



HAL
open science

Procédé de traçabilité de bactéries corrosives dans les systèmes de transport de l'industrie pétrolière

Jean-Jacques Godon, Marc Labat, Bruno Mayeux

► **To cite this version:**

Jean-Jacques Godon, Marc Labat, Bruno Mayeux. Procédé de traçabilité de bactéries corrosives dans les systèmes de transport de l'industrie pétrolière. France, N° de brevet: FR 2945821 (A1) FR 2945821 (B1). 2010. hal-01189744

HAL Id: hal-01189744

<https://hal.science/hal-01189744>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

①1 N° de publication :

2 945 821

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

09 53375

⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 Q 1/68** (2006.01), C 12 Q 1/04, 1/64, G 01 N 33/
22

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 PROCÉDE PERMETTANT LA TRACABILITE DE BACTERIES CORROSIVES.

②2 Date de dépôt : 20.05.09.

③0 Priorité :

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT DE RECHERCHE POUR
LE DEVELOPPEMENT (IRD) , INSTITUT NATIONAL
DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA — FR ,
UNIVERSITE DU 7 NOVEMBRE-CARTHAGE
(U7NC) TUNISIE et CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE
DE SFAX (CBS)- TUNISIE — TN.

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 26.11.10 Bulletin 10/47.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 26.08.11 Bulletin 11/34.

⑦2 Inventeur(s) : LABAT MARC JEAN PAUL, GODON
JEAN JACQUES et MAYEUX BRUNO.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦3 Titulaire(s) : INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DEVELOPPEMENT (IRD) , INSTITUT NATIONAL DE
LA RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA
,UNIVERSITE DU 7 NOVEMBRE-CARTHAGE
(U7NC) TUNISIE, CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE
DE SFAX (CBS)- TUNISIE.

⑦4 Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET
DEMACHY.

FR 2 945 821 - B1



PROCEDE PERMETTANT LA TRAÇABILITE DE BACTERIES CORROSIVES

La présente invention a pour objet un procédé permettant la traçabilité de
5 bactéries corrosives posant problème dans les transports commerciaux et les prospections-
exploitations-distributions terrestres, sub-terrestres ou maritimes, notamment pétrolières.

Dans de nombreux domaines, notamment le domaine pétrolier, l'étude des populations
bactériennes est devenue une obligation. En effet, la contamination microbienne des
installations est retrouvée à de multiples endroits au niveau des différents sites de
10 prélèvement, dans les circuits de transports et jusque dans les cuves de stockage, notamment
celles des stations services. Certains microorganismes utilisent les hydrocarbures présents
comme source de carbone pour leur croissance ce qui diminue la qualité du pétrole brut ou du
produit raffiné. En raison de la poussée écologique des dernières années notamment face aux
catastrophes écologiques imputables aux compagnies pétrolières (marées noires, sols
15 contaminés par les hydrocarbures), des études sur les microorganismes dégradant les
hydrocarbures ont été lancées et devraient permettre d'isoler des souches bactériennes
utilisables dans le processus de bioremédiation des environnements marins ou terrestres
contaminés par les hydrocarbures. Outre l'intérêt écologique qu'ils présentent, l'étude de ces
microorganismes a de nombreuses implications aussi bien fondamentales (stabilisation des
20 macromolécules et des membranes) qu'appliquées (utilisation industrielle d'enzymes
thermostables).

Le pétrole résulte de la lente dégradation chimique et bactériologique d'organismes
aquatiques végétaux et animaux qui, il y a des dizaines, voire des centaines de millions
d'années, ont proliféré dans les mers et se sont accumulés en couches sédimentaires. Les
25 gisements se localisent toujours en un point singulier ou dans une anomalie naturelle de ces
roches, que l'on appelle roches-réservoirs ou roches-magasins.

Le pétrole se présente le plus souvent surmonté d'une couche d'hydrocarbures gazeux
et se situe généralement au-dessus d'une couche d'eau salée. Typiquement, dans la partie
huileuse du réservoir, 80 % du volume poreux sont occupés par le pétrole alors que les 20 %
30 restants le sont par de l'eau de salinité variable constituant le milieu de croissance des
organismes. Les réservoirs de pétrole sont généralement caractérisés aussi par des
températures élevées puisque la température est généralement estimée subir une augmentation
de 2 à 3° C par 100 mètres de profondeur.

Les pétroles bruts sont constitués de différentes familles des composés (Figure 1) dont la composition chimique varie énormément selon leur origine géographique et géologique. Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier et représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon l'origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %).

Les microorganismes extrémophiles peuvent se développer dans des milieux où les conditions physico-chimiques sont inappropriées pour la croissance de la plupart des organismes. Dans ce type de milieux, la diversité biologique est souvent plus réduite et l'on peut parfois observer un seul type de microorganisme. Au total cependant, la diversité des extrémophiles est notable (Stetter K.O., FEMS Microbiol., (1996), **19**, 149-158). Des habitats extrêmes de type hypersalés, très acides ou alcalins, des habitats à hautes pressions, très chauds ou très froids ont ainsi été colonisés.

Les puits de pétrole, avec leur forte salinité, leur forte chaleur et parfois leur forte pression font partie des environnements extrêmes. A ce jour, peu d'études ont été menées sur la biodiversité des puits eux-mêmes. La plupart des bactéries isolées appartiennent aux bactéries sulfato-réductrices (BSR), aux bactéries méthanogènes, aux bactéries fermentaires et aux bactéries aérobies.

Les bactéries fermentaires ne sont pas capables de dégrader, en condition anaérobie et en culture pure, les hydrocarbures vrais. Mais certaines bactéries fermentaires le sont pour des composés de type hydrocarbures oxydés. De plus, ce type de bactéries peut intervenir dans certains réseaux trophiques en dégradant les composés plus polaires car oxydés lors de l'attaque initiale de l'hydrocarbure par d'autres types bactériens (BSR, bactéries méthanogènes). En effet des composés de type phénols ou benzoates présentent une polarité et un taux d'oxydation suffisant pour permettre une récupération d'énergie significative en condition anaérobies par certaines bactéries fermentaires. De plus le pétrole brut n'étant pas constitué uniquement de composés hydrocarbonés, des bactéries fermentaires peuvent croître au dépend de ces autres composés en condition anaérobie. Par exemple des bactéries des genres *Petrotoga* et *Thermotoga* ont ainsi été isolées de puits de pétrole.

Les BTEX (ou Benzène, Toluène, Ethyl-benzène et Xylènes) représentent les composés hydrocarbonés volatiles les plus abondants d'un brut pétrolier. Ces BTEX, y

compris le benzène, sont dégradés par des consortia méthanogéniques qui sont restés longtemps non caractérisés. Parmi les habitats de ces consortia, les stockages souterrains d'hydrocarbures, qui sont susceptibles de subir une dégradation méthanogénique, ont fait l'objet d'étude de caractérisation de leur microflore méthanogénique par analyses des séquences d'ARN 16S (Watanabe K. *et al.* Appl. Environ. Microbiol., (2002), **68**, 3899-3907). Les techniques moléculaires ont ainsi permis à Ficker M. *et al.* (Appl. Environ. Microbiol., (1999), **65**, 5576-5585) de décrire de façon détaillée un consortium méthanogénique utilisant le toluène pour sa croissance. Ce consortium avait été obtenu par enrichissement sur toluène pendant plusieurs années. La composition de la communauté ressemblait à celle d'une culture syntrophique dégradant le benzoate décrite par d'autres auteurs. Elle comportait deux espèces eubactériennes et deux espèces archéennes méthanogènes. L'une de ces deux dernières était apparentée à celles du genre *Methanosaeta*, une archée acétoclastique, et l'autre à celles du genre *Methanospirillum*. L'une des espèces eubactériennes était voisine du genre *Desulfatamaculum*, un genre de BSR qui est aussi capable de conversions acétogéniques en l'absence de sulfate. L'autre espèce eubactérienne, sans affiliation avec un groupe connu, était vraisemblablement celle effectuant l'attaque initiale du toluène. D'autres types de dégradation syntrophique du toluène ont été décrits par la suite.

De nombreux groupes de micro-organismes utilisent une assez large variété de composés inorganiques voire organiques comme accepteurs terminaux d'électrons lors de leur respiration anaérobie. Parmi ces composés inorganiques, ceux du soufre jouent un rôle particulièrement important ; on peut citer le soufre élémentaire et les polysulfures, le sulfate et le sulfite, le thiosulfate et les polythionates. Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) constituent un groupe physiologique unique de micro-organismes partageant la capacité d'utiliser le sulfate pour leur croissance en produisant d'importantes quantités d'hydrogène sulfuré. Il existe deux groupes de BSR : le premier comprend les bactéries capables d'oxyder complètement les composés organiques en dioxyde de carbone alors que le second n'oxyde que partiellement ces composés organiques, menant à la synthèse d'acétate.

La physiologie et la taxonomie des BSR ont subi de considérables changements durant ces vingt dernières années et environ 40 genres et 150 espèces de sulfato-réducteurs sont actuellement caractérisés et divisés en trois groupes phylogénétiques d'après l'analyse de leurs séquences d'ARNr 16S :

- Eubactéries BSR Gram-positive sporulées

- Eubactéries BSR Gram-négative mésophiles et thermophiles
- Archaeobactéries thermophiles sulfato-réductrices.

La majorité des BSR décrites à ce jour appartient au domaine des *Bacteria* (firmicutes pour les BSR sporulées et delta protéobactéries pour les BSR non-sporulées). Le
5 domaine des *Archaea* n'est actuellement représenté que par deux genres thermophiles :
Archaeoglobus et *Caldivirga*.

Diverses BSR ont été isolées d'environnement pétrolier et certaines d'entre elles sont capables de croître sur certains hydrocarbures monoaromatiques. Les BTEX sont ainsi tous dégradables en conditions sulfato-réductrices. Ces BSR sont capables de dégrader et de
10 minéraliser la plupart d'entre eux en culture pure. C'est le cas par exemple des souches oXyS1 et mXyS1, isolées respectivement sur o-xylène et m-xylène à partir d'une culture d'enrichissement sur pétrole brut. Les alkylbenzènes dégradés par ces souches sont utilisés comme substrat de croissance et minéralisés, et non pas dégradés par co-métabolisme.

D'autres souches bactériennes ont également été isolées de champs pétroliers dont
15 *Desulfovibrio alaskensis*, *Desulfovibrio capillatus* ou encore *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans*.

Les bactéries aérobies habitant les réservoirs pétroliers chauds sont encore très peu étudiées. Parmi ces bactéries aérobies et thermophiles, certaines ont été isolées à partir de divers puits pétroliers (Kazakhstan, Sibérie, Russie et Chine). Par exemple, deux bactéries
20 sporulantes et oxydant le pétrole ont été identifiées, comme appartenant au genre *Geobacillus* : *G. subterraneus* et *G. uzenensis*. Récemment, une nouvelle espèce bactérienne thermophile du même genre *Geobacillus*, (*G. jurassicus*) a été isolée d'un réservoir pétrolier géothermique localisé à Dagang en Chine. De même a pu être décrit à partir d'un puits de pétrole situé dans le Queensland, à l'Est de l'Australie, un nouveau genre bactérien
25 consommateur de nitrate, *Petrobacter succinatimandens*, qui se distingue par ses activités métaboliques. Elle s'est révélée capable d'oxyder les acides organiques et se caractérise par un métabolisme aérobie-anaérobie facultatif.

L'introduction accidentelle d'oxygène, via un apport d'eau extérieur au gisement (infiltrations d'eau de pluie ou pratique courante d'injections d'eau lors de l'extraction du
30 pétrole) pourrait expliquer la présence de telles bactéries aérobies et de leur maintien dans un environnement anaérobie.

La microbiologie moléculaire permet, entre autre, d'identifier différentes souches bactériennes présentes dans un échantillon même lorsque l'on n'est pas capable de les

cultiver. Une des branches de cette discipline est impliquée dans le développement de méthodes moléculaires pour l'identification et le suivi de microorganismes dans leur environnement.

Depuis une vingtaine d'années, l'identification des microorganismes basée sur des méthodes moléculaires, spécialement celles incluant le séquençage des gènes codant pour l'ADN ribosomal 16S, est devenue un outil très important dans l'étude des communautés bactériennes. L'orientation vers l'utilisation des techniques culture-indépendantes vient, d'une part, du manque de connaissances des conditions réelles sous lesquelles se développent les microorganismes dans leurs environnements et, d'autre part, de la difficulté rencontrée pour développer des milieux de culture réunissant toutes les conditions nécessaires à la croissance bactérienne.

Les techniques de biologie moléculaire peuvent également être désignées sous le terme de « fingerprint génétique », que l'on peut traduire par « empreinte génétique ». Elles ont d'abord été utilisées en génétique humaine, pour permettre la détection de mutations, responsables de maladies génétiques. Ces techniques ont ensuite été appliquées à l'identification de populations de procaryotes et d'eucaryotes unicellulaires.

Parmi les techniques qui ont été développées, on peut citer la technique appelée *Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP). Il s'agit d'un outil moléculaire basé sur la présence de sites de restriction à l'intérieur de fragment d'ADN, ces sites étant coupés par des enzymes spécifiques, appelés enzymes de restriction et a été introduite plus tard (Liu W.T. *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., (1997) **63**, 4516-4522). Cette technique, bien que permettant d'identifier des polymorphismes au sein des espèces, ne permet pas la caractérisation de toutes les sous espèces, et en particulier ne permet pas de différencier deux espèces différentes qui ne possèdent pas de polymorphisme de restriction.

25

La gestion de la biocorrosion en milieu pétrolier génère un coût annuel énorme pour les exploitants pétroliers de toute la chaîne, du gisement à la pompe en passant par le raffinage et le stockage. Ce problème de corrosion est aussi important dans le transport maritime (militaire ou commercial), et estimé à 250 Millions de dollars aux USA pour prévenir, réparer, changer les infrastructures métalliques du pays (ponts, barrage, bâtiments...).

Aussi la traçabilité de procaryotes (bactéries ou leurs produits de métabolisme) posant problème dans un champ pétrolier comme lors de son exploitation-distribution,

permettrait de mettre en évidence la présence du problème et de traiter/éliminer/gérer le potentiel contamination « oil spoilage »/toxique/biocorrosif d'un brut pétrolier, quel qu'il soit, et par extension tout problème de biocorrosion lié à des tankers métalliques de transport ou de stockage pour produits aqueux ou solides, y compris aliments, boissons, ainsi que tout type de biotope concerné, y compris boues, sources, etc....

Actuellement, seul l'isolement de bactéries permet d'identifier la présence de bactéries corrosives de type BSR ou assimilé. Hors pratique culturale, il n'existe aucun moyen d'identification et donc aucune traçabilité et en cas de problème de corrosion la seule solution est le traitement par des biocides.

Le Brevet français N°2 791 362 décrit un procédé de dénombrement de BSR mais ne mentionne pas la possibilité d'une traçabilité de ces bactéries.

Il existe donc un besoin de disposer de techniques simples, fiables et économiques permettant l'évaluation, l'identification et la caractérisation d'une microflore bactérienne.

Aussi la présente invention a-t-elle pour objet un procédé de détection et/ou de discrimination de microorganismes responsables de la corrosion de matériaux, lesdits matériaux étant en contact avec un échantillon susceptible de contenir au moins un desdits microorganismes, ledit procédé comprenant :

- a. l'extraction du matériel génétique des microorganismes susceptibles d'être contenus dans ledit échantillon en contact avec un matériau susceptible d'être corrodé,
- b. la détermination de l'éventuelle présence d'au moins un microorganisme responsable de la corrosion de matériaux dans ledit échantillon au moyen de l'amplification d'au moins un fragment du gène *dsrB* par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR),
- c. la discrimination des microorganismes présents dans l'échantillon, révélés à l'étape précédente, par la mise en œuvre d'une technique de séparation des produits de réactions de PCR précédents en fonction de leur séquence nucléotidique utilisant le polymorphisme de conformation des simples brins SSCP, notamment par système capillaire (CE-SSCP).

Par « procédé de détection et/ou de discrimination », l'invention définit un « procédé de détection », ou un « procédé de discrimination », ou un « procédé de détection et de discrimination ».

Le « procédé de détection » selon l'invention permet d'identifier la présence d'un microorganisme dans un échantillon. Le « procédé de discrimination » selon l'invention permet de définir qu'un échantillon possédant des microorganismes en possède plusieurs différents. Enfin, le « « procédé de détection et de discrimination » décrit dans l'invention permet à partir d'un échantillon déterminé de définir s'il présente ou non des microorganismes, et si tel est le cas de définir s'il contient un ou plusieurs microorganismes ».

Le procédé décrit dans l'invention repose sur une méthode comprenant trois étapes :

- une étape de purification et d'extraction du matériel génétique des microorganismes susceptibles d'être contenus dans un échantillon,
- une étape d'amplification dudit matériel génétique, notamment au moyen de la technique de PCR connue de l'homme de métier, et
- si l'échantillon est positif, c'est-à-dire s'il contient au moins un microorganisme à l'issue de l'étape précédente, la discrimination de l'éventuelle présence de plusieurs microorganismes au moyen de la technique de SSCP.

Le polymorphisme de conformation des simples brins (*Single-Strand Conformation polymorphism* ou SSCP), a été introduit avant la T-RFLP, il y a une dizaine d'années (Lee DH, Zo YG, Kim SJ, Appl. Environ. Microbiol., (1998), **62**, 3112-3120). Cet outil moléculaire utilise les différentes conformations que peut acquérir un ADN simple-brin pour différencier des séquences entre elles.

La technique SSCP sur séquenceur capillaire (CE-SSCP) est utilisée en routine par l'homme de métier. La séparation des fragments d'ADN de même taille est basée sur la migration différentielle de l'ADN simple brin en condition non dénaturante, en fonction de leur conformation tridimensionnelle.

Comparativement à la SSCP sur gel classiquement utilisée par l'homme de métier, la SSCP capillaire (CE-SSCP) est une technique haut-débit séparant, sans action humaine, les produits d'amplification, cette automatisation en améliore la reproductibilité. Il s'agit d'une méthode privilégiée pour la description de flores complexes de microorganismes.

Ainsi, le procédé de l'invention, à partir des profils obtenus par CE-SSCP, permet d'établir un profil moléculaire du ou des microorganismes susceptibles d'être présents dans l'échantillon.

Dans l'invention, la « corrosion » désigne l'altération d'un objet par réaction avec un oxydant. Les exemples les plus connus sont les altérations chimiques des métaux. Cependant,

la corrosion est un domaine bien plus vaste qui touche toutes sortes de matériaux (métaux, céramiques, polymères) dans des environnements variables (milieu aqueux, pétrolifères, atmosphère, hautes températures...).

Dans l'invention, le procédé permet de détecter et de discriminer des
5 microorganismes capables, ou susceptibles d'être capable, d'altérer un matériau en provoquant une corrosion.

Dans un mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, lesdits microorganismes sont des procaryotes, préférentiellement des procaryotes exprimant l'enzyme sulfite réductase, notamment des bactéries sulfato-réductrices.

10 Dans un autre mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, ledit échantillon est en contact avec un contenant susceptible d'être corrodé.

Par contenant on entend dans l'invention tout objet capable de contenir. Par exemple, un *pipeline* est un contenant pour le pétrole, et une boîte de conserve est un contenant pour un aliment... Par extension, un contenant est défini dans l'invention comme tout matériau en
15 contact avec l'échantillon, et notamment les outils de forage.

Conformément à l'invention, ledit échantillon est choisi parmi tout échantillon susceptible d'être acheminé, transporté, stocké, conservé, commercialisé en contenant métallique ou équivalent, et donc pouvant être sujet à la corrosion, et notamment le pétrole brut, le pétrole lourd, le pétrole léger et les eaux de pétrole, ainsi que les aliments, les
20 boissons, et autres produits assimilés tels que les boues et autres milieux.

Par produits assimilés, on entend dans l'invention des produits tels que les compléments alimentaires correspondant à des produits ingérés, les eaux potables, les eaux de source contenus, ou transportés dans des contenants susceptibles de corrosion.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, si l'échantillon contient une
25 faible quantité de microorganismes responsables de la corrosion de matériaux, le procédé selon l'invention comprend une étape complémentaire permettant d'augmenter la quantité de matériel génétique issu desdits microorganismes afin de disposer d'une quantité plus importante.

Conformément à l'invention cette étape complémentaire peut être réalisée par
30 n'importe quelle technique connue de l'homme du métier, notamment elle peut consister en une étape de stimulation de la prolifération desdits microorganismes afin d'augmenter la quantité desdits microorganismes.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, la stimulation de la prolifération consiste en la levée de phase stationnaire desdits microorganismes, notamment par la mise en culture desdits microorganismes, dans un milieu contenant des nutriments et dans des conditions nécessaires à leur prolifération.

5 La « phase stationnaire » d'un microorganisme est définie dans l'invention comme la phase où un microorganisme est métaboliquement actif (il est capable de se nourrir) mais pendant laquelle ledit microorganisme ne se multiplie pas, c'est-à-dire qu'il ne procède pas à la division cellulaire.

10 La « levée de la phase stationnaire » correspond donc dans l'invention aux conditions environnementales (nutriments, air...) qui font que le microorganisme se met à entrer dans une phase de division cellulaire, notamment par Mitose. Un moyen de lever la phase stationnaire est de mettre ledit microorganisme dans un milieu de culture riche en nutriments et en éléments essentiels pour sa division cellulaire, c'est-à-dire sa prolifération.

15 Avantageusement cette mise en culture est réalisée dans les conditions suivantes :

- la température est généralement celle de l'échantillon + ou - 5°C, (sans excéder 75°C) ; toutefois pour les échantillons de très basse et très haute température, ladite mise en culture est également effectuée à la température standard de 37°C,
- 20 - la salinité correspond généralement à celle de l'échantillon + ou - 1% en NaCl (sans excéder 300 g/l) ; pour les microorganismes aptes à supporter des salinités élevées, la mise en culture est également effectuée à une salinité standard de 1% en NaCl ,
- le pH correspond généralement à celui de l'échantillon + ou - 0,5 unité de
25 pH ; pour les échantillons fortement acides ou basiques, la mise en culture est également effectuée à un pH compris entre 7,2 et 7,5.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, les nutriments utiles à la stimulation de la prolifération sont fournis par le lactate et/ou l'acétate dans une gamme de concentration d'environ 0,3 à environ 30 g/l, ainsi que par la peptone et/ou l'extrait de levure,
30 dans une gamme de concentration d'environ 0,1 à environ 20 g/l.

Lorsque l'échantillon est du pétrole ou de l'eau de pétrole, ledit milieu contenant des nutriments est éventuellement complété avec d'environ 0,1 % à environ 1 % de pétrole brut.

L'étape complémentaire permettant d'augmenter la quantité de matériel génétique issu desdits microorganismes afin de disposer d'une quantité plus importante peut également être réalisée par une étape de concentration du matériel génétique des microorganismes, notamment une étape de concentration par filtration au moyen d'un filtre spécifique, notamment avec une taille de pores dans une gamme d'environ 0,05 à environ 0,25 μm , notamment de type polyéthersulfone ou tout filtre de caractéristiques équivalentes.

Les filtres de caractéristiques équivalentes qui peuvent être utilisés dans l'invention possèdent une porosité telle qu'elle permet la rétention d'une biomasse bactérienne, c'est-à-dire que la taille des pores est comprise entre 0,05 et 0,25 μm . Les filtres préférés de l'invention sont de type polyéthersulfone qui sont plus inertes et plus broyables que les autres filtres utilisables par l'homme de métier.

Dans un mode de réalisation du procédé selon l'invention, la PCR est réalisée en utilisant :

a. une amorce sens comprenant ou consistant en au moins 15 nucléotides consécutifs, préférentiellement au moins 19 nucléotides consécutifs, au moins 21 nucléotides consécutifs, de la séquence SEQ ID NO 1 suivante :

5'-GGN₁N₂TN₃N₄N₅CAACATCGTN₆CAN₇ACCCAGGG-3'

où

N₁ représente un C ou un T,

N₂ représente un A ou un G,

N₃ représente un A, un C ou un T,

N₄ représente un A ou un T, et

N₅ représente un C ou un G,

N₆ et N₇ représentent n'importe quel nucléotide (A, T, G ou C)

b. une amorce anti-sens comprenant ou consistant en au moins 15 nucléotides consécutifs, préférentiellement au moins 16 nucléotides consécutifs, préférentiellement les 17 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID NO 2 suivante :

5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3'.

L'amorce sens peut donc correspondre, lorsqu'elle comprend au moins 15 nucléotides, aux séquences suivantes :

11

5'- GGN₁N₂TN₃N₄N₅CAACATC-3',5'- GN₁N₂TN₃N₄N₅CAACATCG -3',5'- N₁N₂TN₃N₄N₅CAACATCGT-3', etc...

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux du procédé selon l'invention, l'amorce sens comprend ou consiste en au moins 15 nucléotides consécutifs, préférentiellement au moins 19 nucléotides consécutifs, au moins 21 nucléotides consécutifs de l'une quelconque des séquences suivantes :

- 5'- GGCATAACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 3,
- 10 5'- GGTATAACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 4,
- 5'- GGCGTAACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 5,
- 15 5'- GGTGTAACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 6,
- 5'- GGCATCACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 7,
- 5'- GGTATCACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 8,
- 20 5'- GGCGTCACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 9,
- 5'- GGTGTCACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 10,
- 5'- GGCATTACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 11,
- 25 5'- GGTATTACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 12,
- 5'- GGCGTTACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 13,
- 30 5'- GGTGTTACCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 14,
- 5'- GGCATATCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 15,

- 5'- GGTATATCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 16,
- 5'- GGCGTATCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 17,
- 5 5'- GGTGTATCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 18,
- 5'- GGCATCTCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 19,
- 5'- GGTATCTCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
10 SEQ ID NO 20,
- 5'- GGCGTCTCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 21,
- 5'- GGTGTCTCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 22,
- 15 5'- GGCATTTCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 23,
- 5'- GGTATTTCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 24,
- 5'- GGCGTTTCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
20 SEQ ID NO 25,
- 5'- GGTGTTTCCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 26,
- 5'- GGCATAAG CAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 27,
- 25 5'- GGTATAAGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 28,
- 5'- GGCGTAAGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 29,
- 5'- GGTGTAAGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
30 SEQ ID NO 30,
- 5'- GGCATCAGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 31,

- 5'- GGTATCAGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 32,
- 5'- GGCGTCAGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 33,
- 5 5'- GGTGTCAGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 34,
- 5'- GGCATTAGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 35,
- 5'- GGTATTAGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
10 SEQ ID NO 36,
- 5'- GGCGTTAGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 37,
- 5'- GGTGTTAGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 38,
- 15 5'- GGCATATGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 39,
- 5'- GGTATATGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 40,
- 5'- GGCGTATGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
20 SEQ ID NO 41,
- 5'- GGTGTATGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 42,
- 5'- GGCATCTGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 43,
- 25 5'- GGTATCTGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 44,
- 5'- GGCGTCTGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 45,
- 5'- GGTGTCTGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
30 SEQ ID NO 46,
- 5'- GGCATTTGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence
SEQ ID NO 47,

5'- GGTATTTGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 48,

5'- GGCGTTTGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 49,

5 5'- GGTGTTTGCAACATCGTCCACACCCAGGG-3' correspondant à la séquence SEQ ID NO 50).

Dans un mode de réalisation encore plus avantageux du procédé selon l'invention,

10 - l'amorce sens consiste en l'une quelconque des séquences SEQ ID NO 3 à SEQ ID NO 50, ou consiste en la séquence SEQ ID NO 51 suivante :

5'- CAACATCGTCCACACCCAGGG-3', et

- l'amorce anti-sens consiste en la séquence SEQ ID NO 2.

15 Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le procédé comprend en outre une étape de référencement des profils SSCP afin de disposer d'une banque de données référençant les polymorphismes, c'est-à-dire leur profil moléculaire, des différents microorganismes susceptibles d'être contenus dans ledit échantillon.

20 L'invention a également pour objet un procédé de discrimination de microorganismes responsables de la corrosion de matériaux, lesdits matériaux étant corrodés et étant en contact avec un échantillon contenant au moins un desdits microorganismes, ledit procédé comprenant :

25 a. l'extraction du matériel génétique des microorganismes contenus dans ledit échantillon en contact avec un matériau corrodé,

b. l'amplification d'au moins un fragment du gène *dsrB* par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR),

30 c. la discrimination des microorganismes présents dans l'échantillon, révélés à l'étape précédente, par la mise en œuvre d'une technique de séparation des produits de réactions de PCR précédents en fonction de leur séquence nucléotidique utilisant le polymorphisme de conformation des simples brins, notamment par système capillaire (CE-SSCP).

L'invention a également pour objet l'utilisation du procédé selon l'invention, pour la détermination de la signature moléculaire d'un échantillon en contact avec un matériau susceptible d'être corrodé,

- ladite signature moléculaire correspondant à la somme des profils moléculaires de chacun des différents microorganismes susceptibles d'être contenus dans ledit échantillon,

- lesdits profils moléculaires étant obtenus à partir du profil SSCP des différents microorganismes susceptibles d'être contenus dans ledit échantillon, et

- ledit profil SSCP de chacun des différents microorganismes susceptibles d'être contenus dans ledit échantillon étant référencé dans une banque de données.

Le procédé selon l'invention permet donc, d'établir une signature moléculaire, c'est-à-dire une sorte de carte d'identité moléculaire d'un échantillon donné, qui correspond à la somme des profils moléculaires des différents organismes contenus dans l'échantillon.

A partir de la banque de donnée établie dans l'invention, il est donc possible de déterminer avec exactitude quels sont les microorganismes contenus dans un échantillon déterminé.

Plus généralement, la signature moléculaire d'un échantillon obtenue selon l'invention permet la traçabilité d'un échantillon. Cela signifie, que la signature moléculaire permet d'identifier un échantillon et de remonter jusqu'à sa source, et d'identifier tous les contenants susceptibles d'être corrodés qui ont été en contact avec les microorganismes définissant ladite signature moléculaire.

L'exemple et les figures 1 à 6 qui suivent illustrent l'invention.

La figure 1 illustre les principaux composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le brut pétrolier.

La figure 2 présente les caractéristiques principales des trois puits (P1, P2 et P3) tunisiens étudiés. nc : non communiquée.

La figure 3 illustre la biodiversité sur la base de la région V3 de l'ADNr 16S retrouvée dans les échantillons natifs des puits P1 et P2.

La figure 4 illustre la biodiversité sur la base de la région V3 de l'ADNr 16S retrouvée après levée de phase stationnaire (profil LPS pauvre) provenant de P2 (haut) et P3 (bas).

La figure 5 illustre la reconnaissance des clones grâce à la co-migration (superposition) des pics. Les flèches indiquent les trois pics du profil ayant été identifiés. Les clones 1 et 8 sont affiliés à la souche *Marinobacter sp* YJ0216, les clones 3 et 10 à *Marinobacter sp* BR-13 et les clones 12 et 13 à *Leuconostoc citreum* KM20. La figure 5 illustre la possibilité d'effectuer la traçabilité d'un profil bactérien unique.

La figure 6 illustre la biodiversité en sulfato-réducteurs révélée dans les échantillons natifs, avec l'exemple des puits P2 (haut) et P1 (bas). Les flèches représentent les co-migrations entre les deux échantillons, les couleurs identiques représentant les identifications bactériennes superposables pour ces deux puits P2 et P1.

10

Exemple

1.1. Matériels et méthodes

1.1.1. Echantillons

Les échantillons utilisés ont été collectés de trois puits pétroliers tunisiens notés respectivement P1, P2 et P3. Les échantillons ont été récupérés à la sortie des tuyaux ramenant le pétrole du puits à la surface, en prenant soin de rester dans les conditions les plus stériles possibles, pour éviter toute contamination liée aux prélèvements effectués. Les échantillons ont été stockés à 4°C dès leurs prélèvements et durant tout le temps précédant les manipulations. Les caractéristiques des différents sites de prélèvements (puits) sont synthétisées dans la figure 2.

20

1.1.2. Milieux utilisés pour les techniques culture-dépendantes

Pour pouvoir comparer les résultats obtenus entre les outils moléculaires et les techniques culture-dépendantes, une mise en culture des différents échantillons natifs a été réalisée.

25

1.1.1.1. Milieu de base

Le milieu de base est composé de (par litre de solution) : extrait de levure : 1g, NaCl : 50g, KCl : 0,1g, NH₄Cl : 0,5g, KH₂PO₄ : 0,6g, K₂HPO₄ : 0,6g, solution d'oligoélément de Widdel & Pfennig (Arch. Microbiol., (1981), **129**, 395-400), modifiée par Imhoff-Stuckle & Pfennig (Arch. Microbiol., (1983), **136**, 194-198) : 1ml, cystéine-HCl : 1g, résazurine : 1ml (solution aqueuse à 0,1 %), MgCl₂ x 7H₂O : 0,3g, CaCl₂ x 2H₂O : 0,05g, solution de vitamines de Balch et al. (Microbiol. Rev., (1979), **43**, 260-296) : 10ml. Lors de l'utilisation d'un milieu pauvre, le même milieu est utilisé, mais avec une concentration en extrait de levure réduite à 0,1g par litre de solution.

30

Ce milieu de base a été distribué dans des tubes de Hungate puis stérilisé (autoclavé à 110°C pendant 30 min). Les autres éléments ont été ajoutés dans ces tubes, en conditions anaérobies et stériles, dont une solution de tampon carbonaté (NaHCO_3 10%) et un réducteur de milieu (Na_2S). Le volume final est de 5ml. Pour garantir les conditions d'anaérobiose stricte, les ajouts sont effectués sous flux d'azote et de manière stérile.

1.1.1.2. Milieu spécifique pour bactéries sulfato-réductrices

Pour cibler les conditions sulfato-réductrices, il n'y a pas eu d'ajout de réducteur de milieu (Na_2S) pour ne pas interférer avec les sulfures produits lors de la réduction des sulfates. Les substrats carbonés ajoutés sont les d'hydrocarbure (1% v/v de brut pétrolier) et l'acétate (5mM) ou le lactate (5mM). Enfin, les tubes ont été inoculés avec 0,1 ml d'échantillon natif par tube de Hungate. Les tubes ont été placés sous étuves à 45°C et sans agitation. Il n'y a pas eu de gazage H_2/CO_2 (tube à pression atmosphérique).

1.1.1.3. Milieu spécifique pour bactéries fermentaires

Pour privilégier des conditions fermentaires, des solutions de peptone (5g/l) et de glucose (20mM) ont complété la source d'hydrocarbures (1% v/v). Les tubes ont été inoculés avec 0,1 ml d'échantillon natif. Les tubes, comme précédemment, ont été placés à incuber à 45°C, sans agitation et sans gazage H_2/CO_2 .

Pour l'ensemble de ces milieux, les croissances positives sont repiquées dans les mêmes conditions jusqu'à l'obtention d'un enrichissement bactérien dense permettant les isollements bactériens correspondants.

1.1.1.4. Milieu spécifique pour bactéries aérobies

Le milieu utilisé est identique à celui des bactéries fermentaires, mais les tubes et boîtes de Pétri sont placés sous atmosphère aérobie. Ces tubes, comme précédemment, ont été placés à incuber à 45°C, sans agitation.

1.1.3. Techniques de culture bactérienne

1.1.3.1. Levée de phase stationnaire (LPS)

Une partie des bactéries présentes dans un échantillon natif, du fait de son stockage à 4°C, risque d'être en phase stationnaire ou en phase de dormance. Cette première culture mise en culture en milieu spécifique a pour but d'initier cette levée de dormance.

Tous les milieux ont été réalisés avec 50g/l de NaCl et ajustés à un pH compris entre 7,2 et 7,5 unités pH. Les trois échantillons natifs ont été mis en culture dans deux types de milieux. Le premier milieu dit « riche » en substrat carboné est supplémenté avec : 1g/l de

peptone, 1g/l d'extrait de levure, 1% de brut. Le deuxième milieu dit « pauvre » se différencie du premier par une réduction au dixième de l'extrait de levure et de la peptone. Toutes les cultures ont été réalisées sous agitation et à 45°C.

Avant toute mise en croissance, une partie de chaque échantillon natif a également
5 été conservée pour une utilisation directe de l'ADN bactérien présent avec l'outil moléculaire (SSCP).

1.1.3.2. Enrichissement et isolement bactérien

Les enrichissements ont été réalisés à partir des croissances positives observées lors de la LPS (levée de phase stationnaire) des échantillons natifs et sous les conditions décrites
10 ci-dessus. L'isolement bactérien a été recherché par des séries de dix dilutions successives au 1/10^{ème} dans des tubes de Hungate pour les conditions anaérobies et en boîte de pétri pour les conditions aérobies. Les colonies obtenues à partir de la dilution ultime sont observées sous loupe binoculaire et les colonies bien isolées sont prélevées et remises en suspension-dilution dans les mêmes conditions. Le protocole est ainsi répété jusqu'à l'obtention de clones qui sont
15 alors considérés comme des souches pures. Ces souches pures sont ainsi prêtes pour une analyse phylogénétique du gène de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal.

1.1.4. Techniques moléculaires

1.1.4.1.Extraction d'ADN pour la SSCP

Les extractions d'ADN ont été réalisées de deux manières, suivant la quantité d'ADN
20 bactérien disponible. Soit directement sur culots bactériens après centrifugation (13000rpm, 15 min, 4°C) soit sur des filtres, stockés à -80°C avant extraction. Les Kits « QIAamp DNA Stool » et « QIAamp Mini Kit » ont permis l'extraction sur culot et filtrat respectivement. Les extractions ont été vérifiées sur gel d'agarose 0,7% et 1% de BET puis stockées à -20°C.

1.1.4.2.Technique d'amplification par PCR

1.1.4.2.1. Amplification de la partie V3 de l'ADNr 16S

Toutes les amplifications ont été réalisées avec la technique de polymérisation en chaîne (PCR). La PCR utilisée pour la SSCP est une PCR qui cible la région V3 de l'ADNr 16S. L'intérêt d'utiliser ce gène vient du fait de sa très grande conservation mais également
30 du fait que le gène produit un ARN fonctionnel, non traduit en protéine et possédant des structures secondaires remarquables et indispensable à la fonction de cet ARN. Cette PCR utilise les primers sens w49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3') et anti-sens w104 (5'-6FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), ce dernier étant couplé à un fluorochrome (6

FAM, 6 carboxyfluorescein) permettant la détection du fragment couplé par l'outil SSCP. Le mix PCR utilisé est le suivant (pour un tube PCR 0,2ml) : H₂O : 36.98µl, Tampon 10x Pfu Turbo : 5µl, dNTP : 4µl, primer w36 : 1,3µl, primer w104 : 1,3µl et Pfu Turbo (0,5µl).

Les cycles PCR utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous.

5

	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation	94°C	2 min	1
Dénaturation	94°C	30 sec	20
Hybridation	55°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Elongation	72°C	10 min	1

La vérification de la PCR se fait sur gel d'agarose 2% et 1% BET puis les produits de PCR sont stockés à -20°C.

10

1.1.4.2.2. Amplification du gène dsrB

Le principe est le même que pour la partie V3 mais avec l'utilisation d'amorces sens inspirées de l'amorce DSRp2060F décrite par Geets J. *et al.* (J. Microbiol. Meth., (2005), **66**, 194-205), dont l'amorce 5'-CAACATCGTCCACACCCAGGG-3' et d'amorces anti-sens dont l'amorce DSR4R 5'-6FAM-GTG TAGCAGTTACCGCA-3' décrite par Wagner M *et al.*

15 (J. Bacteriol., (1998) **180**, 2975– 2982).

Le produit de PCR obtenu est de plus grande taille, environ 320 paires de bases. Les cycles PCR utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation	94°C	2 min	1
Dénaturation	94°C	30 sec	25
Hybridation	55°C	30 sec	
Elongation	72°C	45 sec	
Elongation	72°C	10 min	1

20

1.1.5. Analyse des échantillons en SSCP

L'outil SSCP utilisée est à 4 capillaires, permettant d'analyser des plaques 96 puits. Au fond de chaque puits est déposé 1ml de produits de PCR recouvert par 18,925µl de formamide et 0,075µl de RoxGS 400. La plaque est ensuite mise à 95°C pour dénaturer les doubles brins d'ADN puis placée immédiatement dans la glace pour favoriser les repliements du simple brin sur lui-même. L'analyse se fait sur la nuit : 30 min sont nécessaires pour l'analyse d'un « run », c'est-à-dire 4 échantillons.

25

1.1.6. Clonage et séquençage

Pour le clonage de la région V3 du gène de l'ADNr 16S, les amorces utilisées sont w49 (5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3') et w31 (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') avec un mélange (en μL): H₂O pure : 35, Tampon Red *Taq* : 5, dNTP 2,5mM : 4, amorce 100ng/ μL : 2, Rad *Taq* : 1. Le programme PCR utilisé est le suivant : 2 mn à 94°C, 25 cycles comprenant 1 mn à 94°C, 1 mn à 61°C et 1 mn à 72°C puis après les cycles, 10 mn à 72°C.L

La purification du produit de PCR obtenu se fait suivant les indications du kit de purification sur colonnes QIAQUICK (kit QIAQUICK).

Pour le clonage proprement dit, le kit « Topo Ta Cloning Kit » est utilisé et les instructions de ce kit permettent la ligation du gène dans un plasmide chez *E. coli*, la transformation de ces bactéries, la vérification des transformants. La sélection des plasmides est réalisée par SSCP, par l'intermédiaire de co-migration entre le pic de référence et le pic formé par la séquence de la région V3 de l'ADNr 16S, introduite dans le plasmide.

Avant d'envoyer les transformants au séquençage, deux plaques sont réalisées : une plaque avec un milieu LB kanamycine liquide qui est envoyée au séquençage et une plaque LB kanamycine solide qui est conservée à -80°C, en cas de problème lors du séquençage.

1.2. Résultats

1.2.1. Identification de la microflore, notamment sulfato-réductrice, par les techniques cultures –dépendantes

Les enrichissements aérobies et anaérobies ont été effectués pour les trois puits P1, P2 et P3. Ils ont montré des résultats positifs pour les conditions sulfato-réductrices en présence de lactate ainsi que pour les conditions fermentaires pour le puits P1. Pour ces conditions fermentaires, plusieurs bactéries ont pu être isolées, et notamment une souche bactérienne appartenant au genre *Thermoanaerobacter*.

Pour les enrichissements en présence de lactate plusieurs isolements bactériens ont été obtenus, et identifiés comme trois espèces de BSR appartenant au genre *Desulfovibrio*.

1.2.2. Estimation de la microflore présente par SSCP

Les résultats sont donnés dans les figures 3 et 4

Les deux puits P1 et P2 analysés par SSCP ont montré un profil complexe. Le nombre de genre et d'espèce présents a pu être estimé grâce à ces profils à plusieurs milliers (Figure 3). Ces résultats originaux remettent en cause l'estimation généralement considérés faible des environnements pétroliers.

Les résultats comparés pour les profils obtenus après LPS en milieu « pauvres » (figure 4) comme ceux obtenus après LPS en milieu « riches » (résultats non présentés) confirment en revanche que seule une faible biodiversité s'est révélée cultivable et ceci pour les trois puits étudiés.

5 L'ensemble de ces résultats montrent :

- (i) d'une part, la découverte d'une forte biodiversité bactérienne en milieu pétrolier, à savoir un grand nombre de profils bactériens différents, identifiée à partir de la SSCP 16S selon l'invention ; les puits P1 et P2 (Figure 3) montrant une très grande diversité de pics, et
- 10 (ii) d'autre part, l'existence d'une énorme différence de détection des microorganismes entre les échantillons natifs et après LPS, c'est-à-dire que la LPS permet, de manière complémentaire aux résultats obtenus sur échantillons natifs, l'amplification d'une population minoritaire correspondant à certains profils mineurs détectés dans l'échantillon natif, et ce quelque soit le puits (P1,
- 15 P2 ou P3 testé, Figure 4).

Ces résultats montrent également que certains pics ont été amplifiés par prolifération bactérienne, donc rendus visibles grâce au passage par la LPS, pics qui n'étaient pas ou très peu visibles avant LPS.

20

1.2.3. Identification des pics d'un profil SSCP

Elle a été réalisée sur profil LPS « pauvre ». L'exemple du puits P3 est illustré dans la figure 5.

25 Sur les 4 pics présents révélés par SSCP, trois ont pu être clonés. Après séquençage et identification, les positionnements phylogénétiques des trois clones ont été les suivants : *Marinobacter sp* YJ0216, *Marinobacter* BR-13 et *Leuconostoc citreum* KM20.

1.2.4. Identification de la microflore bactérienne sulfo-réductrice par SSCP

Elle a été réalisée sur des échantillons d'eau de pétrole issus des puits P1 et P2.

Les résultats sont donnés dans la figure 6.

30 Chaque profil (P1 et P2) est représenté par 5 pics dont trois sont identiques (3 co-migrations) entre les deux puits. (Figure 6). Pour chacun des profils, 60% des bactéries détectées présentée ont donc un profil identique (flèches pleines de la figure 6).

Ces résultats ont permis de confirmer la présence de ce type de bactéries sulfato-réductrices dans cet environnement pétrolier, ces résultats ayant par ailleurs été également obtenus par les techniques culturales.

Ces résultats ont ainsi permis pour la première fois de détecter des BSR grâce à
5 l'outil SSCP couplé au gène dsrB. De plus ces résultats ont été obtenus malgré une concentration très faible d'ADN initialement disponible, ce qui permet d'envisager l'utilisation de ce couplage dsrB-SSCP pour d'autres biotopes où la présence d'une fonction sulfito-reductase dissimilatrice est suspectée.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection et/ou de discrimination de microorganismes responsables de la corrosion de matériaux, lesdits matériaux étant en contact avec un échantillon susceptible de contenir au moins un desdits microorganismes, ledit procédé comprenant :
- 5
- i. l'extraction du matériel génétique des microorganismes susceptibles d'être contenus dans ledit échantillon en contact avec un matériau susceptible d'être corrodé,
 - 10 ii. la détermination de l'éventuelle présence d'au moins un microorganisme responsable de la corrosion de matériaux dans ledit échantillon au moyen de l'amplification d'au moins un fragment du gène *dsrB* par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR),
 - 15 iii. la discrimination des microorganismes présents dans l'échantillon, révélés à l'étape précédente, par la mise en œuvre d'une technique de séparation des produits de réactions de PCR précédents en fonction de leur séquence nucléotidique utilisant le polymorphisme de conformation des simples brins SSCP, notamment par système capillaire (CE-SSCP).

20
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdits microorganismes sont des procaryotes, préférentiellement des procaryotes exprimant l'enzyme sulfite réductase, notamment des bactéries sulfato-réductrices.
- 25
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit échantillon est en contact avec un contenant susceptible d'être corrodé.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que si l'échantillon contient une faible quantité de microorganismes responsables de la corrosion de matériaux, ledit procédé comprend une étape complémentaire permettant d'augmenter la quantité de matériel génétique issu desdits microorganismes.
- 30

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que si l'échantillon contient une faible quantité de microorganismes responsables de la corrosion de matériaux, ledit procédé comprend une étape de stimulation de la prolifération desdits microorganismes afin d'augmenter la quantité desdits microorganismes.
- 5
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite stimulation de la prolifération consiste en la levée de phase stationnaire desdits microorganismes, notamment par la mise en culture desdits microorganismes, dans un milieu contenant des nutriments nécessaires à la prolifération desdits microorganismes.
- 10
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que lesdits nutriments sont fournis par le lactate et/ou l'acétate dans une gamme de concentration d'environ 0,3 à environ 30 g/l, ainsi que par la peptone et/ou l'extrait de levure, dans une gamme de concentration d'environ 0,1 à environ 20 g/l.
- 15
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, dans lequel, si l'échantillon est du pétrole ou de l'eau de pétrole, ledit milieu contenant des nutriments est éventuellement complétement avec d'environ 0,1 % à environ 1 % de pétrole brut.
- 20
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que si l'échantillon contient une faible quantité de microorganismes responsables de la corrosion de matériaux, ledit procédé comprend une étape de concentration du matériel génétique des microorganismes, notamment une étape de concentration par filtration au moyen d'un filtre spécifique, notamment avec une taille de pores dans une gamme d'environ 0,05 à environ 0,25 μm , notamment de type polyéthersulfone.
- 25
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que la PCR est réalisée en utilisant :
- 30
- i. une amorce sens comprenant ou consistant en au moins 15 nucléotides consécutifs, préférentiellement au moins 19 nucléotides consécutifs, au

moins 21 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID NO 1
suivante :

5'- GGN₁ N₂T N₃ N₄ N₅CAACATCGT N₆CAN₇ACCCAGGG-3'

où

5

N₁ représente un C ou un T,

N₂ représente un A ou un G,

N₃ représente un A, un C ou un T,

N₄ représente un A ou un T, et

N₅ représente un C ou un G,

10

N₆ et N₇ représentent n'importe quel nucléotide (A, T, G ou C)

ii. une amorce anti-sens comprenant ou consistant en au moins 15
nucléotides consécutifs, préférentiellement au moins 16 nucléotides
consécutifs, préférentiellement les 17 nucléotides consécutifs de la
séquence SEQ ID NO 2 suivante :

15

iii. 5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3'.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'amorce sens comprend
ou consiste en au moins 15 nucléotides consécutifs, préférentiellement au moins
19 nucléotides consécutifs, au moins 21 nucléotides consécutifs de l'une
20 quelconque des séquences suivantes : SEQ ID NO 3 à SEQ ID NO 50.

12. Procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce que

a. l'amorce sens consiste en l'une quelconque des séquences SEQ ID NO 3 à
25 SEQ ID NO 50, ou consiste en la séquence SEQ ID NO 51 suivante :

5'- CAACATCGTCCACACCCAGGG-3', et

b. l'amorce anti-sens consiste en la séquence SEQ ID NO 2.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce
30 que ledit procédé comprend en outre une étape de référencement des profils
SSCP afin de disposer d'une banque de données référençant les polymorphismes
des différents microorganismes susceptibles d'être contenus dans ledit
échantillon.

14. Procédé de discrimination de microorganismes responsables de la corrosion de matériaux selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, lesdits matériaux étant corrodés et étant en contact avec un échantillon contenant au moins un desdits microorganismes, ledit procédé comprenant :

- 5
- i. l'extraction du matériel génétique des microorganismes contenus dans ledit échantillon en contact avec un matériau corrodé,
 - ii. l'amplification d'au moins un fragment du gène *dsrB* par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR),
 - 10 iii. la discrimination des microorganismes présents dans l'échantillon, révélés à l'étape précédente, par la mise en œuvre d'une technique de séparation des produits de réactions de PCR précédents en fonction de leur séquence nucléotidique utilisant le polymorphisme de conformation des simples brins, notamment par système capillaire (CE-SSCP).

15

15. Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la détermination de la signature moléculaire d'un échantillon en contact avec un matériau susceptible d'être corrodé,

ladite signature moléculaire correspondant à la somme des profils moléculaires de chacun des différents microorganismes susceptibles d'être contenus dans ledit échantillon,

lesdites profils moléculaires étant obtenus à partir du profil SSCP des différents microorganismes susceptibles d'être contenus dans ledit échantillon,

ledit profil SSCP de chacun des différents microorganismes susceptibles d'être contenus dans ledit échantillon étant référencé dans une banque de données.

25

FIGURE 1

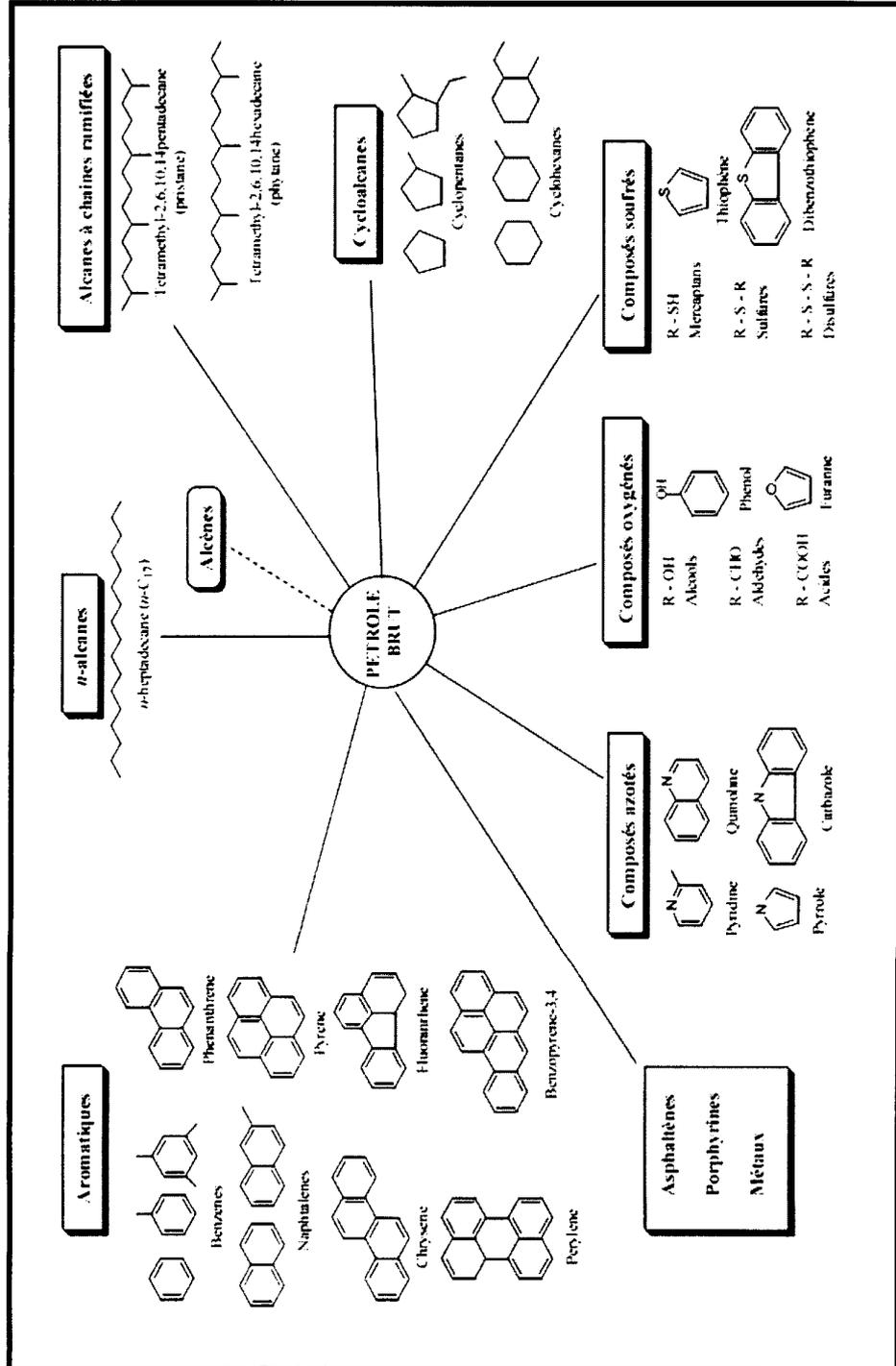


FIGURE 2

		Puits P1	Puits P2	Puits P3
Condition de prélèvement initiale	T° :	80°C	90°C	20°C
	NaCl :	120g/l	50g/l	100g/l
	Brut :	Brut lourd	Brut léger	Eau de pétrole
	Date :	Sept 2006	Déc 2006	Déc 2006
Condition estimée <i>in situ</i>	T° :	nc	nc	nc
	NaCl :	nc	nc	nc
	Type HC :	Brut lourd	Pétrole brut	Pétrole brut
	Profondeur :	2000m	1000m	1000m
	Tuyauterie :	1-2km	nc	nc

3 / 6

FIGURE 3

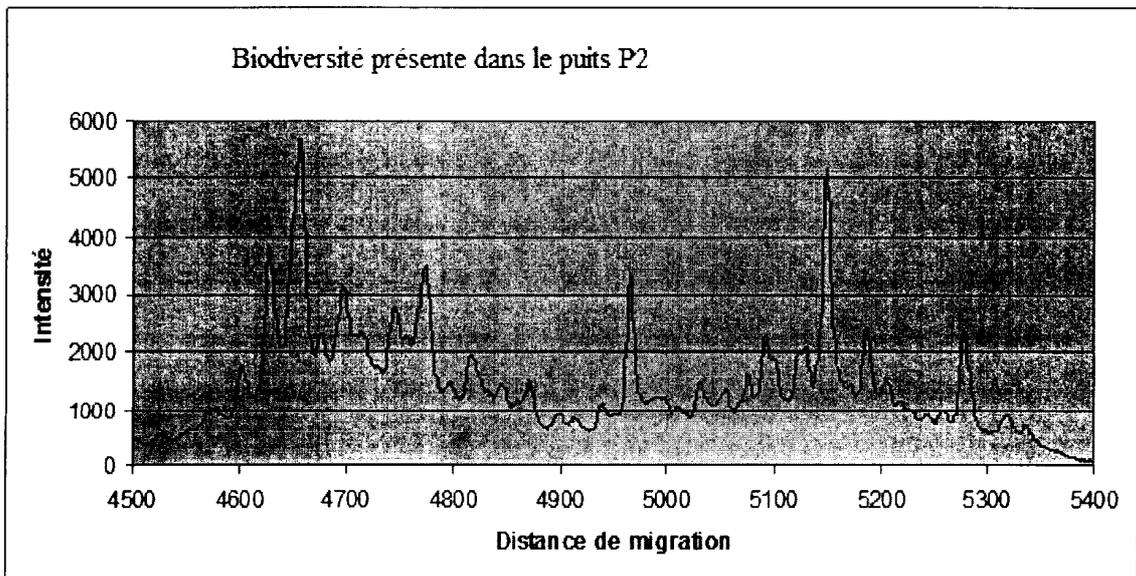
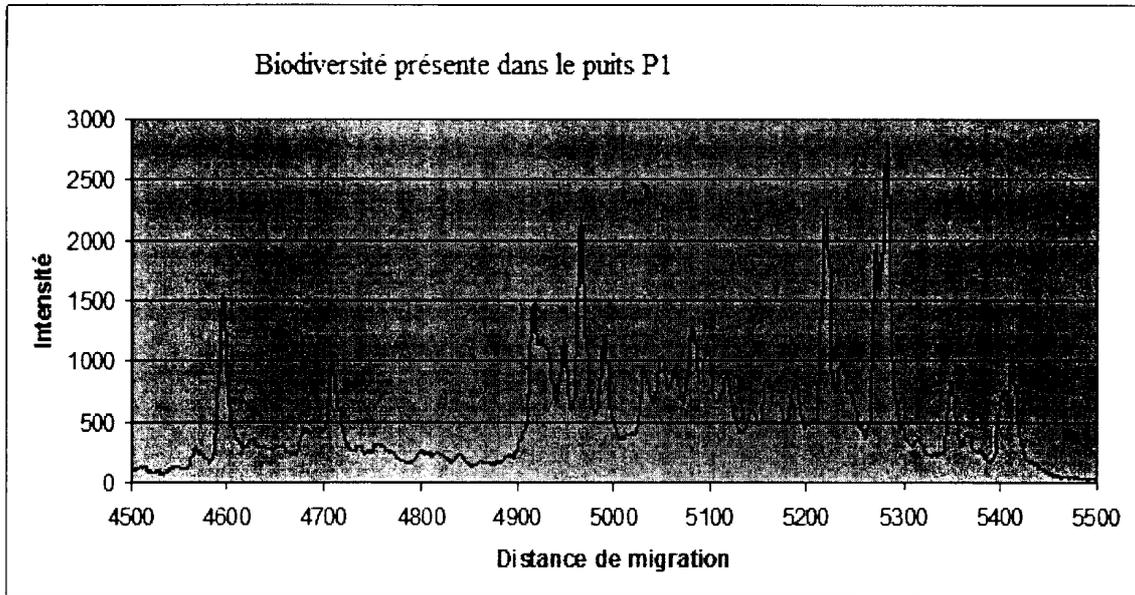
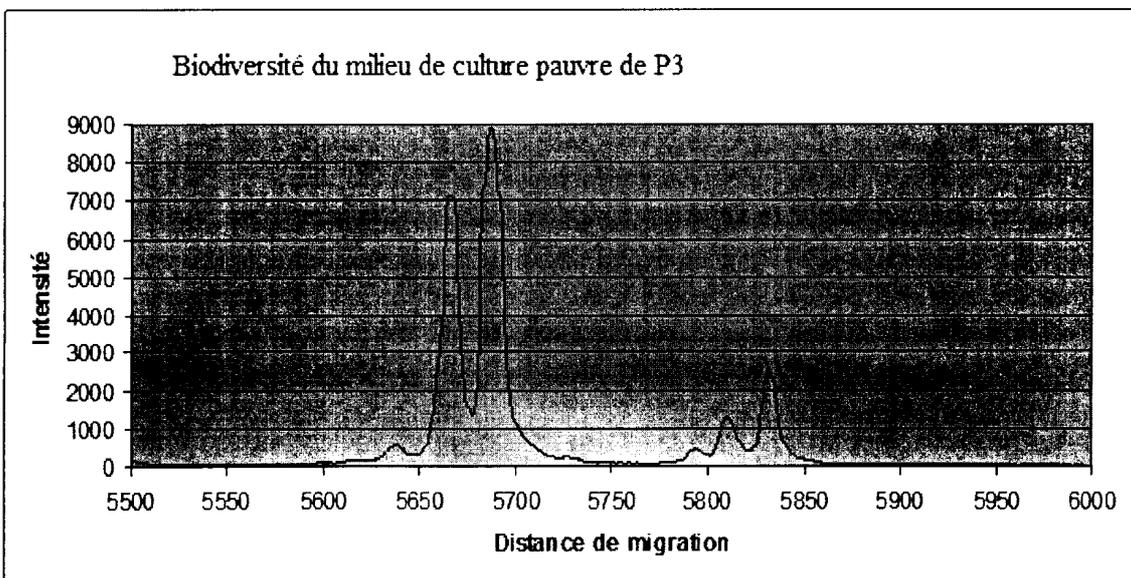
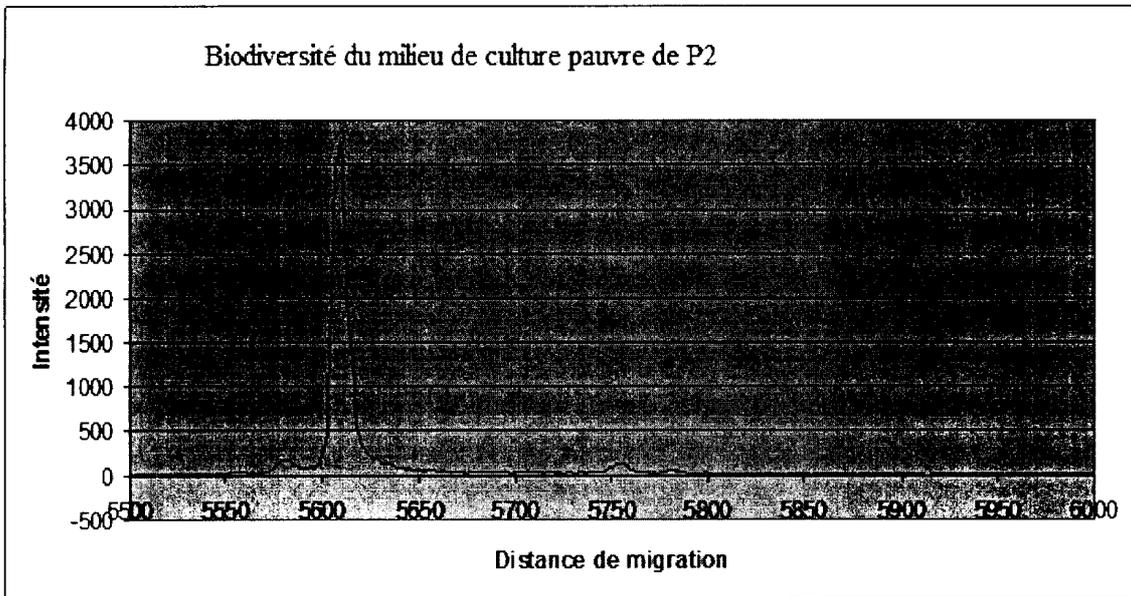


FIGURE 4



5 / 6

FIGURE 5

Superposition entre pics Sercina et pics clones

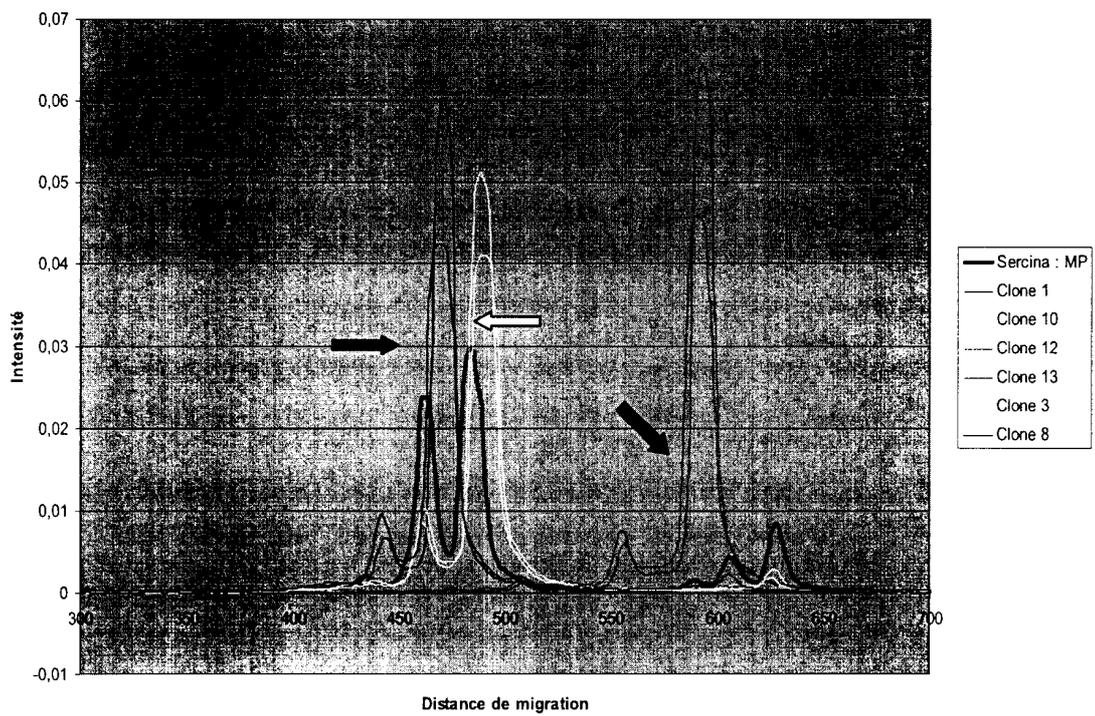
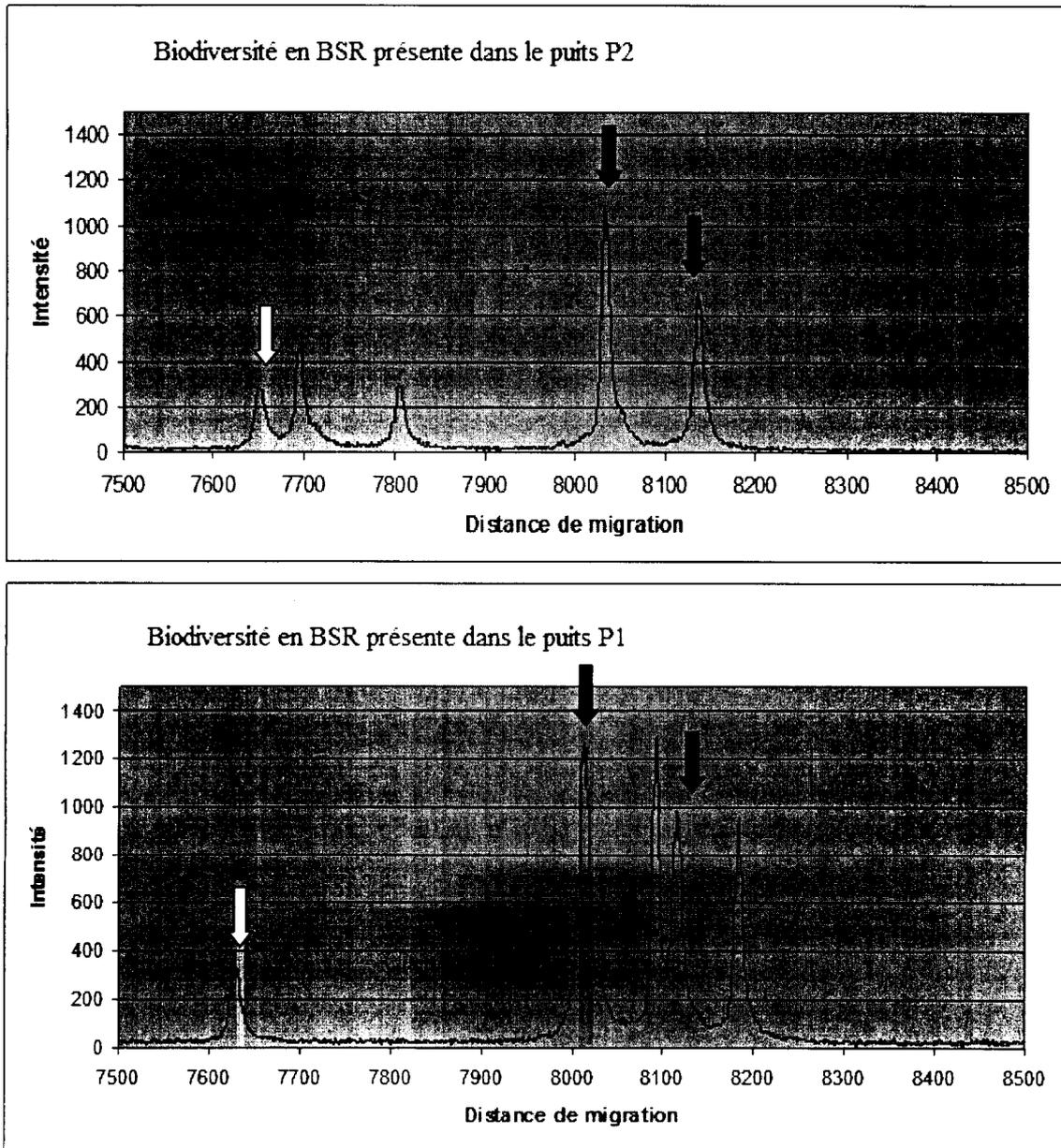


FIGURE 6



1
SEQUENCE LISTING

<110> Institut de recherche pour le développement (IRD)
 Institut national de recherche agronomique (INRA)
 Université du 7 Novembre-Carthage (U7NC)
 Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS)
 LABAT, Jean-Paul
 GODON, Jean-Jacques
 MAYEUX, Bruno

<120> PROCEDE PERMETTANT LA TRAÇABILITE DE BACTERIES CORROSIVES

<130> IFB 08 CS IRD TRAC

<160> 51

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> N= C ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> N= Aou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> N= A, C ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> N= A ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> N= A, T, C ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> N= A, T, C ou G

<400> 1
 ggnntnnnca acatcgtnc naccagg

<210> 2
 <211> 17
 <212> DNA

2

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide antisens
 <400> 2
 gtgtagcagt taccgca 17

<210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 3
 ggcataacca acatcgcca caccaggg 29

<210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 4
 ggtataacca acatcgcca caccaggg 29

<210> 5
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 5
 ggcgtaacca acatcgcca caccaggg 29

<210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 6
 ggtgtaacca acatcgcca caccaggg 29

<210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 7
 ggcatcacca acatcgcca caccaggg 29

3

<210> 8
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 8
 ggtatcacca acatcgtcca caccaggg 29

<210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 9
 ggcgtcacca acatcgtcca caccaggg 29

<210> 10
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 10
 ggtgtcacca acatcgtcca caccaggg 29

<210> 11
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 11
 ggcattacca acatcgtcca caccaggg 29

<210> 12
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 12
 ggtattacca acatcgtcca caccaggg 29

<210> 13
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 13

4

ggcgttacca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 14
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens

<400> 14
 ggtgttacca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 15
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens

<400> 15
 ggcatatcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 16
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens

<400> 16
 ggtatatcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 17
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens

<400> 17
 ggcgtatcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 18
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens

<400> 18
 ggtgtatcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 19
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> oligonucleotide sens
 <400> 19
 ggcatctcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 20
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 20
 ggtatctcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 21
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 21
 ggcgtctcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 22
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 22
 ggtgtctcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 23
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 23
 ggcatttcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 24
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 24
 ggtatttcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 25
 <211> 29
 <212> DNA

<213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 25
 ggcgtttcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 26
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 26
 ggtgtttcca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 27
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 27
 ggcataagca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 28
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 28
 ggtataagca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 29
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 29
 ggcgtaagca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 30
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 30
 ggtgtaagca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 31
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 31
 ggcatcagca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 32
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 32
 ggtatcagca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 33
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 33
 ggcgtcagca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 34
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 34
 ggtgtcagca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 35
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 35
 ggcattagca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 36
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> oligonucleotide sens

 <400> 36

ggtattagca acatcgtcca cacccaggg 8 29
 <210> 37
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 37
 ggcgtagca acatcgtcca cacccaggg 29
 <210> 38
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 38
 ggtgtagca acatcgtcca cacccaggg 29
 <210> 39
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 39
 ggcataatgca acatcgtcca cacccaggg 29
 <210> 40
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 40
 ggtatatgca acatcgtcca cacccaggg 29
 <210> 41
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 41
 ggcgatgca acatcgtcca cacccaggg 29
 <210> 42
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>

<223> oligonucleotide sens
 <400> 42
 ggtgtatgca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 43
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 43
 ggcacatctgca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 44
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 44
 ggtatctgca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 45
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 45
 ggcgtctgca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 46
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 46
 ggtgtctgca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 47
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> oligonucleotide sens
 <400> 47
 ggcatttgca acatcgtcca cacccaggg 29

<210> 48
 <211> 29
 <212> DNA

10

<213> Artificial sequence

<220>

<223> oligonucleotide sens

<400> 48

ggtatttgca acatcgtcca cacccaggg

29

<210> 49

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> oligonucleotide sens

<400> 49

ggcgtttgca acatcgtcca cacccaggg

29

<210> 50

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> oligonucleotide sens

<400> 50

ggtgtttgca acatcgtcca cacccaggg

29

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> oligonucleotide sens

<400> 51

caacatcgtc cacaccagg g

21

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN
CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

MILETTO ET AL: "Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments" JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 70, no. 1, 22 juin 2007 (2007-06-22), pages 103-111, XP022130106 ISSN: 0167-7012

HONG ET AL: "Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage" JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 69, no. 1, 28 mars 2007 (2007-03-28), pages 52-64, XP005928177 ISSN: 0167-7012

GEETS J ET AL: "DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria" JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 66, no. 2, 1 août 2006 (2006-08-01), pages 194-205, XP025073181 ISSN: 0167-7012 [extrait le 2006-08-01]

HORI T ET AL: "Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments" JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 66, no. 1, 1 juillet 2006 (2006-07-01), pages 165-169, XP025073217 ISSN: 0167-7012 [extrait le 2006-07-01]

WO 02/29007 A2 (B R G M BUREAU DE RECH S GEOL [FR]; BATTAGLIA BRUNET FABIENNE [FR]; MO)
11 avril 2002 (2002-04-11)

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN
TECHNOLOGIQUE GENERAL**

NEANT

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT