

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA –Bejaia**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Filière : Biotechnologie  
Spécialité : Biotechnologie Microbienne



**Réf :.....**

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**  
*Thème*

**Caractérisation d'un biofilm corrosif  
formé sur un acier inoxydable**

**Présenté par : Mme RAHMANI Dalila**

**Soutenue le: 22/06/2023**

**Devant le jury composé de :**

<b>Mme ARKOUB Warda</b>	<b>MCA</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mme BELHAMICHE Nabila</b>	<b>MCB</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mr BETTACHE Azzeddine</b>	<b>Pr</b>	<b>Encadreur</b>
<b>Mme DJELLALI Nawel</b>	<b>Ingénieur</b>	<b>Co-encadreur</b>

**Année universitaire : 2022/ 2023**

# ***Remerciements***

**Merci,**

*C'est un petit mot tout simple mais qui pèse lourd si mes lèvres l'expriment avec douceur car il prend naissance au fond de mon cœur.*

*Je tiens d'abord à remercier le bon **Dieu** qui m'a aidé et m'a donné la patience, la santé et le courage durant toute cette période.*

*J'adresse mes sincères remerciements à mon promoteur **Mr le Professeur BETTACHE Azzeddine** à qui j'exprime ma reconnaissance de m'avoir encadré et encouragé tout au long de ce travail, merci pour votre patience, conseils ainsi que toutes les remarques qui ont enrichie ce travail.*

*J'exprime aussi mes sincères remerciements **au personnel du CRD de BOUMERDES** pour leur aide, accueil chaleureux et leurs encouragements. **Mme DJELLALI Nawel** pour ses précieux conseils et son aide dans l'élaboration de ce travail. **Mme KHOUKHI Faiza** qui n'as pas hésité à m'aider et leur gentillesse, j'ai appris plus que je ne l'aurais imaginé, mille mercis à Mme **ARKOUB Warda** qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. **Mme BELHAMICHE Nabila** d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Je remercie enfin toute personne qui de près ou de loin, de façon active ou passive a contribué à la réalisation de ce mémoire.*





## *Dédicaces*

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots que  
je dédie ce modeste travail aux êtres les plus chers à mon cœur, à **mes  
trésors** ma princesse Asma, ma mère et à l'hommage mon père et mon mari que  
dieu les accueille dans son vaste paradis qui ont sacrifiés leurs vies  
pour ma réussite et mon bien être.*

*A mes frères et sœurs Saida, Samia, Noureddine, Nadir, Nassim, Fatah*

*A mes nièces Bouchera, Serine, Ikram et Ilham*

*et neveux Lyes, farés, Mokhtar, Hakim, Median et wassim*

*A mes belles sœurs Hayat, Noura, Yasmina et Ibtissem et mon beau-frère Karim.*

*A mes amis et frères BENZAADI.C et KAID KASBAH.O*

*A toute personne qui de près ou de loin m'a aidé à réaliser  
ce travail.*



**Remerciements**

**Dédicaces**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Matériels et équipements**

## **Sommaire**

***Introduction*** .....01

### **CHAPITRE I : Synthèse bibliographique**

**I. Les installations métalliques dans l'industrie pétrolières**.....02

I.1. La production..... 02

I.2. Transport et stockage.....02

I.3. Opérations de raffinage.....02

**II. La corrosion**.....02

II.1. Définition.....02

II.2. Type de corrosion.....02

II.2.1. Corrosion chimique.....02

II.2.2. Corrosion électrochimique.....03

II.2.3. Corrosion bactérienne (biochimique) .....03

II.3. Facteurs de la corrosion bactériennes .....03

II.4. Bactéries impliqués dans la bio-corrosion.....04

II.4.1. Bactéries aérobies.....04

II.4.1.1. Bactéries Ferri-réductrices (IRB).....04

II.4.1.2. Bactéries oxydantes du soufre (SOB).....04

II.4.1.3. Bactéries réduisant les nitrates (NRB).....05

II.4.1.4. Bactéries oxydantes le fer et manganèse (IOB).....05

II.4.2. Bactéries anaérobies.....05

II.4.2.1. Bactéries méthanogènes.....05

II.4.2.2. Bactéries productrices d'acides organiques (APB).....06

II.4.2.3. Bactéries sulfato-réductrices (BSR).....07

II.5. Mécanisme de la bio-corrosion.....07

II.5.1. La production des substances corrosives.....07

II.5.2. La dépolarisation anodique et cathodique.....08

II.5.3. Aération différentielles.....	08
II.6. Mécanisme de la corrosion des NRB.....	09
<b>III Le biofilm.....</b>	<b>10</b>
III.1. Définition.....	10
III.2. Composition.....	10
III.3. Les caractéristiques d'un biofilm.....	10
III.4. Formation d'un biofilm .....	11
III.4.1. Conditionnement de la surface par le milieu.....	11
III.4.2. Adhésion des bactéries.....	11
III.4.3. Croissance du biofilm.....	12
III.4.4. Dispersion du biofilm.....	12

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

I. Surfaces d'essai.....	13
II. Echantillonnage.....	13
III. Mise en évidence des bactéries sessiles réductrices de nitrates.....	14
III.1. Le milieu de culture LB-NO <sub>3</sub> .....	14
III.2. Isolement des bactéries sessiles anaérobies facultatives réductrices des nitrates.....	14
III.2.1. La pré-culture.....	14
III.2.2. Réactivation des NRB sessiles.....	14
III.3. Mise en évidence de l'isolement des NRB sessiles.....	15
III.3.1. Réduction des nitrates.....	15
III.4. Dénombrement des NRB sessiles sur milieu liquide (test de kit) .....	17
III.5. Croissance des NRB.....	18
III.5.1. Mesure de la densité optique.....	18
IV. Caractérisation du consortium NRB.....	19
IV.1. Mise en évidence de la corrosivité des NRB.....	19
IV.2. Dénombrement des NRB sessiles sur la gélose LB-NO <sub>3</sub> .....	19
IV.2.1. Technique d'ensemencement.....	19
IV.2.1.1. Ensemencement en masse.....	19
IV.3. Observation au microscope optique.....	19
IV.4. Observation au microscope électronique à balayage.....	19
IV.4.1. Préparation pour l'analyse au MEB.....	20

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

I. Mise en évidence de l'isolement des bactéries sessiles réductrices de nitrate.....	21
I.1. Réduction des nitrates.....	21
II. Croissance et dénombrement des NRB sessiles sur le milieu liquide Test de kit.....	22
II.1.Perte de nitrate.....	23
II.2.La densité optique à 600nm.....	24
III. Caractérisation du consortium NRB sessiles.....	25
III.1. Mise en évidence de la corrosivité des NRB.....	25
III.2. Aspect morphologique des colonies sur le milieu LB-NO <sub>3</sub> .....	26
III.3. Dénombrement des NRB sessiles sur gélose LB-NO <sub>3</sub> .....	26
III.4. Observation au microscope optique.....	28
III.5. Observation au microscope électronique à balayage MEB.....	40

### **Conclusion et perspectives**

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumé**

### **Liste des abréviations**

<b>AUT</b>	<b>Assistances aux unités industrielles</b>
<b>DLAB</b>	<b>Direction des Laboratoires</b>
<b>BSR</b>	<b>Bactéries sultato-réductrices</b>
<b>BRI</b>	<b>Bactéries Ferri-réductrices</b>
<b>BOS</b>	<b>Bactéries oxydantes de soufre</b>
<b>BRN</b>	<b>Bactéries réductrices de nitrate</b>
<b>BTR</b>	<b>Bactéries Thiosulfato-Réductrice</b>
<b>MIC</b>	<b>Microbiologically influenced corrosion</b>
<b>Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>Trioxyde d'antimoine</b>
<b>BPA</b>	<b>Bactéries productrices d'acide</b>
<b>NR-BSO</b>	<b>Bactéries réductrices de nitrate sulfo-oxydantes</b>

<b>EPS</b>	<b>Exo-polysaccharides</b>
<b>hNRB</b>	<b>Bactéries hétérotrophes réductrices de nitrate</b>
<b>SnCl<sub>2</sub></b>	<b>Chlorure d'étain(II)</b>
<b>NACE</b>	<b>National Association of Corrosion Engineers</b>
<b>LB</b>	<b>Milieu Luria-Bertani</b>
<b>NR1</b>	<b>Acide sulfanilique</b>
<b>NR2</b>	<b><math>\alpha</math>-naphtylamine</b>
<b>NPP</b>	<b>Le Nombre le Plus Probable</b>
<b>PBS</b>	<b>Phosphate-buffered saline</b>
<b>MEB</b>	<b>Le microscope électronique à balayage</b>
<b>ASTM</b>	<b>American Standards of Technical Material</b>

## Liste des figures

Figure 1. Interaction matériau-milieu-micro-organisme en bio- corrosion.....	03
Figure 2. Schéma représentatif d'une zone d'aération différentielle.....	09
Figure 3. Impact des nitrates sur le cycle du soufre.....	10
Figure 4. Etapes de maturation d'un biofilm.....	11
Figure 5. Surfaces d'essai de terrain.....	13
Figure 6. Echantillons de biostuds.....	13
Figure 7. Erlenmeyers pour la culture des NRB sessiles.....	15
Figure 8. Etapes de préparation des Kits de dénombrement des NRB sessiles.....	16
Figure 9. Procédure d'inoculation par la méthode des dilutions successives (sessiles).....	17
Figure 10. Microscope électronique à balayage MEB.....	20
Figure 11. Lecture sur le kit de dénombrement des NRB sessiles anaérobies et aérobies.....	22
Figure 12. Technique de dosage de nitrate .....	24
Figure 13. Effet corrosive des NRB.....	25
Figure 14. Mécanisme proposé de la corrosion anaérobie induite par les NRB sessiles.....	26
Figure 15. Aspect des colonies NRB sessiles.....	26
Figure 16. Observation microscopique des NRB sessiles aérobies.....	28
Figure 17. Observation microscopique des NRB sessiles anaérobies.....	28
Cartographe. A B, C, D, E, F, G, H, E. Echantillon de la culture mixte des anaérobies .....	28
Cartographe. I, J, K. Echantillon de la troisième génération des aérobies.....	35
Cartographe. L, M, N, O, P. Echantillon après le détachement de biofilm NRB sessiles.....	37

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Résultats du dénombrement des NRB sessiles sur le milieu liquide LB-NO <sub>3</sub> .....	23
Tableau II. Résultats du dosage de perte de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> pour la dilution 10 <sup>-1</sup> .....	23
Tableau III. Résultats de l'absorbance à 600nm.....	24
Tableau IV. Dénombrement des colonies sur gélose LB-NO <sub>3</sub> .....	27
Tableau V. Marge des nombres de bactéries sessiles.....	27

## Matériels et équipements

- Balance analytique et de précision
- Etuves
- Hottes chimique et microbiologique
- Autoclave
- Distillateur
- Réfrigérateurs et chambre froide
- Bec bunsen
- Sertisseuse
  
- Microscopes optique et électronique à balayage
- Distributeur de solution automatique
- Bain mari chauffant et à ultrason
- Previ coloration de GRAM
- Compteur de colonies
- Agitateurs magnétique et chauffant
  
- pH-mètres
  
- Micropipettes
- Erlenmeyers
- Bêchers
- Spatules
- Barreaux magnétiques
- Fioles
- Éprouvettes
- Bouteille d'azote munis de manodétenteurs à pression de sortie maximale de 10 bars ± 0.5
- Des seringues de 01 ml et 10ml
- Flacons pénicilline en verre de 10 ml
- Bouchons en caoutchouc et capsules métalliques

# Introduction

La corrosion des métaux est un problème économique important et, dans de nombreux cas, l'activité des micro-organismes accélère considérablement ce processus. Les coûts annuels mondiaux de la corrosion sont estimés à 2,5 billions de dollars américains (**Koch et al., 2016**) et environ 20 % de cette corrosion a été attribuée à une forme d'activité microbienne (**Gu et al., 2015**).

Le défi permanent dans les industries de pétrole et de gaz, est la conception de matériaux pour les tubages, les tuyaux et autres installations qui résistent à la corrosion (**Abadeh et Javidi, 2019**). Actuellement, l'acier est le matériau d'ingénierie le plus utilisé à cause de sa solidité, sa disponibilité et son coût relativement bon marché (**Batis et al., 1997**).

Cependant, l'acier souffre de dommages dus à la corrosion abiotique et biotique (**Daniilidis et al., 2020**). La corrosion biotique, communément appelée corrosion sous influence microbienne, est difficile à prévoir par rapport à la corrosion abiotique, car les processus microbiens, chimiques et physiques se produisent ensemble et interagissent entre eux, ce qui rend le processus de corrosion très complexe (**Ibrahim et al., 2018**).

La corrosion biotique des alliages métalliques est due à la présence de bactéries aérobies et anaérobies sessiles qui adhèrent à la surface attaquée, plutôt qu'à des cellules planctoniques proches ou en contact étroit avec le métal. Les produits métaboliques des microbes modifient la chimie de l'interface matériau-solution (**Liang et al., 2014**).

Les changements chimiques entraînent différents effets tels que l'induction d'une corrosion localisée (**Videla et Herrera, 2005**), s'ils ne sont pas traités, entraînent des situations environnementales dangereuses, comme celle de Prudhoe Bay, en Alaska, en 2006 (**Meggert et Giguere, 2008**).

La gestion de la corrosion peut être considérée comme l'architecture de soutien de la direction AUT de la division du laboratoire DLAB, BOUMERDES ou j'ai réalisé mon stage.

Dans le cadre de ce travail, l'axe de recherche concerne l'étude d'un groupe de bactéries sessiles qui rentrent dans la formation d'un biofilm corrosif sur de l'acier, des coupons du même alliage que celui de l'installation pétrolière, ont été expertisés, pour cela un plan expérimental a été établi et suivi.

Le manuscrit rapporte principalement :

- Une synthèse bibliographique sur les installations pétrolières, la corrosion et les biofilms.
- Une partie expérimentale qui relate : isolement, dénombrement, croissance et observations microscopiques (optique et électronique à balayage) des NRB sessiles.

# **Synthèse bibliographique**

## I. Les installations métalliques dans l'industrie pétrolière

Les problèmes de corrosion se produisent dans l'industrie pétrolière dans au moins trois

Opérations généraux :

### I.1. Production

Les gisements de pétrole et de gaz consomment une quantité énorme de tuyaux, tubes, pompes, vannes et tiges en fer et en acier. Les fuites entraînent des pertes de pétrole et de gaz et causent également l'infiltration d'eau, ce qui accroît les dommages causés par la corrosion (Santhana Prabha et al., 2014).

### I.2. Transport et stockage

Les produits pétroliers sont transportés par des citernes, des pipelines et des camion-citerne. La principale raison de la corrosion interne des réservoirs de stockage est la présence d'eau qui se dépose et reste dans le fond (Santhana Prabha et al., 2014).

### I.3. Opérations de raffinage

La plupart des problèmes de corrosion dans les raffineries sont dus à des substances inorganiques telles que l'eau, H<sub>2</sub>S, CO<sub>2</sub>, l'acide sulfurique et le chlorure de sodium, et non aux substances organiques elles-mêmes (Santhana Prabha et al., 2014).

## II. La corrosion

### II.1. Définition

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

### II.2. Types de corrosion

#### II.2.1. Corrosion chimique

Il s'agit d'une réaction purement chimique entre la surface d'un matériau et un gaz ou un liquide non électrolyte. Par exemple, l'oxydation de l'acier ordinaire à haute température par l'oxygène de l'air est une corrosion chimique (Besma et Haifa, 2016).

#### II.2.2. Corrosion électrochimique

C'est une réaction électrochimique entre la surface d'un matériau et un liquide électrolyte. Cette réaction est accompagnée de la formation de piles qui sont le siège de

circulation de courant électrique. Ce type constitue 96% de cas de corrosion (**Besma et Haifa, 2016**).

### II.2.3. Corrosion bactérienne (biochimique)

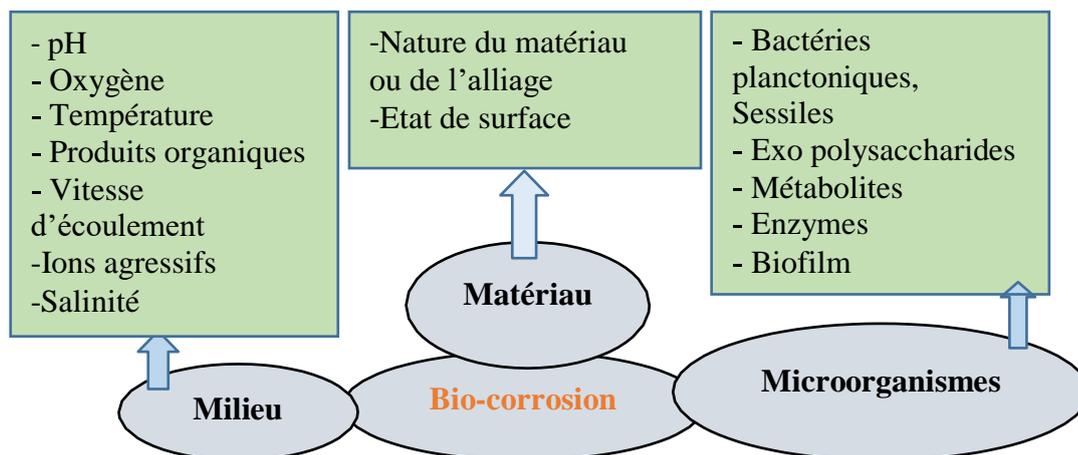
La corrosion induite par les microorganismes, le plus souvent appelée « bio-corrosion » implique tous les phénomènes de corrosion où les microorganismes agissent directement ou par l'intermédiaire de leur métabolisme (production d'acides, de sulfures...) en jouant un rôle primordial, en accélérant un processus déjà établi, ou en créant les conditions favorables à son établissement (**Chantereau, 1980**). Elle se caractérise par une attaque localisée profonde et très rapide (**L'hotis, 2002**).

De nombreux termes sont employés pour décrire cette corrosion: bio-détérioration des matériaux métalliques, bio-corrosion, corrosion microbienne, corrosion bactérienne, corrosion biochimique, corrosion influencée ou induite par les microorganismes mais seules corrosion microbienne et corrosion bactérienne sont définies et retenues dans la norme internationale ISO 8044 (1994) (**Dupont-Morral, 2005**).

### II.3. Facteurs de la corrosion microbienne

La bio-corrosion résulte de la conjonction défavorable de trois facteurs (**Mehanna, 2009**) (figure 1) :

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



**Figure 1.** Interactions matériau-milieu-micro-organisme en Bio-corrosion (**Branger et Mazille, 2002**)

### II.4. Bactéries impliquées dans la bio-corrosion

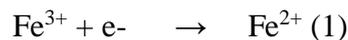
La communauté bactérienne retrouvée dans les réservoirs est très diversifiée, elle englobe des microorganismes anaérobies, présents depuis le dépôt de la matière organique dans le fond des puits pétroliers et avant toute activité humaine, et incluent principalement les

bactéries réductrices de sulfate, les archées méthanogènes et les bactéries fermentaires (**Magot et al., 2000**). Autrement, il semble clair qu'une autre catégorie bactérienne étrangère transitoire, dont l'origine semble exogène, abrite les gisements pétroliers. Elles regroupent fréquemment des espèces aérobies, anaérobies facultatifs ou des micro aérophiles (**Telang et al., 1997; Voordouw et al., 1996**). En effet, il est avéré que généralement, toute existence d'espèces exogènes signifie une contamination, c'est-à-dire que ces dernières ont pu être introduites dans les puits au cours des opérations de production ou du processus de récupération secondaire du pétrole (**Ollivier et Magot, 2005**).

## II.4.1. Bactéries aérobies

### II.4.1.1. Bactéries Ferri réductrices (IRB)

Les bactéries Ferri réductrices, sont un groupe de micro-organismes facultatifs (**Little, 2014**), qui peuvent utiliser l'O<sub>2</sub> en aérobiose et passer à la respiration anaérobie en l'absence d'O<sub>2</sub> (**Panter, 1968**). Les IRB tirent profit de la respiration anaérobie en réduisant les ions ferriques insolubles (Fe<sup>3+</sup>) en ions ferreux solubles (Fe<sup>2+</sup>) (équation (1)).



Un exemple de ce groupe les genres *Pseudomonas* et *Shewanella* (**Beech et al., 2000**).

### II.4.1.2. Bactéries oxydantes du soufre(SOB)

Les bactéries oxydant le soufre, sont principalement des microbes aérobies qui oxydent les composés inorganiques du soufre; tels que les sulfures métalliques, H<sub>2</sub>S, SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup> et le soufre élémentaire afin d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance (**Little et al., 2007; Tang et al., 2009**). Les sous-produits métaboliques de ces microbes, sont l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et l'acide sulfureux (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) (**Muthukumar et al., 2003**), qui sont très agressifs et corrosifs pour le fer et l'acier. L'un des genres communs de SOB est l'espèce *Acidithiobacillus*.

### II.4.1.3. Bactéries réduisant les nitrates (NRB)

Ces bactéries polyvalentes sur le plan métabolique utilisent le nitrate comme accepteur d'électrons et des substrats organiques et inorganiques comme donneurs d'électrons (**Li et al., 2017**). En effet, le nitrate NO<sub>3</sub><sup>-</sup> est réduit en nitrite NO<sub>2</sub><sup>-</sup> puis en diazote N<sub>2</sub> (95%), c'est ce qu'on appelle la dénitrification. Le nitrate peut être également transformé en ammoniac NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (5%) (**Voordouw, 2011**).

Les bactéries réductrices de nitrate sont groupées en:

- Bactéries hétérotrophes réductrices de nitrate (hNRB), tirant leur énergie de l'oxydation des composés organiques comme les hydrocarbures et produisent en retour du CO<sub>2</sub> ou bien de l'acétate et du CO<sub>2</sub> (**Voordouw, 2011**).

- Bactéries réductrices de nitrate et oxydantes de sulfure (soNRB), elles sont des chimio-lithotrophes qui utilisent le CO<sub>2</sub> et les produits chimiques inorganique tel que le sulfure comme source d'énergie pour former du soufre et / ou du sulfate en plus de nitrite et azote ou nitrite et ammoniac (**Voordouw, 2011**).
- Bactéries anaérobies oxydantes d'ammonium (**Li et al., 2017**), Parmi les isolats bactériens hétérotrophes réduisent le nitrate: *Denitrivibrio acetiphi*, mésophile anaérobie couple la réduction du nitrate en ammonium à l'oxydation de l'acétate et du fumarate (**Myhr et Torsvik, 2000**). L'autre est thermophile anaérobie, appelée *Garciella nitratreducens*, Elle réduit le nitrate en ammonium et utilise plusieurs substrats comme donneurs d'électrons tels que le cellulose, le fumarate et le lactate (**Ollivier et Magot, 2005**).

#### II.4.1.4. Bactéries oxydantes le fer et le manganèse (IOB)

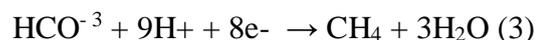
Les bactéries oxydantes le fer et le manganèse constituent un groupe aérobie de micro-organismes oxydent le fer soluble (Fe<sup>2+</sup>) en ferrique (Fe<sup>3+</sup>) pour en tirer de l'énergie, ce qui peut entraîner un dépôt dense à la surface du métal (équation (2)). Un exemple de bactérie de ce groupe est Gallionella.



### II.4.2. Bactéries anaérobies

#### II.4.2.1. Bactéries méthanogènes

Les méthanogènes sont des micro-organismes qui utilisent des composés organiques, du CO<sub>2</sub> ou du H<sub>2</sub> pour produire du méthane (CH<sub>4</sub>) comme métabolites pendant la respiration anaérobie (équation (3)) (**Kato, 2016**). Les espèces *Methermicoccus* et *Methanobacterium* sont des exemples de méthanogènes corrosifs (**Beese-Vasbender et al., 2015**).



#### II.4.2.2. Bactéries productrices d'acides organiques (APB)

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

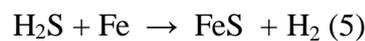
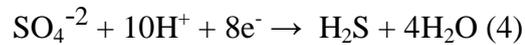
#### II.4.2.3. Bactéries sulfato-réductrices (BSR)

Les BSR sont un groupe ubiquitaire et diversifié de microbes anaérobies qui tirent leur énergie de composés organiques de faible poids moléculaire, tels que les hydrocarbures, les alcools, les composés aromatiques et les acides aliphatiques mono- ou di carboxyliques (lactate

et acétate) ou de le H<sub>2</sub> (**Dolla et al., 2006; Pallud et Van Cappellen, 2006**).

Les BSR utilisent l'ion sulfate (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) comme accepteur terminal d'électrons (équation (4)) pour produire du H<sub>2</sub>S ou du HS<sup>-</sup> (**Little et Lee., 2007; Al-Jaroudi et al., 2011**).

Le H<sub>2</sub>S réagit agressivement avec le fer métallique pour produire du sulfure de fer (équation (5)) (**Hamilton, 2003**). Les espèces *Desulfovibrio* sont un exemple de BSR très corrosifs.



## II.5. Mécanismes de la bio-corrosion

**Ferons 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 processus de corrosion des métaux en milieu aqueux est de type électrochimique, mais les microorganismes ne viennent pas modifier cette nature électrochimique de la corrosion.

### II.5.1. Production des substances corrosives

C'est l'explication la plus simple du phénomène de bio-corrosion, qui est dû au fait que certaines bactéries libèrent au cours de leur métabolisme des substances dont l'action agressive vis à vis des métaux est bien connue (**Beec, 1999; Coulter et Russel, 1976**). C'est l'exemple de l'acide sulfurique produits par *Thiobacillus*, ou l'hydrogène sulfuré produits par des bactéries sulfato-réductrices (**Schmidt, 1999**). De plus, de nombreuses bactéries et champignons peuvent produire d'importantes quantités d'acides organiques et d'acides minéraux, intervenant dans la modification du pH en provoquant la corrosion du fer et de ses alliages (**Lee et Debeer, 1995**).

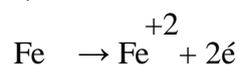
### II.5.2. Dépolarisation cathodique et anodique

Le processus de corrosion des métaux en milieu aqueux, est de nature électrochimique, ce processus fait intervenir les hétérogénéités du métal (**Murry, 1998**).

Il apparaît donc lors du contact avec cet électrolyte, des zones à potentiels différents formant des piles de corrosion. C'est-à-dire des zones cathodiques et des zones anodiques (**Neveux, 1968**).

➤ La réaction anodique:

C'est une réaction d'oxydation au cours de laquelle il existe une dissolution du métal en espèces solubles sous forme d'ions (**Scully, 1990**). Dans le cas du fer nous obtenons :



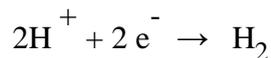
➤ La réaction cathodique:

Pour que la réaction anodique se poursuive, elle doit s'accompagner d'un processus cathodique correspondant à une réaction de réduction (**Degrement, 2005**). Dont le terme pourrait être :

- En aérobose: l'oxygène dissout, suivant la réaction :



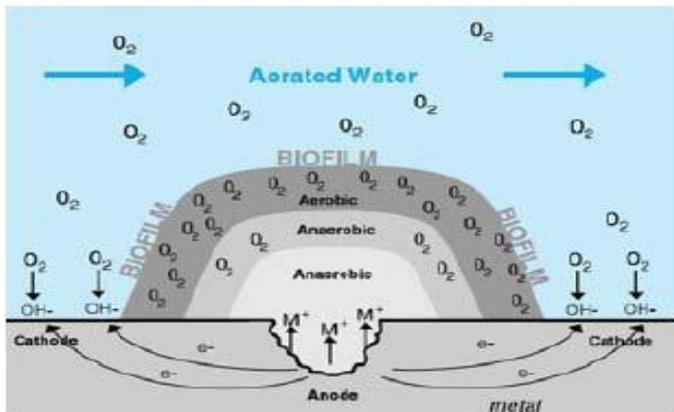
- En anaérobose: les ions  $\text{H}^+$  provenant de la dissociation électrolytique de l'eau :



### II.5.3. Aération différentielle

Le biofilm se caractérise par une très haute hétérogénéité, que soit au niveau chimique ou microbiologique. Ce sont donc des conditions favorables à l'établissement des cellules de concentration, d'aération différentielle (Figure 2). Il se crée en effet une différence de potentiel entre la zone périphérique considérée comme cathode et le centre du biofilm considéré comme anode (**Feron et Thierry, 1998**).

Dans ce sens de nombreux auteurs en l'occurrence (**Degrement, 1993; Coulter et Russel, 1976; Costerton et Geesey, 1979**). Ont démontré que la diffusion non uniforme de l'oxygène vers la surface conduit à une dépolarisation partielle des zones cathodiques, en accélérant le processus de corrosion.



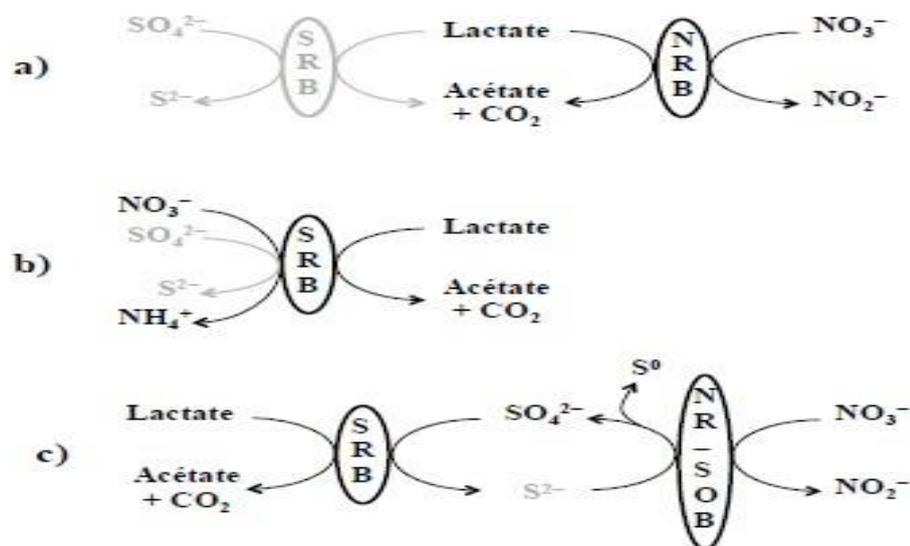
**Figure.2.** Schéma représentatif d'une zone d'aération différentielle (**Haras, 2005**).

Le problème lié à la corrosion, induite par les NRB, semble être lié à l'injection de nitrate dans les réservoirs pétroliers, qui sont utilisés pour atténuer l'acidification et les MIC; causées par les BSR, le nitrate à son tour, accélère la croissance des membres NRB, et en supprimant la croissance des BSR (Gieg et al., 2011), qui causent un sérieux problème dans l'industrie pétrolière, en raison de sa toxicité, son odeur, sa corrosivité et la formation d'insolubilisations de sulfure métallique, qui menacent à la fois la sécurité humaine et causent la diminution de la qualité du pétrole induisant ainsi de graves pertes économiques (Jenneman et Gevertz, 1999).

**II.6. Mécanisme de la corrosion par les NRB**

L'ajout de nitrates, nitrites ou biocides à base de nitrates entraîne une diminution significative de la bio-corrosion causée par les BSR et BTR selon plusieurs mécanismes (figure3) :

- 1) une stimulation de la croissance des bactéries réductrices des nitrates ou Nitrites en présence de donneurs d'électrons, au détriment des BSR/BTR.
- 2) un détournement de la capacité de certaines BSR à réduire les sulfates en sulfures en favorisant une réduction dissimulatrice des nitrates en ammoniacque.
- 3) une élimination des sulfures de dihydrogène (H<sub>2</sub>S) à travers une oxydation bactérienne couplée à la réduction des nitrates (Jenneman et al., 1986; Gardner et Stewart, 2002; Zuo et al., 2004; Hubert et Voordouw, 2007; Schwermer et al., 2008; Pillay et Lin, 2014).



**Figure. 3.** Impact des nitrates sur le cycle du soufre :(a) compétition BSR/NRB pour le donneur d'électrons organique entraînant une inhibition de la production de sulfures,

(b) réduction dissimulatrice des nitrates en ammonium aux dépends de la réduction des sulfates en sulfures, (c) conversion des sulfures en sulfates et soufre élémentaire par les bactéries réductrices des nitrates sulfo-oxydantes (NR-SOB).

### **III. Le biofilm**

#### **III.1. Définition**

Le terme biofilm fait référence au développement de communautés microbiennes sur des surfaces immergées dans des environnements aqueux (**Characklis et Marshall, 1990**).

#### **III.2. Composition**

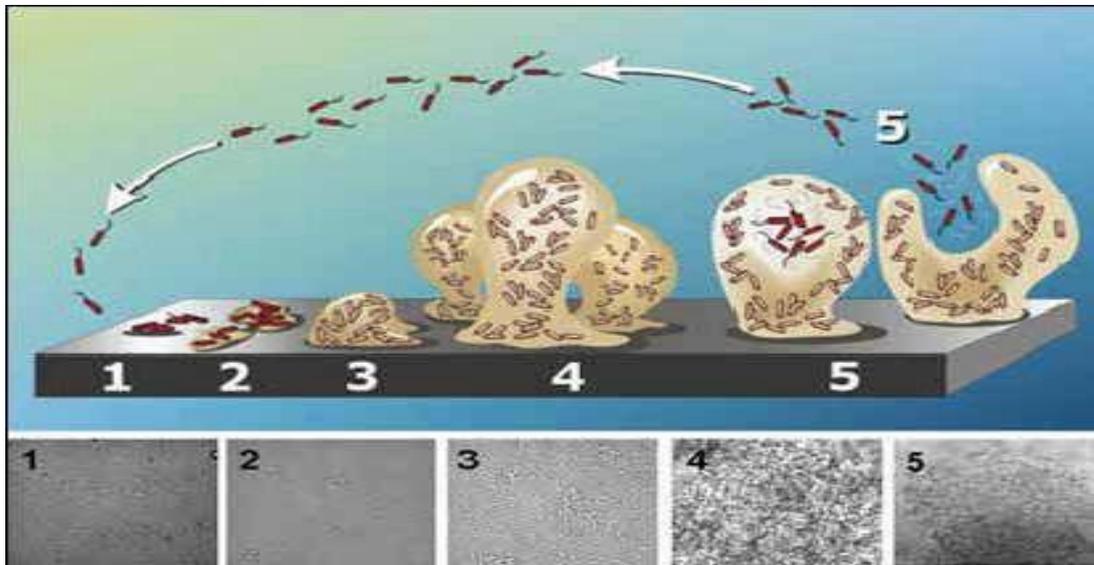
Les biofilms sont constitués principalement d'eau (80 à 95 %) et de bactéries, incluses dans une matrice organique. Cette matrice est composée de molécules organiques tel que les protéines et les polysaccharides, appelée EPS (Extracellulaire Polymérique Substances). Ces derniers peuvent occuper jusqu'à 75 à 95% du volume d'un biofilm mature (**Suci et al., 1994**). Elles ont notamment pour rôle de favoriser l'adhésion des bactéries au substrat et les protéger des agressions externes, comme les biocides (**Béranger et Mazille, 2002**).

#### **III.3. Caractéristiques d'un biofilm**

Les bactéries contenues dans un biofilm, présentent des caractéristiques très différentes de leurs homologues planctoniques (bactéries libres en suspension) parmi lesquelles des modifications structurales par exemple la disparition des flagelles (**Flemming, 1990; Costerton et al., 1995**), la production d'exo-polymères, la mise en place d'un système de communication chimique "quorum sensing" (**Parsek et Greenberg, 2000**), une augmentation significative de leur résistance aux agents antimicrobiens (désinfectants ou antibiotiques) et aux stress environnementaux (déshydratation, privation nutritionnelle, rayonnements ultraviolets...) (**Frank et Koffi, 1990; Morton et al., 1998; Mah et O'Toole, 2000; Campanacet al., 2000**).

### III.4. Formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm sur une surface est le résultat d'un ensemble de processus physiques, chimiques et biologiques. Elle se compose de cinq étapes successives (Stoodley et al., 2002), détaillée dans la Figure 4.



**Figure. 4.** Etapes de maturation d'un biofilm. 1: transport et adsorption des microorganismes sur la surface inerte; 2: attachement irréversible; 3: colonisation et croissance; 4 : maturation; 5: dispersion.

#### III.4.1. Conditionnement de la surface par le milieu

La nature du milieu, du matériau, ainsi que les caractéristiques de surface de ce dernier, sont des paramètres essentiels intervenant lors de cette première étape. En effet, la surface est le siège d'une adsorption irréversible de macromolécules telles que des acides humiques, des polysaccharides ou des protéines, conduisant à la formation d'un film conditionnant (Baier, 1980; Little et Jacobus, 1984; Ishida et Griffiths, 1990). Ce film est qualifié de conditionnant car il peut modifier les propriétés de surface initiales du matériau ce qui a pour conséquence soit de prévenir l'approche des bactéries ou au contraire de créer un microenvironnement favorable à l'adhésion stable des bactéries.

#### III.4.2. Adhésion des bactéries

L'approche des bactéries de la surface dépend des propriétés dynamiques du milieu (vitesse d'écoulement du fluide) et des propriétés physico-chimiques de la surface (Katsikogianni et al., 2004). L'adhésion bactérienne implique le déplacement de la cellule vers le lieu de son adhésion. Cette approche nécessite différents appendices bactériens, tels que les

flagelles et les cils (**O'Toole et Kolter, 1998; Gavin et al., 2003**) qui permettent également à la bactérie de se déplacer sur la surface.

Dans un premier temps l'adhésion est due à des interactions faibles entre la surface et les bactéries (interactions de type van der Waals et électrostatiques), l'adhésion est donc réversible.

Dans un deuxième temps, l'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymère par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas, des interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type Hydrophobe.

#### **III.4.3. Croissance du biofilm**

Une fois que la bactérie est irréversiblement adhérente à la surface, sa multiplication conduit à la formation de colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface selon les propriétés de surface des bactéries et des matériaux. Par la suite le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel (**Costerton et al., 1995; Davey et O'Toole, 2000; Sauer et al., 2002**).

Finalement l'épaisseur du biofilm se stabilise lorsque les phénomènes d'arrachement du biofilm compensent sa croissance.

#### **III.4.4. Dispersion du biofilm**

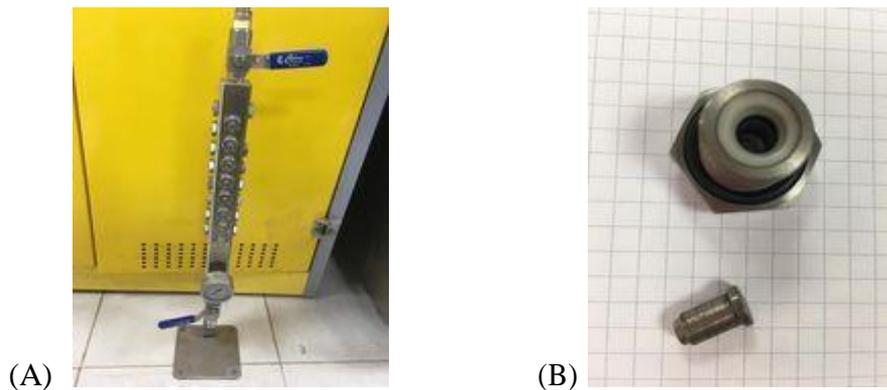
Le détachement des cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables: limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (**Sauer et al., 2002; Sauer et al., 2004**). Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement.

# **Matériel et Méthodes**

## I. Surfaces d'essai

Le degré de contamination des installations pétrolières est mesuré en utilisant une bioprob qui est une conduite en acier inoxydable contenant environ 24 ports étanches, chacun contient un coupon métallique ou biostud démontable (figure 5).

Une fois la bioprob installée, les bactéries libres ou planctoniques peuvent coloniser la surface des biostuds qui est située à ras avec la surface interne de la bioprob (Sayah, 2018).

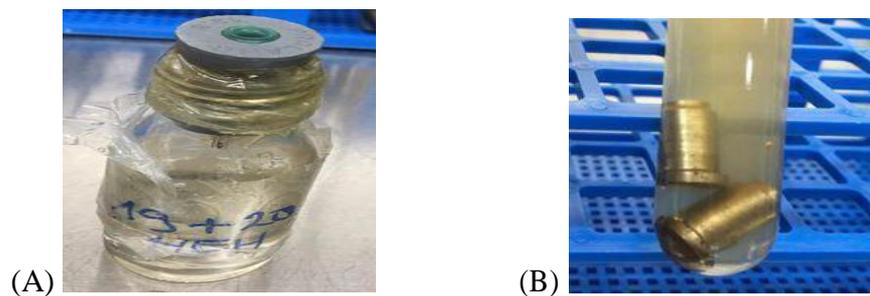


**Figure.5.** Surfaces d'essai de terrain

(A) Bioprob; (B) Biostud

## II. Echantillonnage

Des échantillons en double sont retirés du porte-coupons chaque 45 jours (NACE Standard RP0775-2005) par les ingénieurs de laboratoire de corrosion (Figure 6).



**Figure 6.** Echantillons de biostuds

(A) biostud pour l'isolement des anaérobies; (B) biostud pour l'isolement des aérobies

Les échantillons ont été retirés aseptiquement de l'appareil et transportés au laboratoire dans du glycérol et conservés

J'ai effectué mon stage à la division AUT dans le laboratoire de la corrosion bactérienne du 15/02 au 15/05/2022.

La division assistances aux unités industrielles est divisée en trois départements :

### 1- Département environnement

- Laboratoire d'analyse d'eau et de sol
- Laboratoire étude d'impact environnement

### 2- Département traitement et contrôle des fluides

- Laboratoire chimie traitement des eaux
- Laboratoire de caractérisation physicochimique des eaux industrielles
- Laboratoire chimie des contrôles

### 3- Département corrosion

- Laboratoire de corrosion électrochimique et métallurgique
- Laboratoire de corrosion bactérienne

## III. Mise en évidence des bactéries sessiles réductrices de nitrates(NRB)

### III.1. Milieu de culture liquide LB-NO<sub>3</sub>

Les souches NRB utilisées dans l'étude ont été isolées à partir d'un champ pétrolier de Hassi Messaoud du sud Algérie. Le consortium NRB a été cultivé dans le milieu Luria-Bertani. (Fu et al., 2021) avec du NO<sub>3</sub> (milieu LB-NO<sub>3</sub>) (annexe1).

### III.2. Isolement des bactéries sessiles anaérobies facultatives réductrices des nitrates (NRB)

#### III.2.1. Pré-culture

Le premier échantillon de coupon prélevé en double a été traité pour l'isolement des NRB sessiles anaérobies viables, le coupon a été rincé pendant 20 secondes dans de l'eau distillée stérile pour éliminer les cellules non fixées (Wolfaardt et al., 1991).

Le coupon a été ensuite immergé à l'aide d'une pince métallique stérile sous une hotte microbiologique dans 25ml de milieu de culture spécifique LB-NO<sub>3</sub> dans un Erlenmeyer de

50ml, scellé avec un bouchon en caoutchouc et barboté à l'argan pendant 3min puis placé dans un nettoyeur à ultrasons pendant 15min, pour le détachement de biofilm.

Les mêmes étapes ont été suivies pour le premier échantillon de coupon des aérobies, mais celui-ci sans barbotage.

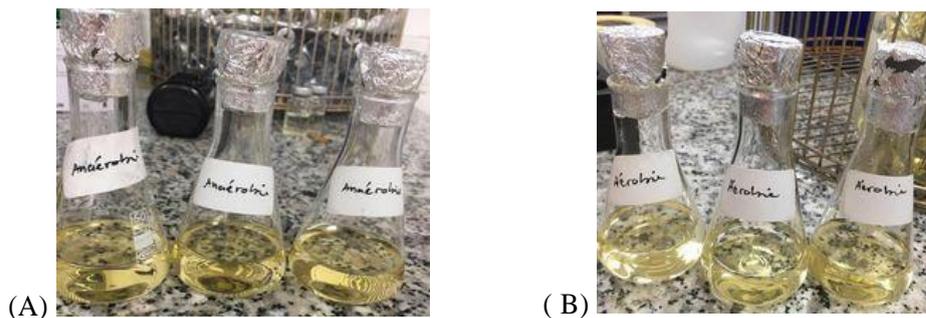
### III.2.2. Réactivation des NRB sessiles

Après incubation à 37°C pendant 72 heures de la pré-culture des NRB anaérobies sous agitation (première génération) ; sous une hotte microbiologique et à l'aide d'une seringue stérile un volume de 2,5ml a été prélevé, le même coupon a été plongé à l'aide d'une pince métallique stérile dans un autre Erlenmeyer de 50ml contenant 25ml de milieu de culture liquide LB -NO<sub>3</sub>.

L'Erlenmeyer est scellé avec un bouchon en caoutchouc, barboté et placé dans un nettoyeur à ultrasons pendant 15min. La culture est incubée pendant 72 heures à 37°C sous agitation (deuxième génération).

Les mêmes étapes de réactivation ont été suivies à partir de la pré-culture des aérobies, mais sans barbotage.

Il faut signaler que la réactivation doit être refaite de la même manière dans le 3<sup>ème</sup> Erlenmeyer (troisième génération) pour avoir des cellules jeunes (**Normes API RP-38, 1982-la NACE, 2004**).



**Figure.7.** Erlenmeyers pour la culture des NRB sessiles

(A) pour les aérobies ; (B) pour les anaérobies

### III.3. Mise en évidence de l'isolement des NRB sessiles

#### III.3.1. Réduction des nitrates

Cette réaction de réduction a été étudiée dans un bouillon nitraté (Annexe1). Après ensemencement de ce bouillon, il a été incubé à 37°C pendant 72h. Une fois les 72h écoulées, 05 gouttes de chacun des réactifs NR1 et NR2 ont été ajoutés. Si la bactérie possède une nitrate réductase, une teinte rose-cerise se manifeste traduisant la présence d'ions nitrites dans le milieu. Par contre, si l'on observe aucun changement de couleur, le test est complété par l'épreuve de Zo-Bell; à savoir l'ajout de poudre de zinc. L'apparition d'une couleur rouge signifie que la souche testée est "NR<sup>-</sup>", par contre si aucune couleur n'apparaît cela veut dire que la bactérie a réduit les nitrates au-delà du stade nitrite (Delarras, 2007; Denis et al., 2016).

### III.4. Dénombrement des NRB sessiles sur milieu liquide (test de kit)

La procédure de dénombrement des bactéries sessiles NRB à l'aide d'un test de kit par la méthode du nombre le plus probable (NPP) a été décrite par **Ru Jia et al (2017)**.

Les valeurs de nombre le plus probable (NPP) obtenues ont été comparées par la méthode statistique de **Cochran (1950)** (annexe 2). Après incubation, la croissance des NRB a produit une turbidité dans la culture.

Les étapes de préparation des kits sont les suivantes (figure 8).

1. Le milieu LB-NO<sub>3</sub> préparé auparavant est réparti dans des flacons de type pénicilline à raison de 9 ml.

2. Les flacons sont scellés avec des bouchons en caoutchouc, puis capsulés à l'aide d'une sertisseuse avec des couvercles métalliques jetables. L'élimination de l'oxygène contenu dans les flacons est réalisée par un barbotage à l'azote ou à l'argan (gaz inerte) pendant 3 min en introduisant deux aiguilles à travers le bouchon en caoutchouc, l'une l'entrés d'azote et l'autre pour la sortie de l'oxygène créant ainsi les conditions d'anaérobiose pour les NRB.

3. Ils sont ensuite stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C et sous une pression de 1 bar.

4. Le milieu LB-NO<sub>3</sub> préparé auparavant est répartis dans des flacons de type pénicilline à raison de 9 ml.

5. Les flacons sont scellés avec des bouchons en caoutchouc, puis capsulés à l'aide d'une sertisseuse avec des couvercles métalliques jetables. L'élimination de l'oxygène contenu dans les flacons est réalisée par un barbotage à l'azote ou à l'argon (gaz inerte) pendant 3 min en introduisant deux aiguilles à travers le bouchon en caoutchouc, l'une l'entrés d'azote et l'autre pour la sortie de l'oxygène créant ainsi les conditions d'anaérobiose pour les NRB.

6. Ils sont ensuite stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C et sous une pression de 1 bar.

7. Après autoclavage, les flacons ont été regroupés en trois séries de six, pour chaque culture (aérobies et anaérobies).



**Figure.8.** Étapes de préparation des Kits de dénombrement des NRB sessiles. (A) capsulation des flacons à l'aide d'une sertisseuse; (B) barbotage à l'argon; (C) regroupement des Kits de dénombrement.

8. A l'aide d'une seringue stérile et au près du bec bunsen, 1 ml de la pré-culture est prélevé et introduite dans le premier flacon de la première série de flacons pénicilline. Après homogénéisation, la dilution  $10^{-1}$  est obtenue. Avec la même seringue on prélève 1ml du 1<sup>er</sup> flacon et l'on introduit dans le 2<sup>ème</sup> flacon pour la dilution  $10^{-2}$ , ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-6}$ .

Les mêmes étapes ont été suivies pour la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> séries de flacons (voir figure.9).

9. Les premières séries sont incubées à 37°C pendant 72 heures.

A signaler que les mêmes étapes ont été suivi pour le troisième Erlenmeyer de réactivation.

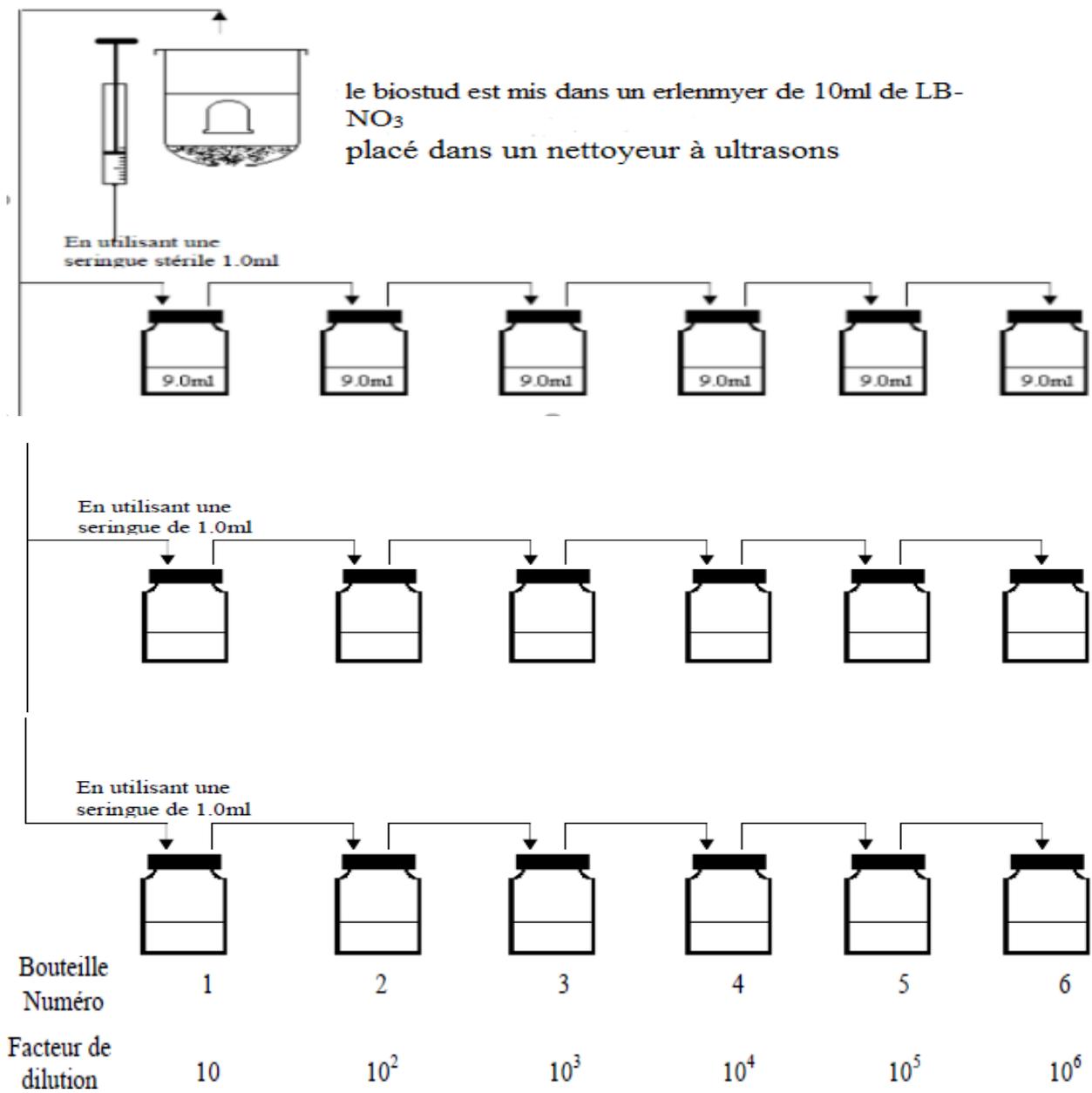


Figure 9. Procédure d'inoculation par la méthode des dilutions successives (sessiles) (Sayah, 2008).

### III.5. Croissance des NRB

#### III.5.1. Mesure de la densité optique (DO)

Cette DO est définie par la loi de Beer –Lambert :  $A = L \times C \times \varepsilon$

(Béranger et Mazille, 2002).

**A** : l'absorbance ;

**L** : l'épaisseur de la cuve [cm] ;

**C** : la concentration de la substance absorbante [mol/l] ;

$\varepsilon$  : le coefficient d'absorption moléculaire [l/mol.cm].

##### ➤ Méthode. 1

Le milieu a été testé pour la perte de nitrate à l'aide d'une méthode d'absorbance UV 220 à 440 nm (Tiedje, 1982). Le tube NPP a été considéré comme positif pour la croissance de NRB sessiles s'il consomme plus de 10% du nitrate disponible par rapport au tube non ensemencé (Davidova et al., 2001).

##### ➤ Méthode. 2

La DO est mesurée par un spectrophotomètre UV-V. La longueur d'onde de travail correspond au maximum d'absorption pour la culture bactérienne, qui est de 600 nm.

Pour la mesure, une cuve en verre de 1cm d'épaisseur est remplie avec le milieu de culture stérile (LB-NO<sub>3</sub>) représentant le blanc. La même cuve est ensuite remplie avec :

1- La pré-culture.

2- La culture de la troisième génération. Le coupon a été légèrement rincé dans une solution tampon saline phosphate (PBS) (annexe1), de pH7,4 pour éliminer les cellules planctoniques et le milieu de culture (Ru Jia et al., 2017), ensuite, il a été immergé dans un autre Erlenmeyer contenant le milieu LB-NO<sub>3</sub> stérile, et placé dans un nettoyeur à ultrasons pendant 15min, pour le détachement de biofilm.

## IV. Caractérisation du consortium NRB

### IV.1. Mise en évidence de la corrosivité des NRB

L'effet corrosif des NRB a été mis en évidence sur une boîte de Petri. Un coupon métallique est déposé au milieu d'une boîte de Pétri contenant la gélosé NRB-NO<sub>3</sub>,ensemencée par les souches NRB sessiles, et incubé à 37°C pendant 72 heures.

### IV.2. Dénombrement des NRB sessiles sur la gélose LB-NO<sub>3</sub>

Une série de six dilutions est préparée à partir de troisième Erlenmeyer de réactivation et de la pré-culture, cette suspension a été utilisée pour compter les organismes viables. Le milieu de croissance était de la gélose LB-NO<sub>3</sub> sur 3boîtes de Pétri pour chaque dilution pour comptage, et les cultures ont été incubées pendant 3 jours à 72°C.

#### IV.2.1. Technique d'ensemencement

##### IV.2.1.1. Ensemencement en masse

S'effectue par l'introduction de 1ml de l'échantillon de chaque dilution est incorporé dans le milieu de culture en surfusion à 45°C, bien homogénéiser puis laissé solidifier. Cela permet l'isolement des germes aéro-anaérobies facultatifs. Les colonies se développent à la fois dans la masse et en surface (**Marchal et Bourdon, 1973**).

Afin de réaliser une caractérisation morphologique du consortium NRB sessiles de la pré-culture et la culture de la troisième génération présentes dans le milieu de culture.

### IV.3. Observations au microscope optique

Cette caractérisation s'est basée sur le Gram, la forme des cellules, la mobilité des isolats bactériens ainsi que le mode de regroupement.

L'observation à l'état frais permet d'apprécier au microscope optique la morphologie et la mobilité des bactéries. Elle est réalisée en disposant une goutte de suspension bactérienne entre la lame et lamelle puis observation sous microscope optique à un grossissement de 10x40 (**Delarras, 2007**).

### IV.4. Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

Les observations effectuées sont réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage (figure 10).



**Figure10.** Microscope électronique à balayage MEB

#### **IV.4.1. Préparation pour l'analyse au MEB**

Le deuxième échantillon de coupon prélevé en double a été traité pour observer la morphologie du biofilm et détecter les compositions élémentaires.

Avant l'observation du biofilm, le coupon a été traité avec une solution de glutaraldéhyde à 5% pendant 8 heures pour fixer le biofilm. Ensuite il a été déshydraté avec, 50, 60, 70, 90, 95 et 100 % d'éthanol (v/v) pendant 30 minutes (**Li et al., 2021**), puis sécher.

Un autre coupon a été d'abord récupéré de son milieu liquide de troisième Erlenmeyer de réactivation, la solution de Clark a été utilisée pour éliminer les biofilms et les produits de corrosion sur les surfaces des coupons conformément à la norme ASTM G1-034 (**Ru Jia et al., 2017**).

Les coupons sont collés sur le porte-échantillon (plot) avec des pastilles en carbone qui s'agit de conducteurs à double rôle, ils servent à coller le coupon sur le plot et à conduire les électrons (**John Lynch, 2001**).

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

## **Résultats et discussion**

## I. Mise en évidence de l'isolement des bactéries sessiles réductrices du nitrate

### I.1. Réduction des nitrates

Après l'ajout de NR I est NR II, nous n'avons pas eu une coloration rouge, même après l'ajout de la poudre de zinc (pas de coloration rouge) (figure 11), ce qui montre que les NRB sessiles isolées sont des nitrates réductase positives.



(A) (B)

**Figure 11.** Réduction de nitrate

(A) NRB sessiles aérobies; (B) NRB sessiles anaérobies.

Les NRB sont capable de réaliser deux voies pour la réduction des nitrates (**Gevertz et al., 2007**) :

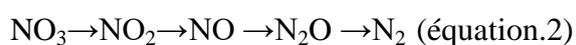
#### La voie dissimilatrice ou ammonification du nitrate

Le nitrate est transformé en ammonium, celui-ci n'est pas nécessairement assimilé, surtout si le milieu contient déjà une source d'azote, l'opération n'est possible qu'en anaérobiose (équation.1).



#### La voie assimilatrice ou respiration dénitrifiant ou dénitrification

Il s'agit d'un processus biologique de respiration anaérobie dans lequel l'accepteur final des électrons n'est pas le dioxygène (équation.2).



Chacune des étapes de la chaîne de dénitrification est catalysée par une enzyme spécifique (nitrate réductase, nitrate réductase, N<sub>2</sub>O réductase).

L'oxydation de donneurs d'électron nécessite moins de nitrate si la première opération est stimulée.

Les facteurs gouvernant la stimulation de telle ou telle voie lors de l'injection de nitrates sont encore méconnus.

**Strohm et al., (2007)** ont montré que la voie dissimulatrice est plus favorable que celle de dénitrification, donc elle domine dans l'environnement où la concentration en nitrate est faible (**Teidjie, 1988; Burgin et Hamilton, 2007**).

Il n'est pas nécessaire que la réduction de nitrate soit complète en donnant de N<sub>2</sub> ou du NH<sub>3</sub>. L'excès en nitrates et la disponibilité des donneurs d'électron aux NRB permet la production de nitrite comme produit fini de la réduction (**Greene et al, 2003; Hubert et Voordouw, 2007; Grigoryan, 2008**).

### II. Croissance et dénombrement des NRB sessiles sur milieu liquide (test de kit)

La méthode NPP est une technique statistique efficace d'estimation des densités de populations microbiennes qui est obtenue par application du principe de vrai semblance, à partir de réponses positives observées pour une ou plusieurs dilutions successives de la suspension bactérienne.

Dans la ligne la somme des flacons; choisir le nombre à 3 chiffres le plus grand 333 se reporter au table de MAC GRADY pour 3 tubes de dilution (annexe 2) afin de trouver le NPP correspondant au nombre 333: le NPP est 140 cela signifie qu'il y a statistiquement 140 bactéries dans l'inoculum de la dilution 10<sup>-3</sup>.

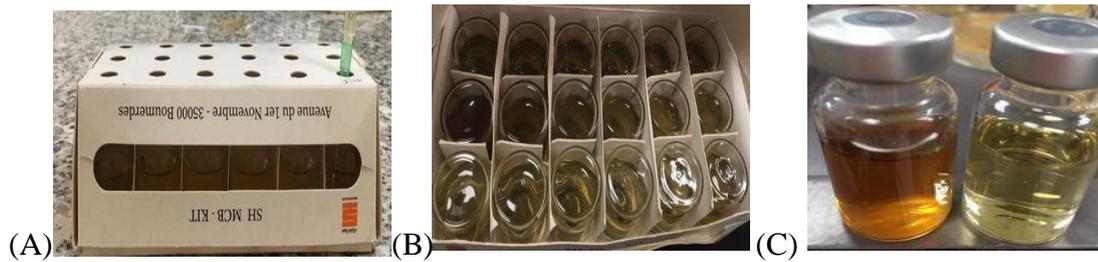
$$N = \text{NPP} / V \text{ inoculum} \times F_d$$

F<sub>d</sub>: facteur de la dilution correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique 10<sup>-3</sup>

V: volume d'inoculum = 1ml

$$N = 140 / 1 \times 0.001 = 140 \times 10^4 \text{ bactéries/biostuds}$$

Après l'incubation des kits de la pré-culture et la culture de la troisième génération (anaérobies et aérobies), on a remarqué un trouble (figure.12(C)) dans les flacons de pénicillines à différentes dilutions.



**Figure.12.** Lecture sur le kit de dénombrement des NRB sessiles anaérobies et aérobies

(A) Le kit de dénombrement; (B) les trois séries de dilutions; (C) le trouble dans les flacons.

Les résultats du dénombrement, voir un exemple dans (annex2), sont apportés sur le (tableau. I).

**Tableau.1.** Résultats du dénombrement des NRB sessiles sur le milieu liquide LB-NO<sub>3</sub>

Nombre de bactéries NRB sessiles( cellule/cm <sup>2</sup> )	Pré-culture	Culture troisième génération
Anaérobies	4,5X 10 <sup>3</sup>	1.4X 10 <sup>4</sup>
Aérobies	9,5X 10 <sup>3</sup>	0.2X 10 <sup>4</sup>

➤ La croissance est confirmée par :

**1- La perte de nitrate, plus de 10% du nitrate disponible par rapport au tube non ensemencé** (tableau. II).

On a rapporté sur le tableau II un exemple de résultat positif pour le flacon de 10<sup>-1</sup>

**Tableau. II.** Résultats du dosage de la perte de NO<sub>3</sub> dans la dilution 10<sup>-1</sup>

Concentration de NO <sub>3</sub> (mg/l)	Concentration initial de NO <sub>3</sub> dans les flacons de pénicillines	Concentration de NO <sub>3</sub> dans le flacon positif
<b>Anaérobies</b>	90	78,62(pré- culture);55,76 (culture troisième génération)
<b>Aérobies</b>	90	72,20(pré-culture);62(culture troisième génération)

Les résultats d'absorbance sur tous les flacons de différentes dilutions testées, exemple la dilution  $10^{-1}$  ou la concentration du nitrate consommé est plus de 10%, sont considérés positifs. Ce qui confirme la croissance des NRB sessiles.

**2- La densité optique à 600nm**

Les résultats sont rapportés sur le tableau III.

**Tableau. III.** Les résultats d'absorbance à 600nm

Densité optique à 600nm	Pré-culture	Culture troisième génération	Blanc (le milieu LB-NO <sub>3</sub> )
Anaérobies	0.4	0.944	0.1
Aérobies	0.8	0.629	0.1

D'après les résultats des tableaux I et III, les échantillons de biostuds du champ Hassi Messaoud que nous avons examinés contenaient des NRB sessiles, cela nous indique qu'ils peuvent facilement s'adapter au mode de croissance sur la surface en acier du pipeline (Liu et al., 2021).

Le nombre de bactéries est variable, ceci suggère que le milieu LB-NO<sub>3</sub> contenait tous les nutriments pour leurs croissances.

- Le nombre détecté était variable, entre les anaérobies et les aérobies, cela est peut-être dû:

-Les anaérobies sont sensibles aux différentes manipulations (O<sub>2</sub> qui est toxique).

-Les aérobies s'adaptent mieux au changement des conditions de culture, elles se trouvent en contact direct avec le milieu de culture, Elles peuvent facilement obtenir les nutriments en s'immobilisant.

La réduction des nitrates s'est produite dans la couche inférieure du biofilm parce que la couche supérieure de cellules sessiles épuisait l'oxygène (**Takao Iino et al., 2021**).

- Le nombre détecté était variable aussi entre la pré- culture et la culture de la troisième génération, cela peut être dû:

-Le milieu de culture renouvelé (culture en continu).

-Une corrosion plus sévère en augmentant les bactéries NRB existantes qui étaient dormantes en raison de l'absence de composés de nitrate (**Vitor Silva al., 2022**).

-Le nombre de bactéries dénombrées dans la pré-culture, explique que c'était le nombre qui était présent sur l'acier exposé sur le terrain, donc la surface de l'acier était colonisée par différents groupes bactériens de corrosion cités dans la littérature (les BSR, BTR etc...), mais dans la culture de la troisième génération, seul le groupe des NRB s'est développé sur la surface de l'acier.

### III. Caractérisation du consortium NRB

#### III.1. Mise en évidence de la corrosivité des NRB

Après l'incubation des boîtes de Petri (figure 13(B) et (C)), nous avons noté sur l'acier immergé dans un milieu contaminé par les NRB sessiles la présence de couches plus importantes autour de l'acier.



(A) Avant incubation

(B) NRB aérobies

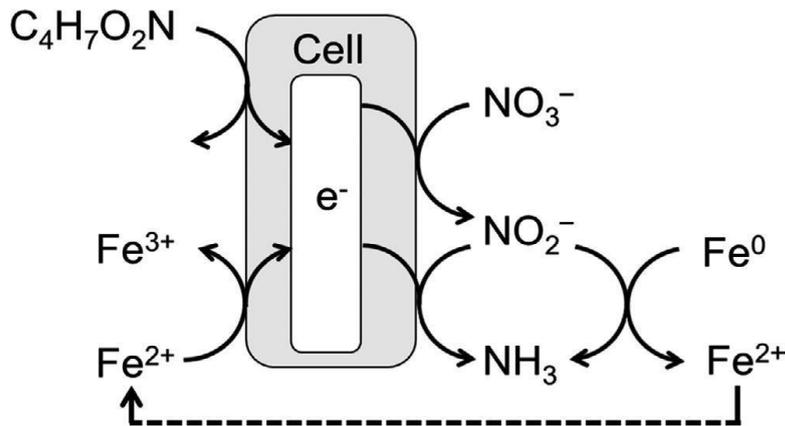
(C) NRB anaérobies.

**Figure 13.** Effet corrosif des NRB

D'après **Normand et al., (2004)**, lorsqu'un acier est plongé dans un milieu contaminé par des bactéries, il est généralement colonisé par ces mêmes bactéries. Ces dernières formant un

biofilm qui cause une altération, suite à la réaction de réduction du nitrate sous la surface de l'acier.

Cette altération était accompagnée par des dépôts noirs, ce sont les produits de corrosion d'acier (rouille) selon le mécanisme illustré dans la figure 14



**Figure 14.** Mécanisme proposé de la corrosion anaérobie du Fe induite par les NRB sessile (Takao Iino et al., 2021).

### III.2. Aspect morphologique des colonies en gélose LB- $NO_3$

Après ensemencement sur le milieu gélosé LB- $NO_3$  les souches NRB sessiles sont apparues. Elles forment des grandes et petites colonies jaunes orangés, bombés, de contours réguliers, à surface lisse avec une consistance généralement visqueuse qui exprime leur pouvoir physiologique à sécréter des polymères extracellulaires qui leur confèrent la faculté d'adhérer à une surface solide (figure 15).



**Figure 15.** Aspect des colonies NRB sessiles.

### III.3. Dénombrement des NRB sessiles sur la gélose LB- $NO_3$

Pour le dénombrement il faut que le nombre d'UFC soit significatif entre 30 et 300 colonies, la formule mathématique AFNOR peut être utilisée.

$$N = \frac{\text{la somme des colonies des boîtes interprétables}}{v} (n1+0,1n2) d$$

V : 1 ml volume d'ensemencement en masse

-n1 : nombre de boites considéré à la 1er dilution retenue

-n2 : nombre de boites considéré à la 2eme dilution retenue

-d : facteur de la 1ère dilution retenue

Les résultats de dénombrement des colonies des NRB sessiles sont mentionnés sur le tableau IV.

**Tableau IV.** Résultats du dénombrement des colonies sur la gélose LB-NO<sub>3</sub>

Nombre de colonies UFC/cm <sup>2</sup>	Pré-culture	Culture de troisième Génération
Anaérobies	1,20 X 10 <sup>7</sup>	Indénombrable (tapis)
Aérobies	3,09 X 10 <sup>7</sup>	Indénombrable (tapis)

L'augmentation de la charge microbienne, indénombrable dans la culture de la troisième génération et les chiffres élevés dans la pré-culture qui est supérieur à 10<sup>7</sup> UFC/cm<sup>2</sup> (tableau IV), considérés comme supérieurs à la norme (tableau V).

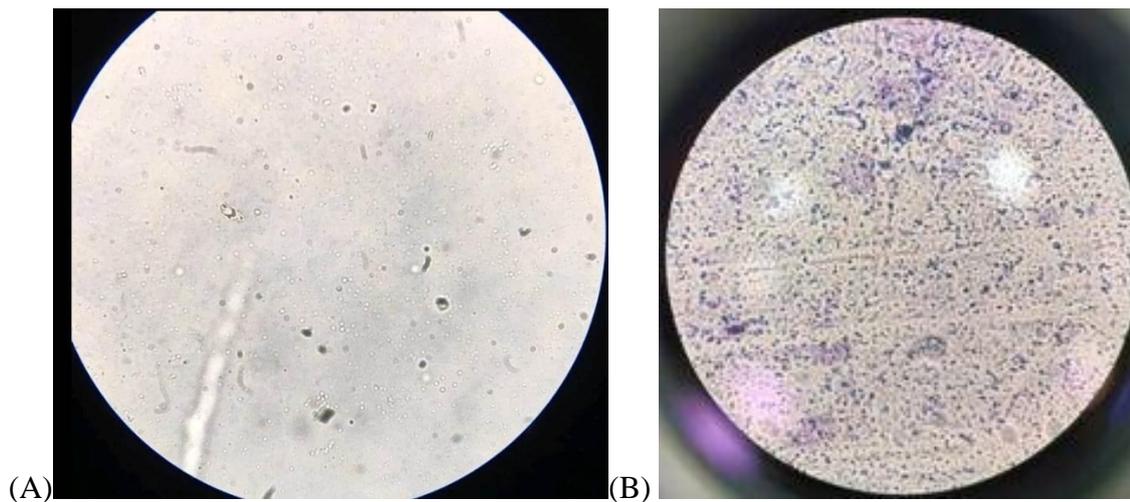
**Tableau V.** Marge de nombre de bactéries sessiles (Saleh al-Sulaiman., 2016)

Type bactériens	Nombre de bactéries sessiles (cm <sup>2</sup> )
SRB	<10 <sup>2</sup>
GAB (bactéries aérobies générales)	<10 <sup>2</sup>
GAnB (bactéries anaérobies générales)	<10 <sup>2</sup>

Cette charge peut nous donner une indication sur l'état d'altération de l'acier, qui nous permet de suivre la perte de masse de l'acier en fonction l'évolution de la croissance des NRB sessiles au cours du temps pour éviter toute perforation possible.

#### III.4. Observations au microscope optique

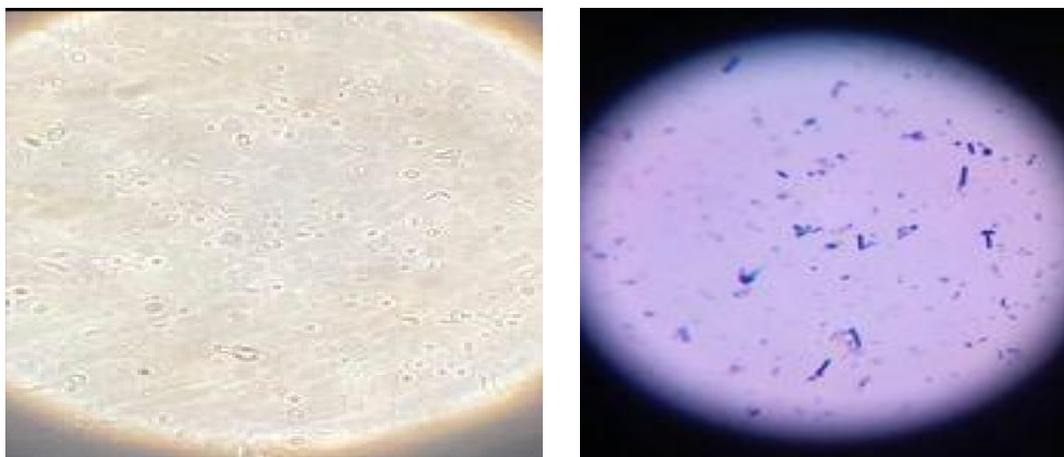
- L'observation microscopique (GX40) à l'état frais d'une culture bactérienne NRB sessiles aérobies a révélé un nombre très élevé de petits, cocci mobiles, isolés, diplocoques, en amas, en chaînette, la coloration de Gram (GX100) a montré que ces colonies appartiennent aux bactéries à Gram positif ( figure 16).



**Figure 16.** Observation microscopique NRB sessiles aérobies

(A) à l'état frais; (B) coloration de Gram

- L'observation microscopique (GX40) à l'état frais d'une culture bactérienne NRB sessiles anaérobies a révélé la présence de grands et petits bâtonnets isolés, mobiles dans tous les sens, quelques formes de vibrio avec toutefois des cocci mobiles, la coloration de Gram a montré qu'elles appartiennent aux bactéries Gram positif (GX100) ( figure 17).



(A) à l'état frais

(B) coloration de Gram

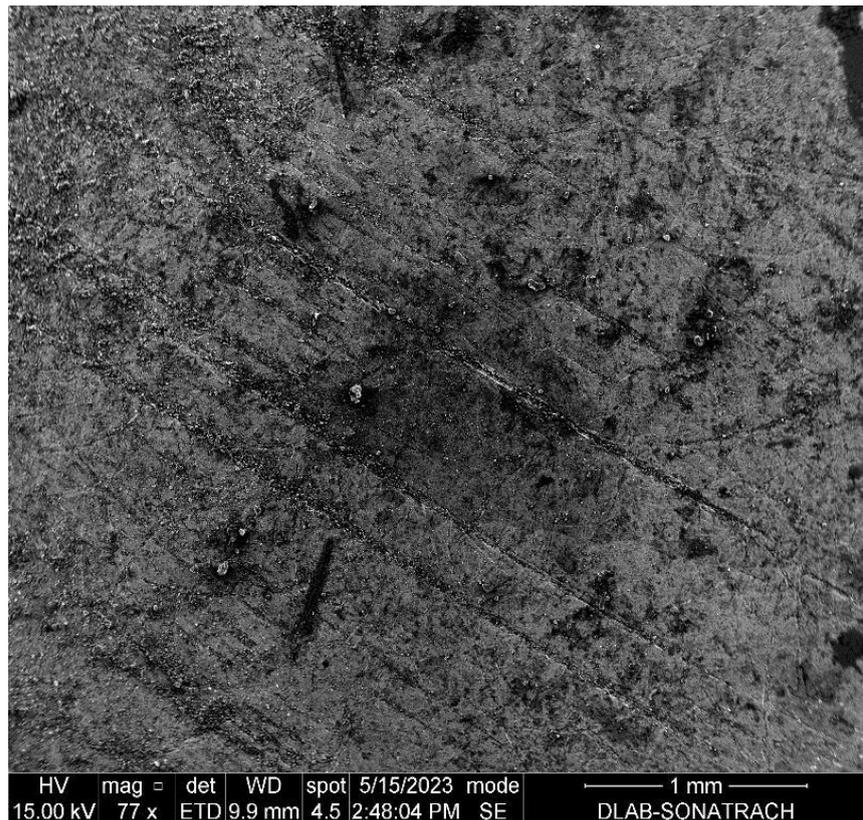
**Figure 17.** Observation microscopique des NRB sessiles anaérobies

### III.5. Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

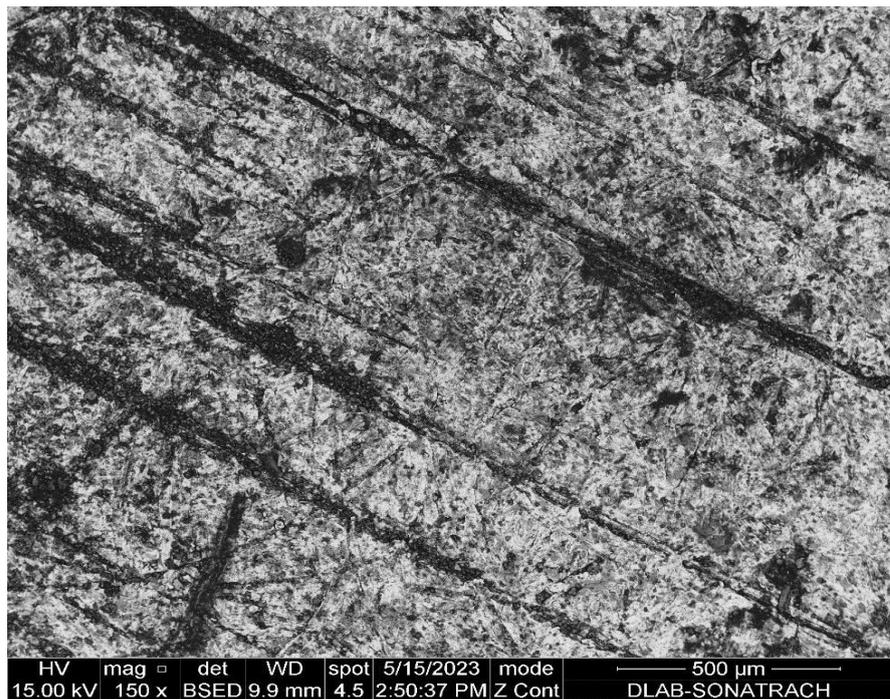
Le microscope électronique à balayage est un appareil qui trouve actuellement son emploi dans tous les domaines de la recherche, particulièrement dans l'industrie pétrolière. Son principe consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser

qui en réponse, réémet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface.

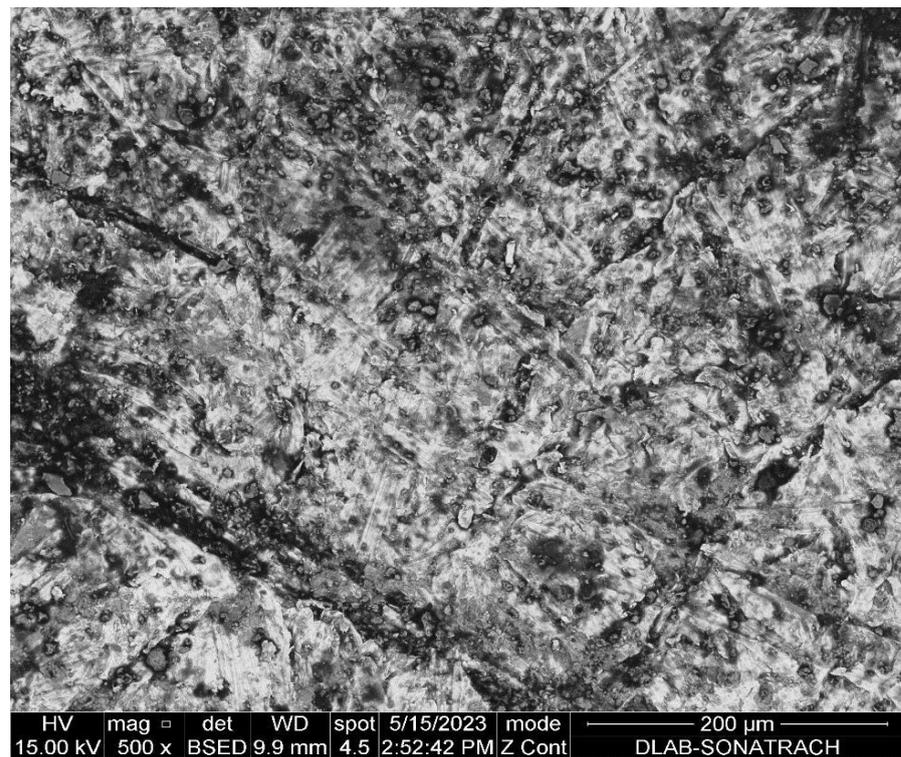
- ❖ Les résultats de l'observation sur le MEB du premier échantillon (culture mixte) de biostud pour l'isolement des anaérobies sont cartographiés et rapportés sur les pages A, B, C, D, E, F, G, et H.



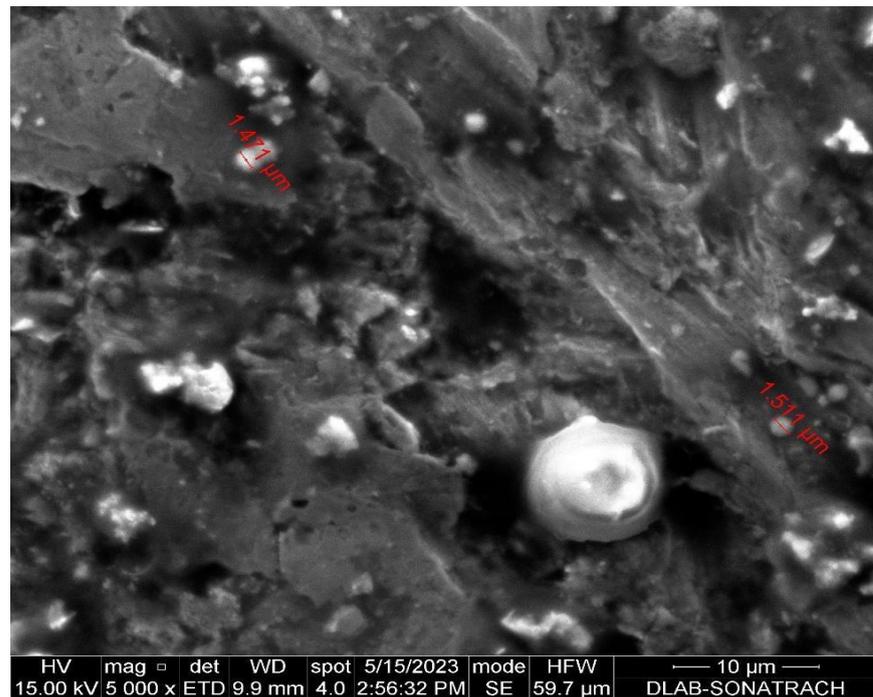
**Cartographe. A:** Observation de biofilm de la culture mixte



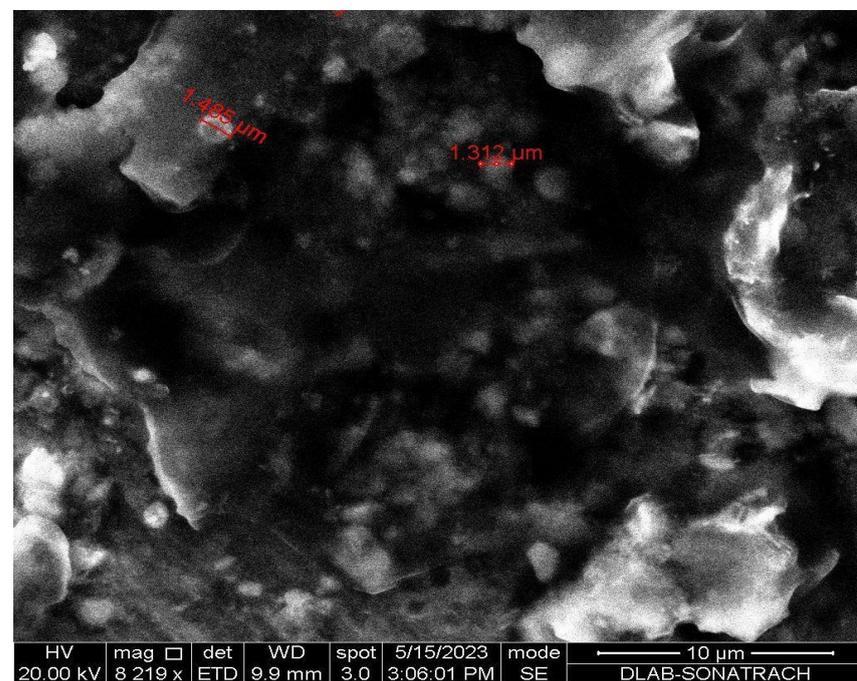
**Cartographe .B :** Observation de biofilm de la culture mixte



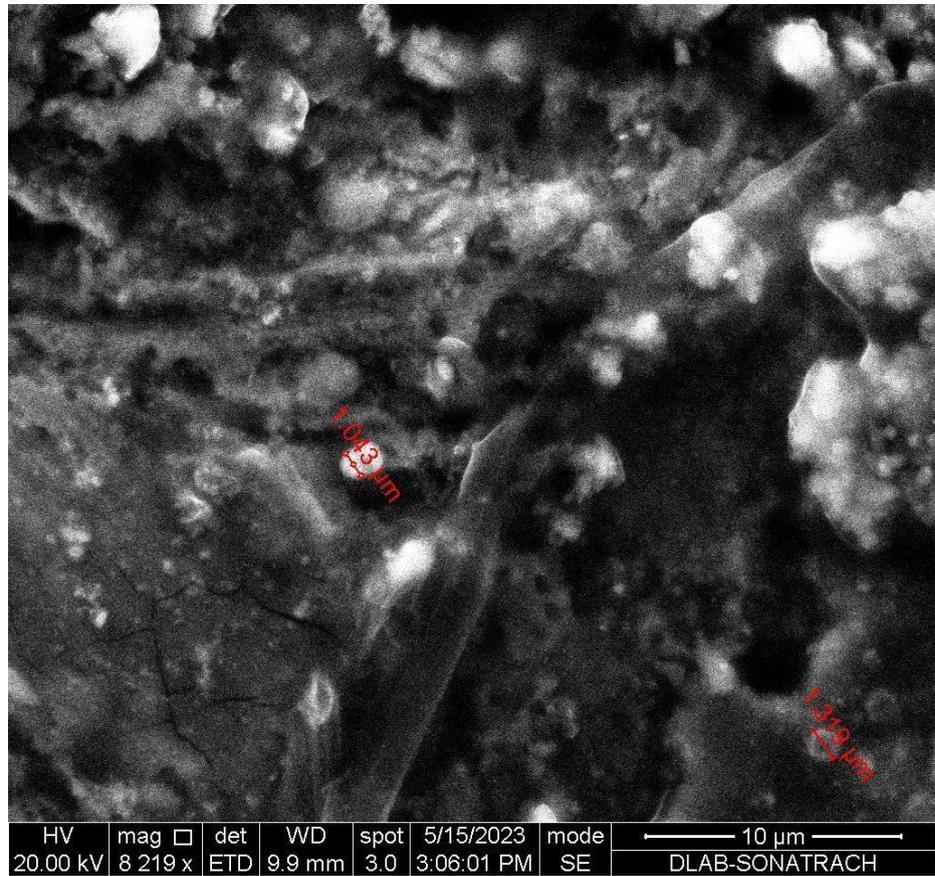
**Cartographe .C :** Observation de biofilm de la culture mixte



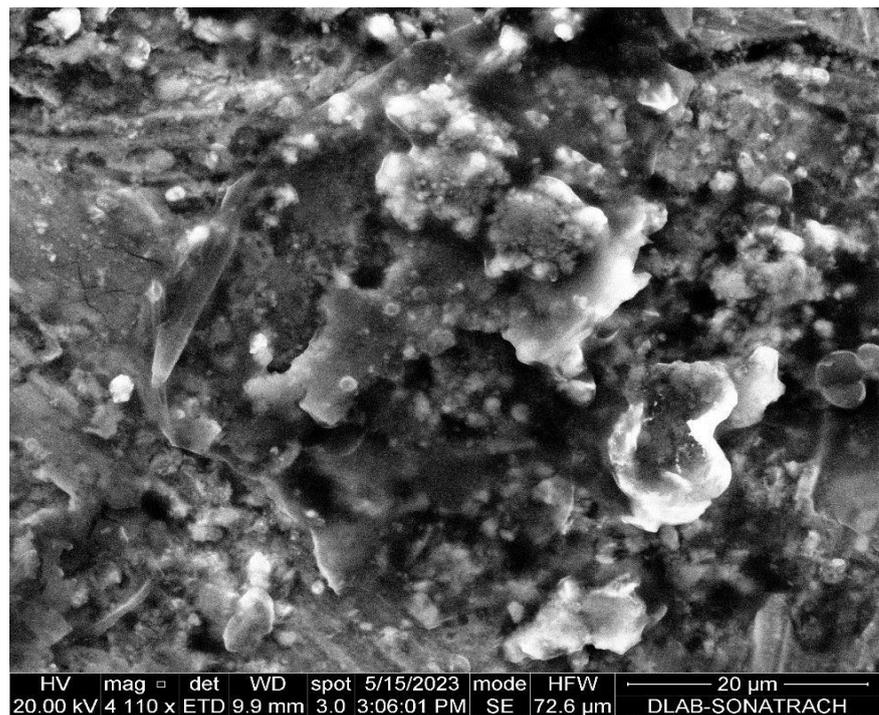
**Cartographe. D :** Observation de biofilm de la culture mixte



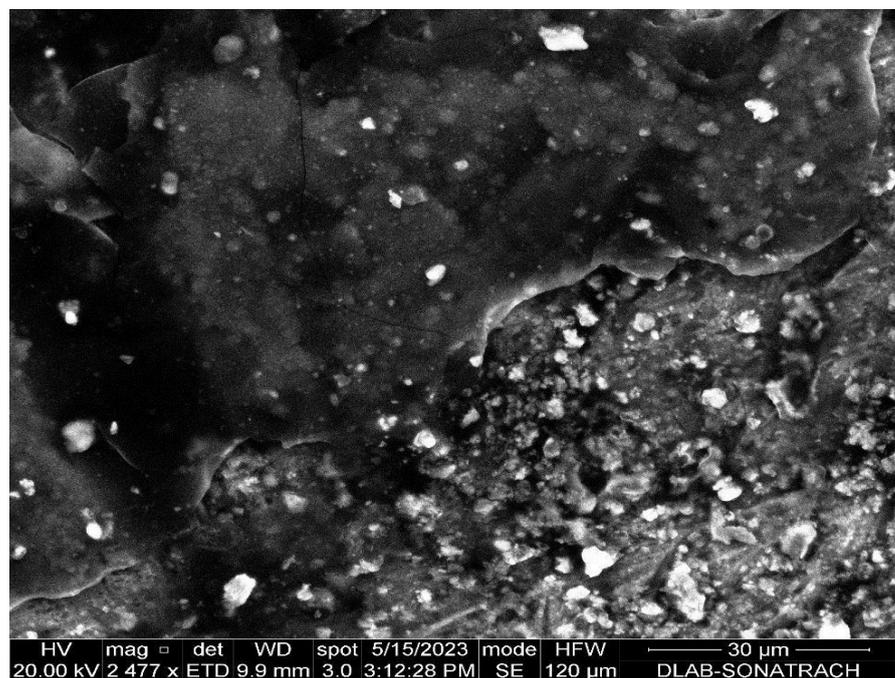
**Cartographe. E :** Observation de biofilm de la culture mixte



**Cartographe. F** : Observation de biofilm de la culture mixte



**Cartographe. G** : Observation de biofilm de la culture mixte



**Cartographe. H** : Observation de biofilm de la culture mixte

Les cartographes (D, E, F, G) nous montrent que le biofilm formé à la surface de biostud est un biofilm dense et hétérogène, présentant notamment des agrégats de bactéries noyées

dans les produits de corrosion, on a pu voir quelques cocci de différentes tailles, isolés ou en division de  $1.043\mu\text{m}$ ,  $1.319\mu\text{m}$ ,  $1.485\mu\text{m}$  et bien d'autres tailles. Selon **Thierry (2011)**, la longueur des bactéries est généralement comprise entre  $0.5$  et  $10\mu\text{m}$ .

Avec la colonisation et la propagation des bactéries, le nombre de bactéries attachées à la surface de l'échantillon (cartographies D, E, F) et les EPS se sont combinés pour former ce biofilm hétérogène.

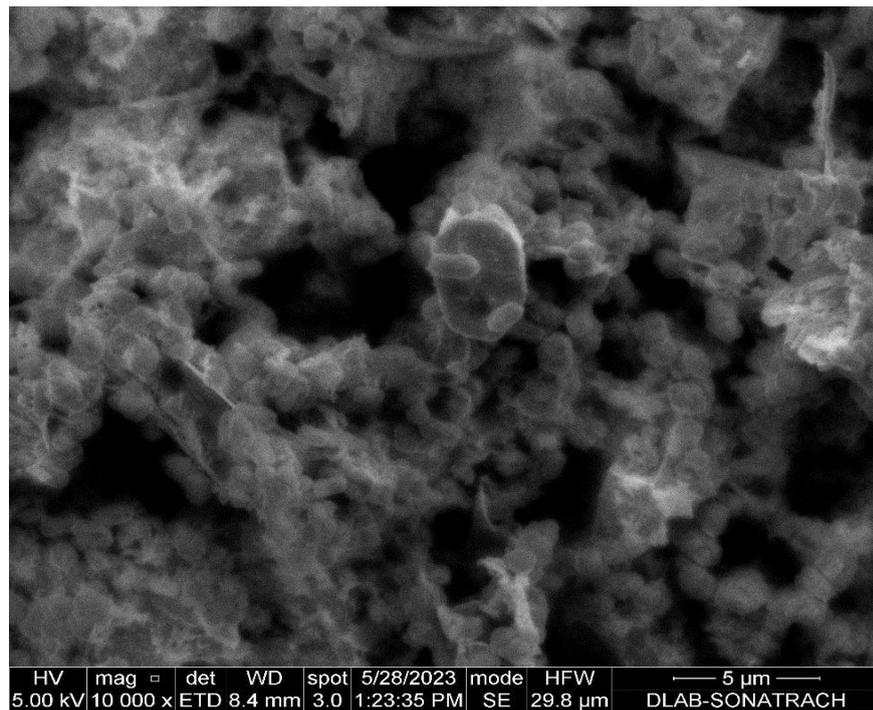
La synthèse intense d'EPS a dû caché la plupart des cellules du biofilm (cartographies D, E, F, G) ce qui a rendu l'observation difficile (**Vitor Silva et al., 2022**).

L'épaisseur du biofilm peut représenter l'état de croissance bactérienne (cartographies (B, C, H) car les bactéries planctoniques peuvent plus facilement obtenir les nutriments en s'immobilisant.

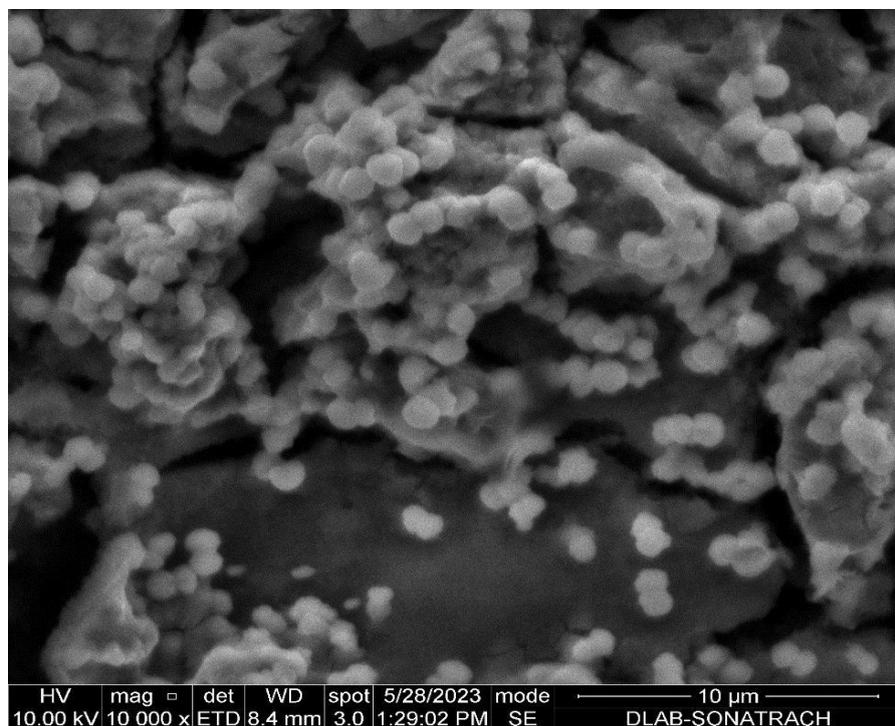
Les bactéries planctoniques tentent de s'attacher aux surfaces par divers mécanismes, et subir des changements phénotypiques qui déclenchent la formation des biofilms (**Costerton, 2012**).

Lorsque l'environnement interne des biofilms se détériore, les cellules sessiles peuvent mourir ou se détacher des biofilms (**Liu et al., 2021**), ce qui peut entraîner la migration et la fragmentation des biofilms (cartographe H).

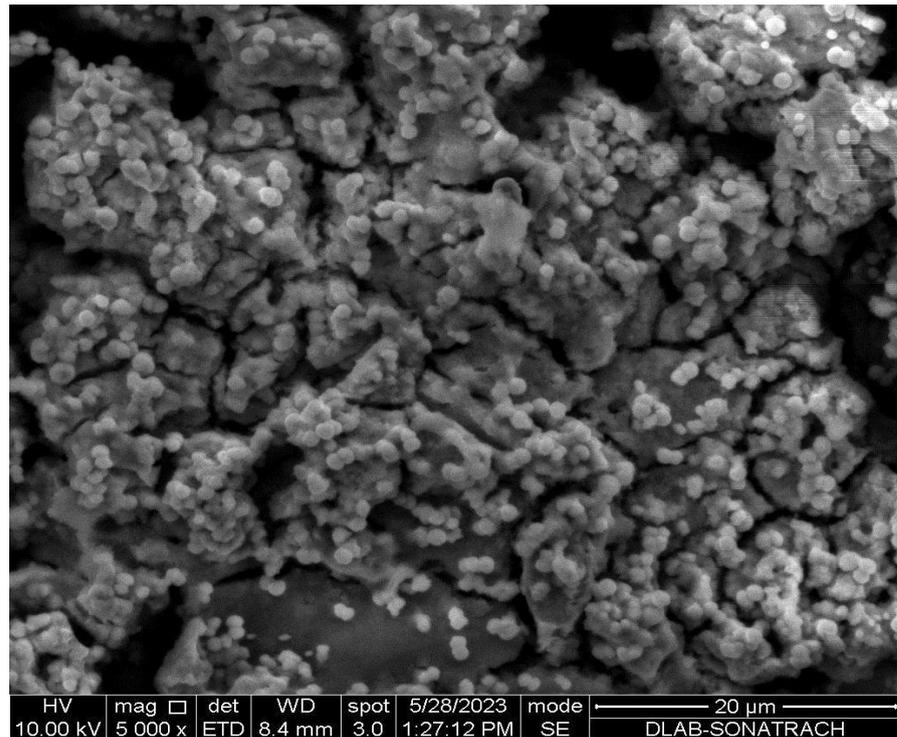
- ❖ Les résultats de l'observation sur le MEB de la surface d'échantillon de biostud de troisième génération des aérobies, sont rapportés sur les cartographies en dessous (I, J, K).



**Cartographe I :** Observation de la surface de l'échantillon des aérobies de la troisième génération



**Cartographe. J :** Observation de la surface de l'échantillon des aérobies de la troisième génération



**Cartographe. K :** Observation de la surface de l'échantillon des aérobies de la troisième génération

Les trois cartographes nous montrent clairement la formation d'un biofilm homogène sur la surface de l'acier. On voit des cocci séparés, en diplocoque et en cubes etc, qui se sont combinés avec les EPS.

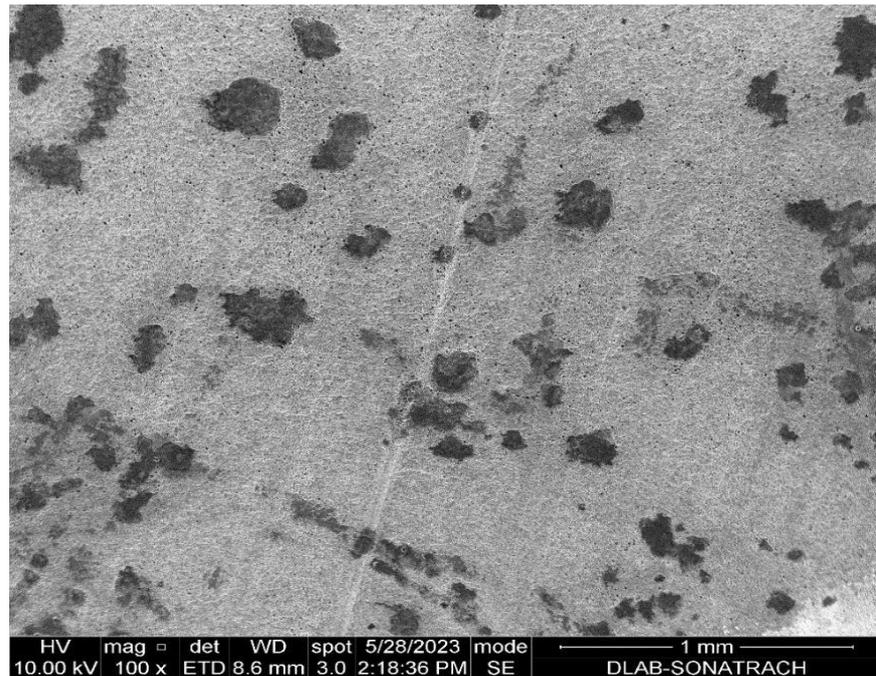
➤ Les résultats obtenus des deux observations (le MEB et au microscope optique) sont cohérents.

-Le biofilm formé sur le biostud de premier échantillon des anaérobies est un biofilm dense et hétérogène (NRB, BSR, BTR...).

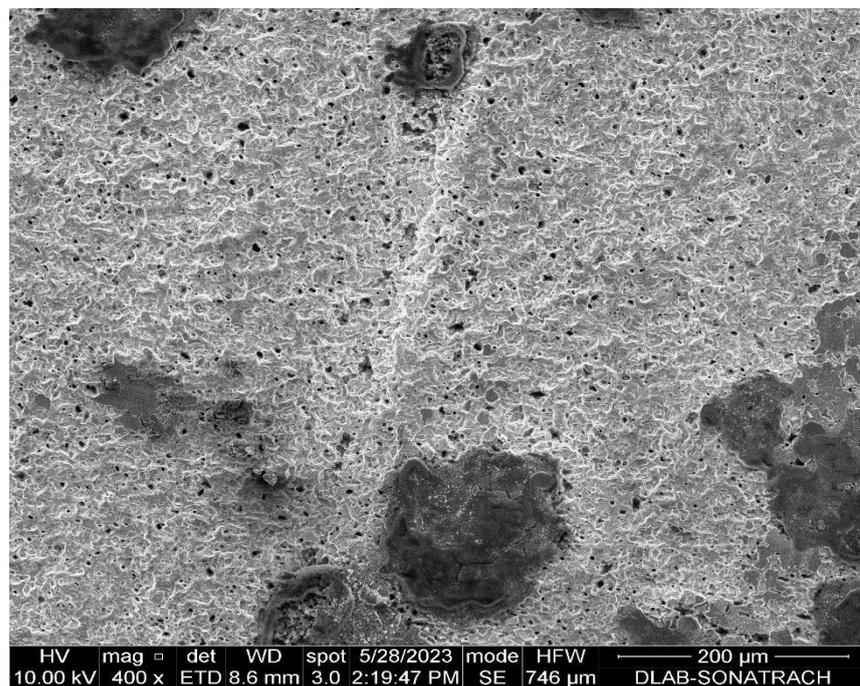
-Le biofilm formé sur le biostud de la culture de la troisième génération des aérobies est un biofilm dense et homogène (NRB).

-Les biofilms nouvellement formés (formé au laboratoire) sont souvent monocouches, à l'inverse des biofilms plus anciens (formé sur le terrain), qui sont stratifiés (**Bury-Moné, 2007**).

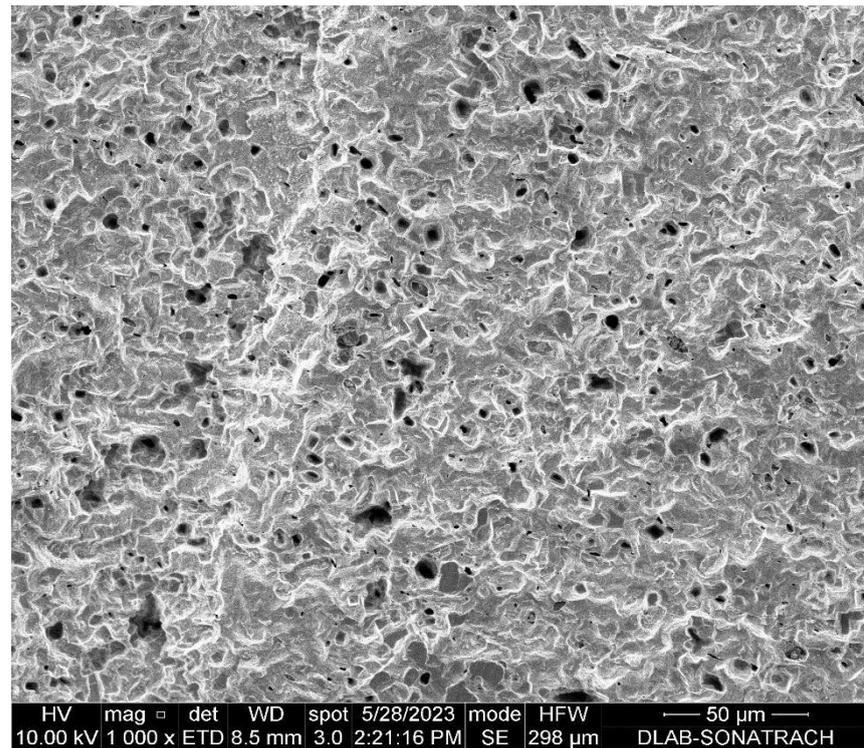
❖ Les résultats de l'observation sur le MEB de la surface d'échantillon de biostud après le détachement de biofilm (cartographes L, M, N, O et P).



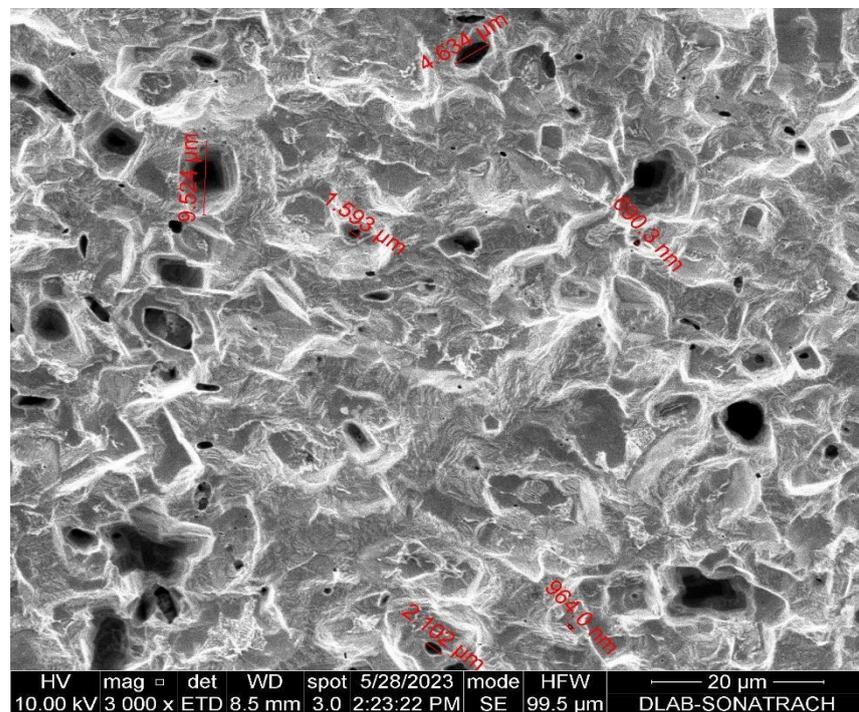
**Cartographe. L :** Observation de la surface de l'échantillon après le détachement de biofilm



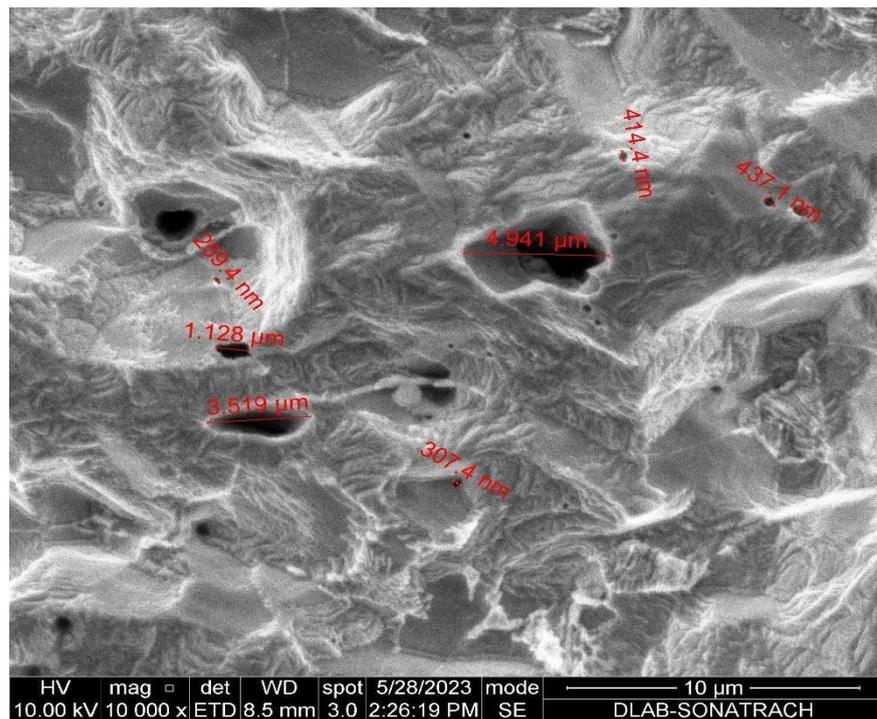
**Cartographe. M :** Observation de la surface de l'échantillon après le détachement de biofilm



**Cartographe. N :** Observation de la surface de l'échantillon après le détachement de biofilm



**Cartographe. O:** Observation de la surface de l'échantillon après le détachement de biofilm



**Cartographe. P:** Observation de la surface de l'échantillon après le détachement de biofilm

Les cartographes L, M, N, O et P montrent la morphologie de la surface de l'échantillon après l'élimination du biofilm et des produits de corrosion.

On observe la morphologie des puits. La profondeur et la largeur (cartographes O et P) ont été mesurées afin de caractériser clairement les piqûres (**Liu et al., 2021**).

Les zones de 10μm, 20μm, 50μm et 200μm montrent les échelles des cartographes, ils ont été sélectionnés au hasard pour caractériser le biofilm. Des piqûres plus prononcées et plus denses sont apparues 3.519μm, 4,941μm (l'épaisseur est évaluée par la distance entre le point focal haut du biofilm et le point focal bas).

La morphologie et les images tridimensionnelles montrent que le NRB favorise la formation de corrosion par piqûres.

Dans des conditions aérobies, les ions nitrate réagissent avec l'oxygène pour former de l'ammoniaque, ce qui entraîne une corrosion de l'acier, la corrosion induite par *P. aeruginosa* en milieu aérobie est plus grave qu'en milieu anaérobie (**Jianhua Tang et al., 2022**).

Comparativement, la corrosion enclenchée par les NRB a favorisé une plus petite agrégation de piqûres, mais la plupart d'entre elles étaient très profondes. Alors que la corrosion enclenchée par les SRB a produit plus de piqûres, mais moins profondes. Cela peut s'expliquer

par le fait que la réduction des nitrates est thermodynamiquement plus rapide que la réduction des sulfates, qui consomme facilement plus d'énergie que la réduction des nitrates (**Xu et al., 2013**).

L'analyse des coupons métalliques par MEB a révélé la structure des biofilms qui se sont développés sur les coupons dans des conditions normales d'exploitation pétrolière, et nous a indiqué que les biofilms étaient associés à la corrosion localisée des surfaces métalliques des coupons des oléoducs.

Les résultats démontrent que la corrosion par piqûres sur les métalliques en présence de micro-organismes est inévitable.

## **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

Au terme de ce travail relatif à la caractérisation d'un biofilm corrosif formé sur un acier inoxydable au niveau d'une installation du champ de Hassi Messaoud, il apparaît que l'installation évaluée à l'aide des biostuds placés à l'intérieur d'un appareil de control de terrain bioprob, est dans un seuil critique de contamination par les bactéries sessiles de corrosion.

Des concentrations très élevées en bactéries sessiles réductrices de nitrates de corrosion avec un niveau de contamination sévère de nature mixte aéro-anaérobies.

Ce travail a fourni des preuves montrant que les bactéries sessiles réductrices de nitrates et les produits sécrétés accélèrent le processus global de corrosion.

Les résultats des observations au microscope électronique à balayage ont montré que le biofilm formé par les NRB accélérât la formation de piqûres sur l'acier.

Les informations recueillies par notre étude nous permettent de confirmer que le niveau de corrosion est critique, elles montrent également que le problème de la bio-corrosion est bien réel et nécessite une imminente prise en charge, surtout en ce qui concerne les zones les plus sensibles (soudures, coudes ...etc).

Nous recommandons de procéder à l'évaluation et à la cartographie de la corrosion bactérienne au niveau de toutes les installations afin de mettre en avant les installations critiques en corrosion bactérienne et d'éviter d'éventuels percements de ces installations lors de leurs mises en service.

Il est recommandé :

de mettre en place une cellule de suivi de l'évolution de la bio-corrosion au niveau des installations du champ;

de procéder à l'homologation des produits de traitement par biocide, au niveau du laboratoire et sur site, afin de traiter les installations;

de surveiller régulièrement les facteurs influant;

d'élaborer un plan descriptif d'inspection des équipements en service ou en arrêt pour l'évaluation des risques de dégradation, de la réparation et définition des moyens et des périodicités des contrôles à effectuer en service et aux arrêts ultérieur.

## Conclusion et perspectives

L'ensemble de ce travail pluridisciplinaire est une partie intégrante d'un domaine de recherche en pleine expansion nécessaire à une meilleure connaissance des microorganismes NRB sessiles, l'identification des espèces les plus corrosifs et à l'amélioration des méthodes de prévention et de lutte contre la corrosion.

# Références Bibliographiques

- Al Zubaidi I., Jones R., Alzughaihi M., Albayyadhi M., Darzi F. et Hussameldin I. (2018).** Le glycérol brut comme inhibiteur de corrosion innovant Appl. Syst. Innov. 2018. 1, 12; DOI: 10.3390/asi1020012.
- Alain D., Fournier M. et Darmoun Z. (2006).** Défense de l'oxygène chez les bactéries sulfato-réductrices. *Journal of biotechnologie* tome 126, numéro 1, 20 octobre 2006. page 87-100. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.041>.
- Al-Sulaiman S., A Al-Shamari A., A Jarragh A., Khuraibut Y. et A Balasundaram. (2016).** Plant Integrity Management through Internal Corrosion Monitoring and Inspection. *Kuwait Oil Co., Ahmadi, Kuwait*.
- Amy J., Burgin., Stephen K. et Hamilton. (2007).** Le rôle de la dénitrification dans les écosystèmes aquatiques. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2007\)5](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2007)5) [89: [HWOTRO](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2007)5)]2.0.CO;2. API American Petroleum Institute. (1982). Recommendation Practice for Biological Analysis of Subsurface injection Waters. Third Edition.
- Batis G., Kouloumbi N. et Kotsakou K. (1997).** Corrosion et protection des aciers au carbone dans les fluides géothermiques à basse enthalpie. Février 1997, pages 65-82. [https://doi.org/10.1016/S0375-6505\(96\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0375-6505(96)00030-2).
- Batmanghelich F., Lei L. et Youngwoo S. (2017).** Influence of multispecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Desulfovibrio vulgaris* on the corrosion of cast iron.
- Beese-Vasbender P., Grote J., Garrelfs J., Stratmann M. et Mayrhofer K. (2015).** Selective microbial electrosynthesis of methane by a pure culture of a marine lithoautotrophic archaeon *Bioelectrochemistry* Volume 102, April 2015, Pages 50-55.
- Béranger G. et Mazille H. (2002).** Corrosion des métaux et alliages. Mécanismes et phénomènes. Éd. Lavoisier, Paris. Pp : 121-404.
- Bo L., Meihui S., Fangyuan L., Cuiwei D. et Xiaogang L. (2021).** Study of biofilm-influenced corrosion on X80 pipeline steel by a nitrate-reducing bacterium, *Bacillus cereus*, in artificial Beijing soil. *Colloids and Surfaces B: Bio-interfaces* 197 (2021) 111356.
- Bonifay V., Biri B. et Suflita J. (2014).** Identification and characterization of microbial biofilm associated with corroded oil pipeline surfaces. *The Journal of Bio Adhesion and Biofilm Research*, 30:7, 823-835, DOI:10.1080/08927014.2014.931379.
- Bury-Moné S. (2007).** Les biofilms. Polycopié. Ecole Normale Supérieure de Cachan.
- Chantereau J. (1993).** Corrosion bactérienne. Lavoisier - Technique Et Documentation. *Corrosion Science* 121 (2017) 94-104.
- Costerton W., Lewandowski Z., Caldwell D., Korber D. et Lappin-Scott H. (1995).** Biofilms microbiens. *Revue annuelle de microbiologie*. Vol 49. Num 1. Pages. 711-745.
- Davey M. et George A. (2000).** Biofilms microbiens: de l'écologie à la génétique moléculaire. DOI: <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.847-867.2000>.
- Davidova., Hicks M., Fedorak P. et Suflita J. (2001).** the influence of nitrate on microbial processes in oil industry production waters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 27, 80-86.
- Dellaras C. (2007).** Pratique en microbiologie de laboratoire Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier, Paris ISBN: 978-2-7430-1565-7. développement en tant que biofilm. DOI : <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>.

- Dupont I. (2005).** Généralités sur la bio-corrosion moyens de lutte.
- Emde K., Smith D. et Facey R. (1992).** Enquête initiale sur la corrosion sous influence microbienne (MIC) dans un système de distribution d'eau à basse température. Fabrication et transport Woodhead Publishing Series dans l'énergie 2017, Pages 3-30 <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101105-8.00001-2>.
- Fu Q., Xu J., Wei B., Qin Q., Gao L., Bai Y., Yu C. et Sun C. (2021).** Effect of alternating current and nitrate reducing bacteria on corrosion of X80 pipeline steel in Shenyang soil solution. *Engineering Failure Analysis* 129 (2021) 105688.
- Gassarellil B. et H Bouledroua H. (2016).** Etude des phénomènes de Corrosion liés à la Détérioration des Aciers pour tubes Galvanisés. Mémoire de Master en Génie des matériaux.
- George A., O'Toole et Kolter R. (1998).** La motilité des flagelles et des contractions musculaires est nécessaire au développement du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>.
- Gevertz D., Telang J., Voordouw G. et Jenneman G. (2000).** Isolation and Characterization of Strains CVO and FWKO B, Two Novel Nitrate-Reducing, Sulfide Oxidizing Bacteria Isolated from Oil Field Brine. *Applied and Environmental Microbiology*, June 2000, p. 2491–2501. Vol. 66, No.6.
- Héctor A., Videla L. et Herrera K. (2005).** microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY* (2005) 8:169-180
- Hubert C. et Voordouw G. (2007).** Contrôle de l'acidification des champs pétrolifères par la réduction des nitrates *Sulfurospirillum* spp. Qui surpasse les bactéries sulfato-réductrices pour les donneurs d'électrons organiques.
- Iino T., Shono N., Ito K., Nakamura R., Sueoka K., Harayama S. et Ohkuma M. (2021).** Nitrite as a causal factor for nitrate-dependent anaerobic corrosion of metallic iron induced by *Prolixibacter* strains. DOI:10.1002/mbo3.1225. Institute of Materials, Minerals, Mining, and ASM.10.1179/1743280414Y.0000000035.Vol59.
- Jia R., Yang D., Xu D. et T Gu. (2017).** Electron transfer mediators accelerated the microbiologically influence corrosion against carbon steel by nitrate reducing *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Bioelectrochemistry* 118 (2017) 38–46.
- Karimi H. et Javidi M. (2019).** Assessment and influence of temperature, NaCl and H<sub>2</sub>S on CO<sub>2</sub> corrosion behavior of different microstructures of API 5L X52 carbon steel in aqueous environments. *Journal of naturel gas science and engineering*. Volume, July 2019, Pages 93-107. <https://doi.org/10.1016/j.jngse.2019.04.023>.
- Kartsonakis I., Daniilidis I. et Kordas G. (2008).** Encapsulation de l'inhibiteur de corrosion 8-hydroxyquinoline dans des nano conteneurs en oxyde de cérium. *J Sol-Gel Sci Technol* 48, 24–31 (2008). <https://doi.org/10.1007/s10971-008-1810-4>.
- Kato S. (2016).** Transfert d'électron extracellulaire microbien et sa pertinence pour la corrosion du fer. *Microbial biotechnologie*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12340>.

- Katsikogianni M. et Missirlis Y. (2004).** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria material interaction. *M. European Cells and Materials* Vol. 8.2004 (pages 37-57) DOI:10.22203/eCM.v008a05.
- Koch G. (2017).** Trends in oil and gas corrosion research and technologies. *L' eau, l'industrie, les nuisances.* 2005Num 284, pp 51-55, 5 p. ref: 32.
- L'Hostis V. (2002).** Rôle enzymatique d'un biofilm sur la corrosion d'aciers inoxydables immergés en eau de mer naturelle. Thèse de doctorat en Océanologie, météorologie, environnement à Paris.
- Lenhart T., Duncan K., Beech I., Jan S., Whitney S., Tobin O., Griffin B., Zumft W. et schink B. (2007).** Rendements décroissance dans la dénitrification bactérienne et l'ammonification des nitrates. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-06>.
- Liang C., Wang H. et Huang N. (2014).** Effets des bactéries sulfato-réductrices sur le comportement à la corrosion de l'acier inoxydable duplex 2205. *J. Fer Acier Res. Int.* 21, 444–450 (2014). [https://doi.org/10.1016/S1006-706X\(14\)60069-8](https://doi.org/10.1016/S1006-706X(14)60069-8).
- Liduino V., Batalha G., Flávia E., Sérvulo C. et Cammarota M. (2022).** Investigation of carbon steel corrosion by oilfield nitrate and Sulfate-reducing prokaryotes consortia in a hypersaline environment. *Environmental Science and Pollution Research* (2023) 30:10830–10840. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22896-y>.
- Little J. et Lee J. (2014).** Corrosion influencée par la microbiologie. <https://doi.org/10.1179/1743280414Y.0000000035>
- Little J. et Lee J. (2014).** microbiologically influenced corrosion: an update. *Institute of Materials, Minerals, Mining, and ASM.* 10.1179/1743280414Y.0000000035. Vol 59.
- Lynch J. (2001).** Analyse physico-chimique des catalyseurs industriels. Manuel pratique de caractérisation Nb. De *pages*314. ISBN13978-2-7108-0750-6.
- Magot M., Ollivier B. et Kcpatel B. (2000).** Microbiologie des réservoirs pétroliers. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77,103-116 (2000). <https://doi.org/10.1023/A:1002434330514>.
- Maha M. (2009).** Mécanismes de transfert direct en corrosion microbienne des aciers : Application à *Geobacter sulfurreducens* et à l'hydrogénase de *Clostridium acetobutylicum*. Thèse en vue de l'obtention du Doctorat de l'université de Toulouse.
- Marchal N. et Bourdon J. (1973).** Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. *Biologie appliquée.* p.175-179.
- Merino S., Gavín R., Vilches S., Shaw J. et Tomás J. (2003).**  
Un facteur de colonisation (production de flagelles latéraux) des *Aeromonas* mésophiles spp. Est inactif dans les souches d'*Aeromonas salmonicida*. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.663-667>.
- Muthukumar N., Rajasekar A., Ponmariappan S., Mohanan S., Maruthamuthu S., Muralidharan S., Subramanian P., Palaniswamy N. et Raghavan M.(2003).** Corrosion influencée par la microbiologie dans les pipelines de produits pétroliers - Une revue. Page.1012-1022. *IJEB* Vol.41 (09).

- Myhr S. et Torsvik T. (2000).** Denitrovibrio acetiphilus, un nouveau genre et une nouvelle espèce de bactérie réductrice de nitrate dissimilatrice isolée d'une colonne modèle de réservoir de pétrole. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2000), 50, 1611–1619.
- NACE Standard RP0775. (2005).** Standard Recommended Practice Preparation, Installation, Analysis, and Interpretation of Corrosion Coupons in Oilfield Operations NACE Standard Item. No. 21017.
- Normand B., Bébère N., Caroline R. et Wery M. (2004).** Prévention et lutte contre la corrosion. Presses polytechniques et universitaires Romandes.
- Pallud C. et Cappellen P. (2006).** Cinétique de réduction microbienne des sulfates dans les sédiments estuariens. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. Tome 70, Numéro 5, Pages 1148-1162. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2005.11.002>.
- Prabha S., Rathish J., Dorothy R., Brindha G., Pandiarajan M., Al-Hashem A. et S Rajendran. (2014).** Corrosion problems in petroleum industry and their solution. *Eur. Chem. Bull.*, 2014, 3(3), 300-307.
- Renata C., Campoccia D., Speziale P., Montanaro L. et Costerton J. (2012).** Formation de biofilm dans les infections d'implants à *Staphylococcus*. Un examen des mécanismes moléculaires et des implications pour les matériaux résistants aux biofilms. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.031>.
- Sauer K., Anne K., Camper D., Ehrlich J., Costerton W. et Davies D. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* affiche plusieurs phénotypes.
- Sauer K., MC C., AH R., LAH Z., Davies D. et Gilbert P. (2004).** Caractérisation de la dispersion induite par les nutriments dans le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.186.21.7312-7326.2004>.
- Sayah H. (2008).** Etude du phénomène de corrosion microbienne dans les installations de production et de raffinage du pétrole<sup>o</sup> d'ordre 12/2008-M/C.I.
- Tang J., Guo R., Zhang X. et Xu Z. (2022).** Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on corrosion of X65 pipeline steel. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12588>.
- Telang A., Ebert S., Foght J., Westlake D., Jenneman G., Gevertz D. et Voordouw G. (1997).** Effet de l'injection de nitrate sur la communauté microbienne dans un champ pétrolifère tel que surveillé par sondage inversé du génome d'un échantillon.
- Thierry D. (2011).** Corrosion protection and corrosion mechanisms of continuous galvanizes steel sheet with focus on new coating alloys. *French Corrosion*.
- Tiedje J. (1988).** Ecology of Denitrification and Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium. Zehnder, AJB, Ed., *Biologie des micro-organismes anaérobies*, John Wiley and Sons, New York, 179-244.
- Voordouw G. (2011).** Microbiologie pétrolière liée à la production : avancées et perspectives. *Opinion actuelle en biotechnologie*. Tome 22, Numéro 3, juin 2011, Pages 401-405. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.005>.

- Voordouw G., Armstrong S., Reimer M., Fouts B., Telang A., Shen Y. et Gevertz D. (1996).** La caractérisation des gènes d'ARNr 16S des communautés microbiennes des champs pétrolifères indique la présence d'une variété de bactéries sulfato-réductrices, fermentatives et oxydant les sulfures. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1623-1629.1996>.
- William G. (1950).** Estimation of Bacterial Densities by Means of the "Most Probable Number". *Biometrics*, Vol. 6, No. 2, (Jun. 1950), pp. 105-116 Published by: International Biometric Society. <http://www.jstor.org/stable/3001491>.
- Wolfaardt G., Archibald R. et Cloete T. (1991).** the use of DAPI in the quantification of sessile bacteria on submerged surfaces. *Biofouling*, 1991, Vol. 4, pp.265-274. [www.im.microbios.org](http://www.im.microbios.org).
- Xia J., Yang C., Xu D., Sun D., Nan L., Sun Z., Li Q. et Gu T. (2015).** Étude en laboratoire de la résistance à la corrosion sous influence microbiologique (MIC) d'un nouvel acier inoxydable duplex 2205 contenant du cuivre en présence d'un biofilm marin aérobie de *Pseudomonas*. *Biofouling*, 31:6, 481.
- Xu D. et Tingyue Gu. (2014).** Carbon source starvation triggered more aggressive corrosion against carbon steel by the *Desulfovibrio vulgaris* biofilm *International Biodeterioration and Biodegradation* 91 (2014) 74e81.
- Xu D., Li Y, Song F. et Gu T. (2013).** Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing bacterium *Bacillus licheniformis*. *Corrosion Science* 77 (2013) 385–390.
- Yeoh Y., Paungfoo-Lonhienne C., Dennis P., Robinson N., A.Ragan M., Schmidt S. et Hugenholtz P.(2016).** Le microbiome racinaire central des cannes à sucre cultivées sous diverses applications d'engrais azotés. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12925>.

# Annexes

Annexe1

**Composition des milieux de culture**

**Milieu de culture liquide LB-NO<sub>3</sub>**

Sa composition est la suivante (g/L) :

Nitrate de potassium KNO<sub>3</sub> 10

Chlorure de sodium NaCl 5

Trypone 10

Extrait de levure 5

pH de 7,0-7,2

Stérilisé à 121°C pendant 20 min.

Argon gaz inerte 1bar

Eau distillée

**Milieu de culture gélosé LB-NO<sub>3</sub>**

Sa composition est la suivante (g/L) :

Nitrate de potassium KNO<sub>3</sub> 10

Chlorure de sodium NaCl 5

Trypone 10

Extrait de levure 5

Agar 10

Eau distillée

Le tout stérilisé à 121°C pendant 20 min.

**Bouillon nitraté**

Infusion cœur-cerveille 25 g

Nitrate de sodium 10 g

pH = 7.2 ± 0.2

*Eau distillée*

Le tout stérilisé à 121°C pendant 20 min.

**Composition des réactifs****Violet de Gentiane**

Violet de Gentiane 01 g

Ethanol à 90 % 10 ml

Phénol 02 g

Eau distillée 100 ml

**Lugol**

Iode 01 g

Iodure de potassium 02g

Eau distillée 300 ml

**Fuchsine**

Fuchsine basique 01 g

Alcool éthylique à 90° 10 ml

Phénol 05 g

Eau distillée 100 ml

**Réactif de Griess I (NRI)**

Acide parasulfanilique 8g

Acide acétique 5N 1L

**Réactif de Griess II (NRII)**

$\alpha$ -naphtylamine 6 g

Acide acétique 5N 1L

**Alcool**

Ethanol 30, 50, 70, 90 et 100 %

**La solution saline tampon phosphate (ABS)**

NaCl 8.7g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.23g

Eau distillée 1000 millilitres

**La Solution de Clark**

2,5 % de SnCl<sub>2</sub> et

Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dans du HCl concentré

Annexe 2

Exemple de calcul de nombre de bactéries sessiles dans les bio probes en utilisant les tables NPP.

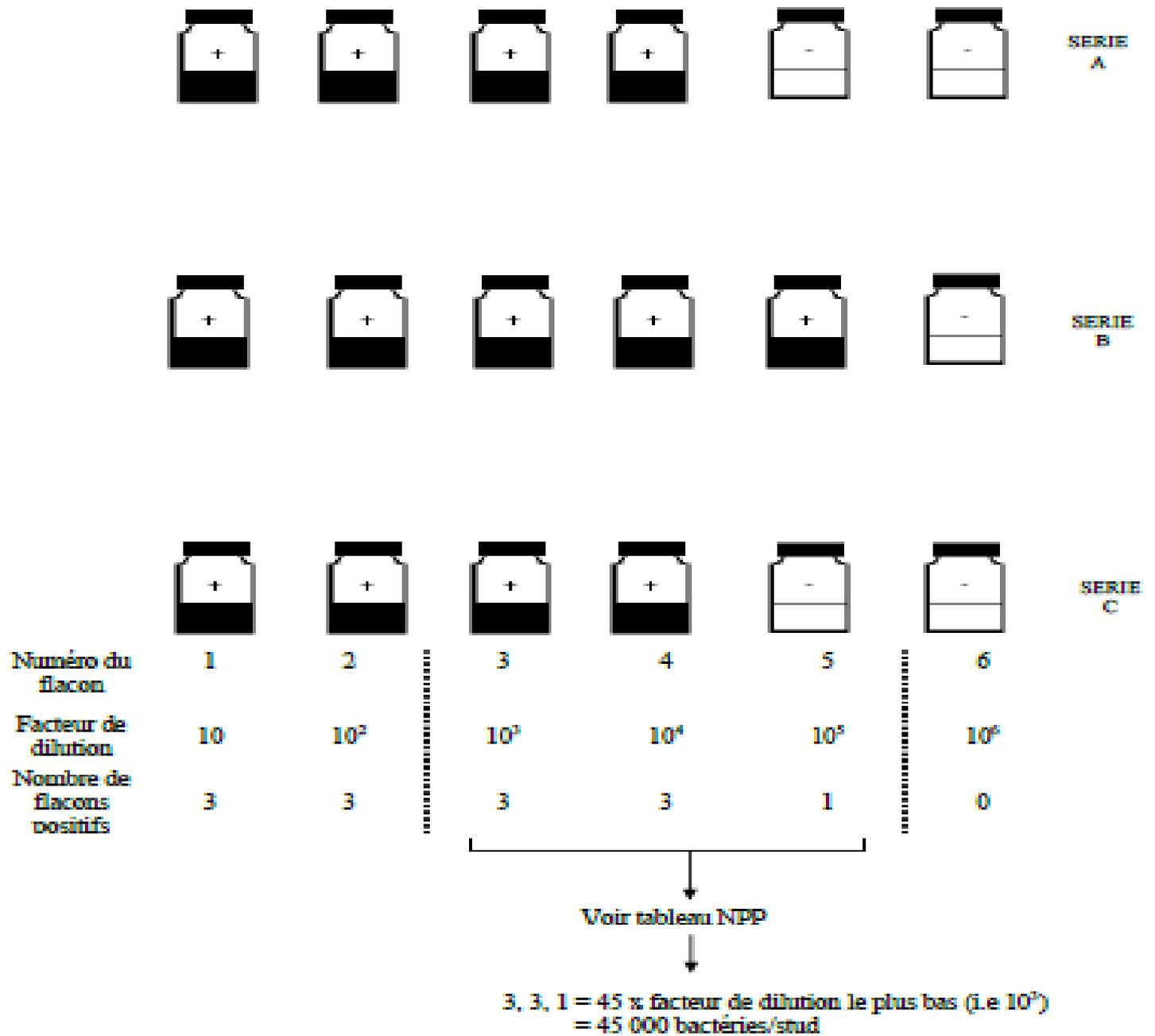


Figure.9. Procédure d'inoculation par la méthode des dilutions successives (sessiles).

Table du nombre le plus probable NPP DE MAC GRADY

Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

## Résumé

La corrosion sous influence microbiologique (MIC) ou bio-corrosion est un phénomène associé aux activités bactériennes par la formation de biofilms complexes, créent des conditions favorables à la dégradation des surfaces métalliques, ce qui provoque des dommages connus sous le nom de piqûres. L'objectif de cette étude est de caractériser un échantillon de biofilm NRB sessile aérobies et anaérobies formé sur un coupon métallique (biostud) en acier inoxydable placé dans un dispositif de terrain (bioprob) après 45 jours dans une exploitation pétrolière et gazière. Cette étude a permis d'isoler les NRB sessiles aérobies et anaérobies sur le milieu gélose LB-NO<sub>3</sub>, voir la forme bâtonnets, cocci, la mobilité et le Gram. Le dénombrement des colonies sur la gélose LB-NO<sub>3</sub> et sur le milieu liquide LB-NO<sub>3</sub> par la méthode NPP de plus, est réalisé le test de corrosivité sur boîte, réduction de nitrate et de la densité optique, a permis de déterminer la croissance favorable des NRB sessiles anaérobies facultatives sur le coupon d'acier comme donneur d'électron et le nitrate comme accepteur finale d'électrons. Les dommages provoqués par le processus dynamique de biofilm NRB sessiles anaérobies facultatives sur le coupon a révélé des piqûres profondes à l'observation au microscope électronique à balayage.

**Mots-clés:** bio-corrosion, NRB sessiles, réduction de nitrate, piqûres.

## Abstract:

Microbiologically influenced corrosion (MIC) or bio-corrosion is a phenomenon associated with bacterial activity through the formation of complex biofilms, creating favorable conditions for the degradation of metal surfaces, resulting in damage known as pitting. The aim of this study was to characterize an aerobic and anaerobic sessile NRB biofilm sample formed on a stainless steel metal coupon (biostud) placed in a field device (bioprob) after 45 days in oil and gas operations. This study isolated sessile aerobic and anaerobic NRBs on LB-NO<sub>3</sub> agar medium, looking at rod shape, cocci, mobility and Gram. Colony counts on LB-NO<sub>3</sub> agar and LB-NO<sub>3</sub> liquid medium using the MPN method medium. The corrosivity test on plate, nitrate reduction and optical density, determined the favorable growth of facultative anaerobic sessile NRB on steel coupon as electron donor and nitrate as final electron acceptor. The damage caused by the dynamic process of facultative anaerobic sessile NRB biofilm on the coupon revealed deep pitting on SEM observation.

**Keywords:** bio-corrosion, sessile NRB, nitrate reduction, stings.

## ملخص

التآكل تحت التأثير الميكروبيولوجي (MIC) أو التآكل الحيوي هو ظاهرة مرتبطة بالأنشطة البكتيرية من خلال تكوين أغشية حيوية معقدة، مما يخلق ظروفًا مواتية لتدهور الأسطح المعدنية، مما يسبب الضرر المعروف باسم التآكل. الهدف من هذه الدراسة هو توصيف عينة من الغشاء الحيوي اللاهوائي NRB المتشكل على قسيمة معدنية (biostud) مصنوعة من الفولاذ المقاوم للصدأ موضوعة في جهاز ميداني (bioprob) بعد 45 يومًا من استغلال النفط والغاز. جعلت هذه الدراسة من الممكن عزل NRBs الهوائية واللاهوائية على وسط LB-NO<sub>3</sub>، شكل عصيات، والمكورات، والتنقل، والجرام. وبالتالي حساب المستعمرات على الوسط الصلب LB-NO<sub>3</sub> وعلى الوسط السائل LB-NO<sub>3</sub> بطريقة MPN. أتاح اختبار التآكل، وتقليل النترات والكثافة، تحديد النمو الملائم للنوع اللاهوائي الاختياري على قسيمة الفولاذ كمنح للإلكترون والنترات كمستقبل نهائي للإلكترون. كشف الضرر الناجم عن العملية الديناميكية للأغشية الحيوية اللاهوائية NRB على القسيمة عن تأليب عميق على مراقبة المجهر الإلكتروني لمسح SEM.

**الكلمات المفتاحية:** التآكل الحيوي، NRB اللاطي، اختزال النترات، العض.