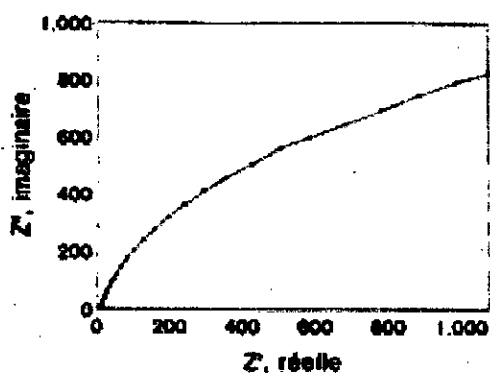
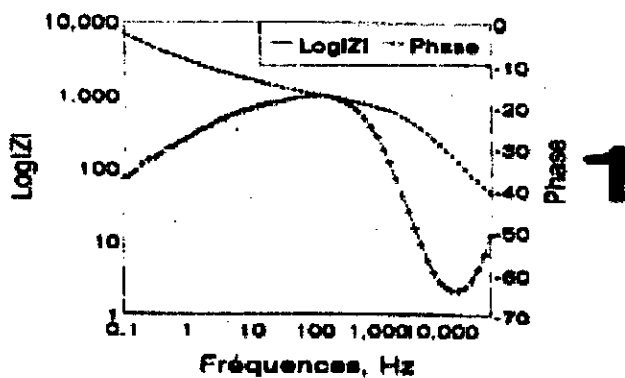
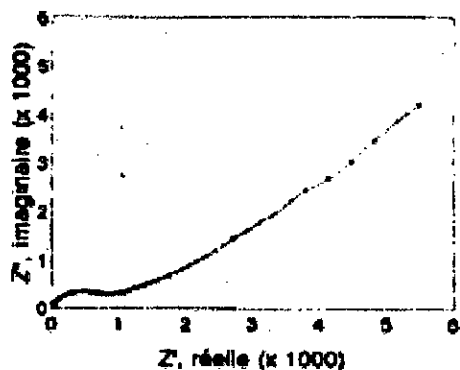


Fig. 31: Evolution des diagrammes d'impédance de l'électrode de travail plongée dans le milieu de culture inoculé par *Desulfovibrio sp2* durant le 1<sup>er</sup>, le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour d'incubation.

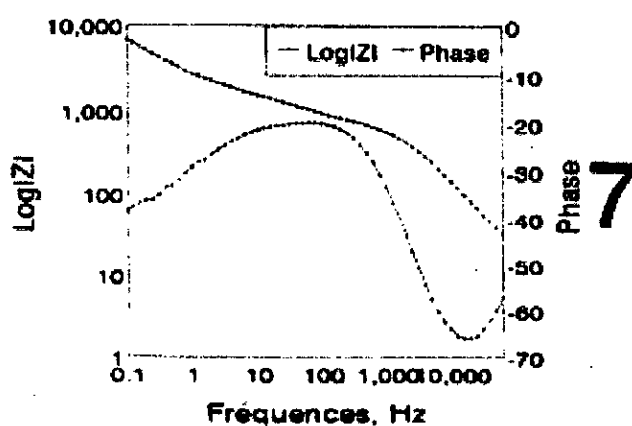
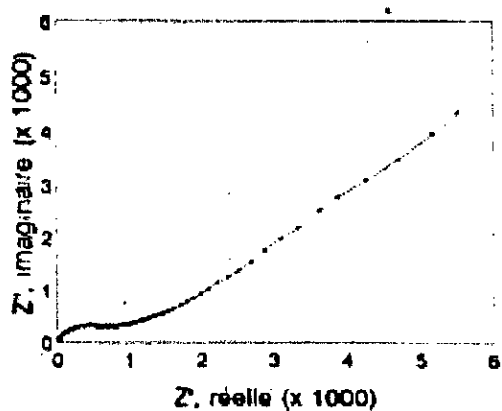
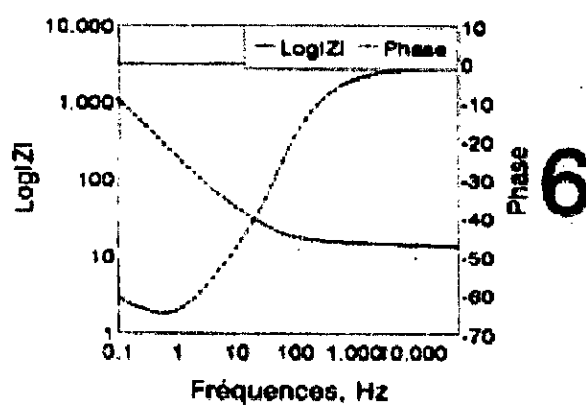
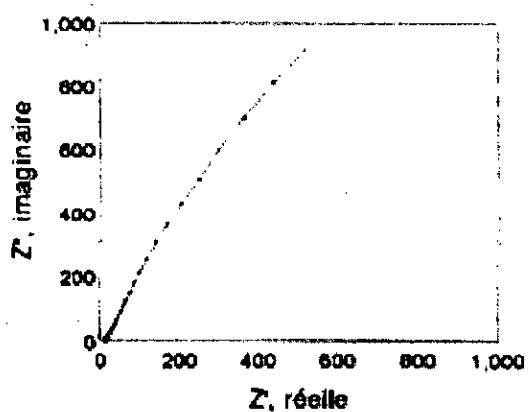
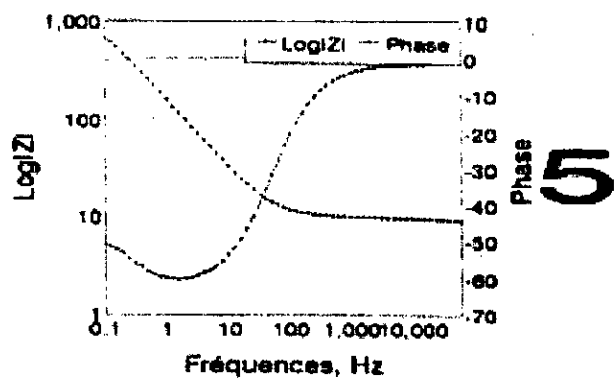
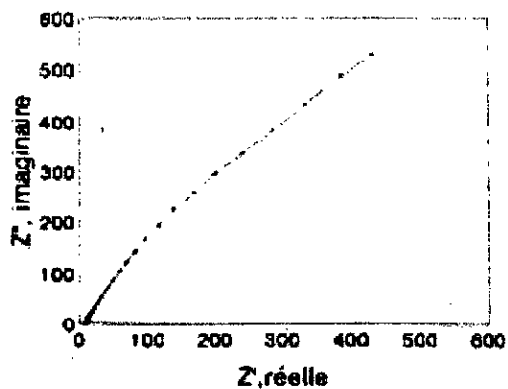


Fig. 32: Suite de l'évolution des diagrammes d'impédance de l'électrode de travail plongée dans le milieu de culture inoculé par *Desulfovibrio sp2* durant le 5<sup>ème</sup>, le 6<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour d'incubation.



## 8. Caractérisation microbiologique des bactéries antagonistes

L'isolement effectué sur le milieu de culture solide a permis de distinguer quatre colonies bactériennes supposées antagonistes aux BSR. Le tableau 16 donne les caractères macroscopiques des colonies isolées de l'eau. Seules les bactéries anaérobies- aérobies facultatifs ou anaérobies strictes sont retenues.

D'après les résultats obtenus, on constate que le type respiratoire est important pour l'exercice de l'effet antagoniste sur les BSR ( Leminore et al., 1989, Selman -1948 ). La culture sur gélose de viande de foie ( V.F ) fait ressortir deux groupes de bactéries antagonistes ayant deux types respiratoires différents. Les colonies codifiées A<sub>231</sub> et A<sub>214</sub> réalisent la respiration aérobie. Alors que, les bactéries A<sub>232</sub> et A<sub>203</sub> sont des aérobies- anaérobies facultatives.

Au cours des différents repiquages pour la purification ( Planche 3 ), les observations microscopiques ( Tableau 17 ) ont montré que les cellules de A<sub>232</sub> se présentent sous forme de cocci isolés en amas irréguliers, Gram positif. Les cellules issues de la division de A<sub>203</sub> sont des cocci avec des bords circulaires ( coccobacilles ), Gram négatif ( Planche 3 ). Ces résultats microscopiques laissent supposer que, les bactéries de A<sub>232</sub> sont des Staphylocoques. D'autre part, les cellules de A<sub>203</sub> font partie du groupe des non- entérobactéries ( API -1985, Larpent et al. -1985 ).

Les tests biochimiques composant les galeries d'identification ( Annexes ) des cocci, Gram+ et des bacilles, Gram- et non- entérobactéries sont effectués sur les bactéries antagonistes A<sub>232</sub> et A<sub>203</sub>. Dans le tableau 18 et 19, les résultats des test biochimiques sont regroupés.

Selon la bibliographie ( Larpent et al. -1985, Leminore et al. -1989 ), on constate que les bactéries A<sub>203</sub> ont un métabolisme fermentaire donnant à partir des glucides, des acides organiques faibles. La disposition des cellules en cocci isolés en amas irréguliers renseigne sur le genre *Staphylococcus*. Ces bactéries sont caractérisées par un test à staphylocoagulase négatif.

Dans le même ordre d'idée, il a été mentionné que, les bactéries de A<sub>232</sub> ne dégradent pas les sucres; excepté le glucose. La production de l'hydrogène sulfuré est négatif. Ceci montre que, le métabolisme des glucides est réalisé par le voie oxydative ou fermentaire.

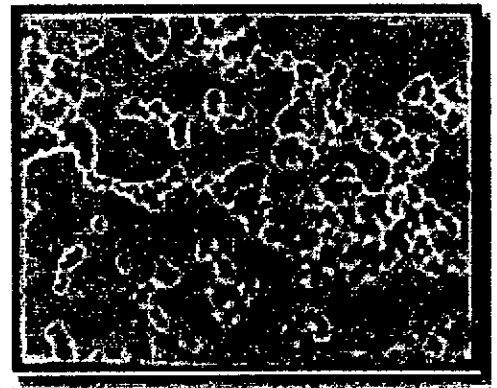
Selon les mêmes auteurs de cette bibliographie, ces bactéries peuvent réaliser la respiration dans un milieu riche en sulfates ou en nitrates. Dans ce cas, le test de dégradation des nitrates est positif ( tableau 19 ). Tenant compte des résultats microscopiques et macroscopiques, ces bactéries appartiennent au genre *Pseudomonas*.



*Isolement des bactéries antagonistes sur milieu de culture solide (G.N).  
(a): Pseudomonas, (b): Staphylococcus.*



*Observation microscopique des cellules  
de Pseudomonas (Gx1000).*



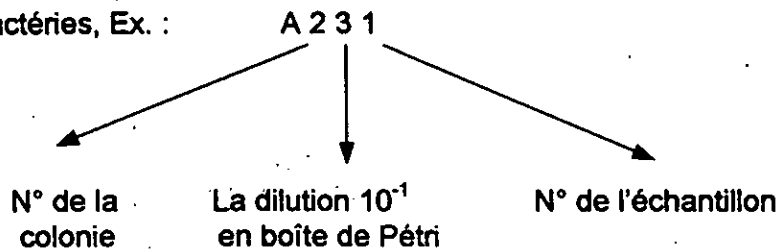
*Observation microscopique des cellules  
de Staphylococcus (Gx1000).*

*Planche 3: Isolement et observation microscopique des bactéries antagonistes.*

**Tableau 16: Identification macroscopique des bactéries antagonistes isolées sur gélose nutritive à partir de l'eau d'injection ZR-641.**

Test \ Code	A <sub>231</sub>	A <sub>232</sub>	A <sub>203</sub>	A <sub>214</sub>
Couleur	Blanche jaunâtre	Jaune	Jaune	Blanche
Consistance	Ferme	Ferme	Ferme	Visqueuse
Forme	Circulaire	Ondulaire	Circulaire à bords régulier	Ondulaire
Opacité	Translucide	Translucide	Translucide	Translucide
Surface	Lisse et brillante	Lisse	Brillante	Rugeuse
Élévation	Convexe	Plate	Plate	Légerement convexe

Codification des bactéries, Ex. :



**Tableau 17: Résultats de l'identification microscopique des bactéries antagonistes isolées sur gélose nutritive à partir de l'eau d'injection de Zarzaitine ZR-641.**

Bactéries \ Tests	A <sub>231</sub>	A <sub>232</sub>	A <sub>203</sub>	A <sub>214</sub>
Mobilité	-	-/+	-	-
Coloration au bleu de méthylène	Cocci	Cocci	Cocci	Diplocoque
Coloration GRAM	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>	G <sup>-</sup>	G <sup>+</sup>

**Tableau 18: Identification systématique de la bactérie antagoniste A203 isolée à partir de l'eau ZR-641, selon Larpent et al. -1985.**

	<i>Souche A203 isolée</i>	<i>Genre Staphylococcus: souche référence (Larpent et al. 1985)</i>
<i>Type respiratoire</i>	<i>Aérobic- anaérobic facultative</i>	<i>Aérobic-anaérobic facultative</i>
<i>Dégradation du glucose</i>	+	+
<i>Dégradation de l'urée</i>	+	+
<i>Dégradation de galactose</i>	-	-
<i>Dégradation des nitrates</i>	-	-
<i>Présence de la catalase</i>	-	-
<i>Présence de la staphylocoagulase</i>	+	+
<i>Synthèse de l'indole</i>	-	-

**Tableau 19: Identification systématique de la bactérie antagoniste A232 isolée à partir de l'eau ZR-641, selon Larpent et al. -1985.**

	<i>Souche A232 isolée</i>	<i>Genre Pseudomonas: souche référence (Larpent et al. 1985)</i>
<i>Type respiratoire</i>	<i>Aérobic- anaérobic facultative</i>	<i>Aérobic stricte (Aérobic-anaérobic facultative sur milieu riche en SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et NO<sub>2</sub><sup>-</sup>).</i>
<i>Présence de l'O.N.P.G</i>	-	-
<i>Synthèse de H<sub>2</sub>S</i>	-	-
<i>Production d'indole</i>	-	-
<i>Test de V.P</i>	-	-
<i>Dégradation du glucose</i>	+	+
<i>Synthèse de l'oxydase</i>	+	+
<i>Dégradation des nitrates</i>	+	+
<i>Dégradation du mannitol</i>	+	+
<i>Présence de catalase</i>	+	+/-

## 8. 1. Effet des antagonistes bactériens sur la croissance des BSR

Le mécanisme par lequel le comportement des BSR corrosives est modifié par d'autres bactéries; d'un même écosystème est loin d'être compris. Les études entreprises in vitro conduisent à des résultats qui permettent de refléter le mécanisme in-vivo. Cependant, le système de culture en discontinu est utilisé pour étudier l'antagonisme. Le milieu utilisé, dans notre étude, est une eau d'injection inoculée par les micro-organismes corrosives cible des antagonistes bactériens ( Wilson et al., 1989 ).

Les résultats obtenus, dans la littérature, ont démontré qu'un modèle expérimental in vitro peut être utilisé pour l'étude des interactions entre une souche test et une souche antagoniste. Les résultats de l'antagonisme sont interprétés par le fait que des composés intracellulaires incluant les substances nutritives non métabolisées, les sécrétions et les excréments de la bactérie antagoniste jouent un rôle dans le mécanisme de l'antagonisme (Yurdusen et al - 1989 ). Le modèle expérimental proposé consiste en un antagonisme entre une souche à effet inhibiteur, les souches bactériennes de *Staphylococcus* ou de *Pseudomonas* et une souche pourvue du pouvoir corrosif, la souche *Desulfovibrio sp1*.

Dans une série d'Erlenmeyers, le milieu naturel est réparti à un volume équivalent et inoculé par les souches bactériennes antagonistes aux concentrations de 2, 4 et 10%. Les figures 33, 35 et 37 illustrent les courbes de croissance correspondantes à la variation de la concentration des germes *Desulfovibrio sp1* en fonction du temps, en présence et en absence des antagonistes. D'après les courbes obtenues, on observe des allures de croissance habituelles d'une bactérie cultivée sur un milieu de culture et constituées des phases de latence, de croissance exponentielle, de ralentissement, stationnaire et de phase de déclin (Figure 5 ).

Avec la culture en batch du témoin inoculé avec les germes corrosifs de *Desulfovibrio sp1*, on constate une croissance bactérienne normale. Nous avons vu que la culture pure de ces germes conduisait à des bioconversions au cours de la croissance. Les sulfates sont métabolisés en sulfures et le milieu devient trouble et corrosif.

En dix jours d'incubation, la concentration en *Desulfovibrio sp1* est passé de  $10^2$  germes/ml à  $10^4$  germes/ml. Le maximum en ces bactéries est obtenu au septième jour d'incubation avec  $10^7$  germes/ml. Dans les Erlenmeyers inoculés par les antagonistes bactériens de *Staphylococcus* ou de *Pseudomonas*, les cellules sont précultivées 24 heures avant l'inoculation.

D'après le temps d'incubation des bactéries antagonistes, on constate que les bactéries sont en phase de croissance dans le milieu. Cet état cellulaire intervient dans l'inhibition des souches corrosives.

L'action antagoniste est liée à l'état physiologique et à la nature des substances extracellulaires libérées dans le milieu en agissant sur les germes de *Desulfovibrio sp1* en voie de croissance. De plus, le milieu de culture contient une concentration en matière nutritive supérieure à 1% suffisante pour que le germe antagoniste prolifère et devient inhibiteur ( Brisou et al., 1971 ). La comparaison des courbes de croissances obtenues ( Fig. 33, 35 et 37 ) montrent un abaissement de plus en plus marqué du nombre des germes corrosifs.

Le dénombrement des germes corrosifs est réalisé sur un milieu gélosé liquide. Aux concentrations de 2, de 4 et de 10% en souches antagonistes de *Staphylococcus* et après trois jours d'incubation, le dénombrement des germes corrosifs se situe entre  $10^3$  germes/ml et  $10^4$  germes/ml. Ces concentrations sont supérieures à celles obtenues à la même période d'incubation de la culture témoin de *Desulfovibrio sp1*. L'analyse des allures de la courbe de croissance montre le même allongement du temps de latence.

Il semble que les souches bactériennes antagonistes en phase d'adaptation n'entravent pas la croissance des germes corrosifs ( Leminore et al., 1989 ). Durant l'incubation de la coculture, les germes de *Desulfovibrio sp1* et ceux des germes antagonistes forment un complexe d'interaction synergique de nutrition.

Selon Waksman (1948), les germes corrosifs synthétisent des substances nutritives complémentaires à celles présentes dans le milieu. Ces composés sont utilisés par les germes bactériens antagonistes. Leminore (1989) a remarqué que, les sulfates et le lactate peuvent être utilisés par *Pseudomonas* en anaérobiose.

Ceci explique l'augmentation en germes bactériens corrosifs en début d'incubation. Aussi, Leminore et al., (1989) interprètent la même augmentation par le phénomène de rebond. Ce phénomène est le résultat de la synthèse par les BSR d'enzymes inductives et inactivantes des antagonistes bactériens. Une autre explication peut être apportée. On pense que, les traces d'oxygène favorise le développement des antagonistes bactériens. Le milieu est anaérobique et favorable à la croissance des souches corrosives de *Desulfovibrio sp1*.

A partir du quatrième jour d'incubation, un effet inverse se produit. Les concentrations en inoculum antagonistes utilisés commencent à affecter la croissance des *Desulfovibrio sp1*.

L'oxygène devient un facteur limitant; et l'antagonisme pour le lactate et les sulfates s'installe. Les bactéries antagonistes de *Staphylococcus* agissent comme des inoculums bactériostatiques. L'effet bactériostatique est caractérisé par un nombre en *Desulfovibrio sp1* inférieur à celui d'une culture témoin sans antagonistes et égale au nombre de bactéries corrosives.

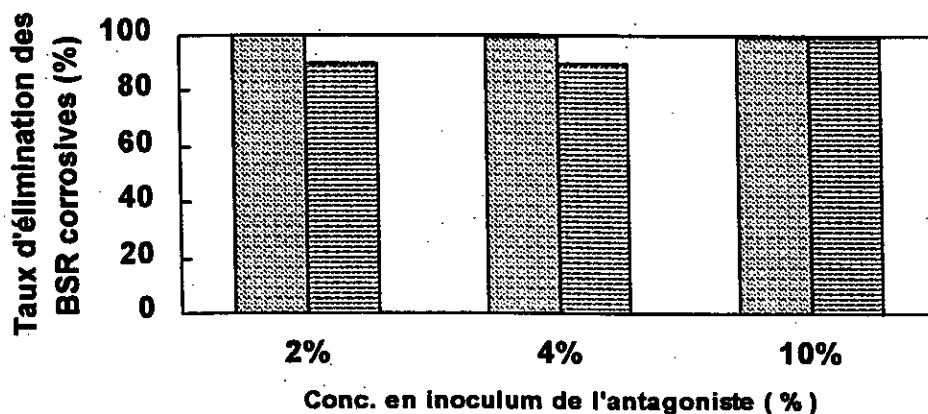
Les tableaux 21 et 22 résument les résultats des dénombrements bactériens effectués à partir d'un milieu de culture liquide naturel ( eau de Zarzaitine ) enrichie avec du lactate de sodium et inoculé par les souches corrosives de *Desulfovibrio sp1* et les souches antagonistes de *Staphylococcus* et de *Pseudomonas* préparées aux concentrations de 2, 4 et 10%. D'autre part, l'effet détaillé des antagonistes bactériens est représenté sur les figures 34, 36 et 38 montre la croissance des BSR en présence des antagonistes.

On remarque la diminution de la concentration en germes corrosifs. Elles sont déduites des figures 33, 35 et 37. Pour les trois courbes, la phase de latence est modifiée, lorsqu'on passe de 2 à 10 % en antagonistes bactériens.

Sur la figure 35, l'effet de l'inoculum de l'antagoniste bactérien de *Staphylococcus* est immédiat, après 24 heures d'incubation. Avec des inoculums de 4 et de 10% en *Staphylococcus*, l'effet n'apparaît qu'après 48 heures d'incubation. Nous avons remarqué que dès le début d'incubation le nombre cellulaire N de *Desulfovibrio sp1* est supérieur à celui obtenu avec l'inoculum témoin de la même bactérie ( Fig. 33, 35 et 37 ). Ces observations permettent d'expliquer que les cellules antagonistes ont synthétisé des composés inhibiteurs propres à leur développement ( iso-antagonisme ).

Un changement d'un paramètre physico-chimique durant le début de la coculture, s'est produit. Quelque fois, les germes corrosifs se développent au voisinage des cellules antagonistes et sont inhibées, sans que les autres cellules corrosives ne soient affectées.

En comparant les résultats obtenus en présence des antagonistes, on conclue qu'un antagoniste bactérien possédant une respiration anaérobie- aérobie facultative affecte plus le développement des BSR qu'un antagoniste à respiration aérobie. L'histogramme suivant résume le taux d'élimination des BSR en phase de croissance exponentielle (7<sup>ème</sup> jour d'incubation ) présentes dans le milieu.



**Histogramme 2: Variation du taux d'élimination des BSR corrosive en fonction de la concentration en inoculum de l'antagoniste( =): *Desulfovibrio sp1* + *Pseudomonas* (#): *Desulfovibrio sp1* + *Staphylococcus*.**

**Tableau 20: Résultats des taux d'élimination des BSR corrosives en présence des inoculums des antagonistes bactériens isolés de l'eau d'injection de Zarzaitne ( ZR -641 ).**

	Concentration en inoculum de l'antagoniste		
	2%	4%	10%
<i>BSR</i> + bactérie antagoniste	Taux d'élimination		
<i>Desulfovibrio sp1</i> + <i>Staphylococcus</i>	99,99	99	99
<i>Desulfovibrio sp1</i> + <i>Pseudomonas</i>	90	90	99

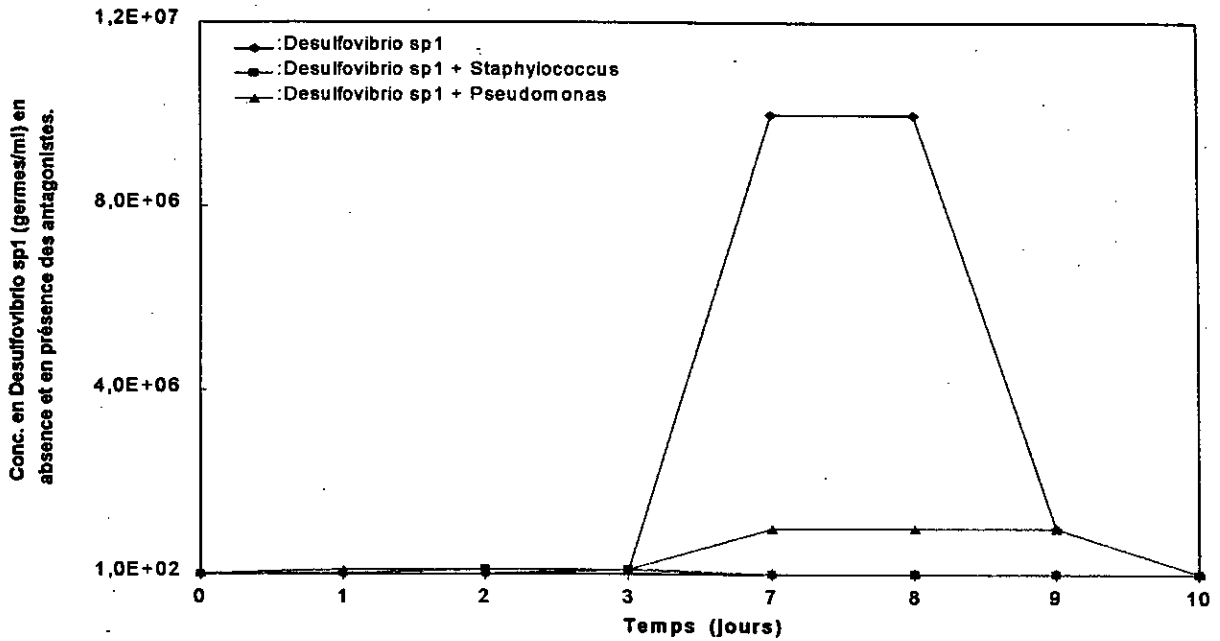
**Tableau 21: Résultats des dénombrements de la bactérie corrosive en présence et en absence des antagonistes bactériens de Staphylococcus utilisés aux concentrations en inoculum de 2%, 4% et 10%.**

Temps d'incubation (jour)	Conc. en <i>Desulfovibrio</i> sp1 en absence des antagonistes (germes/ml)	Conc. en <i>Desulfovibrio</i> sp1 en présence de l'antagoniste bactérien: <i>Staphylococcus</i> (germes/ml)		
		2%	4%	10%
	1%			
0	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^3$
1	$10^2$	$10^4$	$10^4$	$10^3$
2	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^4$
3	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$
4	/	/	/	/
5	/	/	/	/
6	$10^1$	$10^3$	$10^3$	$10^3$
7	$10^1$	$10^3$	$10^3$	$10^3$
8	$10^1$	$10^2$	$10^4$	$10^4$
9	$10^0$	$10^2$	$10^2$	$10^4$
10	$10^4$	$10^1$	$10^2$	$10^3$

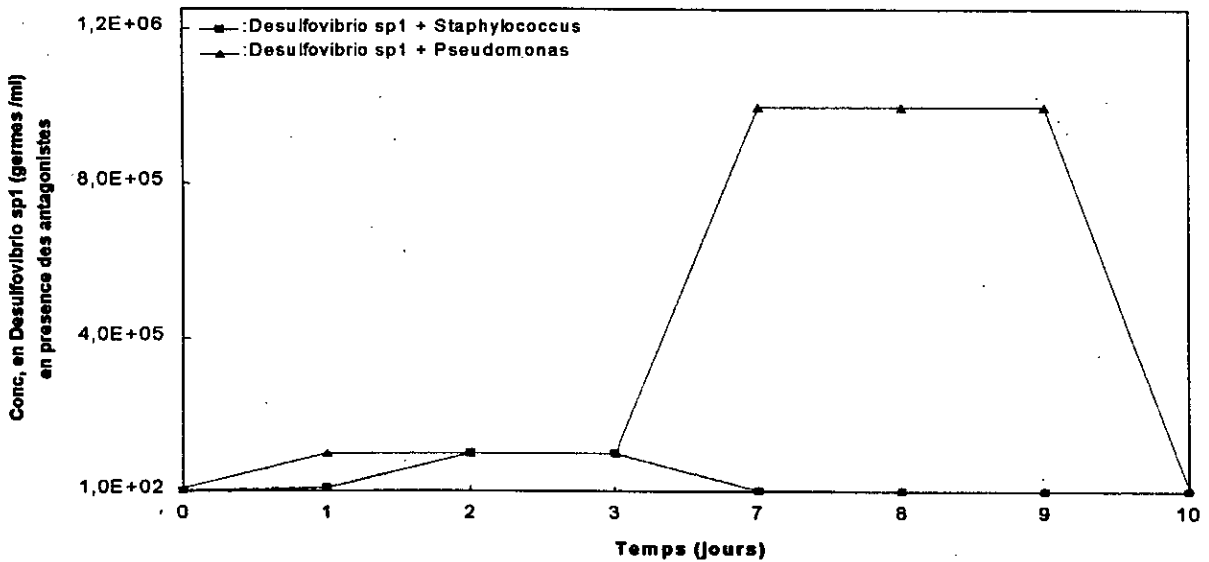
**Tableau 22: Résultats des dénombrements de la bactérie corrosive en présence et en absence des antagonistes bactériens de Pseudomonas utilisés aux concentrations en inoculum de 2%, 4% et 10%.**

Temps d'incubation (jour)	Conc. en <i>Desulfovibrio</i> sp1 en absence des antagonistes (germes/ml)	Conc. en <i>Desulfovibrio</i> sp1 en présence de l'antagoniste bactérien: <i>Pseudomonas</i> (germes/ml)		
		2%	4%	10%
	1%			
0	$10^2$	$10^4$	$10^4$	$10^3$
1	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^3$
2	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^4$
3	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$
4	/	/	/	/
5	/	/	/	/
6	$10^1$	$10^0$	$10^0$	$10^3$
7	$10^1$	$10^0$	$10^0$	$10^0$
8	$10^1$	$10^0$	$10^4$	$10^4$
9	$10^0$	$10^4$	$10^3$	$10^4$
10	$10^4$	$10^4$	$10^2$	$10^3$

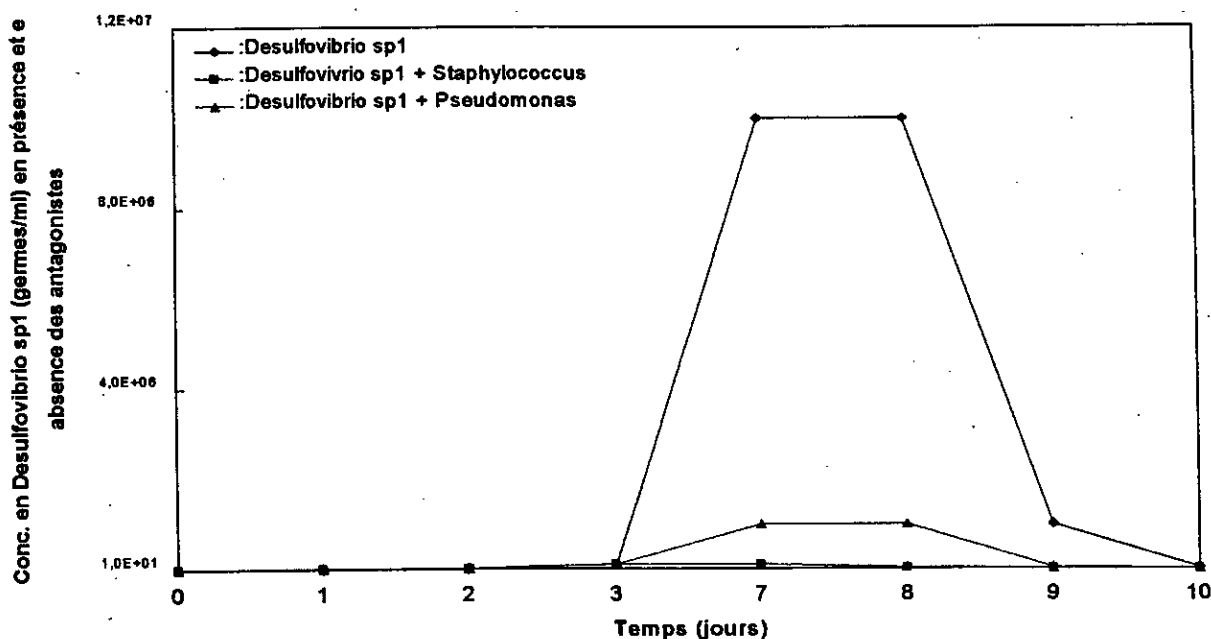




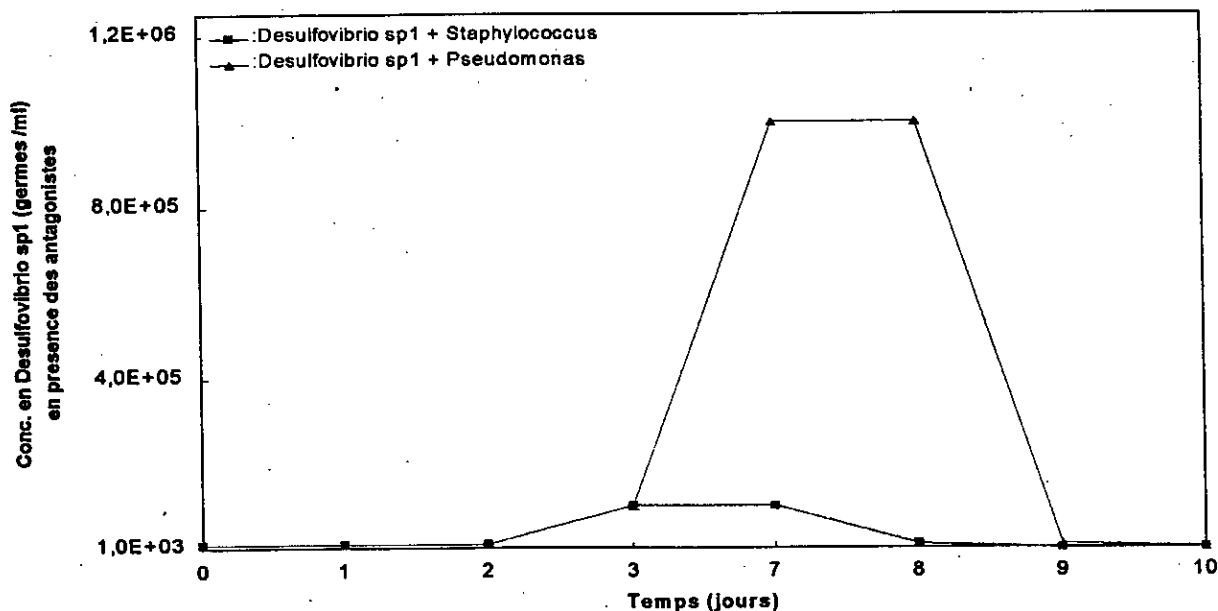
**Fig.33: Evolution de la concentration en bactéries sulfatoréductrices provenant de la souche bactérienne *Desulfovibrio sp1* cultivée dans le milieu naturel en absence, en présence des antagonistes et en fonction du temps, ( Conc. en l'inoculum de staphylococcus et Pseudomonas = 2%, celle de la BSR= 1% ).**



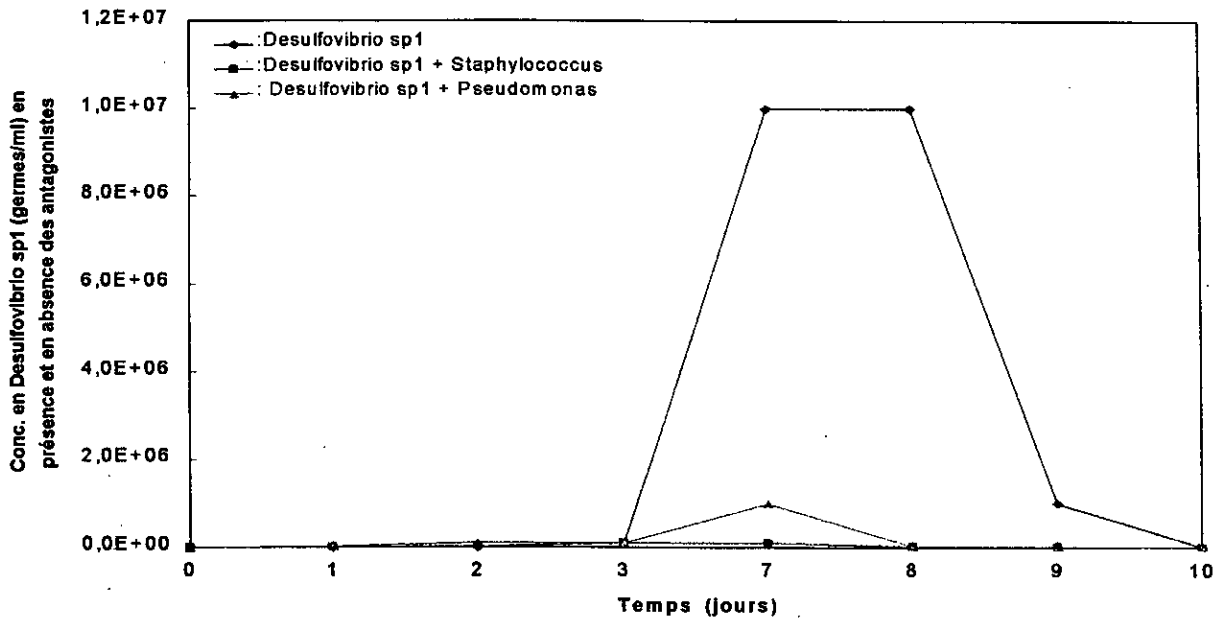
**Fig. 34: Evolution de la concentration en bactéries sulfatoréductrices provenant de la souche bactérienne *Desulfovibrio sp1* cultivée dans le milieu naturel en présence des antagonistes et en fonction du temps. ( Courbes de comparaison de l'effet inhibiteur des antagonistes, sur la croissance des bactéries sulfatoréductrices *Desulfovibrio sp1* en fonction du temps, obtenues à partir de la figure n°33 et dans l'intervalle de  $10^1$  et  $10^6$  germes/ml. La conc. en inoculum de Staphylococcus et Pseudomonas = 2% et celle de la BSR= 1% ).**



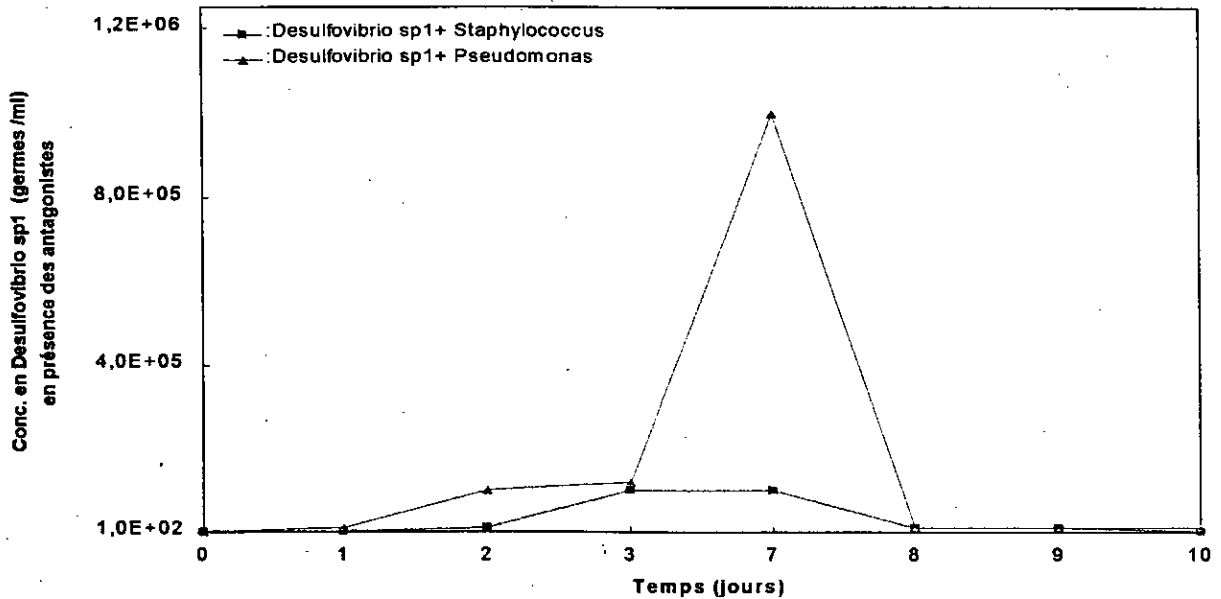
**Fig.35: Evolution de la concentration en bactéries sulfatoréductrices provenant de la souche bactérienne *Desulfovibrio sp1* cultivée dans le milieu naturel en absence, en présence des antagonistes et en fonction du temps, ( Conc. en inoculum de *Staphylococcus* et *Pseudomonas* = 4%, celle de la BSR= 1% ).**



**Fig. 36: Evolution de la concentration en bactéries sulfatoréductrices provenant de la souche bactérienne *Desulfovibrio sp1* cultivée dans le milieu naturel en présence des antagonistes et en fonction du temps. ( Courbes de comparaison de l'effet inhibiteur des antagonistes sur la croissance des bactéries sulfatoréductrices en fonction du temps obtenues a partir de la figure n 35 et dans l'intervalle de  $10^1$  et  $10^6$  germes/ml, Conc. en inoculum de *Staphylococcus* et *Pseudomonas* = 4% et celle de la BSR= 1% ).**



**Fig. 37:** Evolution de la concentration en bactéries sulfatoréductrices provenant de la souche bactérienne *Desulfovibrio sp1* cultivée dans le milieu naturel en absence, en présence des antagonistes et en fonction du temps, ( Conc. en inoculum de *Staphylococcus* et *Pseudomonas* = 10%, celle de la BSR= 1% ).



**Fig. 38:** Variation de la concentration en bactéries sulfatoréductrices provenant de la souche bactérienne *Desulfovibrio sp1* cultivée dans le milieu naturel en présence des antagonistes et en fonction du temps. ( Courbes de comparaison de l'effet inhibiteur des antagonistes, sur la croissance des bactéries sulfatoréductrices en fonction du temps, obtenues à partir de la figure n°37 et dans l'intervalle de  $10^1$  et  $10^6$  germes/ml, Conc. en inoculum de *Staphylococcus* et *Pseudomonas* = 10% et celle de la BSR= 1%

**CONCLUSION**

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude de la corrosion bactérienne et sa lutte; afin de protéger les installations pétrolières. Nous avons étudié ce type de corrosion sous son aspect appliqué pour pouvoir juger rapidement des éventuelles possibilités de développement d'un traitement antibiocorrosion.

L'analyse qualitative et quantitative d'une eau très utilisée dans le domaine de l'exploitation pétrolière, l'eau d'injection de Zarzaitine d'In - Aménas, était essentielle pour pouvoir aborder l'étude de l'influence des bactéries sulfatoréductrices vis à vis de la corrosion de l'acier au carbone.

En plus des BSR, l'analyse microbiologique de l'eau d'injection ZR -647 a révélé une contamination par les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aérobies- anaérobies facultatives. Seules, les BSR ont subies une identification poussée.

L'étude de l'action corrosive des BSR développées en culture mixte était, aussi importante. Les tests électrochimiques donnant l'évolution du potentiel libre de l'acier en fonction du temps ont montré que les BSR étaient corrosives vis à vis de l'acier. Le déplacement du potentiel de corrosion (  $-770$  mV ), après l'inoculation vers des valeurs plus anodiques a favorisé la corrosion de l'acier. Aussi, en traitant le milieu par un biocide, nous avons enregistré un potentiel de corrosion proche de  $E_{\text{corr}}$  initial de l'acier. Seulement, l'observation microscopique d'un échantillon provenant de la culture mixte de BSR a montré une présence de BSR. Le biocide utilisé n'a pas éliminé toutes les bactéries sulfatoréductrices de l'eau d'injection. La biocorrosion peut persister.

L'étude du choix du milieu spécifique aux BSR a été entamée pour aborder l'étude de l'optimisation d'un milieu de culture. La croissance des BSR a été suivie dans deux milieux différents par la composition chimique, pendant une durée de 15 jours pour le milieu MC1 et 21 jours pour le milieu MC2. Le processus de synthèse des sulfures responsables de la biocorrosion, débute après 48 heures d'incubation des cultures. Il s'est poursuivi jusqu'au septième jour. Par conséquent, la présence de l'acide ascorbique, comme facteur de croissance dans le milieu MC2 a affecté le développement bactérien. Sur les courbes de croissance obtenues avec des cultures de BSR, nous avons retenus deux étapes:

- la première étape d'une durée de 48 heures, on assiste au démarrage de la croissance des BSR. Durant cette étape, la biocorrosion n'est pas importante;

- la deuxième étape correspond à la libération massive des sulfures et dure cinq jours. Au cours de cette étape, l'action corrosive des BSR se manifeste.

La comparaison de la croissance des BSR sur le milieu synthétique et naturel ( eau d'injection ) a démontré qu'un milieu naturel peut être utilisé comme milieu de culture pour les BSR.

A la suite des caractérisations microbiologiques et électrochimiques (  $E = f^t(t)$  ) d'une culture mixte de BSR, nous nous sommes orientés à caractériser des cultures de BSR purifiées et isolées du même échantillon d'eau d'injection ZR- 647.

Les tests macroscopiques et microscopiques effectués sur les souches pures ont montré une hétérogénéité d'espèces de bactéries sulfatoréductrices. Elles étaient différentes par l'aspect, la couleur, la forme et la morphologie cellulaire. Nous avons isolé cinq souches de BSR pures.

L'identification systématique de ces souches a été complétée par des tests biochimiques. Il a été montré que l'affinité des BSR pour la dégradation des substrats organiques, tels que l'acétate et le lactate varie selon le genre de la BSR purifiée. Le test de la synthèse des sulfures a permis de mettre en évidence deux groupes de BSR:

- le premier comprenait les genres *Desulfovibrio sp1* et *Desulfuromonas*; ces BSR synthétisent une quantité importante de sulfures;

- le deuxième groupe comprend les bactéries synthétisant une faible quantité de sulfures. Les genres identifiés sont *Desulfobacter*, *Desulfosarcina* et *Desulfovibrio sp2*.

L'action corrosive des cinq bactéries sulfatoréductrices purifiées vis à vis de l'acier a été étudiée, durant sept jours. Des voltampérogrammes ont été tracés. L'analyse des profils a montré que, les BSR synthétisant une quantité massive de sulfures sont les plus corrosives. Les BSR synthétisant une quantité faible de sulfures sont les moins corrosives.

La détermination de la vitesse de corrosion, du courant de corrosion et des pentes de Tafel a révélé que les électrodes en acier au carbone possédaient un comportement mixte. Dans le milieu inoculé par les BSR les plus corrosives, l'acier subissait une dépolarisation anodique. L'acier exposé à l'action des BSR les moins corrosives subissait une dépolarisation cathodique.

En outre, la caractérisation de l'interface métal -milieu a été étudiée pour apporter plus de compréhension sur l'action des BSR purifiées. Deux souches de BSR ont été sélectionnées pour étudier l'impédance électrochimique. Ces souches sont la *Desulfovibrio sp1* ( plus corrosive ) et *Desulfovibrio sp2* ( moins corrosive ).

Les résultats obtenus ont montré que l'impédance électrochimique varie en fonction de l'état physiologique des cellules bactériennes. On avait remarqué que le groupe des BSR les plus corrosives, sont plus actives.

Après un bref aperçu sur les mécanismes de l'action corrosive des BSR développées en culture mixte et en culture pure, il était judicieux de développer une méthode d'inhibition de la culture des BSR.

Le traitement du milieu naturel, eau d'injection de Zarzaitine contenant des BSR, par des antagonistes bactériens isolés d'un même biotope (eau d'injection ZR- 641 ) a fourni des résultats intéressants. L'utilisation de bactéries aérobies - anaérobies facultatives a engendré un effet antagoniste sur le développement des BSR corrosives ( *Desulfovibrio sp1* ). Il a été montré que l'inoculation des antagonistes était réalisée au moment où les germes corrosifs sont en phase de croissance.

Par ailleurs, l'isolement de *Staphylococcus*, une bactérie anaérobie- aérobie facultative, nous a permis de montrer une interférence de type nutritive, au cours de la coculture de *Staphylococcus* et BSR corrosives. Deux pour cent d'un inoculum de *Staphylococcus* a permis d'obtenir un effet bactériostatique. De plus, un temps de contact de cinq jours entre les bactéries antagonistes et les BSR corrosives est nécessaire pour obtenir une bonne efficacité des antagonistes.

Il est bon de signaler que les résultats obtenus au cours de ce travail méritent d'être améliorés en mettant en oeuvre d'autres essais d'antagonisme et réaliser par la suite des essais sur un monitoring avant d'effectuer le traitement in- situ.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



**[1] Akashi A & al.**

“ Studies on the cellulose decomposing bacteria in the rumen “. Jour. agr. chem. soc. jap. nb 34, pp 895, 90 -1960.

**[2] API ( American petrolum institut ).**

“ API recommended pratice for biological analysis of subsurface injection waters “ art., pp 2 -7, 1965

**[3] A. P.I**

“ Appareils et procédures d'identification “. Tableau de différenciation des bacilles G<sup>-</sup> non-entérobactéries, n°2010 -1985.

**[4] Berger Y.**

“ Corrosion et inhibition des puits et collectes “. Chambre syndicale de la corrosion et de la production du pétrole et du gaz. ed. technique, pp 72 -73, 1981.

**[5] Benard J & al.**

“ Métallurgie générale “. 2ème éd. pp 349 -396, ed. Masson ,1984.

**[6] Booth G. H. & Tiller A. K.**

“ Trans. Faraday soc.”. Vol. 58, p 110, 1962.

**[7] Bergey R.**

“ Bergey's manuel of systimatic bacteriology “, 9th edition vol 1, pp 663 -679, 1984.

**[8] Boudrant J, Corrieur G & Coulet P.**

“ Capteurs et mesures en biotechnologie “. Ed. Techniques et documentations, Lavoisier pp 83 -110, 1994.

**[9] Biomerieux.**

“ Manuel de microbiologie “, 3ème ed. pp 551 -591, 1980.

**[10] Bianchi A. J. M.**

“ Distribution quantitative et qualitative des populations bactériennes à l'interface eau-sédiment “. Colloque internationaux du CNRS, n°293, pp 269, 274 -1973.

**[11] Beller H. R & al.**

“ Isolation and characterization of a novel toluene degrading sulfate reducing bacterium“. Applied and environment microbiology, pp 1188, 1196 -1996.

**[12] Beerstecher E.**

“ An introduction to microbiology petrolum hydrocarbons “. Petrolum microbiology, ed. Elsevier press. inc., pp 58, 61 -1954.

**[13] Bowers E. F & Jefferies L. R.**

“ Optochin in the identification of streptococcus pneumoniae “. Jour. of clin. pathol. nb 8, pp 58, 60 -1955.

**[14] Booth G. H. & al.**

“ Mechanism of anaerobic corrosion of steel by sulfate reducing bacteria “. Art. Corrosion. The international corrosion forum sponsored by the NACE, California, April 13- 22, pp 243/2, 243/7 -1983.

**[15] Brisou J, Grimaudeau, Guillaume I & Valensi G.**

Rapports techniques de Cebelcor, pp116, 189 -1971.

**[16] Cabrillac C.**

“ Aspect économique et bases de la corrosion “. 3ème Ecole Maghrébine de Corrosion fascicu. pp 1 -12, 1996.

**[17] Crolet J. L.**

“ Interfaces et surface en métallurgie “. Troust. Techn. Publications, Acedermanns Dorf pp 20 -31, 1975.

**[18] Cordonnier J & al.**

“ Corrosion bactérienne et protection, application au circuit d'eau de refroidissement“. Ed. Degrémont, pp 1361 -1379, 1984. “ Etude de la biodétérioration des réseaux d'eau potable“. Ed. C.I.R.S.E.E., lyonnaise des eaux, pp 1 -10, 1995.

**[19] Cabridenc R, Gatellier C, Leclerc H & Kaiser P.**

“ Dégénération microbienne des matériaux “. Collection, colloque et séminaire, publication de l'association des ingénieurs en anticorrosion, ed. Technip. p.203, 1974.

**[20] Cubicciotti D & Licina G. J.**

“ Electrochemical aspects of microbially induced corrosion “. Art. general interest, pp 72 -75, 1990.

**[21] Costerton J. W & Geesey. G. C.**

“ Surfaces et contaminations “. Ed. K.L. Wittal et P. Plenum, pp 20 -100, 1979.

**[22] Coulter W. A. & Russel T. C.**

jour. appl. Bact. pp 40 -73, 1976.

**[23] Ceca.**

“ Les services et les spécialités prochinor dans les industries pétrolières “. Rev. Ed. Ceca pp 39 -42, 1975.

**[24] Chantereau J.**

“ Corrosion bactérienne et bactéries de la corrosion “. 2ème ed. pp 136 -140, 1980.

**[25] Canivez O.**

“ Les bactéries anérobies, vers de nouvelles voies métaboliques “. Rev. Biofuture n°86, le mensuel européen de biotechnologie, pp 22, 29 -1990.

**[26] Carbonelle B & Kouyoumdjan S.**

“ Techniques et les étapes de l'analyse en microbiologie “, pp 9 -196, 1985.

**[27] Degrement.**

“ Mémento technique de l'eau “ . Ed. du cinquantenaire, 9ème ed. Tome 1, technique et documentation, Lavoisier, pp 437 -446, 1989.

**[28] Daumas S, Massiani Y et Crousier J.**

“ Microbiological battery induced by reducing bacteria “ . Corrosion science, vol. 28, n° 11, pp 1041 -1050, 1988.

**[29] Dmitrevskaya N. A & Tchebotarwitch M. F.**

“ On the phenomenon of antagonism among microorganisms “ . Arch. biol. nank (U.S.S.R), n°43, pp 337.-344, 1936.

**[30] Duga. J.**

“ Manuel de traitement des eaux d'injection “ . Ed. technip. pp 62, 73 -1973.

**[31] E.n.p.**

( Ecole Nationale Polytechnique). “ Notions générales sur les habitats naturels “, écologie microbienne pp 88 -116, 1983.

**[32] Emde K M. & al.**

“ Initial investigation of microbiologically influenced corrosion in a low temperature water distribution system “ . Art. water res. vol. 26 n°2, pp 169, 175 -1992.

**[33] Feron D & Thierry D.**

“ Corrosion bactérienne des matériaux “ . Connaissances actuelles des mécanismes, école thématique du CNRS sur la biodérioration des matériaux, pp 1 -10, 1995.

**[34] Faulkner L. R & Bard A. L.**

“ Electrochimie principe, méthodes et applications “ . Ed. Masson, pp 95 -148, 1983.

**[35] Garret J. H. & al.**

“ Prévention de la corrosion “, pp 8.-20, ed. 1977

**[36] Gaines J. H.**

“ Bacterial activity as a corrosion influence in the soil “ . Ind. Eng. Chem. pp 180 -130,- 1910.

**[37] Goudiakas J, Seblin A & Schwartz F.**

“ Biodérioration des matériaux dans les circuits de refroidissement “ . Art. Ecole thématique du CNRS sur la biodérioration des matériaux, pp 17 -30, 1995.

**[38] Guillaume I, Grimaudeau J & Brisau J.**

“ Contribution bactérienne à la corrosion et à la protection des métaux “ . Art. Corrosion science, vol. 17 n°9, pp 753 -763 ed. pergamon Press -1977.

**[39] Gamard P & De Boer.**

“ Evaluation of antagonistic bacteria for suppression of bacterial ring rot of potato ”. European journal of plant pathology 101: pp 519 -525, 1995.

**[40] Gatellier & al.**

“ Méthode de numération des bactéries sulfatoréductrices ”. Chambre syndicale de la recherche et de la production du pétrole et du gaz naturel, rapport n° 6925, pp. 2 -11, 1966.

**[41] Gratia A & Dath S.**

“ De l'action bactériologique des streptothrix ”. Compt. rend. soc. de biologie 91, pp 1442 -1443, 1924, 92: pp 1125 -1126, 1925, 93: pp 451, 1925, 94: pp 1267 -1268, 1926.

**[42] Hamilton W. A.**

“ The sulfate reducing bacteria, their physiology and consequent ecology ”. Art. BC 91, pp 1, 6 -1995.

**[43] Hach Use.**

DR/2000 spectrophotometer handbook, method 8051 et method 8131; pp 559 -566, 1993.

**[44] Haslay C & Leclerc M.**

“ Microbiologie des eaux d'alimentation ”. Memento technique de l'eau, ed. technique et documentation, Lavoisier, pp 206 -208, 420 -422, 1993.

**[45] Hadley R. F.**

“ Corrosion by micro-organismes in aqueous and soil environments ”. The corrosion handbook ed. by Herbert H. Uhlig, pp 466, 481 -1943, 1948, pp 466 -478, 1961.

**[46] Hadley R. F.**

“ The influence of sporvibrio Desulfuricans of on the current and potentiel behavior of corroding iron ”. National bureau of standards corrosion conference, 1943.

**[47] Harry E. G.**

“ Pasteurella ana tipegifer serotypes isolated from cases of anatipegifer septicaemia in ducks ”. Vet. rec. 84 (20), pp 673 -in Bergey's manuel -1969.

**[48] Jones L. W.**

“ Corrosion and water technology for petroleum producers ”. Oil and gas consultants international publications, ch. 3, pratical microbiology, pp 129, 134 -1988.

**[49] Landolt D.**

“ Corrosion et chimie des surfaces des métaux ”. 1ère éd. Presse polytechnique et universitaires Romandes, pp 2 -12, pp 188 -205, 1993.

**[50] Lonchay D. P.**

“ Exposé sur les problèmes de corrosion, bactéries et solides ”, rencontres sur les champs pétroliers. Baroide traing chemicals, pp 54, 75 -1979.

**[51] Larpent J. P & Larpent M.**

“ Elements de microbiologie “. Ed. Hermann, pp 177, 181 et pp 237, 244 -1985.

**[52] Leminore L & Veron M.**

“ Bactériologie médicale “. 2<sup>ème</sup> ed. médecine science Flammaron, pp 297, 306, pp 555, 599 et 795, 828 -1989.

**[53] Mouchet P, Montiel A & Rigal. S.**

“ Déggradations physico-chimiques dans les réseaux de distribution “. Ed. Techn. Sci. meth., pp 299 -306, 1992.

**[54] Magot. M.**

“ Introduction à la microbiologie des bactéries “. Ecole thématique sur la biodétérioration de matériaux -C.N.R.S, Art. pp 28 -47, 1995.

**[55] Maury M.**

“ Milieux de culture et réactifs de laboratoire “. Microbiologie et immunologie , 3<sup>ème</sup> édition, diagnostic Pasteur pp 290 -291, 1987.

**[56] McLeod J. W. & Govenlock P.**

“ The production of bactericidine by microorganisms “. Lancet 200, pp 900 -903, 1921.

**[57] Marechal N.**

“ Milieux de cultures et réactifs de laboratoire “. Biologie appliquée, ed. Avril 1981, pp 239 -241, 1981.

**[58] Nakhilivskaia M. I.**

“ Antagonism among bacteria “. Arch. microbiologia ( USSR ) n°7, pp 238 -264, 1938.

**[59] Ostroff A. S.**

“ Introduction to oil field water technology “. Ed. Englewood Cliffs, pp 158 -162, 1965.

**[60] Ostroff A. G.**

“ Introduction to oil field water technology “. Prentice, Hall. Inc. Englewood Cliffs N.J. ed. Prentice Hall, pp 159 -163, 1965.

**[61] Odom J. M. & al.**

“ Energie par l'hydrogène “. Annual of microbiology, n°58, pp 551, 591 -1984.

**[62] Pelment J.**

“ Bactéries et environnement, adaptations physiologiques “. Ed. press. universitaire de Grenoble pp 633 -668, 1993.

**[63] Pfennig N, Widdel F & Truper M. G.**

“ Isolation and identification of bacteria “. A handbook on habitats, vol 2, Prokaryotes, ed. by Springer Verlag Berlin, Heidelberg pp 926 -940, 1981.

**[64] Peng C. G. & Park J. K.**

“ Electrochemical mechanisms of corrosion ”. Departement of civil and environnement engineering, wat. ves. vol 28 nb 8, pp 1681 -1692, 1994.

**[65] Postgate J. R.**

“ Manuel de traitement de l'eau d'injection ”. Ed. technip pp 62 -73, 1973.

**[66] Prevot A. R & Guillermet F. N.**

“ Techniques pour le diagnostic des bactéries anaérobies ”, 3ème ed. pp 51 -88, 1977.

**[67] Pfennig A & al.**

“ Studies on dissimilatory sulfate reducing bacteria that decompose fatty acids ”. Arch. microbiol., pp 129, 395 -1981.

**[68] Portier M. R.**

“ Recent developpment in technology of surfactant ”. Published S.C.I by Elsevier, applied science, pp 65, 108 -1990.

**[69] Riviere J.**

“ Bactéries du cycle du soufre et corrosion ”. Art. Pétrole et technique n° 280 pp 17 -22, 1981.

**[70] Rodier J, Vial J. & Geoffray CH.**

“ Analyse microbiologique des eaux résiduaires et naturelles ”. Ed. IV, pp 709 -816, 1978.

**[71] Stephensen M & al.**

“ Biochem jour. ,Vol 25 n° 1, pp 215 -219, 1931.

**[72] Selman A & al.**

“ Antagonismes microbiens et substances antibiotiques ”. Ed. enseignement supérieur pp 7 -24, 258, 1948.

**[73] Scriban R.**

“ Cinétique microbienne ” Biotechnologie 4ème ed., Technique et documentation, Lavoisier pp 184 -207, 1993.

**[74] Servo.**

“ Servo Chemicals for the oil and gaz industry ”. The influence of varions chemicals; pp 17 -18, 1988.

**[75] Thomas S, Larpent J. F et Larpent J. M.**

“ Microbiologie pratique, ed. Hermant, pp. 2 -9, 1970.

**[76] Teske A & al.**

“ Distribution of sulfate reducing bacteria in a stratified Fjord as evaluated by most probable number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified ribosomal DNA fragments ”. Art. applied and environmental microbiology, pp 1405, 1415 -1981.

**[77] Von Wolzogen Kuhr C. A. M & al.**

“ Water “, vol 18, p 147, 1934.

**[78] Wieland L.**

“ Dégradation microbienne des matériaux “, Colloques et séminaire collection, association des ingénieurs en anticorrosion, ed. technip. pp 57-64, -1974.

**[79] Westlak D. W. S, Semple K. M & Obuekme C. O.**

“ Corrosion by ferric iron reducing bacteria isolated from oil production systems”. In proc. biologically induced corrosion, ed. S. C. Dexter -Nace pp 195, 195 -1986.

**[80] Warren P. Iverson.**

“ Anaerobic corrosion mechanisms “, The international corrosion forum sponsored by the NACE Anaheim, California, April 13.22, paper n° 243, 1983.

**[81] Wormwell et al.**

“ Bergey’s manuel of systimatic bacteriology “, 9th edition vol 1, pp 663 -679, 1984.

**[82] Yurdusen N, Ladire M, Ducluzeau R & Raibaud R.**

“ Antagonism exerted by an association of bacteroïdes thetaiotaomicron strain and a Fusobacterium necrogenes strain against clostridium perfringens in gnotobiotic mice and in fecal incubated in- vitro, Art. infection and immunity, vol. 57, n°3, pp724, 731 -1989.

**[83] Zobbel C. E**

“ The effet of solid surfaces upon bacterial activity “, Jour. of bacteriol. n°46, pp39 -56 - 1969.

**ANNEXES**



## Galeries classiques pour l'identification des bactéries antagonistes

### Préparation de la solution d'O.N.P.G

#### 1. Solution tampon de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ , pH = 4

Dissoudre 6,9 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  dans 45 ml d'eau distillée. Ajouter de la lessive de soude pure et ajuster à 7. Compléter à 50 ml avec de l'eau distillée et conserver à +4 °C.

#### 2. Solution d'O.N.P.G dans la solution précédente

Dissoudre 80 mg d'O.N.P.G dans 15 ml d'eau distillée portée à 50°C. Laisser refroidir. Ajouter 5 ml de la solution tampon. Le mélange doit être incolore. Conserver la solution à 4°C.

### Composition du milieu urée -indole

L. tryptophane.....	0,3 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,1 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	0,1 g
NaCl.....	0,5 g
Urée.....	2,0 g
Alcool à 95°C.....	1 ml
Rouge de phénol à 1%.....	0,25 ml
Eau distillée q.s.p.....	1000 ml

### Test pour la recherche de la catalase

Déposer une goutte d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sur une lame présentant un frottis d'une culture bactérienne. La présence de la catalase se manifeste par un dégagement gazeux d'oxygène.

### Composition du milieu mannitol -mobilité et réduction des nitrates

Peptone tryptique de viande.....	20 g
Agar.....	4 g
Mannitol.....	2 g
$\text{KNO}_3$ .....	1 g
Rouge de phénol à 1 %.....	4 g
Eau distillée q.s.p.....	1000 ml
pH = 7,6 - 7,8	

### Composition du milieu pour la recherche du V.P: Milieu Clarks et Laubs

Peptone tryptique ou polypeptone.....	5 g
Glucose.....	5 g
Phosphate bipotassique.....	5 g
Eau distillée q.s.p.....	1000 ml
pH = 7.	

Après ensemencement, on additionne la solution de V.P ( 0,5 ml de la solution alcoolique d'alpha- naphthol et 0,5 ml de soude à 4 N ).

### **Test pour la recherche de l'oxydase**

Imbiber un papier Whatman n°1 par une solution aqueuse à 1% d'oxalate de N.diméthylparaphénylène diamine. Prélever une colonie bactérienne et l'étaler sur le papier.

### **Composition du milieu culture pour la fermentation du glucose: Milieu de M.E.V.A.G (milieu d'étude pour la voie d'attaque des glucides )**

Macération de viande de ( 500 g/l ).....50 ml  
KCl.....5 g  
Agar.....3 g  
Rouge de phénol ( solution aqueuse à 0,2% ).....10 ml  
pH = 7,6 - 7,8

### **Composition du milieu pour la recherche de H<sub>2</sub>S**

Peptone de caséine.....20 g  
Peptone de viande.....6,6 g  
Citrate ferrique ammoniacal.....0,2 g  
Agar.....3 g  
pH = 7,3