

UNIVERSITÉ DE NANTES  
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE 3MPL  
MATIERE, MOLECULES, MATERIAUX

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Influence des microorganismes sur la corrosion d'un  
acier non allié dans le contexte du stockage géologique  
profond des déchets radioactifs.

THÈSE DE DOCTORAT  
Discipline : Radiochimie  
Spécialité : Sciences des matériaux

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Hicham EL HAJJ**

*Le 4 octobre 2010, devant le jury ci-dessous*

Président M. Massoud FATAHI, professeur, Université de Nantes  
Rapporteurs Mme. Régine BASSEGUY, directeur de recherche, Laboratoire de génie chimique - Toulouse  
M. Damien FERON, directeur de recherches, CEA - Saclay  
Examineurs Mme. Christelle MARTIN, ingénieur d'étude, Andra - Châtenay Malabry  
M. Bernd GRAMBOW, professeur, Ecoles des Mines de Nantes  
M. François FOCT, chercheur, EDF - Les Renardières

*Directeur de thèse : M. Abdesselam ABDELOUAS, Maître Assistant, Ecole des Mines de Nantes  
Laboratoire de physique subatomique et des technologies associées SUBATECH, UMR 6457  
Ecole des mines de Nantes*

*ED : .....*



---

## **Remerciements**

---



La réalisation de cette thèse fut une occasion merveilleuse de rencontrer et d'échanger avec de nombreuses personnes. Je ne saurais pas les citer toutes sans dépasser le nombre de pages raisonnablement admis dans ce genre de travail.

La première personne que je tiens à remercier est M. Abdesselam ABDELOUAS, mon directeur de thèse, qui a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. Il a toujours montré de l'intérêt pour mes travaux et répondu à mes sollicitations lorsque le besoin s'en faisait sentir. Plus qu'un encadrant ou un collègue, je crois avoir trouvé en lui un ami qui m'a aidé aussi bien dans le travail que dans la vie lorsque j'en avais besoin.

Sur le plan scientifique, je tiens à remercier également M. Bernd GRAMBOW, professeur et directeur du pôle radiochimie à SUBATECH, et M. Massoud FATAHI, professeur à l'université de Nantes, pour la confiance et la sympathie qu'ils m'ont témoignées au cours de ces trois années de thèse

Je remercie M. Damien FERON et Mme Régine BASSEGUY de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. J'éprouve un profond respect pour leur travail et leur parcours, ainsi que pour leurs qualités humaines.

Je remercie M François FOCT et Mme Christelle MARTIN d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Leurs remarques et commentaires ont jeté un courant d'air frais qui m'a permis de clarifier certains points de ce manuscrit.

Je remercie M. Michel DION du laboratoire U3B (Unité de Biotechnologie, Biocatalyse, Biodégradation) pour sa collaboration scientifique concernant les expériences de biologie moléculaire.

Je remercie M. Eric GAUTRON, M. Alain BARREAU, M. Nicolas STEPHANT, M. Stéphane GROLLEAU et M. Pierre Emanuel PETIT de l'institut des matériaux de Nantes (IMN) pour leurs conseils et leurs disponibilités concernant les analyses DRX, MET et MEB. Je vous exprime ma gratitude pour notre collaboration et pour la sympathie que vous m'avez

## *Remerciements*

---

témoignée au cours de mes trois années de thèse. J'ai toujours été accueilli chaleureusement dans votre laboratoire et j'ai toujours pu compter sur votre aide pour le travail que je réalisais.

Je remercie M. Philippe REFAIT du laboratoire LEMMA et M. Erwan LE MENN du laboratoire de planétologie et géodynamique de Nantes pour leur collaboration concernant les analyses  $\mu$ -Raman. Je vous exprime ma reconnaissance pour votre intérêt dans le travail présenté ici.

Je remercie Mme. Véronique BATY et Mme. Katy PERRIGAUD. Je vous adresse ma sincère reconnaissance pour vos disponibilités concernant la chromatographie ionique et l'ICPMS. Vous avez contribué à la réalisation de ce travail, soyez assurées de mon plus profond respect pour vos compétences.

Au cours de mes années de thèse, j'ai côtoyé de nombreux collègues qui sont devenus des amis au cours du temps. Je tiens à les remercier tous, plus particulièrement ceux qui se reconnaîtront, pour leur soutien et leur bonne humeur (Shaibia, Delphine, Ludivine, Alicia, James, Francis...)

Comme il ne m'est pas possible de citer toutes les personnes qui ont directement ou indirectement contribué à la réalisation de ce travail et que je souhaite éviter d'en oublier, je me permets de lancer un remerciement général à toutes celles qui se reconnaîtront dans ces lignes, ainsi qu'aux autres.

J'exprime ma plus profonde gratitude à ma famille, la vraie, et notamment à mes parents pour m'avoir soutenu durant toutes ces années. Sans leur aide, ce projet n'aurait pas pu aboutir. Je leur serai toujours redevable de tous les efforts qu'ils ont fournis à mon égard.

Les meilleures choses ont une fin et à cet instant en ce qui concerne ce manuscrit pour moi c'est fini. C'est donc avec une certaine émotion que je vous confie cet épisode passionnant de ma vie résumé dans ces quelques pages en souhaitant par-dessus tout qu'il vous soit utile.

Bonne lecture, Hicham EL HAJJ.

# Tables de matières

Sigles et abréviations.....	10
Avant propos.....	11
<b>I. Introduction générale.....</b>	<b>15</b>
<b>II. Bibliographie.....</b>	<b>21</b>
<b>II-1. Concept de stockage géologique profond.....</b>	<b>21</b>
<b>II-2. Les déchets radioactifs de haute activité et à vie longue HAVL.....</b>	<b>23</b>
II-2-1. Provenance.....	23
II-2-2. Nature des déchets HA-MAVL.....	23
<b>II-3. Stockage des déchets HA-MAVL en formation géologique profonde.....</b>	<b>24</b>
II-3-1. Les fonctions attendues du milieu géologique.....	24
II-3-2. Les caractéristiques favorables de la couche argileuse du Callovo-Oxfordien....	24
II-3-3. Caractéristiques de l'argilite du Callovo-Oxfordien (COX).....	28
<b>II-4. Survie microbienne en condition de stockage.....</b>	<b>28</b>
<b>II-5. Les bactéries sulfato-réductrices (BSR).....</b>	<b>35</b>
II-5-1. Rappel du métabolisme bactérien.....	35
II-5-2. Le métabolisme des BSR.....	36
<b>II-6. Corrosion de l'acier influencé par les BSR.....</b>	<b>39</b>
II-6-1. Le biofilm.....	40
II-6-2. Mécanisme de corrosion en présence BSR.....	42
II-6-3. Corrosion par piqûre des BSR.....	46
<b>II-7. Corrosion des surconteneurs et des chemisages des déchets HAVL.....</b>	<b>47</b>
<b>II-8. Objectif de la thèse.....</b>	<b>50</b>
<b>III. Isolement des bactéries sulfato-réductrices.....</b>	<b>55</b>
<b>III-1. Matériels et méthodes.....</b>	<b>55</b>
<b>III-1-1. L'argilite du Callovo-Oxfordien.....</b>	<b>55</b>
III-1-1-1. Composition minéralogique.....	55
III-1-1-2. Composition des eaux porales.....	55
III-1-1-3. Echantillon d'argilite du Callovo-Oxfordien.....	57

<b>III-1-2. Isolement des BSR</b> .....	59
III-1-2-1. Milieux de culture .....	59
III-1-2-2. Méthodes analytiques.....	62
• Chromatographie ionique.....	62
• Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS).....	63
• COT-mètre (Shimadzu TOC V CSH).....	63
• Mesure des sulfures.....	64
• Suivi de la croissance bactérienne.....	64
• Potentiel redox.....	64
• Microscopie électronique à transmission (MET).....	65
<b>III-1-3. Identification des BSR</b> .....	65
III-1-3-1. PCR.....	66
III-1-3-2. Détection des produits PCR.....	68
III-1-3-3. Purification des produits de PCR.....	68
<b>III-2. Résultats</b> .....	68
<b>III-3- Conclusion</b> .....	77
<b>IV. Etude de l'effet des bactéries sur la corrosion de l'acier</b> .....	81
<b>IV-1. Matériels et Méthodes</b> .....	81
<b>IV-1-1. L'acier P235GH</b> .....	81
<b>IV-1-2-Analyse des coupons</b> :.....	82
IV-1-2-1. Méthode standard pour la mesure de la corrosion par coupon ASTM.....	82
IV-1-2-2. Microscopie électronique à balayage (MEB).....	82
IV-1-2-3. Diffraction des rayons X.....	83
<b>IV-1-3- Expériences de corrosion</b> .....	85
IV-1-3-1. Cultures en Batch.....	86
IV-1-3-3. Corrosion en présence de sulfures.....	87
IV-1-3-4. Influence des irradiations $\gamma$ sur la couche de biocorrosion.....	87
<b>IV-2. Résultats</b> .....	88
<b>IV-2-1. Cultures en Batch</b> .....	88
<b>IV-2-2. Corrosion avec succession de conditions aérobie/anaérobie.</b> .....	98
<b>IV-2-3. Expériences de corrosion abiotique de l'acier en présence de sulfure</b> .....	102
<b>IV-2-4. Influence des irradiations <math>\gamma</math> sur la couche de biocorrosion</b> .....	104
<b>IV-3. Conclusion</b> .....	106

<b>V.</b>	<b>Expériences de percolation simulant les conditions de stockage</b> .....	109
	<b>V-1. Montage expérimental</b> .....	109
	<b>V-2. Résultats</b> .....	112
	<b>V-3. Discussion sur la survie microbienne en contexte de stockage</b> .....	120
<b>VI.</b>	<b>Conclusion générale et perspectives</b> .....	129
	<b>Références</b> .....	137
	<b>Liste des figures</b> .....	153
	<b>Liste des tableaux</b> .....	157
	<b>ANNEXES</b> .....	159
	• <b>Résultats</b> .....	161
	• <b>Loi de 28 juin 2006, continuité de la loi n° 91-1381 du 30 décembre 1991 relative aux recherches sur la gestion des déchets radioactifs</b> .....	168
	• <b>Calendrier de gestion des déchets radioactifs de haute radioactivité et à vie longue</b> .....	170
	• <b>Répartition des déchets radioactifs</b> .....	170
	• <b>Schéma général du métabolisme bactérien des composés organiques</b> .....	171
	• <b>Corrosion en présence des BSR (Hypothèse de dépolarisation cathodique)</b> .....	171

## **Sigles et abréviations**

<b>ADN</b>	Acides désoxyribonucléique
<b>ADNr</b>	Gène codant un ARN ribosomique
<b>AMP</b>	Adénosine monophosphate
<b>Andra</b>	Agence nationale pour la gestion des déchets radioactifs
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>AREVA CN</b>	Société des participations du Commissariat à l'énergie atomique
<b>ASTM</b>	Méthode standard pour la mesure de la corrosion par coupon
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BET</b>	Bromure d'éthidium
<b>BRGM</b>	Bureau de recherches géologiques et minières
<b>BSR</b>	Bactérie sulfato-réductrices
<b>CEA</b>	Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
<b>COT</b>	Carbone organique total
<b>COX</b>	Callovo-Oxfordien
<b>DRX</b>	Diffraction de rayons X
<b>DSMZ</b>	Collection allemande de microorganismes et cultures cellulaires.
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétra acétique
<b>EDF</b>	Electricité de France
<b>EDZ</b>	Zone endommagée
<b>EDS</b>	Spectrométrie en énergie (Energy dispersive spectrometry)
<b>E<sub>corr</sub></b>	Potentiel de corrosion
<b>FA</b>	Faible activité
<b>HA</b>	Haute activité
<b>HAVL</b>	Haute activité à vie longue
<b>ICPMS</b>	Inductively coupled plasma mass spectrometry
<b>μ-raman</b>	Spectroscopie microraman
<b>MET</b>	Microscopie électronique à transmission
<b>MEB</b>	Microscopie électronique à balayage
<b>MA</b>	Moyenne activité
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne par polymérase
<b>TFA</b>	Très faible activité
<b>VM</b>	Vie moyenne
<b>VL</b>	Vie longue
<b>UV</b>	Ultra-violet

## **Avant propos**

Ces travaux de thèse ont été principalement effectués au sein du laboratoire SUBATECH (radiochimie) à l'école des mines de Nantes. SUBATECH est une unité mixte de recherche (UMR 6457) affiliée à trois tutelles : l'Ecole des Mines de Nantes, l'Institut National de Physique Nucléaire et de Physique des Particules (IN2P3) du CNRS, et l'Université de Nantes. Les activités de recherche de SUBATECH gravitent autour d'un domaine, le Nucléaire, que ce soit dans ses aspects les plus fondamentaux ou très appliqués, tant expérimentaux que théoriques, avec des recherches menées à la fois dans le domaine de la physique nucléaire et de la chimie nucléaire.

SUBATECH et l'Andra travaillent en partenariat dans le cadre des recherches menées sur le stockage géologique profond des déchets radioactifs de haute et moyenne activité à vie longue.

Les études menées par l'Andra depuis 1991 visent à acquérir les connaissances relatives aux phénomènes qui régissent l'évolution des colis de déchets, des ouvrages de stockage, et du milieu géologique. A l'issue d'une première phase d'études (1991-2005), l'Andra a démontré la faisabilité d'un tel stockage dans l'argilite du Callovo-Oxfordien en proposant des dispositions de conception simples, robustes, et adaptées aux caractéristiques de la couche argileuse. Ces concepts reposaient sur des choix prudents, voire pessimistes afin de disposer de marges de sûreté importantes.

Depuis 2005, les études se poursuivent afin d'acquérir des connaissances supplémentaires sur certains phénomènes tel que la corrosion bactérienne.

La présence des microorganismes au contact des conteneurs n'est en effet pas certaine, mais elle ne peut cependant pas être exclue notamment dans les phases de construction et d'exploitation du stockage. Cette thèse avait ainsi pour objectif d'étudier l'influence des bactéries sulfato-réductrices sur la corrosion des matériaux de stockage des déchets radioactifs.



---

## I- Introduction Générale

---



## I. Introduction générale

Les besoins croissants en énergie de notre société et les difficultés d’approvisionnement qui lui sont inhérents ont amené la France à faire le choix de l’énergie nucléaire comme source principale de production d’électricité. Par ailleurs, en terme de gestion des matières et déchets radioactifs, la France a choisi de retraiter le combustible usé issu du parc électronucléaire pour en récupérer les matières valorisables (uranium, plutonium) : le combustible usé n’est donc pas considéré comme un déchet. Ces opérations de retraitement du combustible conduisent néanmoins à une production de déchets radioactifs ultimes correspondant aux produits non valorisables (produits de fission et actinides immobilisés dans une matrice de verre) [1]. D’autres activités industrielles, médicales ou de recherche portent sur des matières contenant des corps radioactifs ou mettent en œuvre des rayonnements nucléaires. Elles engendrent aussi des déchets dits radioactifs qui peuvent être sous forme gazeuse, solide ou liquide.

En France, la classification des déchets radioactifs repose sur deux paramètres : le niveau de rayonnement et la période radioactive des radionucléides présents dans le déchet. Les déchets radioactifs se présentent sous des formes très variables tant du point de vue de la nature chimique et physique que du niveau et du type de la radioactivité [2] (Tableau 1). L’Andra a pour mission de développer des solutions de gestion adaptées à chaque catégorie de déchets.

Type des déchets		Vie courte (VC) (T1/2 < 30ans)	Vie longue (VL) (T1/2 > 30ans)
Très faible (TFA)	Ferraille, Gravats,	Stocké en surface au centre de stockage TFA de Morvilliers (Aube)	
Faible (FA)	Bétons...	Stocké en surface au centre de stockage de Soulaines (Aube)	Centre de stockage à faible profondeur (entre 15 et 200m) à l’étude mise en œuvre prévue en 2019
Moyenne (MA)	Gants, Combinaisons...		Centre de stockage profond (à 500m) à l’étude mise en service prévue en 2025
Haute	Déchets vitrifiés	Centre de stockage profond (à 500m) à l’étude mise en service prévue en 2025	

*Tableau 1 : classification Française des déchets radioactifs.*

Les déchets vitrifiés issus du retraitement présentent des risques pour l’homme et pour l’environnement qui perdurent durant des milliers d’années en raison de la présence des actinides et de certains produits de fission. Ces déchets vitrifiés de haute activité et à vie

longue ne représentent environ que 0,2 % en volume des déchets radioactifs français mais concentrent la quasi-totalité de la radioactivité (~95 %).

Le stockage en couche géologique profonde est une des solutions de gestion que la France a choisi d'étudier pour les déchets de haute et moyenne activité et à vie longue (HA-MAVL) dès 1991 (Axe 2 de la Loi de bataille 1991). Le principe d'un tel stockage repose sur un concept multi-barrières afin de limiter les phénomènes de transfert de la radioactivité depuis le site de stockage vers la biosphère pendant plusieurs centaines de milliers d'années. Ainsi, lors du retraitement du combustible, les actinides et produits de fission sont incorporés dans une matrice en verre borosilicaté (verre R7T7) dotée d'un fort pouvoir de confinement sur plusieurs centaines de milliers d'années lorsqu'elle se trouve dans des conditions physico-chimiques favorables. Ces déchets vitrifiés sont coulés dans des fûts en inox pour constituer les colis primaires des déchets. Ces colis primaires sont placés dans des surconteneurs en acier non allié qui retardent l'arrivée de l'eau au contact du déchet. Enfin, la formation géologique hôte limite également la circulation d'eau et la migration des radionucléides.

Depuis près de quinze ans, l'Andra « Agence Nationale pour la gestion des Déchets Radioactifs » mène un important programme scientifique pour acquérir des connaissances sur un stockage dans une formation géologique argileuse. L'outil de recherche le plus important est le Laboratoire souterrain de Meuse/Haute-Marne, implanté à 490 mètres de profondeur au cœur d'une formation argileuse très dure, l'argilite du Callovo-Oxfordien. Après de nombreux forages débutés en 1994, l'argilite, comme les couches qui l'entourent, est étudiée depuis 2004, dans les puits du laboratoire et des galeries expérimentales creusées à une profondeur de -445 mètres depuis 2004, et -490 mètres depuis 2005. Elles comportent actuellement diverses expérimentations destinées à confirmer des données déjà acquises sur le site. Outre des forages depuis la surface, les analyses d'échantillons et les études en milieu souterrain, les recherches s'appuient également sur les travaux menés dans plusieurs laboratoires souterrains étrangers, en particulier celui du Mont Terri en Suisse.

Ainsi, l'Andra a pu retracer l'histoire géologique du site de Meuse/Haute-Marne, confirmer l'intérêt de l'argilite du Callovo-Oxfordien en tant que barrière de confinement et évaluer son comportement à long terme, notamment l'effet des perturbations que l'implantation d'ouvrages de stockage lui ferait subir. En dehors des études géologiques, les recherches portent sur quatre domaines complémentaires : les colis de déchets et le comportement des matériaux pour comprendre l'évolution du stockage sur de très longues durées ; la conception

du stockage (conditionnement des déchets, architecture du stockage, méthodes d'exploitation et de fermeture réversible); l'évolution du stockage ; et la sûreté à long terme.

Le groupement de laboratoires verre-fer-argile (VFA) dirigé par l'Andra, a entre autres pour mission d'étudier tous les phénomènes de corrosion des surconteneurs de stockage, dont la corrosion bactérienne. Il est certes considéré comme invraisemblable qu'une activité bactérienne puisse se développer au sein de la formation géologique, c'est-à-dire à distance des ouvrages d'un stockage, compte tenu notamment de la taille des pores de l'argilite. Néanmoins, la question reste posée dans ou à proximité des ouvrage du stockage, qui a priori réunissent toutes les conditions (espace, facteurs nutritifs,...) nécessaires à une activité microbienne significative.

Les microorganismes, qu'ils soient préexistants dans la formation géologique étudiée ou introduits par le creusement de galeries et l'activité humaine sont des catalyseurs potentiels du transfert des métaux et des radionucléides [3].

En effet, le rôle de l'activité microbienne sur la détérioration des matériaux tels que les oxydes (verre,  $UO_2$ ) et les métaux des conteneurs métalliques est de plus en plus évoqué dans la littérature récente. En conditions atmosphériques (aérobies) ou en profondeur (anaérobies) la croissance des microorganismes peut provoquer la corrosion des matériaux via divers processus comme l'acidification du milieu, la modification des conditions redox, la production des acides organiques et de produits de métabolisme comme l'hydrogène sulfuré ( $H_2S$ ) [4]. Le suivi microbiologique réalisé au cours des expériences de géochimie en laboratoire souterrain a permis la détection et l'identification de souches bactériennes notamment de bactéries sulfato-réductrices [5, 6].

De nombreux secteurs sont concernés par ces phénomènes de dégradation induite par les microorganismes. On peut ainsi citer l'industrie pétrolière affectée au niveau des puits d'extraction, des oléoducs, des plates-formes en mer ; les installations portuaires maritimes et fluviales (palplanches, porte d'écluses) ; les centrales nucléaires (échangeurs, circuits de refroidissement, circuits incendies...); toutes les installations en général qui utilisent les eaux naturelles (systèmes de climatisation...); les structures métalliques des ouvrages d'art (pont, ponton, passerelle) ; l'industrie navale ; la pêche ; mais aussi la géothermie, l'aérospatiale (exemple de corrosion microbienne dans des réservoirs de kérosène), l'industrie agroalimentaire et le secteur médical.

Les travaux de cette thèse, menés dans le cadre du GL-VFA consistent à étudier les processus de corrosion d'un acier non allié modèle d'encapsulation du colis des déchets (verre nucléaire) en présence des bactéries sulfato- réductrices (BSR) isolées à partir d'échantillons d'argilite de la formation géologique hôte des déchets radioactifs prélevés et fournis par l'Andra.

---

## **II- Bibliographie**

---



## **II. Bibliographie**

### **II-1. Concept de stockage géologique profond**

Les déchets de haute et moyenne activité et à vie longue ne peuvent pas être entièrement retraités ou recyclés et nécessitent donc un stockage sécurisé et fiable pour des centaines de milliers d'années. La plupart des nations concernées par la production de ce type de déchets envisagent leur confinement en conteneurs résistants à la corrosion puis leur stockage dans des formations géologiques profondes présentant une grande stabilité tectonique, et susceptibles de constituer une barrière naturelle efficace pour confiner la radioactivité et empêcher le transfert des radionucléides vers la biosphère sur des échelles de temps pouvant atteindre des millions d'années [7, 8].

En France, la loi de Bataille du 30 décembre 1991 [9] sur la gestion des déchets radioactifs de haute activité et à vie longue a confié à l'Anfra « Agence Nationale pour la gestion des Déchets Radioactifs » la mission d'évaluer la possibilité d'un stockage des déchets en formation géologique profonde, notamment grâce à la réalisation de laboratoires souterrains (axe 2 de la loi). Cette loi énonce les grands principes à prendre en compte dans les recherches, en particulier la nécessité de travailler dans le respect de la protection de la nature, de l'environnement et de la santé et de prendre en considération le droit des générations futures.

La formation géologique considérée est l'argilite du Callovo-Oxfordien, étudiée notamment au moyen du laboratoire souterrain de recherche, situé dans l'est de la France, à la limite des départements de la Meuse et de la Haute-Marne (Figure 1).

Géologiquement, le site de Meuse/Haute-Marne appartient à la bordure orientale du bassin de Paris. Dans cette région, le bassin de Paris est constitué d'une alternance de couches sédimentaires à dominante argileuse et de couches calcaires, déposées dans un environnement marin stable au cours de l'ère Jurassique entre -165 millions et -135 millions d'années. Ces couches présentent une structure à géométrie simple et régulière avec un léger pendage vers le nord-ouest [10].

Au sein de la série sédimentaire, le Callovo-Oxfordien est la formation retenue pour l'étude de la faisabilité de stockage. Elle est encadrée par deux formations géologiques, le Dogger sous-jacent et l'Oxfordien carbonaté sus-jacent [11] au sein desquels se trouvent des horizons sédimentaires aquifères présentant néanmoins de faibles perméabilités et des écoulements lents de l'ordre du kilomètre par centaine de milliers d'années.

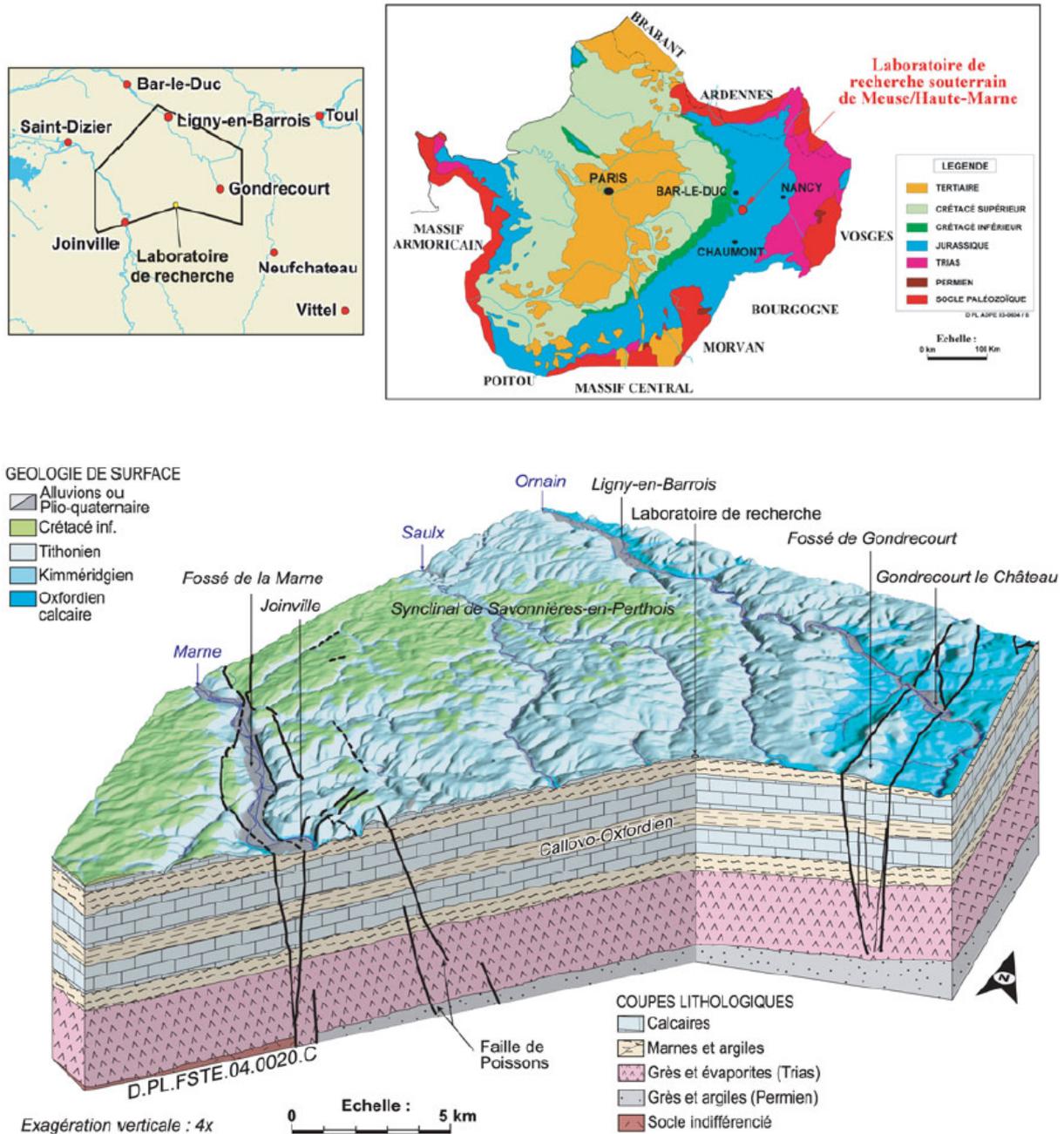


Figure 1 : le Callovo-Oxfordien, une couche argileuse profonde du bassin Parisien destinée à accueillir les déchets radioactifs de haute et moyenne activité et à vie longue [7].

A l'issue d'une première phase d'études (1991-2005), l'Andra a conclu à la faisabilité d'un stockage des déchets radioactifs à haute et moyenne activité et à vie longue dans l'argilite du Callovo-Oxfordien en proposant des dispositions de conception simples, robustes, et adaptées aux caractéristiques de la couche argileuse [6].

Les études se poursuivent aujourd'hui dans le cadre de la loi du 28 juin 2006 [10] qui charge l'Andra de concevoir et d'implanter un centre de stockage pour ces déchets selon un calendrier qui prévoit une mise en service du stockage en 2025.

## **II-2. Les déchets radioactifs de haute activité et à vie longue HAVL**

En France, la règle fondamentale de sûreté édictée par l'autorité de sûreté nucléaire, stipule qu'un déchet radioactif est « toute substance dont l'activité est telle que son rejet et /ou sa dispersion dans l'environnement n'est pas autorisé et pour laquelle aucun usage n'est envisagé ». Une substance radioactive est une substance qui contient des radionucléides, naturels ou artificiels, dont l'activité ou la concentration justifie un contrôle de radioprotection. En pratique, il n'existe pas de seuils d'activité ou de concentration uniques, valables pour tous les radionucléides, qui permettraient de déterminer si un contrôle de radioprotection est justifié.

### **II-2-1. Provenance**

Les principaux secteurs d'activité concourant à la production de déchets de haute et moyenne activité et à vie longue (déchets HA-MAVL) sont les industries électronucléaires (réacteurs de production d'électricité d'EDF, usine AREVA NC de la Hague de retraitement des combustibles, ainsi que les activités de recherche (CEA) et de la défense nationale). Aux résidus du traitement des combustibles usés s'ajoutent les déchets d'exploitation et de maintenance des usines de traitement et des réacteurs nucléaires.

### **II-2-2. Nature des déchets HA-MAVL**

- Déchets de haute activité ou déchets vitrifiés, également appelés déchets HA

Les déchets de haute activité et à vie longue représentent environ 0,2% du volume des déchets radioactifs produits actuellement en France. Ils correspondent aux matières non valorisables contenues dans les solutions issues du retraitement des combustibles usés dans les usines de AREVA NC, c'est-à-dire les produits de fission et les actinides mineurs (américium, curium, neptunium). Ces déchets sont incorporés dans un verre doté d'un fort pouvoir de confinement [12] puis coulé dans des fûts en acier inoxydable [13]. Leur haute activité induit un dégagement thermique important qui diminue dans le temps avec la décroissance radioactive des éléments. Il faut donc prévoir un délai d'entreposage pour les laisser refroidir avant qu'ils puissent être accueillis dans un éventuel stockage géologique.

- Déchets de moyenne activité à vie longue également appelés déchets MAVL

Ils proviennent surtout des usines de fabrication et de traitement des combustibles nucléaires ainsi que des centres de recherches [14]. Leur activité est faible ou moyenne, ne présentent

pas ou peu de dégagement thermique, mais leur contenu en éléments à vie longue justifie comme pour les déchets HA un confinement de très longue durée. Suivant leur nature, ils sont conditionnés dans du bitume, du béton ou par compactage. Les déchets ainsi conditionnés sont placés dans des fûts en béton ou en acier.

### **II-3. Stockage des déchets HA-MAVL en formation géologique profonde**

#### **II-3-1. Les fonctions attendues du milieu géologique**

Emise par l'autorité de sûreté nucléaire, la règle fondamentale de sûreté, appelée RFS.2.f, énonce les critères que doit respecter un site de stockage en profondeur :

- Absence de risque sismique à long terme.
- Absence de circulation importante d'eau dans le stockage.
- Roche permettant le creusement des installations.
- Propriété de confinement vis-à-vis des substances radioactives.
- Profondeur suffisante pour se mettre à l'abri des agressions diverses.
- Absence de ressources exceptionnelles exploitables à proximité.

#### **II-3-2. Les caractéristiques favorables de la couche argileuse du Callovo-Oxfordien**

- Suffisamment épaisse pour isoler les déchets de l'arrivée d'eau provenant des couches sous-jacentes et retenir les radionucléides.
  - Suffisamment homogène avec peu de discontinuité à la fois physique et minéralogique.
  - se comporte comme des systèmes clos qui limitent les échanges avec les couches géologiques qui l'entourent, d'où l'assurance de maintenir à long terme la capacité à retenir les radionucléides pour ralentir leur dispersion.
  - La stabilité du milieu géologique sur le long terme.
  - L'existence de faibles gradients hydrauliques locaux, verticaux dans la formation hôte, et horizontaux dans les formations aquifères encaissantes.
  - Une résistance mécanique et une conductivité suffisante.
  - Un mode de transport diffusif des radionucléides dissous dans l'eau et des capacités à retarder leur migration dans l'environnement.
  - Une capacité à absorber les perturbations chimiques (effet tampon).

Quel que soit le programme considéré du stockage, le concept géologique profond repose sur un modèle de confinement multi barrières. Dans le concept français développé par l'Andra [7, 15], les colis primaires de déchets HA sont placés dans un surconteneur constitué d'une virole cylindrique en acier non allié de 1,56m de longueur et 0,60m de diamètre. L'épaisseur de ce surconteneur a été dimensionnée en 2005 pour garantir l'étanchéité du surconteneur sur une durée millénaire en tenant compte des phénomènes de corrosion : les calculs menés sur la base des concepts proposés en 2005 ont conduit à une épaisseur de 55 mm [6]. Cette enveloppe est dotée de patin de glissement en céramique pour faciliter le coulissage des colis lors du stockage (Figure 2).

Ces colis de stockage sont placés dans des alvéoles de stockage creusées dans la formation géologique naturelle (Figure 3). L'alvéole de stockage est un tunnel borgne de 40m de long pour un diamètre de 0,7m. La partie utile de l'alvéole qui accueille les colis de stockage est dotée d'un chemisage métallique définitif en acier non allié qui permet le retrait éventuel des colis dans le cadre du principe de réversibilité [6, 14]. L'épaisseur de ce chemisage a été dimensionnée pour résister à la pression du terrain sur une durée pluriséculaire en tenant compte des phénomènes de corrosion : les calculs menés sur la base des concepts proposés en 2005 ont conduit à une épaisseur de 25 mm [6] (Figure 4).

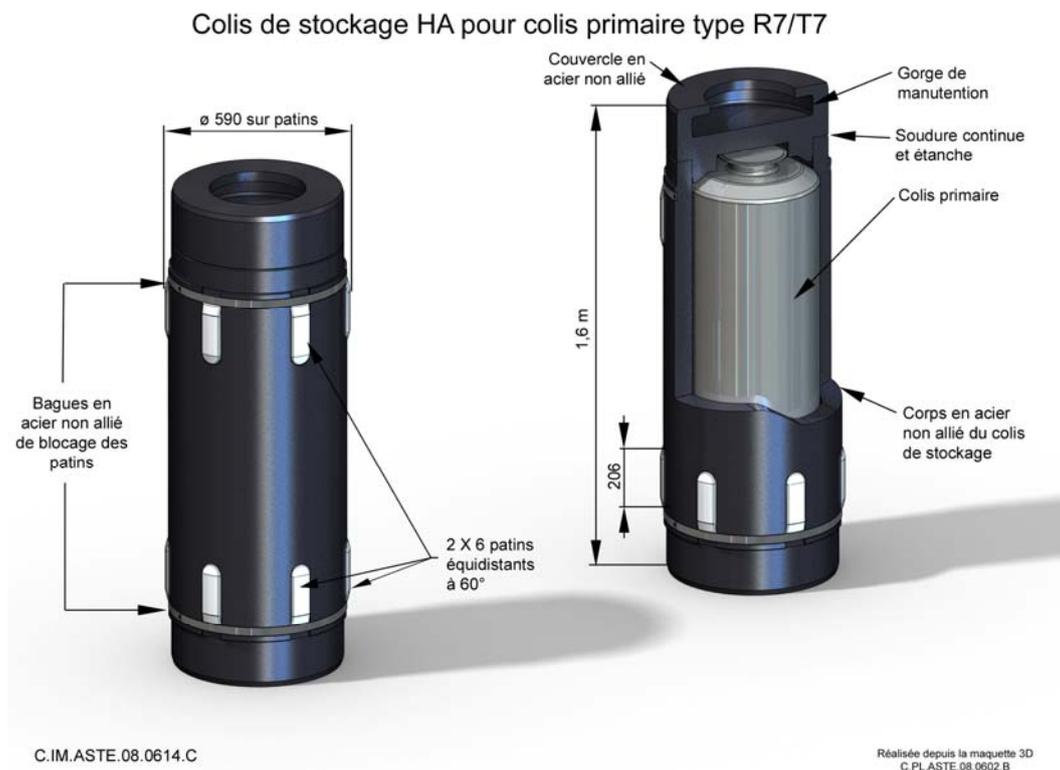


Figure 2 : Schéma d'un coli de stockage de déchets HA [15]

L'épaisseur de la formation hôte constitue une barrière essentielle à la circulation d'eau et à la migration des radionucléides. L'Andra a choisi d'organiser les alvéoles de stockage, de hauteur limitée, sur un seul niveau au milieu de la couche du Callovo-Ofordien afin d'assurer une égale protection des formations géologiques sus et sous-jacentes. La hauteur de garde a été fixée à au moins 50m : l'épaisseur minimale de la formation est de 130m, les installations souterraines se situent dans un niveau médian de 30m d'épaisseur centré à mi-hauteur de la formation [7, 15].

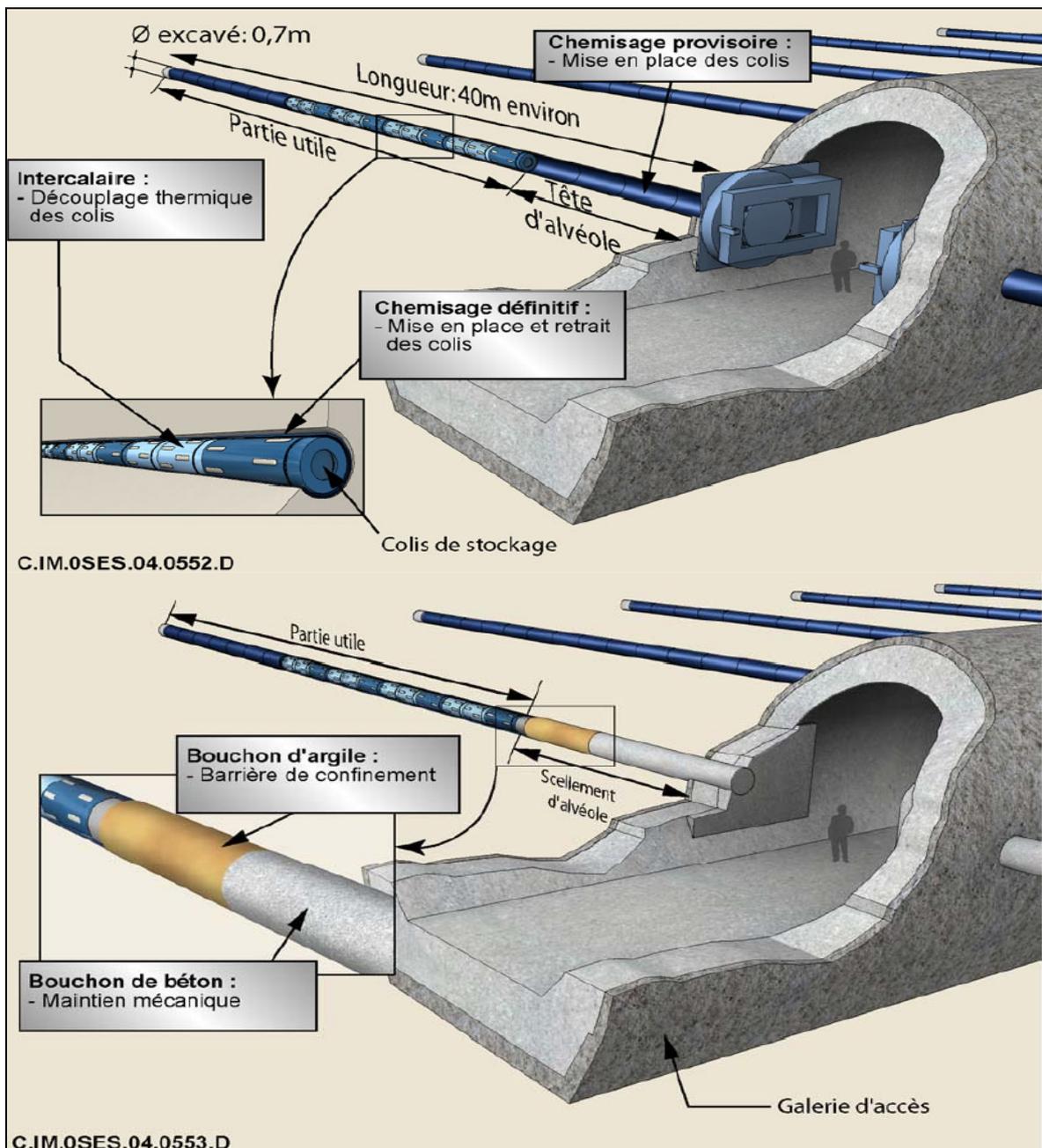


Figure 3 : L'alvéole des déchets HAVL, principaux composants et fonctions associées (en haut, alvéole en exploitation, en bas, alvéole scellée) [7].

L'architecture proposée par l'Andra regroupe les alvéoles de stockage des différentes catégories de déchets (HA, MAVL) au sein de zones de stockage spécifiques afin de permettre une gestion indépendante des différents déchets selon leurs caractéristiques (exemple : exothermicité), et de réduire la quantité de déchets et de radionucléides qui seraient affectés dans une situation de défaillance [7, 15]. Chaque compartiment est séparé l'un de l'autre par une forte épaisseur d'argilite et par des scellements fermant les galeries d'accès (Figure 5).

A noter que l'évolution actuelle des concepts [15] et les études en cours conduiront à un nouveau dimensionnement du chemisage et du surconteneur dans les années à venir.

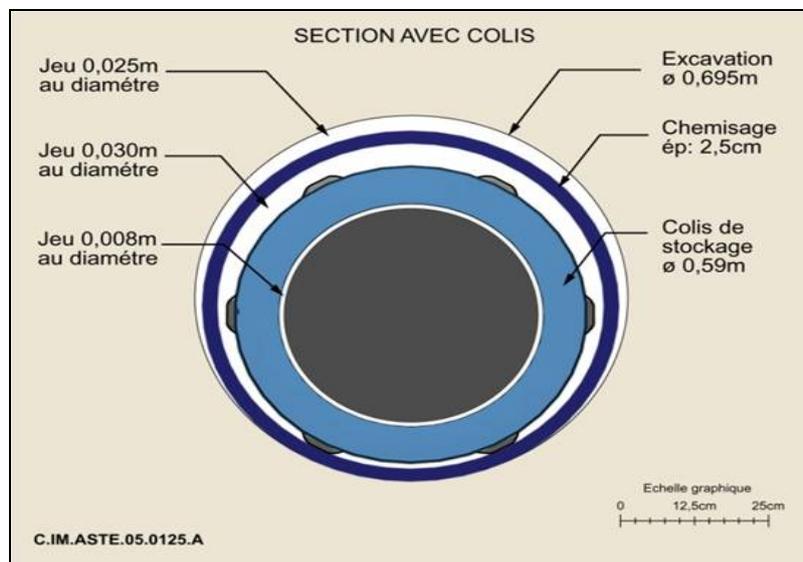


Figure 4 : section transversale de l'alvéole de stockage de déchets HA [7].

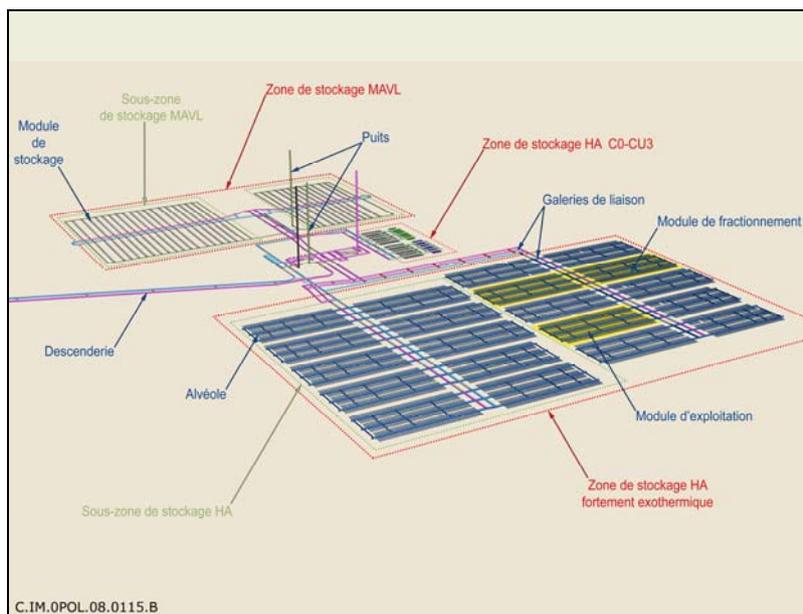


Figure 5 : Exemple d'organisation générale du stockage [15]

### **II-3-3. Caractéristiques de l'argilite du Callovo-Oxfordien (COX)**

L'argilite est un composé naturel formé de minéraux en grains de faible taille (de l'ordre du  $\mu\text{m}$ ), des poudres essentiellement, possédant des propriétés plastiques quand elles contiennent suffisamment d'eau, ou au contraire devenant dures lorsqu'elles sont sèches. L'argilite, qui se présente sous forme de feuillets de silicates, est souvent assimilée aux composés phyllosilicates [16].

L'argilite contient en grande partie des minéraux argileux qui possèdent les propriétés physico-chimiques recherchées pour constituer la barrière ouvragée : rétention des ions en surface, capacité de gonflement et d'absorption d'eau [17]. Elle présente également une faible perméabilité. La mesure de la perméabilité en milieu argileux pose de nombreuses difficultés techniques, diverses techniques ont été mises en œuvre par l'Andra. Quelles que soient les méthodes employées, la gamme des perméabilités reste toujours du même ordre de grandeur, entre  $10^{-12}$  et  $10^{-14}$  m/s [18]. De grandes quantités d'eau peuvent être retenues dans la structure de l'argile, le calcul de la rétention de l'eau aboutit à une teneur en eau de l'ordre de 50% volumique pour l'argilite [19].

### **II-4- Survie microbienne en condition de stockage**

Le cycle de vie bactérien comprend deux parties : l'étape de croissance et l'étape de survie. La capacité des bactéries à survivre dans les environnements hostiles est essentielle pour leur persistance.

Lorsque les conditions de l'environnement sont défavorables les bactéries de type sporulantes produisent des structures particulières : les endospores. Ces cellules sporulantes dites « dormantes », particulièrement résistantes à la chaleur, aux UV, aux agents chimiques ou encore à la dessiccation, peuvent maintenir leur viabilité pendant de longues périodes en attendant des conditions favorables pour germer [20].

Certaines bactéries non sporulantes utilisent d'autres voies lorsqu'elles sont exposées à des conditions hostiles. Elles sont capables d'entrer dans un état « végétatif » en modifiant leur métabolisme. Cet état est souvent référencé comme un état « viable non cultivable » (VBNC). Les bactéries à l'état VBNC sont incapables de croître sur les milieux de culture conventionnels mais possèdent néanmoins une activité métabolique. Des transformations cellulaires telles que la réduction de la taille des cellules, la diminution de la quantité d'ARN,

la condensation du cytoplasme, l'incapacité à se multiplier ou encore la réduction de l'activité métabolique caractériseraient cet état VBNC [21].

Le stockage géologique profond représente partout la solution de référence que ce soit pour les combustibles irradiés à l'étranger ou pour les déchets issus de retraitement en France. A ce jour, il n'existe au plan mondial que des laboratoires méthodologiques ou de qualification au stade de pilote. Citons parmi les pays les plus actifs dans ce domaine : la Suède (laboratoire dans le granite), la Belgique (laboratoire dans l'argilite), la Suisse (laboratoire dans le granite) et le Canada (laboratoire dans le granite).

Dans ces laboratoires, différentes études microbiologiques ont été conduites dans le cadre des programmes d'évaluation de la faisabilité de stockage géologique.

Au Canada, [22], les résultats d'énumération et de détermination de la biomasse cellulaire des bactéries aérobies suggèrent que les bactéries viables et non actives existent dans la bentonite. C'est à cause du manque des nutriments que les bactéries viables et actives deviennent stressées et perdent leur activité et cultivabilité mais pas leur viabilité. Pour les bactéries anaérobiques, une cultivabilité des bactéries sulfato-réductrices a été démontrée avec une production de sulfure et une réduction de 0,5% de sulfate.

En Suède, en milieu granitique, les échantillons d'eau souterraine prélevés à 800m de profondeur ont indiqué une concentration bactérienne de  $10^5$  cellules par ml [23]. Cette étude fait état de la présence potentielle de  $10^3$  à  $10^6$  cellules supplémentaires qui peuvent être attachées aux surfaces rocheuses en contact avec ces eaux. Masurat et al. [24] a pu isoler les bactéries sulfato-réductrices à partir de la bentonite. Il a montré que ces dernières sont capables de survivre entre 20 et 40°C avec une salinité allant de 0 à 4% et qu'elle restent viables même après un traitement à 100°C pendant 20 heures.

En Belgique, tous les échantillons argileux du site de stockage ont permis la détection d'ADN bactériens jugés autochtones de l'argile [25]. Les expériences menées sur ces souches ont montré que les bactéries peuvent accélérer la migration des radionucléides en augmentant la perméabilité et les fissurations dans la roche suite à la production des gaz comme l'hydrogène et le dioxyde de carbone [26], et qu'elles peuvent avoir un rôle important dans la sorption et l'immobilisation des radionucléides : c'est le cas des bactéries sulfato-réductrices qui peuvent sorber jusqu'à 47% de césium des échantillons analysés [27].

En Suisse, une partie des bactéries détectées correspond à des bactéries cultivées en conditions aérobies bien que la formation géologique étudiée au Mont Terri soit caractérisée par des conditions anaérobies et réductrices à l'état initial. Le développement de ces

organismes a pu être réactivé à partir de formes cellulaires en dormance ou de spores. Parmi ces microorganismes, on peut citer une bactérie aérobie appartenant au genre *Sphingomonas* qui peut utiliser un accepteur d'électrons autre que l'oxygène lui permettant de s'adapter au stress et à l'augmentation des capacité de survie [28].

Aux Etats-Unis, plusieurs études ont été menées pour mieux comprendre la biocorrosion des conteneurs de stockage en présence des BSR isolées de Yucca Mountain [29]. Ces études ont montré que le taux de corrosion de l'acier au carbone en présence des bactéries est considérablement plus important en comparaison à des cultures stériles sans aucune trace bactérienne (84µm/an en présence des BSR et 30µm/an pour les cultures stériles)

Compte tenu de la faible porosité de l'argilite, de l'importante restriction des flux d'eaux et de la température qui pourra atteindre jusqu'à 90°C (température qui ne constituera vraisemblablement pas à elle seule une voie de stérilisation microbiologique des zones situées au voisinage des déchets), la présence des microorganismes dans le site de stockage ne doit pas être ignorée. Si un nombre restreint de microorganismes indigènes est vraisemblablement présent dans la roche argileuse sédimentaire, une introduction microbiologique massive est attendue au cours de la construction, de l'excavation et de l'exploitation du site de stockage. Ces microorganismes introduits aérobies ou anaérobies strictes, sont capables de s'adapter aux environnements pollués et peuvent développer des moyens de défense contre les conditions extrêmes de survie comme la présence des métaux lourds, la radioactivité [30] ainsi que la compaction de l'argilite [31].

Malgré la faible porosité de l'argilite, avec plus de 80% des pores qui ont un diamètre moyen de l'ordre de quelques dizaine de nanomètres, des pores de diamètres micrométriques entre la matrice argileuse et les particules de quartz et les silicates (Figure 6) ainsi que des pores sub-micrométriques entre les carbonates existent [32]. Ces pores sont plus susceptibles de renfermer des cellules microbiennes.

La construction et l'exploitation du stockage vont perturber l'équilibre hydromécanique initial de la formation hôte et engendrer une diminution de la pression des pores autour de l'ouvrage. Cette perturbation hydromécanique peut créer une zone endommagée qui s'appelle aussi EDZ (Figure 7) et dans laquelle se distinguent généralement deux zones : une zone fracturée à proximité immédiate de la paroi et une zone micro fissurée derrière la zone fracturée [33]. Par ailleurs, le contact direct et indirect avec l'atmosphère au niveau de la paroi d'un ouvrage va engendrer un transfert de masse d'eau à cause de la différence d'humidité contrôlée par la

température et les conditions de ventilation de l'ouvrage. Globalement, ce processus induit une dénaturation de la roche pendant la phase d'excavation et une resaturation après la phase de fermeture. En raison de la sensibilité des minéraux argileux à l'eau, cette désaturation et resaturation induisent le retrait et le dégonflement de l'argilite ce qui peut engendrer des fissurations voire des fracturations et augmenter l'extension de l'EDZ [34]. Ces fissurations sont irréversibles [35] et le gonflement ne contribue pas à leur fermeture, au contraire il crée une pression additionnelle dans la zone de fissuration [36]. L'amplitude et l'évolution de l'EDZ sont donc d'importantes surfaces pour toute croissance bactérienne et notamment les biofilms.

Ainsi la disponibilité et la mobilité de l'eau dans les argiles sont des données essentielles. Ces informations sont liées à l'état de l'eau dans les milieux poreux et hydrophiles, comme les smectites. Dans le cas de séquestration bactérienne en milieu cloisonné à faible potentiel de circulation et à teneur en eau réduite, on s'attend à des fréquences de division cellulaire très faibles de l'ordre de 1 division toute les 10 ou 100 ans. En milieu géologique, la plupart des bactéries sont susceptibles de se trouver en surface des fractures où des biofilms peuvent se former pour atteindre des densités de  $10^4$  cellules par  $\text{mm}^2$  [37].

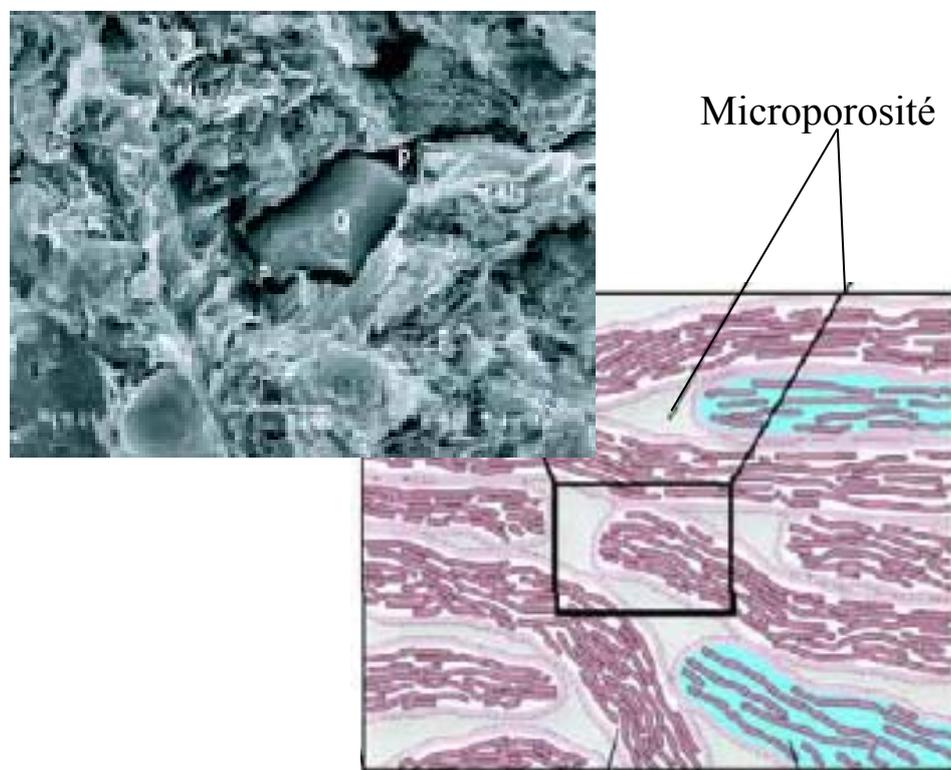


Figure 6 : schéma de la texture microporale de l'argilite du Callovo-Oxfordien[38].

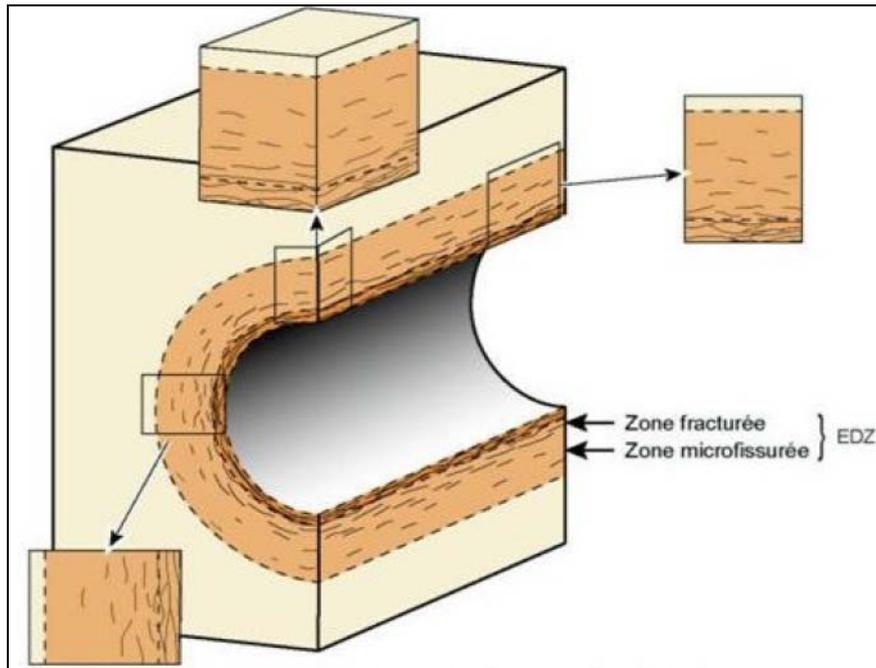


Figure 7 : schéma conceptuel classique de l'EDZ [39].

Toutefois, des signes de présence microbiologique ont pu être mis en évidence au cours des expériences d'hydrologie et de géochimie réalisées ces dernières années sur l'argilite Callovo-Oxfordien. La présence des bactéries chimiotrophes et autotrophes anaérobies a précédemment été évoquée dans des eaux géothermales sous-jacentes du Dogger et du trias de bassin Parisien, à une profondeur de 1 900 m et à une température d'environ 70 °C [40].

Plus récemment, en 2001, la série d'expériences PAC (prélèvements et analyses chimiques) a été initiée par l'Andra dans le laboratoire expérimental de Meuse / Haute-Marne afin de caractériser la composition de l'eau interstitielle de l'argilite du Callovo-Oxfordien. Pendant plusieurs mois et en dépit des précautions prises pour minimiser la contamination bactérienne (stérilisation du matériel, nettoyage des conduites de circulation d'eau par l'alcool et séchage sous azote), une chute du taux de sulfates, une production de sulfures et une augmentation de l'alcalinité ont été observées. Ces variations de concentrations dans le système ont été attribuées à une croissance microbienne impliquant des bactéries sulfato-réductrices (BSR) [6] ayant métabolisé l'alcool résiduel et susceptibles d'exister dans des environnements sédimentaires profonds. Les bactéries isolées à partir des expériences de PAC2001 sont : *Desulfosporosinus* (BSR), *Rhizobium* et *Propionobacteriaceae* (bactéries aérobie du sol).

Des expériences menées par l'Andra (DIR1001, DIR1002 et DIR1003), qui consistaient à étudier le comportement diffusif des traceurs radioactifs dans l'argilite suite à leur injection au niveau des forages ont montré la présence d'un petit nombre de microorganismes [28].

L'originalité génétique de ces souches suggère qu'elles pourraient être d'origine autochtone, c'est-à-dire présentes initialement dans la roche. Parmi ces bactéries, on peut citer *Pseudomonas Stutzeri* et *Micrococcus Lutens* (bactéries dénitrifiantes). Compte tenu des concentrations élevées des bactéries sulfato-réductrices apparues tout au long de l'expérience PAC2001, les échantillons prélevés sur les expériences DIR1001, DIR1002 et DIR1003 au bout de 26 jours ont été inoculés dans un milieu de culture spécifique des bactéries sulfato-réductrices. La formation d'un précipité noir a pu être observée dans les flacons inoculés, indiquant la présence des bactéries sulfato-réductrices dans ces trois prélèvements mais pas dans l'eau initialement injectée. Ces bactéries ne proviennent donc vraisemblablement pas de l'eau synthétique mais, soit de la roche, soit d'une autre source de contamination.

De même en 2002, l'expérience PAC2002 qui consistait à collecter l'eau relâchée naturellement par la roche argileuse a montré de la même manière la présence des bactéries sulfato-réductrices dans le milieu [28].

Une thèse dédiée à la recherche et à l'identification de microorganismes autochtones présents dans l'argilite du Callovo-Oxfordien a révélé une faible densité cellulaire dans le sédiment argileux mais a néanmoins conduit à l'isolement d'espèces bactériennes nouvelles [28]. Au total, quatre espèces bactériennes différentes ont été mises en évidence, isolées et identifiées sur la base de leurs séquences codant l'ARN ribosomique. Les souches sont toutes assignées au genre *Staphilococcus* (bactéries dénitrifiantes, thermophiles et qui peuvent utiliser le lactate et le glucose comme source d'énergie).

Sur les longues périodes envisagées pour le stockage géologique, le transport des radionucléides est contrôlé par les flux d'eau au sein de la formation géologique. Un élément dissous peut être transporté par deux mécanismes : par diffusion due à une différence de concentration en ion (ou plus généralement à une différence de potentiel chimique) et/ou par advection en étant emporté par le mouvement de l'eau. En marge de ces phénomènes, des études antérieures ont montré que le transfert des radionucléides pouvait être influencé, voire catalysé, par une activité microbiologique via quatre mécanismes principaux :

- La biosorption : consiste en une adsorption et une accumulation des radiomolécules en surface cellulaire, elle concerne les cellules vivantes et la biomasse morte et n'est pas affectée par la température [41].
- La bioaccumulation : correspond à la pénétration des éléments comme les actinides et l'uranium dans la cellule microbienne par des voies classiques de transport [42].

- La biotransformation enzymatique : désigne la catalyse des transformations directes de métaux métalloïdes toxiques vers des formes moins solubles ou plus volatiles via les mécanismes enzymatiques [43, 44].
- La biominéralisation : correspond à la précipitation des métaux stables ou radioactifs par des ligands tels que les phosphates, les carbonates et les sulfures produits par voie enzymatique par certains microorganismes [45].
- Enfin la synthèse d'exopolysaccharides par les microorganismes peut conduire à la rétention des radionucléides par réduction des flux d'eau et des solutés. Ce phénomène varie significativement en fonction des organismes considérés. Les exopolysaccharides produits par certaines espèces se comportent comme des agents complexants qui favorisent la mobilité des radionucléides [46].

Les microorganismes peuvent subir aussi l'effet de radiations en provenance des colis de stockage et à plus long terme de substances radioactives susceptibles d'avoir migré dans la formation. Les effets des irradiations sur la survie des microorganismes sont étudiés depuis peu de temps. Les études menées sur le site de Hanford des Etats-Unis ont montré que les échantillons de sédiments contaminés riches en substances alcaline, nitrate, aluminate, chromate  $^{137}\text{Cs}$  et  $^{99}\text{Tc}$  contenaient des bactéries aérobies hétérotrophes viables, y compris dans les échantillons radioactifs [47]. De même aux Etats-Unis, une étude a montré l'existence d'un biofilm mixte sur un conteneur en acier inoxydable irradié. Ce biofilm est formé de bactéries gram positive aérobies et hétérotrophes ainsi que des bactéries sulfato-réductrices. Ces biofilms peuvent survivre jusqu'à 64 jours sous irradiation avec une dose de  $3,2 \times 10^3$  Gray. Les bactéries sulfato-réductrices isolées peuvent tolérer 5 fois plus d'irradiation que les autres bactéries et après 99 jours d'irradiation, leur concentration dans le milieu reste à  $10^7$  cellules par ml [30].

De même, des microorganismes anaérobies dénitrifiants, fermentateurs, réducteurs de sulfates et méthanogenes ont pu être détectés dans des échantillons de liquides faiblement radioactifs issus de stockage en Russie. Les expériences réalisées indiquent même une activité microbiologique plus importante dans les zones de dispersion de radionucléides que dans les zones alentours non contaminées [48].

En réalité, l'étude de la vie microbienne dans les environnements radioactifs illustrés par ces quelques exemples récents, indique que la radioactivité pourra présenter une aptitude limitée à éradiquer des populations microbiennes présentes sur des sites contaminés.

Malgré les aspects positifs que peuvent avoir les bactéries sur la migration des radionucléides, les microorganismes pourraient avoir des effets défavorables sur le devenir des installations du site de stockage. La corrosion induite par les microorganismes (MIC) constitue en outre un sujet de préoccupation où les bactéries interviennent d'une façon directe ou indirecte dans la biodétérioration des matériaux. Les mécanismes de biocorrosion sont variés et reflètent la diversité des différents types de bactéries, de milieux et de matériaux. Actuellement, il est admis que les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et thiosulfato-réductrices jouent un rôle prépondérant dans la biocorrosion anaérobie [49-51] de nombreux types de matériaux comme les aciers inoxydables [52] et les aciers doux [53].

### II-5. Les bactéries sulfato-réductrices (BSR)

#### II-5-1. Rappel du métabolisme bactérien [54]

Le métabolisme bactérien se résume à des réactions d'oxydoréduction en chaîne. Ces réactions correspondent à un transfert d'électrons entre un réducteur (donneur d'électrons) et un oxydant (récepteur d'électrons).

Première étape : oxydation d'un substrat de bas potentiel électrochimique, donneur d'électrons :



Deuxième étape : réduction d'un substrat A de haut potentiel électrochimique, accepteur d'électrons.



L'énergie de ces réactions successives est récupérée dans les systèmes microbiens pour aboutir à la formation d'une molécule biochimique, l'ATP (Adenosine triphosphate) qui joue le rôle de carburant dans les cellules vivantes et stocke l'énergie au niveau de la liaison triphosphate.

Les substrats énergétiques des microorganismes sont :

Donneurs d'électrons ou réducteurs : matière organique, hydrogène, fer, manganèse, ion ammonium, sulfure, soufre.

Accepteurs d'électrons ou oxydants : oxygène, nitrate, sulfate, fer, carbonate, dioxyde de carbone, matière organique.

L'accepteur d'électrons pour les bactéries aérobies est impérativement l'oxygène moléculaire, et une espèce ionique pour les bactéries anaérobies strictes.

### **II-5-2. Le métabolisme des BSR**

Les BSR sont les bactéries anaérobies strictes et sulfurogènes les plus étudiées. De nombreuses références concernant leur métabolisme et leur rôle dans les phénomènes de biodégradation des matériaux sont disponibles [55, 56].

Le métabolisme des BSR se caractérise par la propriété que possèdent ces bactéries, d'utiliser le sulfate comme accepteur terminal d'électrons. Ce processus est couplé à l'oxydation d'un donneur d'électrons qui est le plus souvent une substance organique [57].

La physiologie et la taxonomie des BSR ont subi d'énormes changements ces dernières années et environ 40 genres et 150 espèces de bactéries sulfato-réductrices sont actuellement caractérisés et divisés en quatre groupes phylogéniques d'après l'analyse de leurs séquences d'ARN 16s : les Gram positives sporulés, les Gram négatives mésophiles et thermophiles, et les archaebactéries thermophiles sulfato-réductrices [58].

Les BSR ont une parfaite adaptation à la plupart des écosystèmes, qu'ils soient terrestres ou subterrestres, ce qui résulte certainement d'une grande variabilité métabolique [59]. Ces bactéries sont capables d'utiliser une multitude de substrats qu'elles peuvent dégrader complètement pour certains. Parmi les substrats utilisables par les BSR en présence de sulfate, citons l'hydrogène, les acides organiques, les alcools, les sucres et même les hydrocarbures aliphatiques. Jusqu'en 1980, les BSR étaient considérées comme des microorganismes anaérobies strictes, puis il a été démontré qu'elles pouvaient tolérer la présence transitoire de l'oxygène [60]. Cependant aucune croissance n'a été démontrée en présence d'oxygène comme accepteur terminal d'électrons.

Du point de vue métabolique, les BSR se répartissent en deux groupes : les espèces oxydant incomplètement leurs substrats notamment le lactate jusqu'à l'acétate et celles capables d'oxyder leurs substrats organiques y compris l'acétate jusqu'au dioxyde de carbone [61].

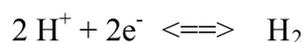
En l'absence de sulfate et d'autres accepteurs d'électrons inorganiques, plusieurs types de BSR peuvent se développer par fermentation de certains substrats organiques, le formate et le malate peuvent être fermentés pour produire du succinate, de l'acétate et du dioxyde de carbone [62].

Les BSR possèdent la capacité de se transformer en petites unités ovoïdales et sphériques appelées spores. Chez ces bactéries, le cycle sporal caractérise les transformations où alternent les phases végétatives de croissance, la sporulation, la dormance et la germination.

Le processus de sporulation qui induit de profonds et radicaux changements morphologiques survient en fin de phase de croissance lorsque le milieu s'appauvrit en nutriments. Lorsque la sporulation est achevée, les bactéries restent en phase de dormance dans l'attente de conditions plus propices à la croissance [63]. La dormance est un état dans lequel le spore se trouve fortement déshydraté et totalement inactif, il n'y a pas d'activité métabolique, ce qui lui permet de survivre pendant de très longues périodes. Dans ces conditions, il est particulièrement résistant à la chaleur, à la dessiccation, aux radiations ainsi qu'aux agents chimiques. Enfin lorsque l'environnement devient à nouveau favorable au niveau physicochimique, le spore germe pour redevenir une cellule végétative [20].

Le spore se distingue donc de la cellule par ces nouvelles structures que sont ses enveloppes. Il existe de plus une différence très importante au niveau de la composition chimique puisque le spore contient des composés totalement absents de la forme végétative. Le spore est donc une entité de structure et de composition complexes douée d'une résistance thermique exceptionnelle et d'une résistance aux changements physico-chimiques du milieu où ils se trouvent. Mais, il ne faut pas perdre de vue que le spore est dormant et qu'il possède tous les mécanismes lui permettant de détecter l'état de l'environnement où il se trouve et ceux lui permettant de sortir de cette dormance. L'acquisition de la résistance est réalisée via l'accumulation de plusieurs composés en quantités très importantes dans le cortex (la membrane externe du spore), les principaux étant l'acide dipicolinique (DPA) et des cations divalents, essentiellement du calcium  $\text{Ca}^{2+}$  [64].

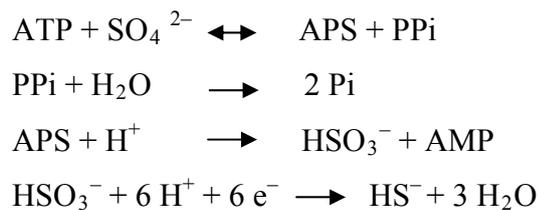
Les BSR sont aussi autotrophes, elles utilisent l'hydrogène seulement pour la réduction de sulfates [65]. La plupart de ces bactéries sont thermophiles et produisent du méthane, de l'acétate et des sulfures d'hydrogène comme produits de métabolisme. Les hydrogénases, enzymes qui catalysent la production et la consommation d'hydrogène occupent une place centrale dans ce métabolisme. Elles permettent la réaction chimique la plus simple :



Il existe deux types d'hydrogénase, les hydrogénases à Fe (fer) et les hydrogénases à Ni Fe (nickel et fer), qui sont douées de la même activité catalytique. Elles sont capables de faciliter dans les deux sens la réaction indiquée plus haut, pourtant, ces deux groupes de protéines ne présentent ni homologie de séquences ni homologie structurale [66]. Ce sont les hydrogénases à NiFe qui se trouvent souvent chez les BSR qui consomment l'hydrogène.

L'activité de l'hydrogénase dépendrait de la concentration en  $\text{Fe}^{2+}$ , et elle est toujours plus importante pour les BSR sessiles (en biofilms) que pour les BSR planctoniques (cf. paragraphe II-6-1). Le fer est un cofacteur important pour la synthèse d'enzymes telles que les hydrogénases et la réductase [67].

La réduction des sulfates (Figure 8) en sulfures consomme 8 électrons fournis par des donneurs d'électrons organiques ou inorganiques. Il s'agit d'un processus bioénergétique. La réduction fait intervenir des déhydrogénases, différents cytochromes, des ferredoxines, des sulfates réductases et des sulfites réductases [68].



C'est la grande stabilité de l'ion sulfate qui rend nécessaire son activation préalablement à l'assimilation par la cellule [69]. Cette activation est effectuée par l'ATP sulfurylase. Elle conduit à l'adénosine phosphosulfate (APS) et au pyrophosphate (PPi). Le groupement sulfate de l'APS est réduit directement en sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) lequel est facilement réduit selon deux mécanismes possibles. Le premier correspond à la réduction directe à six électrons tandis que le second fait intervenir trois étapes biélectroniques, les intermédiaires réactionnels étant le trithionate et le thiosulfate [65].

La littérature ne fournit que très peu de données cinétiques sur la croissance des BSR bien que ces microorganismes soient étudiés de longue date. La croissance des BSR s'accompagne de la production d' $\text{H}_2\text{S}$  qui entraîne la formation de sulfure de fer dans les milieux naturels. Les mesures de biomasse cellulaire sont donc peu aisées. La croissance des bactéries sulfurogènes peut être limitée par l'effet inhibiteur exercé par les produits du métabolisme et notamment par l' $\text{H}_2\text{S}$  [65]. Ce composé agirait, selon Reis et al. [70], par un découplage énergétique analogue à celui connu pour d'autres acides faibles [71]. Les acides faibles sous forme protonée ont, en effet, la propriété de traverser la membrane cellulaire par diffusion passive.

Afin de maintenir un milieu intracellulaire à un pH plus élevé, compatible avec la fonctionnalité cellulaire, des protons doivent être réexportés dans le milieu externe par un mécanisme de transport actif. Ce mécanisme consomme de l'ATP, d'où un découplage énergétique apparent. Ce mécanisme, classique chez les bactéries fermentatives, n'a toutefois

pas été démontré expérimentalement chez les BSR. Comme nous le verrons plus loin, les sulfures produits par le métabolisme réagissent et font précipiter les ions  $\text{Fe}^{2+}$  du milieu de culture. De ce fait, la croissance bactérienne peut être, dans certains cas, fortement limitée par la disponibilité en ions  $\text{Fe}^{2+}$  et non par le découplage énergétique provenant de la diffusion passive d' $\text{H}_2\text{S}$  au travers de la membrane cellulaire. Quel que soit le mécanisme retenu, l' $\text{H}_2\text{S}$  exerce une inhibition directe ou indirecte sur la croissance bactérienne [72].

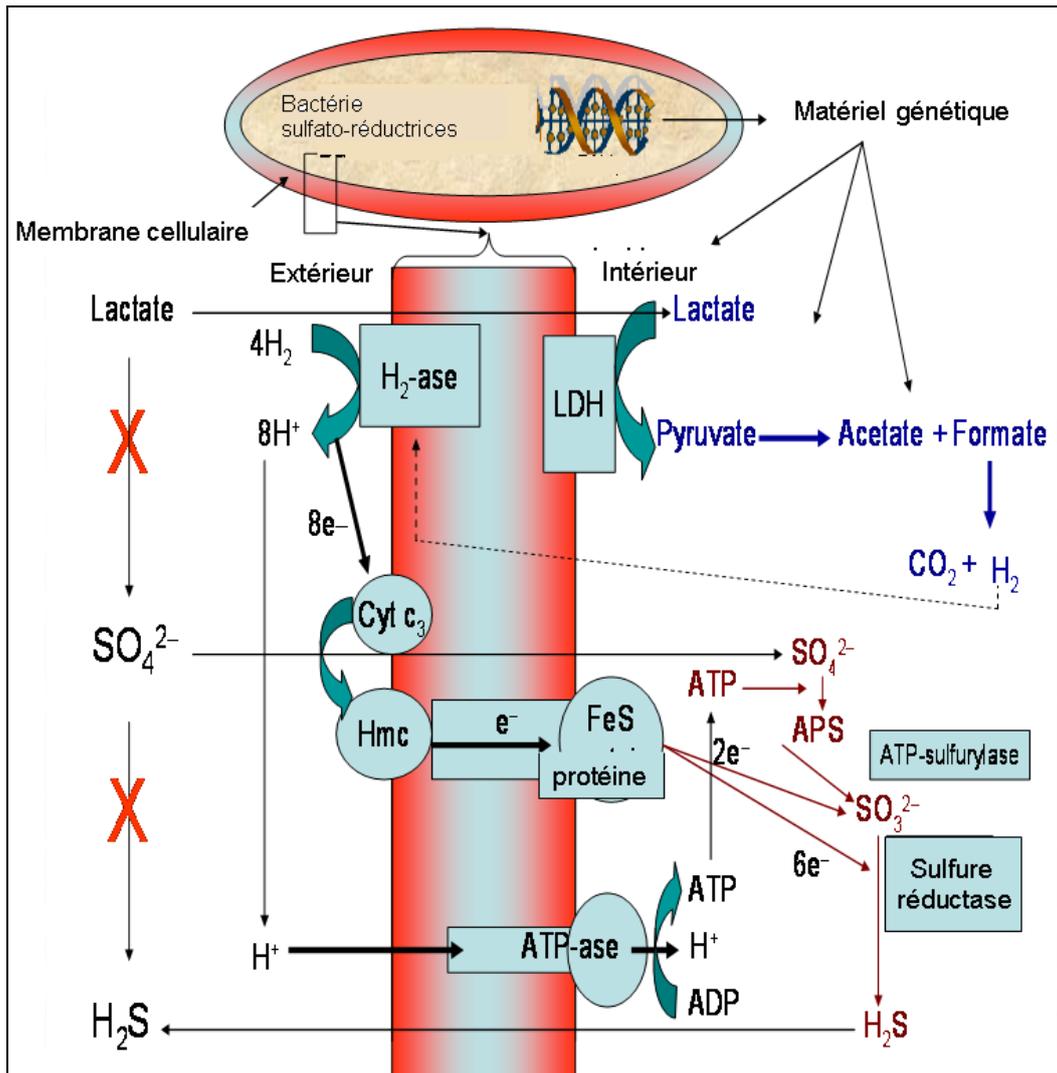


Figure 8: métabolisme des BSR utilisant le lactate comme donneur d'électrons pour réduire le sulfate (Communication personnelle Pedersen Karsten).

## II-6. Corrosion de l'acier influencé par les BSR

La corrosion influencée par les bactéries est un phénomène électrochimique de dissolution du métal qui touche toutes les industries. Elle a fait l'objet de nombreuses revues [73]. Sur les aciers, un des premiers cas remonte au début des années 70 où des fuites sont apparues aux endroits des soudures quelques mois après la mise en service des réservoirs d'eau. Les

réactions électrochimiques s'effectuent à l'interface métal/matériel biologique, ce dernier formant une structure particulière : le biofilm [74].

### **II-6-1. Le biofilm**

Le biofilm a été défini pour la première fois par Costerton et al. [75]. Il s'agit d'un ensemble de cellules attachées à une surface solide et enchâssées dans une matrice fortement hydratée composée d'exopolymères sécrétés par les microorganismes eux-mêmes.

L'organisation, la forme et la densité de ces communautés est une réponse aux variations des conditions environnementales. Les caractéristiques chimiques et physicochimiques du milieu, telles que la quantité et la diversité des nutriments, la présence de métaux lourds (Cd, Pb, Hg), le pH, la température et la force ionique peuvent influencer l'attachement microbien à une surface.

La figure 9 présente les cinq grandes étapes de formation du biofilm. Les clichés de microscopie électronique, également présentés figure 8, montrent l'état de la surface en fonction de la phase de formation du biofilm.

*Etape 1-* La formation d'un biofilm débute par l'attachement de cellules individualisées à une surface. Un film de conditionnement est produit. Ce film a été étudié bien avant que les biofilms aient été décrits. Il est composé de macromolécules organiques, principalement des glycoprotéines, incluant des matières inorganiques présentes dans le milieu ou sécrétées par les microorganismes eux mêmes [72]. Ce film primaire est essentiel car il modifie certaines propriétés de surface des matériaux telles que la tension de surface, l'énergie, la polarité, la mouillabilité. Il conditionnera l'attachement des bactéries et donc la colonisation. Une fois le film de conditionnement mis en place, la fixation des bactéries reste réversible [76]. Les interactions entre le support et les cellules sont faibles, les bactéries se détachent par simple rinçage.

*Etape 2-* L'adhésion des microorganismes est rendue irréversible par la sécrétion des polymères extracellulaires (exopolymères) formant des ponts de fixation entre la cellule et la surface. Ces exopolymères piègent des éléments nutritifs nécessaires à la croissance bactérienne et constituent une barrière de protection vis-à-vis de diverses agressions environnementales de natures chimiques ou biologiques.

*Etape 3-* Une fois les bactéries pionnières installées, et si les conditions environnementales sont favorables, les bactéries se multiplient et forment des microcolonies [77]. En croissant, les microcolonies se touchent et constituent un voile bactérien appelé biofilm. D'après Donlan [78], les cellules migreraient d'une microcolonie à une autre pour former des structures telles que des canaux qui permettent le transport des nutriments vers les profondeurs du biofilm.

*Etape 4-* Le volume du biofilm augmente, il devient mature. Dans des conditions particulièrement favorables, il peut devenir visible à l'oeil nu. Les voiles visqueux présents sur les pierres des rivières ou encore certaines peaux trouvées sur des aliments ne sont autres que des biofilms naturels.

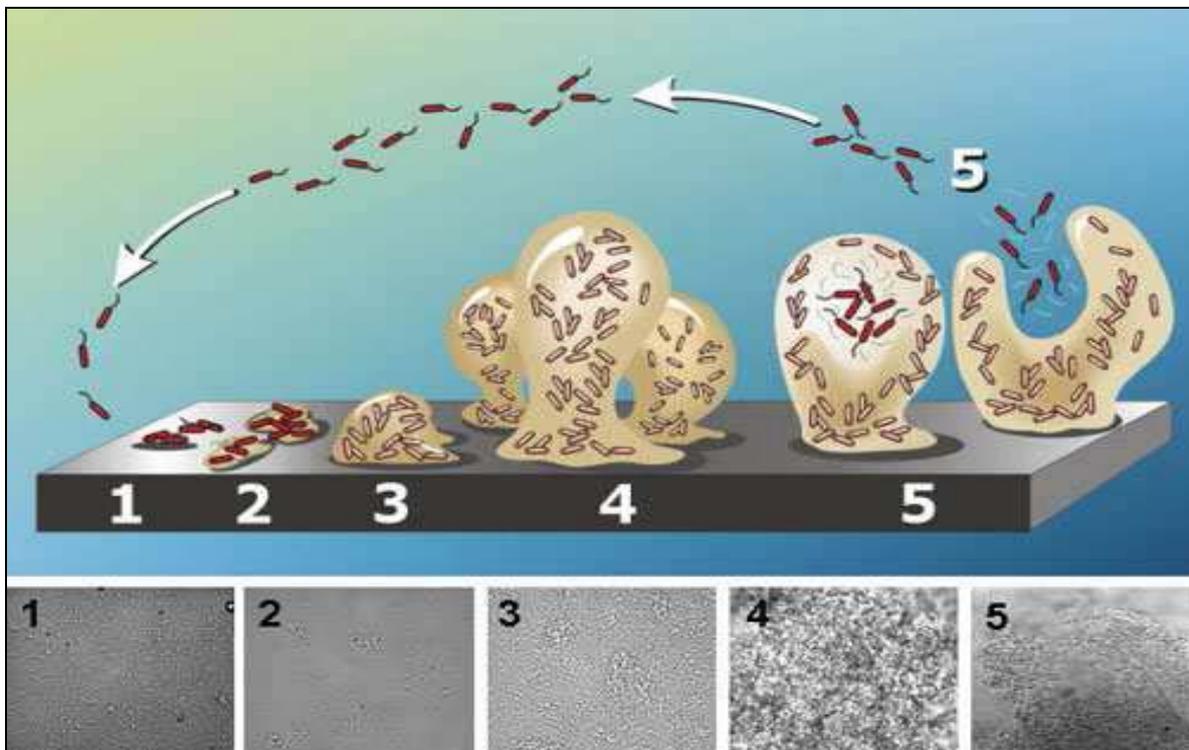


Figure 9 : les étapes de formation des biofilms: 1-Attachement ; 2- Adhésion irréversible; 3- Formation des microcolonies; 4- Biofilm mature; 5- Détachement ([www.biofilm.montana.edu](http://www.biofilm.montana.edu)).

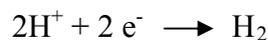
*Etape 5-* La dernière phase de la vie du biofilm est la phase de dispersion, dite « phase planctonique ». Il s'agit du vieillissement du biofilm, qui peut être causé par des stress (carences nutritionnelles, oxydants, antibiotiques). Les microorganismes se séparent du biofilm, parfois ils consomment directement la matrice comme source d'énergie. Ils retournent à l'état dit « planctonique » et peuvent aller coloniser de nouvelles surfaces, complétant ainsi le cycle.

### II-6-2. Mécanisme de corrosion en présence BSR

La corrosion bactérienne rassemble tous les phénomènes de corrosion dans lesquels les bactéries agissent directement ou par l'intermédiaire des substances provenant de leur métabolismes, jouant un rôle primordial soit en accélérant un phénomène déjà établi, soit en créant les conditions favorables à son établissement [79, 80]. Dans un processus de corrosion de type électrochimique classique, la dissolution d'un métal tel que le fer a lieu au sein des sites anodiques selon la demi-réaction :

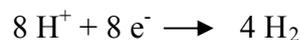


Dans le cas des conditions anaérobies et en absence d'oxygène, le rôle d'accepteur d'électrons est joué par les protons selon la réaction :



Le mécanisme le plus ancien pour expliquer la corrosion induite par les bactéries sulfato-réductrices est celui de la dépolarisation cathodique [81]. D'après cette théorie, les BSR ont la capacité de consommer l'hydrogène cathodique à la surface du matériau en accélérant la vitesse de cette réaction. Les produits de corrosion sont le sulfure de fer et l'hydroxyde ferreux.

En fait, cette théorie montre qu'il y aurait une augmentation de la corrosion par accélération de la réaction cathodique en présence des bactéries sulfato-réductrices.



Booth et Tiller [82] trouvent, en effet, une dépolarisation cathodique seulement en présence des bactéries hydrogénases positives (possédant l'enzyme hydrogénase), les espèces hydrogénases négatives ne semblent pas affecter la courbe de polarisation cathodique. De plus, ils mettent en évidence une forte dépolarisation cathodique lorsque le sulfure de fer et les bactéries hydrogénases positives se trouvent simultanément en présence dans la solution. Ils suggèrent alors que le processus de corrosion est dû à l'action du sulfure de fer et de l'activité enzymatique des bactéries.

En effet la précipitation du sulfure de fer catalyse ensuite la réduction du proton en hydrogène moléculaire créant des zones cathodiques à côté de zones anodiques composées de fer (Fe) conduisant à une pile galvanique qui provoque la formation de piqûres à la surface du métal [83]. Pour expliquer que le dépôt de sulfure de fer catalyse la réduction du proton ou de l'eau, il a été proposé que les BSR, de part leur activité, peuvent réguler localement le pH. Localement, les sulfures et les sulfures d'hydrogène produit par les BSR entraîne la formation

de FeS et engendre l'augmentation de l'acidité (plus de protons libres). Sur les zones entourant le dépôt de FeS, le pH reste stable et neutre. Le métabolisme bactérien pourrait donc induire une pile par acidification différentielle : FeS étant la cathode (pH plus faible) et le fer l'anode (pH plus élevé) [84].

La vitesse de corrosion induite par les sulfures et les sulfures d'hydrogènes est contrôlée par le transfert de masse. La cinétique est alors contrôlée par la présence de film de produit de corrosion FeS à la surface de l'acier [85].

Cette corrosion est essentiellement fonction de la concentration de H<sub>2</sub>S et de la température mais elle est indépendante de la pression [86]. Dans le cas d'un mélange de H<sub>2</sub>S et CO<sub>2</sub> dont le rapport de pression partielle de deux gaz est entre 20 et 500, le risque de corrosion devient élevé avec des taux de plus en plus importants. Lorsque le PCO<sub>2</sub>/PH<sub>2</sub>S est inférieur à 20, le produit de FeS est prédominant, ce qui peut avoir un effet protecteur et limiter la corrosion [87].

Cette théorie est largement incorrecte si l'on considère que le dégagement d'hydrogène provient de la réduction de l'eau qui a été montrée comme une réaction irréversible sur l'acier inoxydable [88]. Néanmoins, des preuves expérimentales de l'augmentation de la corrosion par la consommation de l'hydrogène ont été reportées [89]. Dans ces expériences, des coupons en acier étaient immergés dans une solution de phosphates dans une bouteille connectée via la phase gazeuse à une autre bouteille contenant les BSR. La corrosion a augmenté bien que les BSR n'étaient pas en contact direct avec les coupons. Le même phénomène a été observé dans une expérience similaire mais avec de l'hydrogénase au lieu des BSR.

Il existe d'autres théories du mécanisme de corrosion induite par les bactéries sulfato-réductrices :

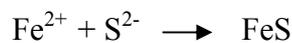
- Booth et Wormell [90] ont tenté de montrer une corrélation linéaire de la vitesse de corrosion et de l'activité de l'hydrogénase des bactéries. Ils n'atteignent pas leur but mais au contraire, ils montrent qu'il y a une augmentation de la vitesse de corrosion avec les bactéries hydrogénases négatives.
- Costello [91] explique la dépolarisation cathodique par la production du sulfure d'hydrogène qui agirait comme un accepteur d'électrons pour former HS<sup>-</sup> et H<sub>2</sub>.
- Iverson [92] explique que les acides faibles, substances qui peuvent être présentes dans les biofilms, peuvent catalyser la branche cathodique du processus de corrosion anaérobie des

aciers grâce à une cinétique de réaction plus rapide que celle de la réduction de l'eau. En plus, pour certains acides faibles, leur réaction de réduction est réversible et par conséquent peut encore accélérer le processus de corrosion lorsqu'il y a une surconsommation d'hydrogène.

- Beech [93] a expliqué que les exopolysaccharides des biofilms peuvent renfermer des groupements ioniques et des métabolites et provoquent une augmentation de la teneur en eau dans les irrégularités du matériau métallique. Une hétérogénéité intrinsèque s'établit alors modifiant ainsi l'environnement physico-chimique et une différence entre l'environnement proche du métal et le reste de la solution est créée entraînant la variation du potentiel électrochimique. C'est la corrosion par pile de concentration. La différence par rapport à la corrosion galvanique, tient dans le fait que les réactions anodique et cathodique ont lieu sur le même métal (Fe) alors que pour la corrosion galvanique, il y a couplage entre deux matériaux de natures différentes (Fe et FeS).

D'autres théories existent mais aucune n'a été démontrée.

La production de sulfures dans le milieu par les BSR est en revanche très importante dans le processus de corrosion. Les sulfures produits catalysent la réaction anodique par la formation de sulfure de fer.



Le sulfure de fer formé se dépose sur la surface métallique permettant la création d'une zone cathodique FeS et anodique Fe. Elles sont suffisamment proches pour créer une pile. Cette pile provoque la formation d'une corrosion localisée à la surface du métal. Une fois amorcées, les piqûres sont susceptibles de croître si les valeurs locales de pH et/ou la teneur en chlorure est grande [94].

En fait, les BSR, comme tout microorganisme, modifient, par leur croissance, les propriétés acido-basiques du milieu. L'excrétion des produits du métabolisme tels que l'acide acétique, le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub>S tend à l'acidifier tandis qu'à l'inverse, la consommation des anions sulfate ou thiosulfate tend à le basifier. La source de carbone intervient également dans ce processus, notamment lorsqu'il s'agit d'un acide faible tel que l'acide lactique qui est souvent le substrat utilisé dans les modèles expérimentaux.

La figure 10 montre la courbe de production de sulfure d'hydrogène par le métabolisme des BSR, causant un changement des paramètres du milieu de la culture (Eh et pH). La production des sulfures augmente pendant la phase exponentielle de la croissance. Quand le

nombre des BSR atteint son maximum (4jours), la concentration de sulfures se stabilise à la valeur de concentration de sulfate ajouté dans le milieu au début de l'expérience [4].

La corrosion électrochimique se produit lorsqu'il existe une hétérogénéité soit dans le métal soit dans le milieu qui l'entourne (ou les deux). Cette hétérogénéité va produire une différence de potentiel entre différents points du métal et si ce matériau se trouve dans un milieu électrolysable, il y aura formations des piles qui vont débiter dans la masse métallique, car elles sont en court-circuit [95]. Les zones anodiques sont corrodées et disparaissent. Le potentiel de corrosion ( $E_{corr}$ ) est le potentiel que prend un métal par rapport à un électrolyte quelconque. Le potentiel n'est plus caractéristique du métal, il dépend des conditions expérimentales : nature, concentration et température de l'électrolyte et aussi de l'état de solide [96].

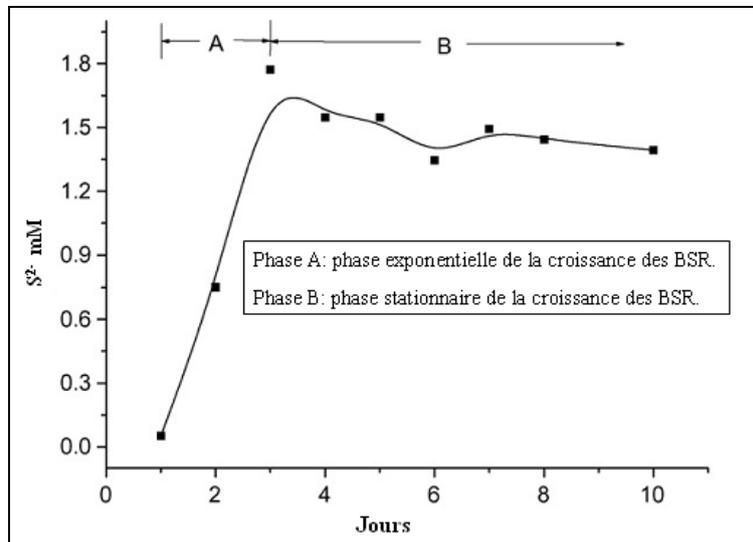


Figure 10 : évolution de la production des sulfures avec la croissance des BSR [4].

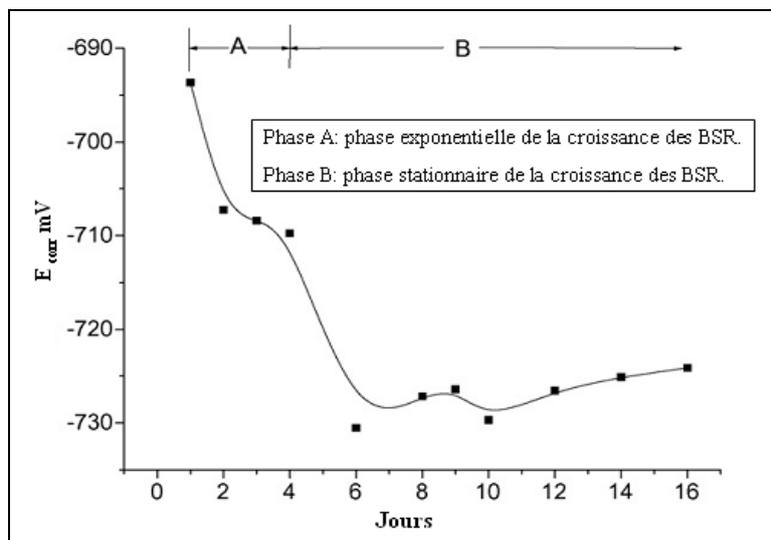


Figure 11 : évolution du potentiel de corrosion de l'acier avec la croissance des BSR [4].

Le potentiel de corrosion du métal ( $E_{corr}$ ) dépend aussi de la croissance des BSR, l' $E_{corr}$  atteint des valeurs négatives avec l'augmentation du nombre des BSR et se stabilise dans la phase stationnaire de croissance (Figure 11) [4]. Cette diminution du potentiel de corrosion indique le développement d'une couche de corrosion en présence des BSR et une perte de la conductivité du métal.

### **II-6-3. Corrosion par piqûre des BSR**

Comme cité auparavant, les BSR sont capables de former des biofilms. Les biofilms ne sont pas des revêtements de surface, ils ne sont en effet ni homogènes ni étanches. Ils se traversent en quelques minutes par simple diffusion en phase liquide et ils sont constitués d'îlots de colonies biologiquement homogènes.

Cette mosaïque biologique se traduit pour le métal sous jacent par une mosaïque chimique de milieu corrosif local, d'où inévitablement des couples galvaniques locaux. Pour autant, ces couples locaux ne sont pas à l'origine des processus de la corrosion localisée [97]. Ils peuvent représenter simplement une fluctuation aléatoire propre à la corrosion uniforme. Ils peuvent aussi constituer un mécanisme de corrosion par piqûre.

La corrosion bactérienne par les BSR a toujours été perçue comme non uniforme, avec un mélange de plages diversement attaquées. Des cas de corrosion très sévères ont pu être observés en présence de BSR (Figure 12) avec des vitesses de pénétration très élevées (1cm/an) [98].



*Figure 12: observation d'une corrosion localisée initiée en 6 mois par des bactéries sulfato-réductrices sur un circuit en acier au carbone (www.corrodys.com).*

La piqûre présente généralement :

- Des bords d'attaques peu compatibles avec une transition simplement biologique.
- Une différence de morphologie de surface entre intérieur et extérieur de la piqûre, suggérant là aussi une différence de processus électrochimique.
- Certaines piqûres sont remplies de sulfures solides mais les plus rapides sont vides (FeS soluble)
- A l'extérieur des piqûres macroscopiques, une intense germination des micropiqûres, (mosaïque de biofilm).

Cette évidence morphologique de l'existence de la corrosion par piqûre explicite permet en outre d'expliquer de nombreux paradoxes, notamment l'absence de corrélation entre la sévérité de la corrosion et l'intensité de la croissance bactérienne. Il existe en effet entre les deux, un facteur de risque supplémentaire qui est la stabilisation d'une corrosion par piqûres.

### **II-7- Corrosion des surconteneurs et des chemisages des déchets HAVL**

Afin de dimensionner une installation de stockage des déchets nucléaires, et de quantifier son impact potentiel sur l'environnement, il est nécessaire d'étudier comment se comportent les surconteneurs des colis de stockage et le chemisage des alvéoles de stockage des déchets HAVL sur quelques centaines, voire quelques milliers d'années [35].

Le besoin d'un surconteneur des colis découle des spécificités phénoménologiques de la phase dite thermique pendant laquelle la température des colis passe par un maximum puis décroît progressivement. Les phénomènes qui caractérisent cette phase augmentent l'altérabilité de la matrice du verre, influant sur le comportement des radionucléides qu'il contient et fragilisent l'enveloppe inox primaire vis-à-vis de la corrosion [99].

L'acier non allié P235GH a été privilégié pour la fabrication des surconteneurs et des chemisages en raison notamment de ses bonnes propriétés de soudabilité. Le choix identique de l'acier pour la fabrication des chemisages et des surconteneurs a été fait pour éviter des phénomènes de corrosion galvanique. Par ailleurs, les processus de corrosion d'un acier non allié sont aujourd'hui bien maîtrisés.

Selon l'Andra [100], la corrosion généralisée est le principal processus à prendre en compte dans le cas de la corrosion des aciers non alliés. Une corrosion par piqûres ou par effet de crevasse peut être observée sur ces matériaux notamment en présence d'oxygène mais,

expérimentalement la vitesse de corrosion localisée à court terme décroît plus vite que celle de la corrosion généralisée de sorte que son importance relative diminue dans le temps.

Dans ce contexte, on distingue trois périodes successives dans la vie du colis en situation de stockage :

- **Période initiale** : dans un premier temps, l'humidité relative de l'alvéole est faible du fait de l'exothermicité des colis, elle ne permet pas la formation d'un film d'eau sur le colis, la corrosion ne peut s'amorcer. La température est par ailleurs suffisamment basse (moins de 100°C) pour que la corrosion par l'oxygène gazeux soit négligée [100].

- **Période transitoire (oxydante et/ou resaturation)** : dès que l'humidité relative de l'atmosphère de l'alvéole dépasse une valeur critique, un film d'eau se dépose au contact du colis et la corrosion peut s'amorcer. L'espèce oxydante prépondérante pendant cette phase est l'oxygène dissous dans l'eau.

La corrosion atmosphérique se manifeste lorsqu'il y a formation d'un film d'électrolyte à la surface d'un métal par suite de la condensation de l'humidité de l'atmosphère. Elle est attendue tout au début du stockage, pendant la phase de réversibilité, mais sans les variations de température et d'humidité relative qui accompagnent, comme en surface, les successions de périodes humides et sèches. Dans le stockage, il s'agit donc d'une corrosion en atmosphère humide permanente, qui s'apparente à une corrosion aqueuse.

Des essais de corrosion à humidité relative contrôlée, effectués en présence d'air ou en ambiance désaérée ont été réalisés. Des plaquettes en acier au carbone ont été ainsi maintenues pendant plus de 2 ans, à 25 et à 90°C, dans une atmosphère humide permanente, close, non polluée, d'humidité relative comprise entre 33 et 95 %. Quelles que soient les conditions, la vitesse de corrosion est extrêmement faible, inférieure à  $1 \mu\text{m}\cdot\text{an}^{-1}$ . Quoique très faible, cette corrosion serait suffisante pour consommer l'oxygène enfermé dans l'espace entre le chemisage et les colis de stockage.

Au cours de la phase de resaturation de l'alvéole, les composants métalliques peuvent être en contact avec une eau équilibrée avec l'argilite du site ou avec une argilite plus ou moins saturée.

Dans le scénario nominal d'évolution du stockage, l'oxygène disponible dans le jeu entre le chemisage et les colis de stockage est rapidement consommé, comme on l'a vu ci-dessus, par la corrosion des surconteneurs et de l'intrados du chemisage ; les pertes de métal associées à cette corrosion sont très faibles (épaisseur micrométrique). L'autre flux d'oxygène, plus important, est apporté à l'extérieur du chemisage, lors de la resaturation en eau de l'alvéole ;

cet oxygène est consommé principalement par la corrosion de l'extrados du chemisage au contact d'une argilite dont le degré de saturation va croître avec le temps.

Le renouvellement de l'oxygène est limité par des dispositions constructives (mise en place rapide d'un capot d'étanchéité en tête de l'alvéole). Aussi, cette phase, si elle existe, sera de courte durée (de l'ordre de la dizaine d'années). Durant cette phase, la vitesse de progression de la corrosion du colis de stockage dépend des cinétiques des phénomènes et prend en compte le rôle protecteur de la couche des produits de corrosion [101].

• **Période anoxique** : Une fois l'oxygène consommé, le milieu redevient anoxique comme à son état initial, la corrosion aqueuse (par réduction de l'eau) en milieu anoxique devient prépondérante.

La corrosion en milieu anoxique s'amorce au-dessus d'un seuil d'humidité supérieur à 60 %. Elle augmente alors avec le degré de saturation de l'argilite, mais reste beaucoup moins élevée qu'en milieu aérobie. La forte épaisseur des surconteneurs limite la corrosion radiolytique due à des espèces oxydantes, comme  $H_2O_2$  (« eau oxygénée »), qui seraient créées par radiolyse de l'eau sous l'effet du rayonnement.

La vitesse de corrosion généralisée observée dans ces conditions sur des essais de corrosion de longues durées (plusieurs années) diminue dans le temps du fait du renforcement du pouvoir protecteur des couches de produits de corrosion. Les vitesses moyennes observées sur les échantillons tendent vers des valeurs très faibles entre 3 et 5  $\mu\text{m}/\text{an}$  pour une température comprise entre 50 à 90°C avec des vitesses instantanées inférieures au  $\mu\text{m}/\text{an}$  après quelques années.

La diminution de la vitesse de corrosion avec le temps traduit le renforcement du pouvoir protecteur des couches de produit de corrosion [101].

Les essais en eau de site ou en pâtes argileuses en conditions anoxiques ont montré des corrosions importantes aux temps courts. À 90°C, elles peuvent atteindre 100 à 150  $\mu\text{m}\cdot\text{an}^{-1}$  dans des pâtes contenant 1 % ou 10 % d'argilite. Le métal est dans ce cas presque dépourvu de couche de corrosion, le fer corrodé passant majoritairement en solution.

Les causes de ces corrosions élevées dans les mélanges eau - argilite font l'objet d'études complémentaires. Plusieurs hypothèses sont examinées [101]:

- un transitoire initial de la chimie du milieu (évolution du pH) ;
- un effet transitoire de transfert de masse (dû par exemple à un piégeage du fer dissous par l'argile).

Les produits de corrosion sont principalement constitués de magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), silicate de fer et sidérite ( $\text{FeCO}_3$ ).

Pendant la phase anoxique, la principale forme de corrosion attendue est la corrosion généralisée. L'hydrogène est un sous-produit de cette corrosion. En l'absence d'oxygène, la corrosion par piqûres et la corrosion par effet de crevasse, amorcées pendant la phase aérée, n'ont pas de moteur dans l'environnement pour continuer à se propager.

Une autre forme de corrosion localisée fait l'objet de programmes expérimentaux : la fissuration par corrosion sous contrainte. La présence d'un milieu corrosif et de contraintes mécaniques peut conduire selon la nature de l'acier à des phénomènes de corrosion sous contraintes qui se traduisent par une fissuration et dégradation prématurée des chemisages [102].

Les microorganismes susceptibles d'être présents dans le stockage pourraient avoir un effet sur la corrosion de l'acier au carbone : la corrosion assistée par les microorganismes. Aucune étude sur l'effet des bactéries anaérobies et notamment les BSR, susceptibles d'être présents dans le stockage sur la corrosion de matériaux de stockage des déchets HAVL, n'avait en revanche été menée au début de nos travaux en 2007.

### **II-8- Objectif de la thèse**

Au regard des données de la partie bibliographie, la corrosion microbienne n'est donc pas une nouvelle forme de corrosion, mais résulte de la conjonction défavorable de ces trois facteurs [103] :

- Un milieu aqueux dont les principales propriétés sont connues.
- Un matériau choisi comme étant compatible avec les conditions d'exposition.
- Des microorganismes dont la présence est le plus souvent inattendue.

En pratique, de nombreux dommages de corrosion sont observés ayant pour conséquence des coûts importants de maintenance, des indisponibilités d'installation et des risques pour la sécurité des biens et des personnes.

L'Anfra a mis en place différents programmes d'étude de la corrosion des aciers au carbone dans le cadre du groupement de laboratoires Verre/Fer/Argile chargé d'étudier le comportement physico-chimique des composants d'une alvéole de déchets vitrifiés HAVL. Ces programmes recouvrent les différents modes de corrosion attendus au cours de la vie du stockage, et comportent à la fois une partie expérimentale et une partie modélisation. Les

modèles développés pourront être utilisés dans les codes de calcul ou servir de données d'entrées, en vue des calculs préparatoires et des calculs de sureté.

La thèse s'inscrit dans le cadre de ce groupement de laboratoires « verre-fer-argile ». **L'objectif de la thèse est d'étudier l'effet des bactéries sulfato-réductrices sur la corrosion de l'acier P235GH retenu actuellement pour la fabrication des sur-conteneurs et des chemisages des alvéoles de stockage des déchets radioactifs HAVL.**

Cette étude est divisée en trois grandes parties :

- Isoler et identifier, en présence ou en absence de l'hydrogène, les bactéries sulfato-réductrices (BSR) à partir de l'argilite Callovo-Oxfordien. En effet, l'hydrogène produit dans le site de stockage ainsi que la source importante de sulfate présente dans l'argilite constituent des sources formidables d'énergie pour la croissance des BSR. Par conséquent, l'interface argilite/chemisage ou les jeux au sein de l'alvéole pourraient constituer un milieu favorable à la croissance bactérienne.
- Réaliser des expériences en batch en présence des BSR et des coupons d'acier pour évaluer la vitesse de corrosion de ce dernier en présence des bactéries. Un effort sur l'identification des produits de corrosion est également réalisé.
- Conduire des expériences en milieu compacté pour simuler le plus fidèlement possible le site de stockage. Ainsi, il s'agit de réaliser des expériences dans des cellules de percolation avec de l'argilite non perturbée.

En 2005, le dimensionnement du chemisage et du surconteneur a été mené en tenant compte des différents processus de corrosion et des sollicitations mécaniques. Une approche conservative a conduit à majorer les cinétiques de corrosion généralisée via un « coefficient de non-uniformité » qui permet de tenir compte des incertitudes identifiées, notamment l'influence de la corrosion bactérienne (augmentation de la vitesse de corrosion d'un facteur 2 à 3). Sur la base des concepts de stockage proposés en 2005, l'épaisseur du chemisage conduit ainsi à une perte d'étanchéité par déformation et rupture mécanique au bout de 100 à 300 ans correspondant à la période de réversibilité. L'épaisseur du surconteneur de déchets vitrifiés HAVL permet d'obtenir avec la même approche conservative une étanchéité sur 4000 ans [100].

**Ainsi, l'objectif de la thèse est de vérifier la présence de bactéries, notamment les sulfato-réductrices dans des échantillons d'argilite du Callovo-Oxfordien prélevés dans le laboratoire expérimental de Meuse / Haute-Marne et de préciser leur effet sur la corrosion de l'acier non allié P235GH.**

---

### **III- Isolement des bactéries sulfato-réductrices**

---



### **III. Isolement des bactéries sulfato-réductrices**

#### **III-1. Matériels et méthodes**

##### **III-1-1. L'argilite du Callovo-Oxfordien**

###### III-1-1-1. Composition minéralogique

L'argilite du Callovo-Oxfordien forme une couche à dominance argileuse homogène dont le toit est situé à 420m de profondeur. Cette profondeur augmente progressivement pour atteindre plus de 600m sur une quinzaine de kilomètres vers le nord du bassin de Paris. L'épaisseur de la couche varie de 130m à 160m environ. L'âge estimé de cette couche géologique profonde est de 155 millions d'années.

La couche s'est déposée sous une profondeur d'eau de l'ordre de la centaine de mètres, cet éloignement des sources naturelles d'apport d'eau explique la granulométrie fine des constituants. Le Callovo-Oxfordien montre trois phases minéralogiques principales : une phase argileuse dominante (illite et smectite silicate stratifiés), une phase carbonate (calcite essentiellement et quelques pourcents de dolomie) et une phase quartzeuse. Ces trois phases principales sont accompagnées de phases dites accessoires, pyrite notamment, en quantité massique inférieure à quelques pourcents [104].

Le tableau 2 montre la composition minéralogique de l'argilite calculée à partir des analyses chimiques [105].

Muscovite	12,5%
Illite	22,5%
Montmorillonite	15%
Daphnite	1,5%
Kaolinite	0,5%
Quartz	25%
Calcite	17%
Dolomite	3%
Feldspath-K	2%
Pyrite	1%

*Tableau 2 : composition minéralogique de l'argilite du Callovo-Oxfordien (proportions pondérales)[105].*

###### III-1-1-2. Composition des eaux porales.

La nature ainsi que les caractéristiques physico-chimiques et texturales des phases minérales déterminent la composition des eaux interstitielles [106]. La teneur en chlorures au sein de la

formation argileuse est cependant contrôlée par la teneur en chlorures dans l'eau porale des formations encaissantes. La composition chimique de l'eau interstitielle est déduite des modélisations thermodynamiques grâce à l'identification des phases minérales qui contrôlent potentiellement la chimie de l'eau interstitielle. Ces modèles comprennent notamment les réactions de spéciation entre les sites de surface des minéraux argileux et les ions majeurs de l'eau interstitielle. Les constantes de stabilité des complexes de surface sont ajustées à partir des expériences de sorption. La composition de référence pour les études de sorption est la même pour tous les échantillons du Callovo-Oxfordien car les paramètres déterminants comme les phases minérales à l'équilibre, la nature et la teneur des phases argileuses présentes, mise à part la teneur en chlorures, varient peu sur toute la série argileuse [107].

Dans le cadre du projet BRGM- Andra le projet THERMOAR a permis la mise au point d'une méthode d'acquisition des données nécessaires à la modélisation de la chimie des eaux des formations argileuses à 25°C. Cette méthode a été appliquée au site du laboratoire expérimental de Meuse/Haute-Marne. Dans ce contexte, une caractérisation physique, chimique et minéralogique a été menée sur six échantillons des expériences PAC2001- 2002 et PAC 1001-1002 réalisées respectivement au niveau de la niche à -455m et de la galerie d'expérimentation à -490m [108].

Le modèle THERMOAR, associé à une base de données thermodynamiques vérifiées (NAGRA-PSI et THERMOCHIMIE) et à une base de coefficients de sélectivité adaptés au Callovo-Oxfordien [109] permet de reproduire de façon précise les lois thermodynamiques régulant la chimie des eaux porales dans les expériences PAC (Tableau 3). L'incertitude sur la concentration des éléments a été réduite à des niveaux très bas.

	Fe	Sr	K	Mg	Ca	Al	SO <sub>4</sub>
mol/l	$3,40.10^{-05}$	$2,00.10^{-04}$	$1,03.10^{-03}$	$6,67.10^{-03}$	$7,36.10^{-03}$	$4,70.10^{-09}$	$1.56.10^{-02}$
	Na	TIC	Si	Cl	NH <sub>4</sub>	Mn	
mol/l	$4,56.10^{-02}$	$3,34.10^{-03}$	$1,80.10^{-04}$	$4,10.10^{-02}$	$2,90.10^{-04}$	$4,70.10^{-06}$	pH : 7.11 Eh :-168mV

*Tableau 3 : composition de référence à 25°C des eaux porales du Callovo-Oxfordien calculée selon le modèle THERMOAR [108].*

La teneur en matière organique des échantillons provenant de PAC 2001 a été déterminée à partir d'analyses par chromatographie ionique et COT-mètre [6, 110]. Les eaux porales contiennent 56,7mg/l de matière organique dissoute (Tableau 4).

Malate	1 $\mu\text{M}$
Lactate	8 $\mu\text{M}$
Formate	2 $\mu\text{M}$
Acétate	1865 $\mu\text{M}$
Propionate	127 $\mu\text{M}$

Tableau 4 : composition en matière organique des eaux porales du Callovo-Oxfordien [111].

### III-1-1-3. Echantillon d'argilite du Callovo-Oxfordien.

Pour toutes les expériences, les échantillons d'argilite issus des forages FOR1118 étaient à notre disposition, les carottes d'argilite utilisées portent la référence EST26459. Le carottage est effectué dans la galerie 4C (Figure 13) d'une manière sub-horizontale ( $+2,6^\circ$ ) à une profondeur de 490.88m. Le diamètre de la carotte est de 108mm et la longueur est de 17,5m [112].

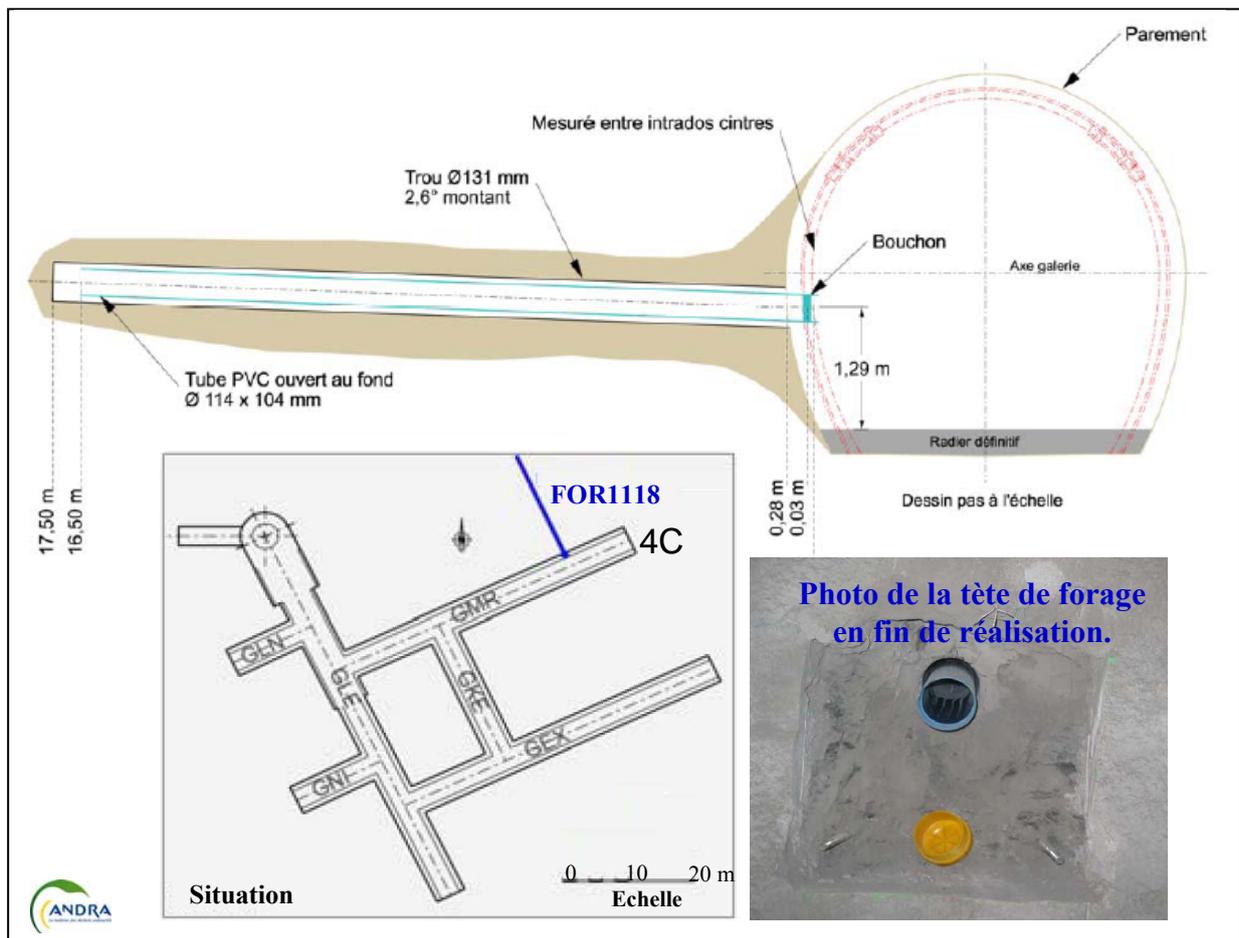


Figure 13 : Localisation du forage 1118 à l'origine des carottes d'argilite EST 26459 utilisées pour nos expériences [112].

Entre le forage des carottes, leur extraction vers la surface, leur conditionnement, leur livraison vers notre laboratoire, les argilites subissent des perturbations hydromécaniques et

chimiques diverses. Les premières perturbations sont dues à la décharge mécanique pendant le carottage. Miehe [113] a montré que la pression de l'eau interstitielle dans les carottes devient négative une fois les échantillons remontés en surface. Ceci peut induire une faible désaturation. De ce point de vue, le carottage seul ne devrait pas générer de fracturations des carottes.

Au contact de l'air, les argilites se désaturent, le front de dénaturation pénètre à environ 1 mm au bout de deux heures de contact de l'air et à 3mm au bout d'un jour. Par conséquent, la préservation de la teneur en eau est la principale préoccupation prise pendant la conservation des échantillons [114].

La carotte EST 26459 est reçue dans un carothèque Andra sous azote (Figure 14). Cette atmosphère permet d'éviter l'oxydation de l'argilite, et toute contamination par tout type de bactéries aérobies et limite l'introduction de l'oxygène potentiellement toxique pour les bactéries anaérobies [115]. En revanche, aucune mesure de précaution particulière de contamination n'a été prise au moment du carottage des échantillons.



*Figure 14 : Différents conteneurs utilisés pour le transport des échantillons d'argilites.*

Une fois reçues, les carottes sont conservées sous vide à 20mbars dans un double emballage de sacs en aluminium Vacupac imperméable à la vapeur d'eau et à la graisse. Une machine à cloche C200 (Figure 15) avec un double programme (Soudure et réalisation du vide) est utilisée pour la conservation des échantillons.



*Figure 15 : Machine à cloche pour la conservation des carottes d'argilites.*

Pour évaluer le risque de contamination microbienne des échantillons, une étude a été faite en Suisse sur des carottes du laboratoire souterrain de Mont Terri [116]. Le test consiste à utiliser des microsphères fluorescentes d'une taille similaire à celle des bactéries comme traceurs des particules pendant le forage. La concentration des microsphères a été calculée pour simuler l'équivalent de 104 fois le risque de contamination due à la présence de bactéries dans l'air comprimé. Les microsphères ont été posées dans un sac en latex contenant 10 ml de suspension. Lorsque le carottage a commencé, le sac a été déchargé à proximité avec un faible flux d'air. Au laboratoire, des micro-perçages de 10 mm de diamètre ont été utilisés pour l'échantillonnage de l'extérieur vers l'intérieur du noyau. La quantification des microsphères a été faite par microscopie à épifluorescence. Les résultats ont prouvé que les microsphères n'ont jamais été retrouvées à l'intérieur du noyau et que les particules ne pénétraient pas plus de 5mm dans la carotte, ce qui montre que le risque de contamination microbienne durant le forage est strictement limité à la surface des carottes.

Suite à ces résultats et sous une hotte à flux laminaire munie d'une lampe UV, le cœur des carottes (beaucoup plus que 5mm de la surface) a été utilisé pour réaliser toutes nos expériences. Le maximum de précaution a été pris pour éviter toute autre source de contamination :

- Effectuer trois ou quatre passages lents des objets à stériliser dans la flamme bleue du bec Bunsen afin de les stériliser.
- Autoclavage dans une atmosphère de vapeur d'eau à 120°C pendant 20 min pour tuer toutes les bactéries y compris les spores. Pour un volume donné, la température est fonction de la pression ; on obtient la température requise de 120°C, très supérieure à la température normale d'ébullition de l'eau, en chauffant en surpression, c'est à dire en vase clos. L'appareil utilisé est l'autoclave.
- Travailler sous la hotte à flux laminaire pré-stérilisée par des rayonnements UV

### **III-1-2. Isolement des BSR**

#### **III-1-2-1. Milieux de culture**

Dans des conditions anaérobies, pendant une semaine, une masse de 10g d'argilite broyée en poudre a été mise en contact avec 100ml d'eau ultra pure pour évaluer et estimer la quantité de nutriments qui peuvent être relâchés par l'argilite et qui sont utiles à la croissance des BSR. L'autoclavage de la solution était nécessaire pour enlever toute trace bactérienne capable de fausser les résultats.

Pour l'isolement des BSR, 3 cas ont été envisagés

**• Isolement des bactéries dans un milieu d'enrichissement**

Le milieu utilisé pour l'enrichissement des bactéries sulfato-réductrices à partir de sédiment argileux a été élaboré conformément aux indications de la collection Allemande de microorganismes et cultures cellulaires DSMZ [117] (tableau 5). Le milieu d'enrichissement favorise la croissance d'une espèce en faible quantité dans un échantillon, sa composition doit permettre la croissance bactérienne et doit donc tenir compte des besoins nutritifs des bactéries [118]. Pour les bactéries BSR, les substrats nutritifs sont généralement le lactate, le sulfate ainsi que d'autres éléments comme le phosphate et l'ammonium.

Une masse de 20g d'argilite a été réduite en poudre dans un mortier en agate pour inoculer un volume de 100ml du milieu d'enrichissement autoclavé pendant une heure à 120°C. Les cultures ont été faites à 30°C dans des conditions anaérobies dans des bouteilles à sérum stériles de 125ml avec des bouchons septiques étanches. Les conditions anaérobies ont été réalisées par dégazage de l'eau à l'aide d'une pompe à vide et autoclavage.

Une fois la bouteille fermée, un barbotage d'un mélange de gaz azote/argon est réalisé pour éliminer au maximum les traces d'oxygène présentes dans la solution.

**• Croissance dans l'eau argileuse synthétique : eau du COX**

L'eau argileuse contient assez d'éléments nutritifs pour la croissance des BSR. Elle contient aussi des composants organiques comme le montre le tableau 4. Pour simuler au mieux les conditions qu'on peut retrouver dans le site de stockage, des essais de cultures des BSR isolées dans le milieu d'enrichissement ont été faits en anaérobiose à 30°C en inoculant les BSR dans un milieu contenant 100ml d'eau argileuse synthétique stérile (eau du COX) et 20g d'argilite.

La composition de l'eau du COX utilisée est conforme à celle indiquée dans le tableau 3 ; seules 8μM de lactate ont été ajoutées.

**• Isolement sous hydrogène sans ajout de matière organique**

L'hydrogène est un produit commun du métabolisme microbien, un grand nombre de bactéries est capable de l'utiliser comme substrat énergétique surtout dans les écosystèmes souterrains [65].

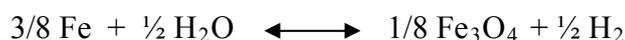
### III. Isolement des bactéries sulfato-réductrices.

Solution A		Milieu BSR		
KCl	33 g/l	Dissoudre dans solution D:	Resazurine	1 mg/l
NH <sub>4</sub> Cl	33 g/l		Extrait de levure	0,2 g/l
MgCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	33g/l		Ebullition 10 min et refroidissement sous N <sub>2</sub>	
CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	33g/l		NaHCO <sub>3</sub>	1 g/l
Solution B			Na <sub>2</sub> S,9H <sub>2</sub> O	1 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	33 g/l		Préparation sou H <sub>2</sub>	
Solution C			L-Lactate	1 g/l
FeCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	1400 mg/l		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g/l
ZnCl <sub>2</sub>	70 mg/l			
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	100 mg/l			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 mg/l			
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	36,mg/l			
NiCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	24 mg/l			
CoCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	190 mg/l			
CuCl <sub>2</sub> ,6H <sub>2</sub> O	2 mg/l			
Solution D				
solution A	1%			
Solution B	1%			
Solution C	1%			

Tableau 5 : composition du milieu d'enrichissement des BSR ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)).

La production d'hydrogène au sein d'un site de stockage de déchets nucléaires a plusieurs origines :

- Radiolyse de l'eau : le phénomène de décomposition de l'eau sous rayonnement ionisant.
- Radiolyse de la matière organique
- Corrosion des conteneurs de stockage : la quantité d'hydrogène disponible est évaluée à partir de la quantité totale de fer métallique disponible dans un m<sup>3</sup> d'alvéole selon la réaction



Soit 91010mol de H<sub>2</sub> par m<sup>3</sup> utile d'alvéole [119].

Plusieurs exemples peuvent être cités sur la croissance des bactéries en présence de l'hydrogène seul comme source d'énergie :

- Gales et al. [120] ont montré que l'hydrogène libéré par la radiolyse de l'eau permet la croissance de 10<sup>5</sup> bactéries autotrophiques par ml d'eau.
- Le développement des bactéries dénitrifiantes dans les environnements de stockage des déchets de moyenne activité, où la présence de H<sub>2</sub> et des bactéries favorisent la réduction du nitrate libéré par le bitume [121].

- *Shewanella*, une bactérie metallo-réductrice capable d'utiliser 1,2mmole d'H<sub>2</sub> par jour pour réduire le fer Fe(III) et les produits de corrosion des conteneurs de stockage [122].

Comme indiqué dans la partie bibliographie, les BSR possèdent les hydrogénases capables d'assimiler l'hydrogène directement. Cet hydrogène pourra servir de donneur d'électrons pour réduire le sulfate sans l'obligation de passer par l'étape d'oxydation des matières organiques.

Dans les mêmes rapports masse/volume (20g d'argilite /100ml d'eau de COX synthétique stérile), un essai d'isolement des BSR a été fait à 30°C sous pression d'hydrogène et sans ajout de matière organique dans la solution. L'argilite est donc la seule source de matière organique pour les bactéries sous ces conditions.

Pour ces 3 cas, un témoin stérile avec de l'argilite autoclavé a été préparé dans les mêmes conditions pour comparaison des résultats.

#### III-1-2-2. Méthodes analytiques.

Les éléments libérés au cours de l'expérience d'équilibrage eau ultra pure/argilite ont été analysés par spectroscopie de masse ICP-MS, chromatographie ionique et COT-mètre. La caractérisation de la croissance des BSR a été faite :

- par le suivi de la concentration de sulfates par chromatographie ionique
- par la mesure de la production des sulfures par spectroscopie UV-visible
- par la mesure du potentiel redox dans la solution
- par la mesure de la densité optique.

L'observation des bactéries a été faite par microscopie électronique à transmission.

- Chromatographie ionique

Cette technique est particulièrement performante pour les analyses des eaux. Elle est destinée à l'identification et à la quantification des anions et des cations (par séparation des espèces) contenues dans un échantillon sous forme liquide et préalablement filtré, dépourvu de matières en suspension.

La séparation d'espèces s'effectue par partage entre une phase mobile (éluant) et une phase stationnaire (colonne de séparation).

Chaque soluté injecté sur la colonne est soumis à :

- L'effet d'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble

- L'effet de rétention par la phase stationnaire avec laquelle le soluté interagit.

La séparation et le temps de migration des composés sont fonction des différences d'affinité de ces composés pour les phases mobiles et stationnaires.

La chromatographie ionique utilisée pour le suivi de la concentration de sulfates dans la solution est la DIONEX ICS2500 avec une phase mobile de KOH et une phase stationnaire composée de groupements cationiques ammonium quaternaires pour les mesures des anions. Le pilotage de l'appareil et la gestion des résultats sont faits par le logiciel CHROELEON.

- Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS)

La spectrométrie de masse est une technique instrumentale d'analyse reposant sur la séparation, l'identification et la quantification des éléments constitutifs d'un échantillon en fonction du rapport masse/charge. Elle est basée sur le couplage d'une torche à plasma générant des ions et d'un spectromètre de masse quadripolaire (dans le cas de l'ICP—MS Elemental) qui sépare ces ions en masse.

L'analyse des échantillons par ICP-MS peut être divisée en quatre étapes : introduction-nébulisation, ionisation, séparation en masse, détection.

L'échantillon est filtré et dilué avec de l'acide HNO<sub>3</sub> à 2% pour éviter la sorption et la rétention des éléments à analyser sur la tuyauterie et la verrerie. Un passeur automatique d'échantillons couplé à une pompe péristaltique introduit la solution dans une chambre de vaporisation où le nébuliseur la transforme en un aérosol liquide composé de microgouttelettes de quelques µm à l'aide d'argon gazeux. L'aérosol ainsi formé est envoyé dans une torche à plasma d'argon (1ml/min) à très haute température (entre 6 000 et 10 000 °C), suffisante pour vaporiser, dissocier, atomiser et ioniser complètement la plupart des éléments. L'interface d'échantillonnage permet de transférer un échantillon représentatif des ions du plasma vers la chambre à vide où les lentilles focalisent les ions pour les amener vers le quadripôle qui sépare les éléments en fonction de leur charge et de leur masse. Enfin, les ions transmis par le quadripôle sont détectés dans le détecteur par un ensemble multiplicateur d'électrons et le signal se traduit en nombre de coups. Une interface informatique assure le transfert des données afin qu'elles soient traitées.

- COT-mètre (Shimadzu TOC V CSH)

Le COT mètre permet de quantifier :

- Le carbone total (CT)

- Le carbone inorganique (IC)
- Le carbone organique total (TOC)

Le CT est transformé en CO<sub>2</sub> par combustion de l'échantillon dans un tube rempli de catalyseur d'oxydation en platine chauffé à 680°C. L'IC est transformé en CO<sub>2</sub> par acidification avec H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> dans le réacteur IC.

Dans les deux cas, un gaz vecteur (air ultra pur avec un débit de 150ml/min) permet ensuite d'amener le CO<sub>2</sub> produit vers une cellule de détection NDIR (à infrarouge non dispersif). Le signal de détection est un pic dont l'aire est proportionnelle à la quantité présente dans l'échantillon. Un étalonnage préalable permet donc de relier la surface du pic à la concentration.

- Mesure des sulfures

Un Kit sulfures avec une limite de détection de 0,02mg/l (Test sulfures, MERCK) a été utilisé pour la mesure des sulfures en solution. Dans les solutions aqueuses, il existe un équilibre pH fonction des concentrations en sulfure d'hydrogène dissous H<sub>2</sub>S, en hydrogénosulfures HS<sup>-</sup> et en sulfures S<sup>2-</sup>. Ces derniers réagissent avec le Diméthyl-p-phénylénédiamine et les ions Fer(III) pour donner le bleu de méthylène. Celui-ci est dosé par photométrie à 665nm [123]. Le spectre UV utilisé est l'UV-2401 PC Shimadzu.

- Suivi de la croissance bactérienne

Un prélèvement d'1ml de chaque essai exposé auparavant (Isolement dans un milieu d'enrichissement, isolement dans de l'eau de COX et isolement sous hydrogène sans ajout de matières organiques) est dilué dans 100ml du milieu d'où il provient, dans les mêmes conditions mais sans ajout d'argilite. Les dilutions ont été faites dans des bouteilles à serum de 125ml. Les cultures sont incubées à 30°C avec une agitation manuelle par jour pour éviter la formation d'agrégats bactériens. La croissance bactérienne est suivie par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 580nm [124] (DO580) (UV-2401 PC Shimadzu) par rapport à un blanc de référence constitué d'eau du COX.

- Potentiel redox

Les mesures sont effectuées en utilisant le pH-mètre / Millivoltmètre qui permet de mesurer des valeurs exactes de pH et de température. Le potentiel redox est mesuré à l'aide d'une

électrode Ag/AgCl. Les valeurs obtenues sont recalculées par rapport à une électrode d'hydrogène.

- Microscopie électronique à transmission (MET)

Le MET est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est transmis à travers un échantillon très mince. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution peut atteindre 0,8Angstrons [125].

Le MET (Figure 16) est formé :

- d'un canon à électron qui fournit le faisceau électronique.
- de lentilles magnétiques.
- d'un système de détecteurs d'électrons.



*Figure 16 : MET HF2000-FEG (IMN)*

Le MET utilisé pour les analyses est le HF2000-FEG caractérisé par une petite taille de sonde (2nm), une bonne résolution (2,3Å), de nombreux porte-objets (-170°C à 130°C, transfert sous vide...), un spectromètre EELS, et un détecteur EDX pour l'analyse chimique des éléments.

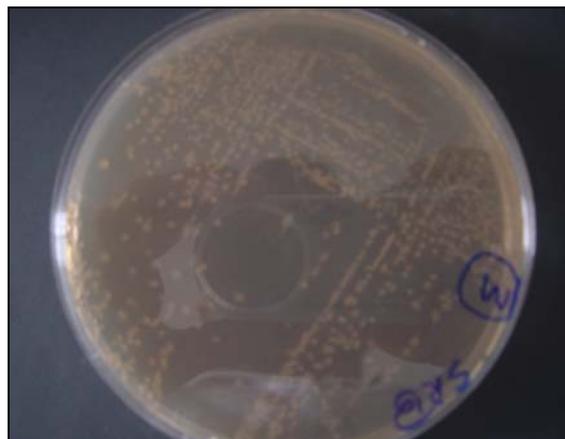
### **III-1-3. Identification des BSR**

L'identification et la classification microbienne ont beaucoup évolué ces dernières années grâce au développement de la biologie moléculaire. De nombreuses techniques sont disponibles dont certaines sont basées sur la PCR (Polymerase Chain Reaction). Classiquement les approches retenues pour l'identification des bactéries ciblent les opérons ribosomiques. Ce sont des régions particulières du génome présentes dans chaque cellule vivante codant des molécules essentielles à la synthèse protéique : les ARN ribosomiques.

Les ADNr sont ubiquitaires et leurs séquences sont constituées d'une alternance de régions constantes formant les doubles brins impliqués dans l'adoption de la structure de l'ARNr [126].

Les ADNr 16S constituent des séquences de référence dans la classification bactérienne et fongique. Les régions variables d'une zone codante sont conservées au sein d'une même espèce. Ainsi, chez les bactéries, les ADNr 16S de souche de la même espèce présentent généralement 97% d'identité de séquence [127].

Des milieux de cultures solides sont préparés dans des boîtes de pétri en ajoutant 15g/l d'agar dans le milieu d'enrichissement. Les bactéries isolées dans le milieu d'enrichissement liquide sont ensemencées sur la gélose pour obtenir des colonies bien isolées. Les colonies bien isolées et morphologiquement différentes sont réensemencées pour obtenir des souches uniques par boîtes de pétri (Figure 17).



*Figure 17 : colonie bien isolée de bactéries.*

Ces colonies bien isolées ont servi de matrice d'amplification des séquences ribosomiques bactériennes en volumes réactionnels de tampon polymérase ( $\text{MgCl}_2$  5  $\mu\text{l}$ ),  $\text{H}_2\text{O}$  (39,5 $\mu\text{l}$ ), DNTP (mélange des quatre désoxyribonucléotides, les nucléides de l'ADN) (2 $\mu\text{l}$ ), Taq polymérase (0,5 $\mu\text{l}$ ) et amorce (1 $\mu\text{l}$ ). Les réactions du PCR ont été réalisées en microtubes de 200 $\mu\text{l}$ . Avant PCR, la membrane cellulaire des colonies est analysée par ultrasons pour libérer l'ADN bactérien.

#### III-1-3-1. PCR

Les expériences sur l'identification des BSR y compris la PCR ont été réalisées par moi-même au Laboratoire U3B avec l'assistance du Prof. Michel Dion. La PCR permet de copier en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) [128], une

séquence d'ADN à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique ou amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides.

La PCR est formée de plusieurs étapes [129] :

- Dénaturation initiale avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage (3 minutes à 94°C) est réalisée. Cette étape permet de déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les Taq polymérase de type « Hot start » et de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution.
- Phase de dénaturation : cette étape (généralement 30 minutes à 95°C) permet de déshybrider les ADN, de « décrocher » les polymérase qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.
- Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces : cette étape (généralement 2 à 60 secondes à 56-64°C) permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider à l'ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable.
- Phase d'élongation : cette étape (généralement 4 à 120 secondes à 72°C) permet aux polymérase de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des DNTP libres présents dans le milieu réactionnel.

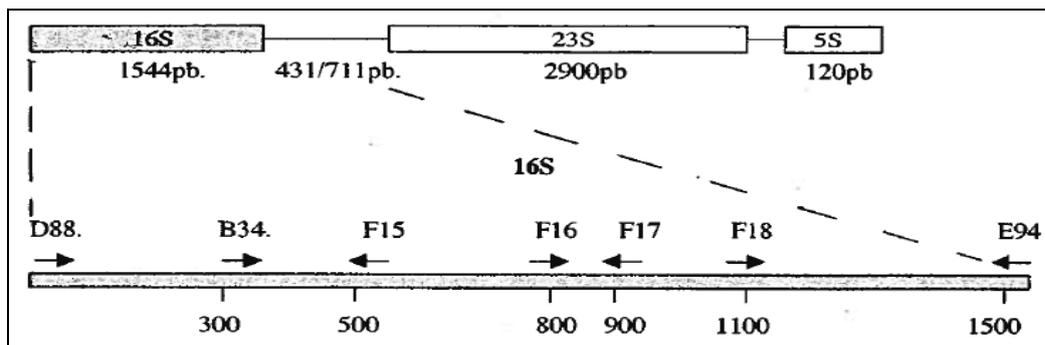


Figure 18 : positionnement des amorces sens D88 et anti-sens E94 dédiées à l'amplification par PCR de la séquence complète de 16sADN (1544 paire de base)

Les amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification des ADNr des colonies isolées sont les D88 et E94 (Figure 18). Ces 2 amorces sont universelles, spécifiques et permettent l'amplification de la séquence complète des ADNr 16s bactérien.

Les séquences des nucléides des amorces sont les suivantes :

D88: 5'- GAG AGT TTG AT(CT) (AC)TG GCT CAG – 3'

E94: 5' - GAG GAA GGT G(AT)T CCA (AG) CC GCA – 3

### III-1-3-2. Détection des produits PCR

L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode utilisée en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou les protéines en fonction de leur poids moléculaire.

La technique de l'électrophorèse en gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures [130]. Le facteur le plus important est donc la longueur de la molécule d'ADN : la séparation se fait en fonction du poids moléculaire et donc de la taille de l'ADN.

L'analyse des produits de PCR a été réalisée par électrophorèse à 100V pendant 30minutes dans un gel d'agarose à 1% préparé en tampon tris acétate EDTA (TAE 0.5X) avec 1 µl de bromure d'ethidium (BET).

La solution de TAE 0.5X est préparée à partir d'une solution stock TAE 50X. La solution TAE 50X est préparée en mélangeant 750ml d'eau déionisée contenant 242g de Tris base avec 57,1ml d'acide glacial et 0,5mM d'EDTA. Le BET est utilisé pour la révélation de l'ADN sur le gel d'agarose, il s'agit d'un agent d'interaction couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique, lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolet il devient fluorescent.

### III-1-3-3. Purification des produits de PCR

Après la détection des produits de PCR et la vérification de la complémentarité des amorces utilisées pour amplifier l'ADN, les produits de PCR ont été purifiés par un Kit (PCR clean up gel extraction-macherey-Nagel) et séquencés.

## **III-2. Résultats**

L'équilibrage de 10g d'argilite dans 100ml d'eau pure pendant une semaine dans de l'eau ultra-pure dans des conditions anoxiques, a permis de mesurer les éléments essentiels présents dans l'argilite (tableau 6). Cet équilibrage pendant une semaine peut induire une déstabilisation de l'argilite par l'eau ultra-pure, d'où l'écart avec les valeurs mesurées dans le tableau 4. Ces valeurs ne correspondent pas à des valeurs de l'eau argileuses.

Ces analyses ainsi que la composition de l'eau de COX (tableau 4 et 5) montrent que l'argilite est un milieu favorable pour la croissance bactérienne car elle contient tous les éléments nutritifs nécessaires à leur développement. Les résultats du tableau 6 montrent que l'argilite

### III. Isolement des bactéries sulfato-réductrices.

contient une concentration importante de sulfate ainsi que du carbone organique et d'autres éléments essentiels à la croissance des bactéries sulfato-réductrices.

Elément	mg/l
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	52 ± 4
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10 ± 2
Fe <sup>2+</sup>	3 ± 1
Ca <sup>2+</sup>	10 ± 1
Na <sup>2+</sup>	45 ± 5
Mg <sup>2+</sup>	3 ± 0,5
Al <sup>3+</sup>	5 ± 2
K <sup>+</sup>	9 ± 1,5
Cr <sup>3+</sup>	0,015 ± 0,005
Carbone organique CO	12 ± 2
Carbone inorganique CI	8 ± 3

Tableau 6 : concentration d'éléments relâchés par l'argilite dans l'eau ultra pure après une semaine d'équilibrage.

Après 10 jours d'incubation de l'argilite dans le milieu d'enrichissement, des spots noirs sont apparus. Ces derniers se sont étendus au cours du temps et la couleur de l'argilite vire vers le noir (Figure 19). Cela s'explique par la précipitation du sulfure de fer dont la solubilité est très faible ( $6 \times 10^{-19}$  mol/l) [131].

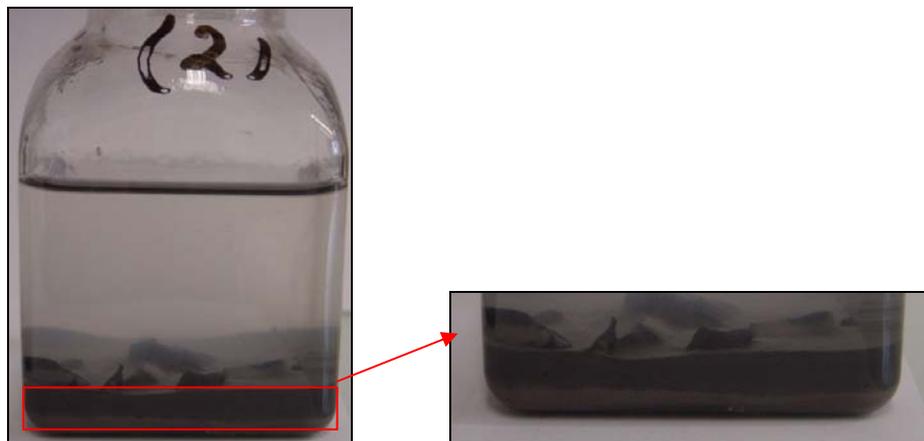


Figure 19: noircissement de l'argilite suite à la croissance des BSR dans le milieu de culture (tableau 5)

A température ambiante, la distribution de concentration des sulfures dissous et de Fe<sup>2+</sup> est complètement gouvernée par la solubilité des sulfures de fer (FeS).



En effet, la figure 20 d'une étude extraite des travaux de Wilkin et al. [132] montre les solubilités de  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{S}^{2-}$  à pH 6 et pH 7. Deux régions apparaissent sur ce diagramme : une région riche en  $\text{Fe}^{2+}$  et, une région riche en sulfures. La région 1 est typique des environnements où la réduction des sulfates est faible alors que la région 2 est typique des environnements où tous les ions réactifs comme  $\text{Fe}^{2+}$  sont consommés par la précipitation du sulfure et l'accumulation du sulfure d'hydrogène.

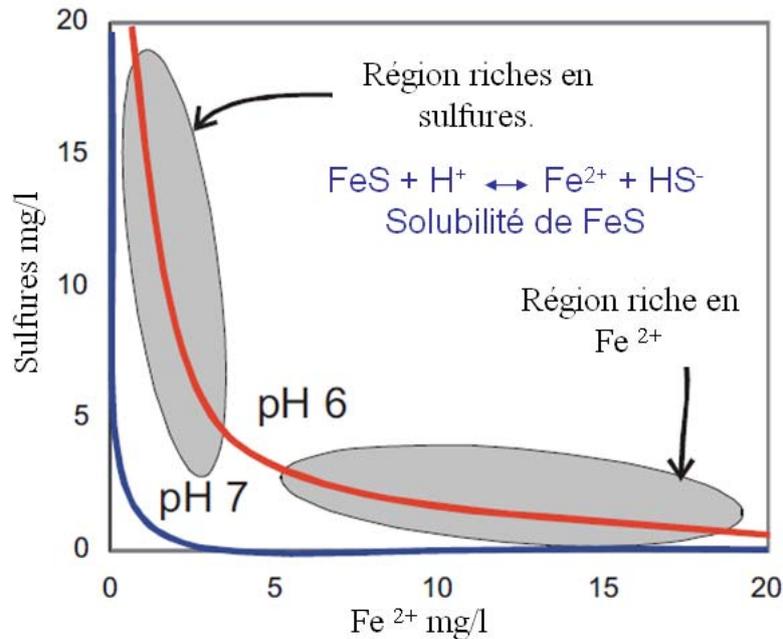


Figure 20 : solubilité de  $\text{FeS}$  à pH 6 et pH 7 [132]

Dans nos expériences, le pH des solutions se stabilise autour de 7 grâce à l'effet tampon de l'argilite présente dans la solution. Les résultats de dosage des sulfates qui suivent, montrent qu'on est plutôt dans la zone riche en sulfure avec une forte précipitation de sulfure de fer. Ces spots noirs ainsi que le dégagement du sulfure d'hydrogène (Figure 19) sont le signe révélateur d'une croissance des BSR.

Les quelques gouttes de la solution posées sur la grille du microscope électronique à transmission ont permis d'observer des clichés de bactéries (Figure 21). La membrane de ces bactéries est tapissée de particules noires dont l'analyse EDS montre deux pics importants de soufre et de fer (Figure 22). Dans les conditions anaérobies réalisées, ce produit correspond vraisemblablement au sulfure de fer résultant de la combinaison, du sulfure produit par le métabolisme des BSR et du fer présent dans la solution.

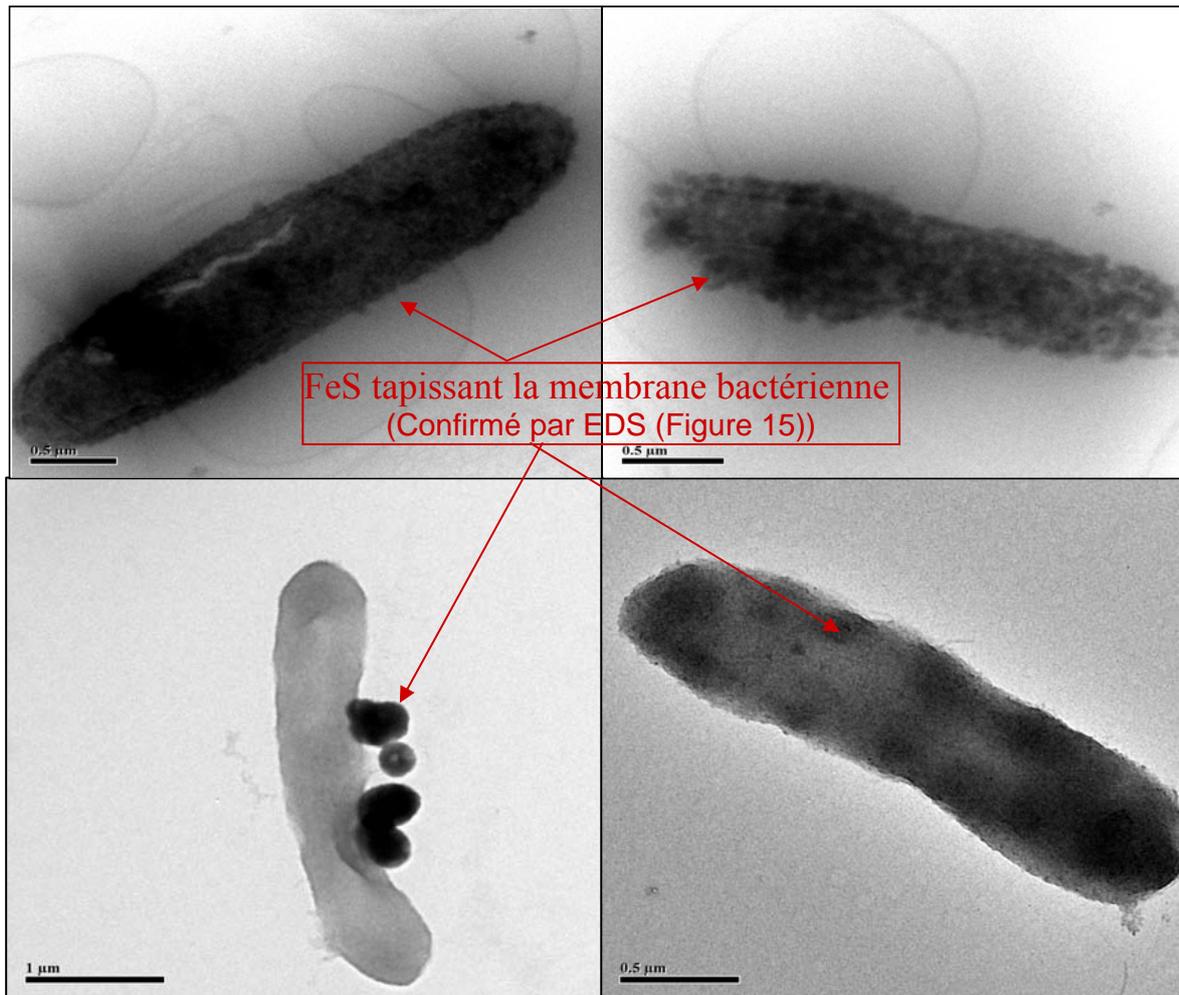


Figure 21: photos MET des bactéries isolées à partir de l'argilite du Callovo-Oxfordien.

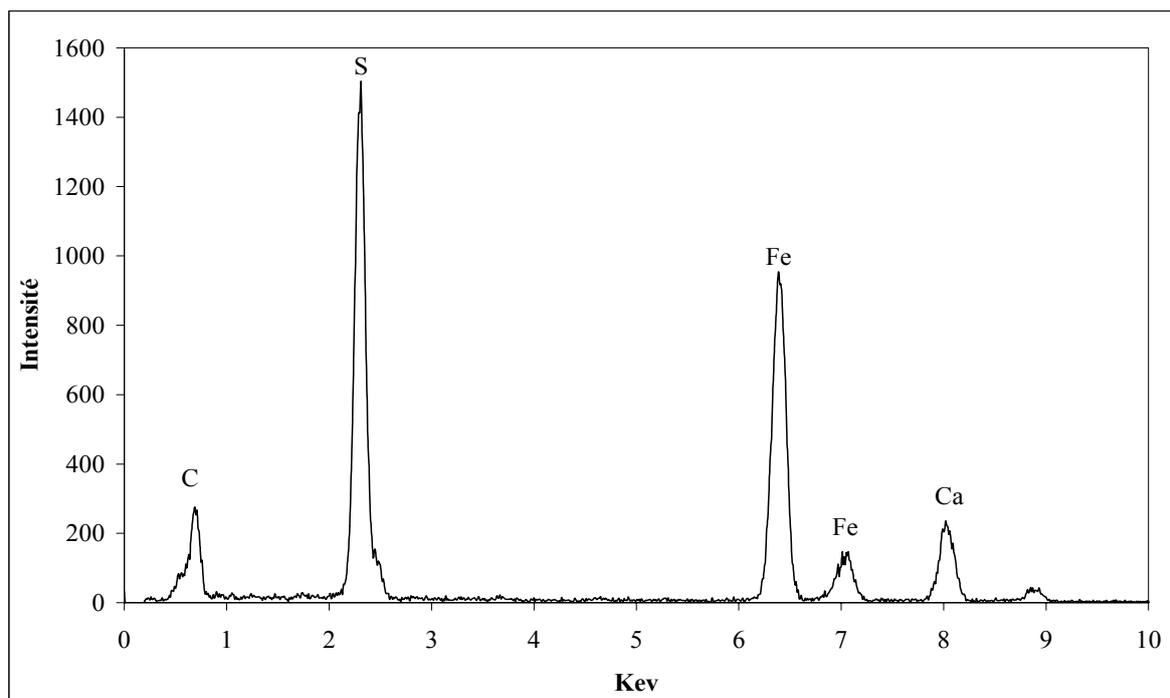


Figure 22 : EDS des particules noires précipitées lors de la croissance des BSR.

### **Caractérisation des bactéries isolées**

Dans les 3 cas :

- Isolement dans un milieu d'enrichissement (Milieu d'enrichissement + COX).
- Inoculation des bactéries enrichies dans de l'eau argileuse synthétique (Bactéries enrichies + COX + Eau de COX stérile).
- Isolement sous hydrogène dans de l'eau de COX synthétique sans ajout de matières organiques (COX + eau de COX stérile+ Hydrogène).

Les résultats montrent une chute importante du taux de sulfates dans la solution par comparaison au témoin stérile (Figure 23).

La croissance des BSR s'accompagne d'une production de sulfures (figure 24), qui n'est pas détectée pour le témoin stérile (donc non représenté dans la figure 24). La production de sulfures ne s'associe pas aux concentrations élevées de sulfates de la solution à cause de la faible solubilité de sulfure de fer et de sa précipitation dans l'argilite.

Dans le milieu d'enrichissement qui contient 1g/l de lactate, l'activité des bactéries est plus importante que dans les 2 autres cas où les bactéries conservent leur énergie pour se multiplier et fabriquer leurs propres protéines et membranes cellulaires. Ceci explique la plus importante réduction des sulfates dans le milieu d'enrichissement, ainsi que la production élevée de sulfures.

La mesure de la croissance bactérienne par spectroscopie UV n'est pas aisée à cause de la formation des précipités noirs de sulfure de fer dans le milieu (Figure 26). Ces précipités rendent les valeurs de l'absorbance plus faibles (Figures 27).

La croissance bactérienne est en général formée de 3 phases : phase de latence, phase exponentielle et phase stationnaire [133]. C'est seulement dans le cas d'isolement sous hydrogène sans ajout de matières organiques qu'on assiste à une phase de latence, avant une croissance normale et l'atteinte des mêmes valeurs stationnaires que celles observées dans les deux autres cas (Milieu d'enrichissement + COX et Bactéries enrichies + COX + Eau de COX stérile). Cela s'explique par une période d'adaptation des bactéries au milieu au cours de laquelle les cellules synthétisent les enzymes qui vont leur être nécessaires pour utiliser les substrats du milieu. Il n'y a pas de division cellulaire.

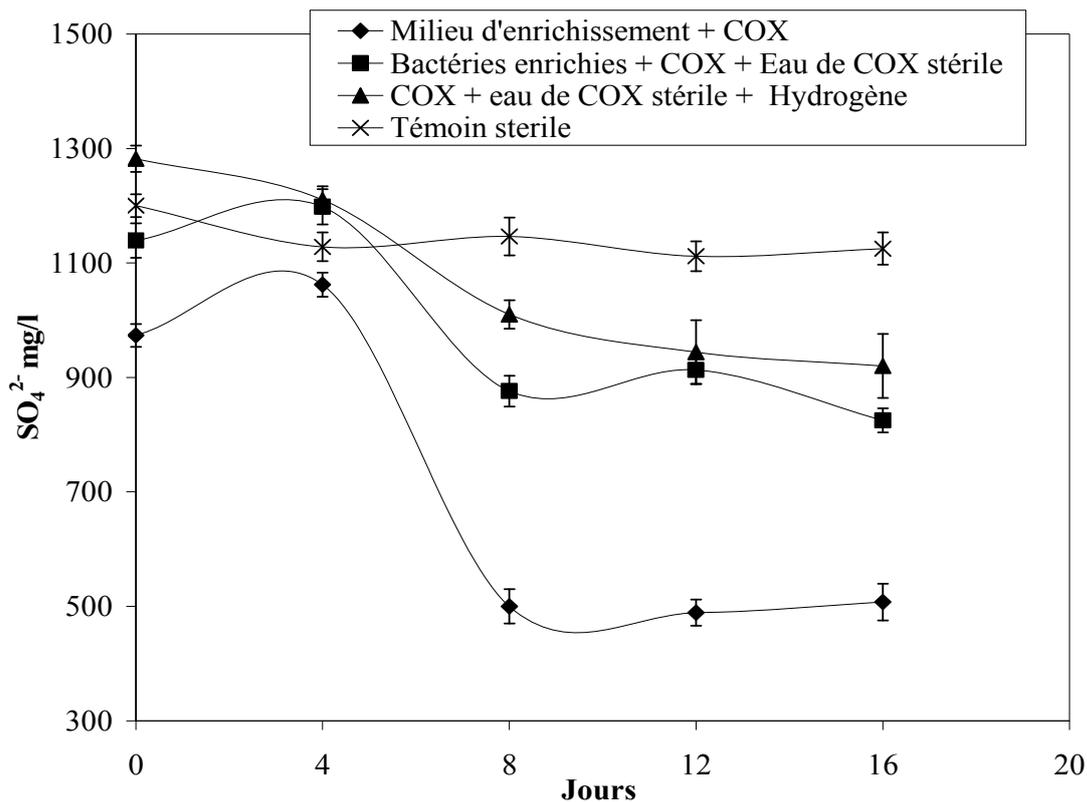


Figure 23 : diminution du taux de sulfates pendant la croissance des BSR.

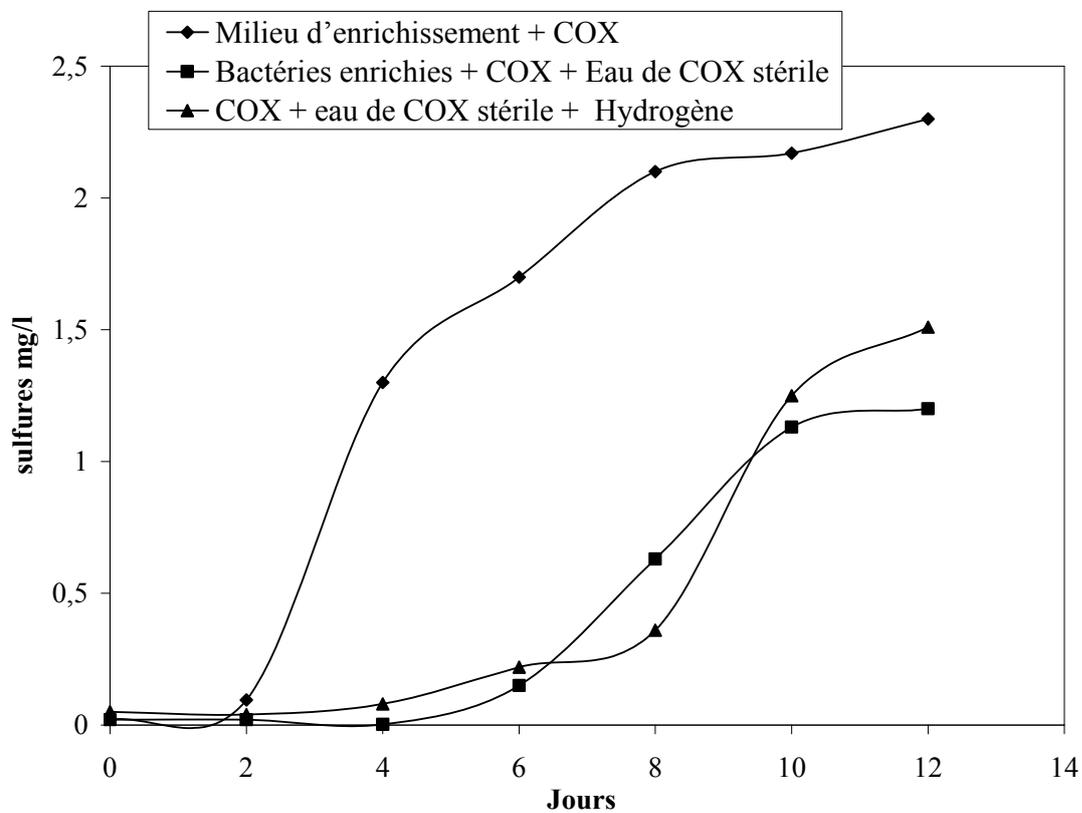


Figure 24 : production de sulfure suite à la réduction de sulfate par les BSR.

### III. Isolement des bactéries sulfato-réductrices.

Par comparaison au témoin stérile, la croissance des BSR dans le milieu d'enrichissement s'accompagne d'une chute de potentiel redox jusqu'à -140 mV (Figure 25) à cause d'une réduction importante de sulfates et de la production des sulfures  $S^{2-}$ . Les valeurs positives des potentiels redox dans le témoin stérile sont probablement dues aux traces d'oxygène introduit dans la solution.

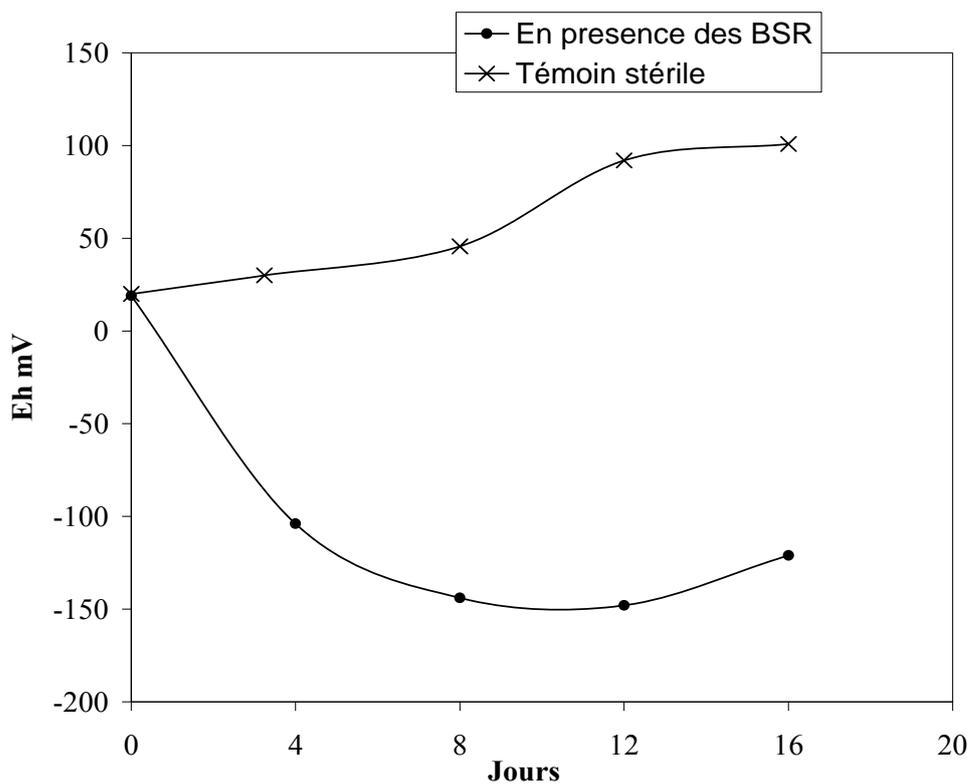


Figure 25 : potentiel redox mesuré dans le milieu d'enrichissement en présence des BSR par comparaison à un témoin stérile.



Figure 26 : précipité noir formé au cours de la croissance des BSR dans le milieu d'enrichissement ainsi que dans l'eau de COX synthétique.

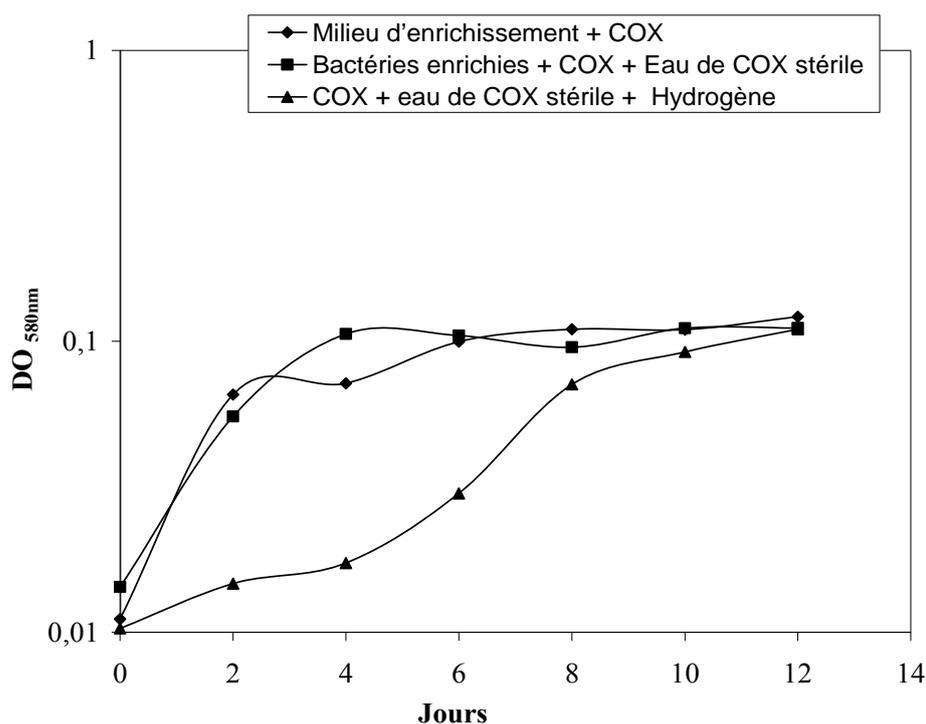


Figure 27 :  $DO_{580}$  associée à la croissance bactérienne dans les 3 cas de culture.

La migration des produits de PCR par électrophorèse en gel d'agarose a permis de visualiser des bandes d'ADN bien amplifiées (Figure 28), ce qui montre la complémentarité des amorces D88 et E94 utilisées pour amplifier par PCR la totalité de la séquences 16s ADN des BSR. Si les amorces étaient incompatibles, on n'aurait pas ces bandes d'amplifications.

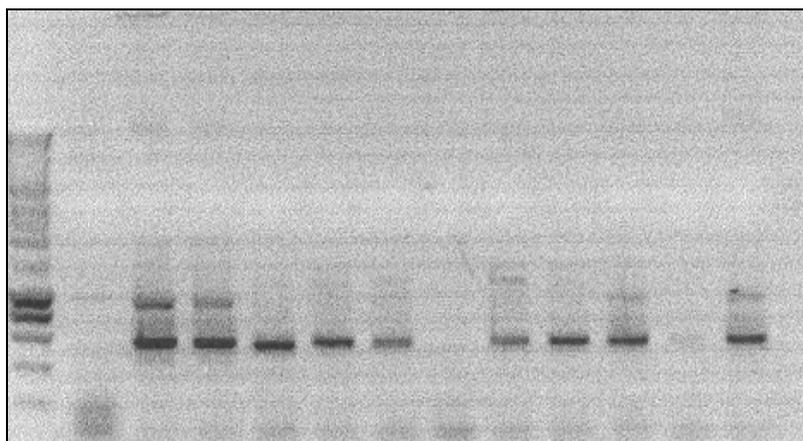


Figure 28 : gel d'électrophorèse des produits de PCR observé sous U.V.

Le résultat de séquençage des produits de PCR purifiés des ADNr 16s sont présentés dans le tableau 7. Le séquençage a consisté à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Vu le nombre restreint des BSR connues, les pourcentages de

similarité (entre 85 et 97%) avec les séquences 16s des souches connues ont été suffisants pour pouvoir identifier les quatre souches de la famille des BSR isolées à partir de l'argilite. Ces BSR peuvent croître dans des conditions extrêmes de température, de pression et de manque de matières nutritives. Ces bactéries sont retrouvées surtout dans des forages en profondeur des mines géothermiques [134], mines d'or [135], mines d'uranium [136], région semi-aride [124] et des forages pétroliers [137].

- *Desulfosporosinus* : ces microorganismes ont longtemps échappé à l'attention des microbiologistes et ont été récemment révélés. Cette espèce a été décrite à tort comme *Orientis Desulfovibrio* par Adams et Postgate [138]. Plus tard, la souche *Desulfosporosinus* a été décrite par Stackebrandt et al. [22] comme un groupe de bactéries strictement anaérobies, sporulantes, Gram positif et en forme de tige. Ces bactéries peuvent réduire le sulfate et le thiosulfate en présence de lactate et pyruvate mais pas en présence d'acétate et de fructose. Elles sont dotées d'une capacité de croissance autotrophique en présence de sulfate et d'hydrogène, et méthanogéniques en présence de méthanol et d'éthanol.

- *Desulfotomaculum*, *Desulfotomaculum sp. 175* et *Thermosubterraneum* : bactéries thermophiles, anaérobies, sporulantes et Gram positive. Leur température de croissance est entre 50 et 72°C à un pH entre 6,4 et 7,8. Elles tolèrent une salinité de 1 à 5% avec une croissance optimale entre 0 et 1% et utilisent le sulfate, le thiosulfate, le sulfite comme accepteurs d'électrons et l'hydrogène, l'alanine, les acides carboxyliques et les alcools comme donneurs d'électrons. Elles ont une capacité de croissance fermentative en présence de lactate et de pyruvate [134]. Ces souches appartiennent aux archéobactéries. Elles ont été isolées de sédiments et possèdent la particularité de réaliser une réduction des sulfates en extrême thermophilie [139]. Elles ont été isolées de sédiments provenant du système hydrothermal marin de la région volcanique du Vulcano (Italie). Zobell [140] a montré la capacité de ces bactéries à croître jusqu'à une température de 104°C et une pression de 1000 bars.

Identification	% de correspondance avec les 16sADN des souches mères
<i>Desulfosporosinus</i>	97%
<i>Desulfotomaculum sp. 175</i>	92%
<i>Thermosubterraneum</i>	85%
<i>Desulfotomaculum</i>	85%

Tableau 7 : bactéries sulfato-réductrices identifiées à partir des expériences d'enrichissement utilisant l'argilite du Callovo-Oxfordien.

### **III-3- Conclusion**

La diversité des microorganismes en conditions anaérobies est fonction des nutriments disponibles et de la présence de réducteurs en absence d'oxygène. En sub-surface, la nature et les capacités métaboliques des communautés des bactéries sulfato-réductrices dépendent de la composition et de la qualité de la matière organique disponible. Ce sont des bactéries anaérobies strictes vivant dans un environnement réducteur (sans O<sub>2</sub>). Dans ces environnements profonds, l'hydrogène joue un rôle primordial notamment pour la plupart des BSR (95 %) qui utilisent H<sub>2</sub> pour réduire le SO<sub>4</sub> et pour leur respiration.

La présence des bactéries sulfato-réductrices dans l'argilite du Callovo-Oxfordien a été abordée à travers différentes approches expérimentales. Sur deux conditions d'étude, dans un milieu d'enrichissement et dans de l'eau argileuse synthétique, la présence de sulfates en quantité non négligeable sous forme solide ou soluble est très importante pour caractériser le pouvoir réducteur des BSR dans la solution. Outre la formation d'un dépôt noir de sulfure de fer (FeS), la production des sulfures, la diminution du potentiel redox, la présence des BSR a également été prouvée par l'isolement d'ADNr de différentes cultures. Au total 4 espèces bactériennes sulfato-réductrices ont finalement été mises en évidence, isolées et identifiées. Les souches isolées sont des souches : autotrophes comme l'a montré l'expérience de croissance sous hydrogène seulement comme unique source d'énergie, sporulantes et thermophiles résistantes. L'état de déshydratation, la présence de dipicolinate de calcium et la richesse en ponts disulfures des tuniques expliqueraient les propriétés de résistance des spores [141]. Les spores sont en effet douées d'une longévité et d'une résistance importante. La longévité est difficile à apprécier mais elle pourrait atteindre plusieurs milliers d'années pour certaines espèces. La sporulation est provoquée par l'épuisement du milieu en substrat nutritif et elle peut nécessiter des conditions particulières comme la présence d'oxygène pour les bactéries anaérobies [142].

Indigène ou introduite par l'activité humaine, ces bactéries sporulantes existent et sont actives : n'importe quelle perturbation dans la roche peut favoriser des conditions idéales pour leur croissances sur le site de stockage. Pour déterminer l'âge des microorganismes en présence, il serait nécessaire de disposer de méthodes de datation. Des concepts récemment développés suggèrent qu'il serait possible d'estimer l'âge évolutif des microorganismes en fonction de leur séquence d'ADN, cette technique s'appelle l'horloge moléculaire. En

### ***III. Isolement des bactéries sulfato-réductrices.***

---

génétique, l'hypothèse de l'horloge moléculaire stipule que les mutations génétiques s'accumulent dans un génome à une vitesse globalement proportionnelle au temps géologique [143].

---

## **IV. Etude de l'effet des bactéries sur la corrosion de l'acier**

---



## IV. Etude de l'effet des bactéries sur la corrosion de l'acier

### IV-1. Matériels et Méthodes

#### IV-1-1. L'acier P235GH

Ces aciers sont essentiellement utilisés pour la fabrication de chaudières, de tuberies à pression ou à vapeur, d'appareils thermiques et de récupérateurs de chaleur. Ils sont adaptés au formage mécanique et au soudage. La propriété essentielle de ces aciers est leur résistance aux pressions élevées, à différentes températures d'utilisation. Ces aciers présentent une bonne aptitude au soudage et une haute résilience. Ils conviennent au recuit normalisant ou au recuit de détente qui neutralise le durcissement consécutif au soudage.

Les spécifications relatives aux compositions et aux caractéristiques mécaniques de l'acier P235GH selon la norme européenne EN-10028-2 sont indiquées dans les tableaux 8 et 9.

% massique	C	Mn	P	S	Si	Al	Cu	Cr	Ni	Mo	Nb	V	Ti	N
<b>P235GH</b>	≤ 0,160	0,60 -1,20	≤ 0,025	≤ 0,015	≤ 0,35	≥ 0,020	≤ 0,30	≤ 0,30	≤ 0,30	≤ 0,08	≤ 0,020	≤ 0,020	≤ 0,030	≤ 0,012

Tableau 8 : spécification des compositions en pourcentages massiques des aciers P235GH.

Caractéristique mécanique	Rp 0,2%	Rm (MPa)	At min( %)
<b>P23GH</b>	185	350 à 480	24

Tableau 9 : spécification des caractéristiques mécaniques des aciers P235GH.

*Rp 0,2%* : limite d'élasticité à 0,2% d'allongement ; *Rm* : charge à rupture ; *At min* : allongement total minimal.

L'acier P23GH a été réceptionné sous forme de blocs. Des coupons carrés de 1 cm de côté et de 1 à 2 mm d'épaisseur ont été préparés au service mécanique de notre laboratoire.

Pour toutes les expériences l'acier a été poli sur 3 microns avec une machine Buehler polisher, en utilisant 3 disques de polissage allant d'une grosse à une faible rugosité. Les coupons sont ensuite lavés en suivant les recommandations de la méthode standard pour la mesure de la corrosion par coupon ASTM [144] :

- Immersion 15 mn dans une solution à 15 % d'acide chlorhydrique contenant 5g/l d'hexaméthylène tétramine (inhibiteur de corrosion) puis rinçage dans l'eau distillée
- Rinçage dans une solution à 5 % de carbonate de soude puis rinçage dans l'eau distillée.
- Lavage dans l'Isopropanol sans aucun contact avec les doigts.
- Séchage au chiffon propre.
- stockage au dessiccateur sous azote pendant 24 heures.

#### IV-1-2-Analyse des coupons :

##### IV-1-2-1. Méthode standard pour la mesure de la corrosion par coupon ASTM [144]

Cette méthode consiste à mesurer la différence de poids des coupons avant et après corrosion. Une fois le coupon poli et lavé, il est pesé à 1/10mg près. Après corrosion, le coupon est d'abord lavé à l'eau courante sous pression, puis on effectue les opérations suivantes :

- Décapage pendant 15 secondes à l'acide chlorhydrique à 15% contenant 5g/l d'hexaméthylène tétramine (inhibiteur de corrosion).

Cette inhibiteur s'utilise à froid et la solution doit être renouvelée lorsque l'acide vire au jaune.

- Rinçage à l'eau pure.
- Rinçage à l'isopropanol.
- Séchage au chiffon puis au dessiccateur.

Après le décapage, les coupons sont pesés à nouveau et la vitesse de corrosion moyenne est calculée en microns/an en appliquant la formule suivante :

$$\frac{3650 \times \text{perte de poids (mg)}}{\text{Densité (g/cm}^3) \times \text{Surface (cm}^2) \times \text{temps (j)}}$$

Avec une Densité  $d = 7,85$  pour l'acier

##### IV-1-2-2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La MEB est une technique de microscopie électronique basée sur le principe des interactions électrons/matière, capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon. Le principe du MEB consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules [145]. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface.

La microscopie électronique à balayage est essentiellement composée d'un canon à électrons et d'une colonne électronique dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon, d'un platine porte objet permettant de déplacer l'échantillon dans les 3 directions et des détecteurs permettant de détecter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon [146].

Le MEB permet d'obtenir des informations sur la topologie de l'échantillon grâce à la détection des électrons secondaires, des informations sur la nature du matériau, et des informations sur la composition chimique de l'échantillon grâce à la spectrométrie X.

Le MEB utilisé pour l'analyse des coupons est le JEOL ltd 5800V (Figure 29) muni d'un canon à électrons en filament tungstène et d'une tension d'accélération de 30 KV à 0,3 KV.

Avant analyse et à cause de la couche de corrosion non conductrice, les coupons sont métallisés à l'aide d'un évaporateur de carbone Balzers qui fonctionne par fort chauffage d'un fil imprégné de carbone par passage d'un courant intense.



*Figure 29 MEB JEOL ltd 5800V  
(Institut des matériaux de Nantes IMN)*

#### IV-1-2-3. Diffraction des rayons X

C'est une technique permettant de caractériser un matériau, c'est-à-dire d'identifier la nature et la structure des produits cristallisés. Cette méthode n'est applicable qu'aux milieux cristallins présentant les caractéristiques de l'état cristallin, c'est-à-dire un arrangement périodique, ordonné et dans des plans réticulaires tridimensionnels (h, k, l) des atomes consécutifs [147].

Les corps cristallins peuvent être comme des assemblages de plans réticulaires plus ou moins denses. Ces plans contenant les atomes sont séparés par des distances caractéristiques. Trois ou quatre distances réticulaires bien choisies permettent une reconstitution des réseaux cristallins du minéral.

Un faisceau de rayons X incident de longueur d'onde  $\lambda$  ne sera réfléchi par une famille de plans réticulaires que dans la mesure où il rencontre ces plans sous un certain angle  $\theta$  dit angle de Bragg. On définit l'angle de diffraction comme l'angle entre le faisceau incident et le faisceau diffracté qui est égale à  $2\theta$  [148].

La technique de diffraction des rayons X consiste à envoyer un flux de rayon X sur un échantillon et à récupérer les rayons diffractés par les faces cristallines de l'échantillon [149].

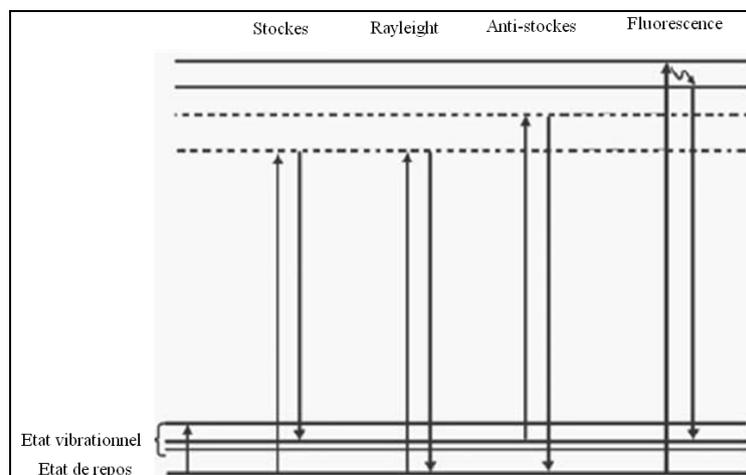
L'analyse DRX a été réalisée sur un appareil SIEMENS D5000 MOXTEK. La source est une anode en cuivre. La géométrie adoptée est celle de Bragg-Bentamo en configuration  $\theta - 2\theta$ . Le

détecteur ponctuel à haute résolution est muni d'un filtre de fluorescence et de l'absorbance. Ce détecteur est adéquat pour éliminer les raies parasites dues à la fluorescence du fer, du manganèse, du vanadium et d'autres éléments qui fluorescent. L'acquisition dure 2 heures. La gamme d'angle  $\theta$  va de 15 à 65 et le pas fixé entre chaque valeur est de 0,01. L'attribution des phases est réalisée à l'aide du logiciel EVA qui comprend la base de données JCPDC.

#### IV-1-2-4. Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique de spectroscopie vibrationnelle qui exploite l'effet Raman [150]. Il correspond à une diffusion inélastique d'un rayon monochromatique incident par la matière irradiée. Les interactions rayonnement-matière qui génèrent la diffusion impliquent un changement d'état vibrationnel des liaisons moléculaires de l'objet irradié. Après le changement d'un état vibrationnel de repos vers un niveau excité, les liaisons reviennent vers un état vibrationnel identique au niveau de départ (Diffusion Rayleigh), ou vers un état plus ou moins excité que le niveau initial (diffusion Stokes et anti-Stokes). Des transitions électroniques peuvent se produire entre les deux niveaux excités avant le retour à son état vibrationnel quelconque, donnant ainsi naissance à de la fluorescence (Figure 30). Cette fluorescence provoque de larges bandes avec une forte intensité qui occulte le signal Raman d'intérêt [151].

Ils sont visualisés dans le spectre Raman par l'intermédiaire des photons rétrodiffusés. Si la molécule absorbe de l'énergie du rayonnement incident, elle diffuse un rayonnement d'énergie plus faible et donc une longueur d'onde plus grande, on se retrouve dans le cas d'une diffusion de Stokes. La diffusion de type anti Stokes correspond au cas inverse.



*Figure 30 : diagramme énergétique présentant les transitions d'état vibrationnel possibles et le type de raies de diffusion qui leur sont associées.*

Deux appareils microraman ont été utilisés pour les analyses :

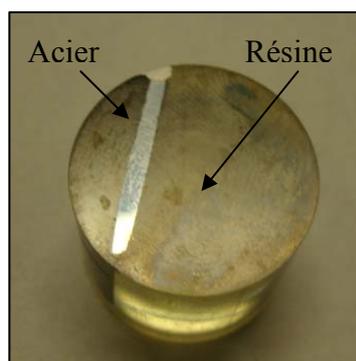
- Jobin Yvon haute résolution (Labram HR) équipé avec un microscope olympus et d'un détecteur CCD (charge coupled detector) de faisceau diffracté. Les spectres ont été acquis avec un logiciel Labspec à une température ambiante avec une résolution de  $2\text{cm}^{-1}$ . L'excitation des échantillons a été obtenue avec un faisceau laser rouge He-Ne (632nm) avec une puissance variant entre 1,94 et 0,07 mW. L'objectif utilisé est X 50 produit un spot laser de  $3\mu\text{m}$ .

- Jobin Yvon (Labram confocale) équipé d'un faisceau laser vert d'une longueur d'onde de 514-53nm, il s'agit d'un laser Innovac à argon ionisé avec une puissance de 0,05 W à la sortie de l'objectif X50. Une fois le faisceau diffracté, il est projeté sur un détecteur CDD Wright avec une dimension de 1024X256 pixels qui permet l'acquisition des spectres par le logiciel Labspec.

#### IV-1-2-5. Sections polies

La préparation des sections polies est faite pour mieux observer les aspects de corrosion (piqûre, locale ou généralisée) ainsi que pour mesurer l'épaisseur de la couche de corrosion.

Les coupons sont maintenus verticalement dans un moule à résine (Figure 31). La résine est de faible viscosité, conçue pour une excellente pénétration de la porosité et dotée d'une bonne adhérence à une basse température exothermique. Lorsque la résine durcit, l'ensemble est sorti du moule et poli à l'aide de la polisseuse Buehler pour les observations au MEB.



*Figure 31 : sections polies de l'acier P235GH*

#### IV-1-3- Expériences de corrosion

Toutes les expériences qui suivent ont été réalisées dans l'eau de COX en présence d'hydrogène comme source d'énergie vu que les BSR ont montré une capacité de croissance dans de telles conditions.

#### IV-1-3-1. Cultures en Batch

Les cultures ont été conduites pendant 1 mois dans des conditions strictement anaérobies dans des bouteilles à sérum de 125ml. 20g d'argilite en poudre ont été mélangés dans 100ml d'eau de COX synthétique stérile en présence de coupons d'acier. Cette expérience a été faite avec et sans inoculation des BSR en comparaison avec deux témoins stériles : le premier avec de l'argilite, le second dans de l'eau argileuse seulement.

#### IV-1-3-2. Corrosion avec succession de conditions aérobies/anaérobies

Cette expérience simule les conditions prévues dans le site de stockage après la fermeture des alvéoles. L'oxygène de l'air va favoriser l'oxydation des matériaux de stockage et de la roche argileuse avant qu'il ne soit totalement consommé. L'objectif de cette expérience est de savoir si la couche d'oxydation formée au cours de la phase aérobie empêche ou diminue l'effet de la biocorrosion des BSR après passage définitif en conditions anaérobies.

Des coupons d'acier sont incubés pendant vingt jours sous conditions aérobies avant d'être transférés sous conditions anaérobies pendant 3 mois dans un milieu inoculé des BSR.

Les cultures ont été faites dans des bouteilles à sérum contenant 100ml d'eau de COX et 20g d'argilite. Les conditions aérobies sont réalisées de deux manières différentes: (1) continu, la bouteille à sérum est fermée avec du coton et (2) discontinu, la bouteille est fermée avec un bouchon septique étanche (Figure 32).

Sous conditions anaérobies, deux bouteilles à sérum inoculées de BSR ainsi que 2 témoins stériles ont été préparés séparément pour les coupons provenant du milieu aérobie continu et aérobie discontinu.

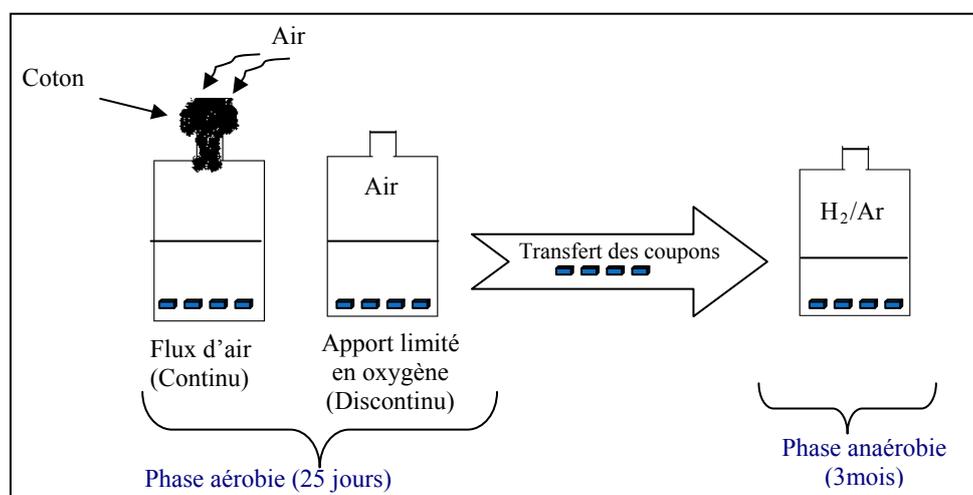


Figure 32 : dispositif expérimental ; corrosion avec succession de conditions aérobies/anaérobies.

#### IV-1-3-3. Corrosion en présence de sulfures

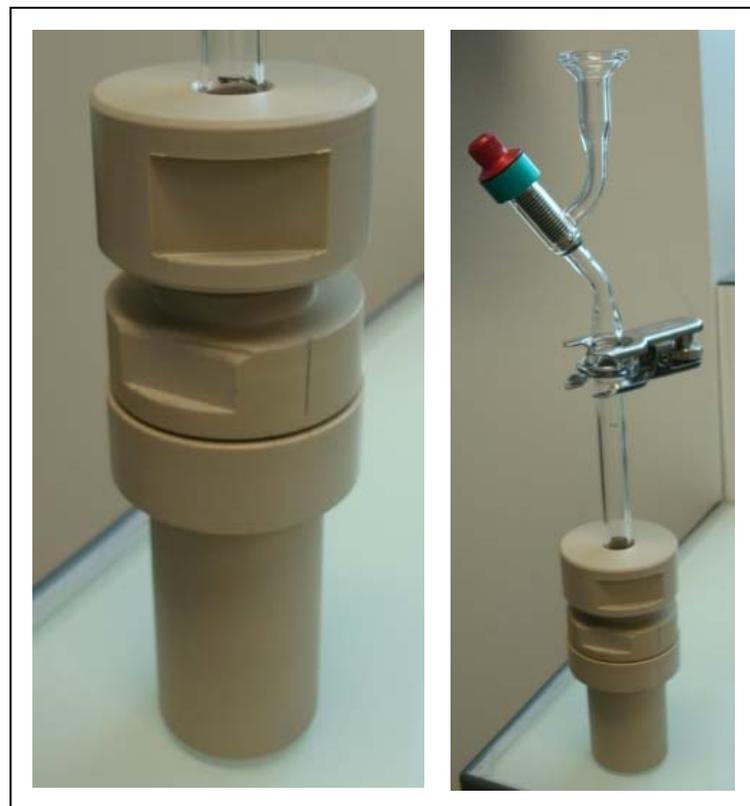
Afin d'évaluer l'effet des sulfures seuls sur la corrosion de l'acier, des coupons en acier ont été mis au contact de sulfures à différentes concentrations pendant 1 mois dans 100ml d'eau de COX. Les concentrations de sulfures utilisées sont 0 ; 1 ; 5 ; 10 et 15mg/l.

#### IV-1-3-4. Influence des irradiations $\gamma$ sur la couche de biocorrosion

En situation de stockage le rayonnement gamma peut conduire à une radiolyse de l'air et/ou du milieu aqueux, avec formation d'espèces oxydantes et réductrices.

Cette expérience a pour objectif d'étudier l'effet des irradiations  $\gamma$  sur la stabilité de la couche de mackinawite (FeS) formée en présence de BSR.

Des coupons en acier sont mis au contact des bactéries pendant 1 mois avant d'être transférés dans des cellules PEEK (figure 33) pour être irradiés avec une source gamma. Les irradiations ont été faites avec un débit de dose de 437 gray/h pendant 2h (faible), 10h (moyen) et 68h (fort). La source de rayonnement  $\gamma$  utilisée pour réaliser cette dosimétrie est constituée d'un barreau cylindrique de cobalt 60 radioactif d'une activité de  $4,8 \cdot 10^{13}$  Bq (1300 Ci).

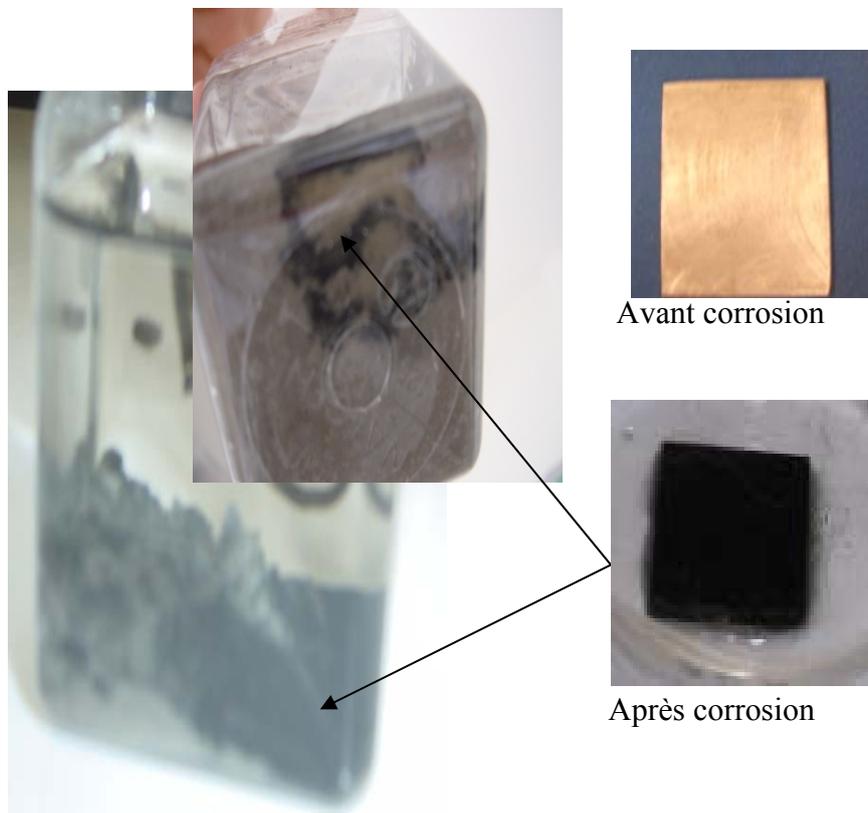


*Figure 33 : cellule PEEK conçue pour les expériences d'irradiation  $\gamma$ .*

## **IV-2. Résultats**

### **IV-2-1. Cultures en Batch**

Après un mois d'incubation et dans les 2 cas (avec ou sans inoculation des BSR), les coupons d'acier deviennent complètement noirs, avec également un noircissement de la zone argileuse autour des coupons (Figure 34). Ce noircissement montre encore une fois que l'hydrogène présent dans la solution ainsi que celui provenant de la corrosion de l'acier peut être une source importante pour la croissance des BSR. Dans les témoins stériles, une couche de corrosion de couleur marron prend place, ce qui pourrait être dû aux traces d'oxygène qui se trouvent dans la solution.



*Figure 34 : noircissement des coupons d'acier au contact des bactéries*

La méthode standard de pesée montre un facteur de corrosion double en présence des bactéries ( $30\mu\text{m}$  par an) par comparaison aux 2 témoins stériles ( $12$  à  $15\mu\text{m}$  par an) (Tableau 10). Les microorganismes, par leur présence ou par leur activité métabolique, modifient de façon drastique la physicochimie à l'interface matériau/environnement, provoquant ainsi l'initiation et l'accélération de la corrosion. La présence de ces microorganismes peut

également entraîner la formation de cellules d'aération différentielles en initiant à la surface du matériau simultanément des zones désaérées ou bien des piles de concentration chimique : c'est le cas des BSR qui sont capables de produire très localement des quantités très importantes de sulfures.

<b>Milieu</b>	<b>Microns/an</b>
Eau COX + COX+ BSR	28,6 ± 4,3
Eau de COX stérile+ COX	25,7 ± 2,4
Témoin stérile (eau de COX+ COX)	16,8 ± 2,0
Témoin stérile (Eau de COX)	11,9 ± 1,3

*Tableau 10 : vitesse de corrosion moyenne (microns/an) en présence des BSR par comparaison à deux témoins stériles.*

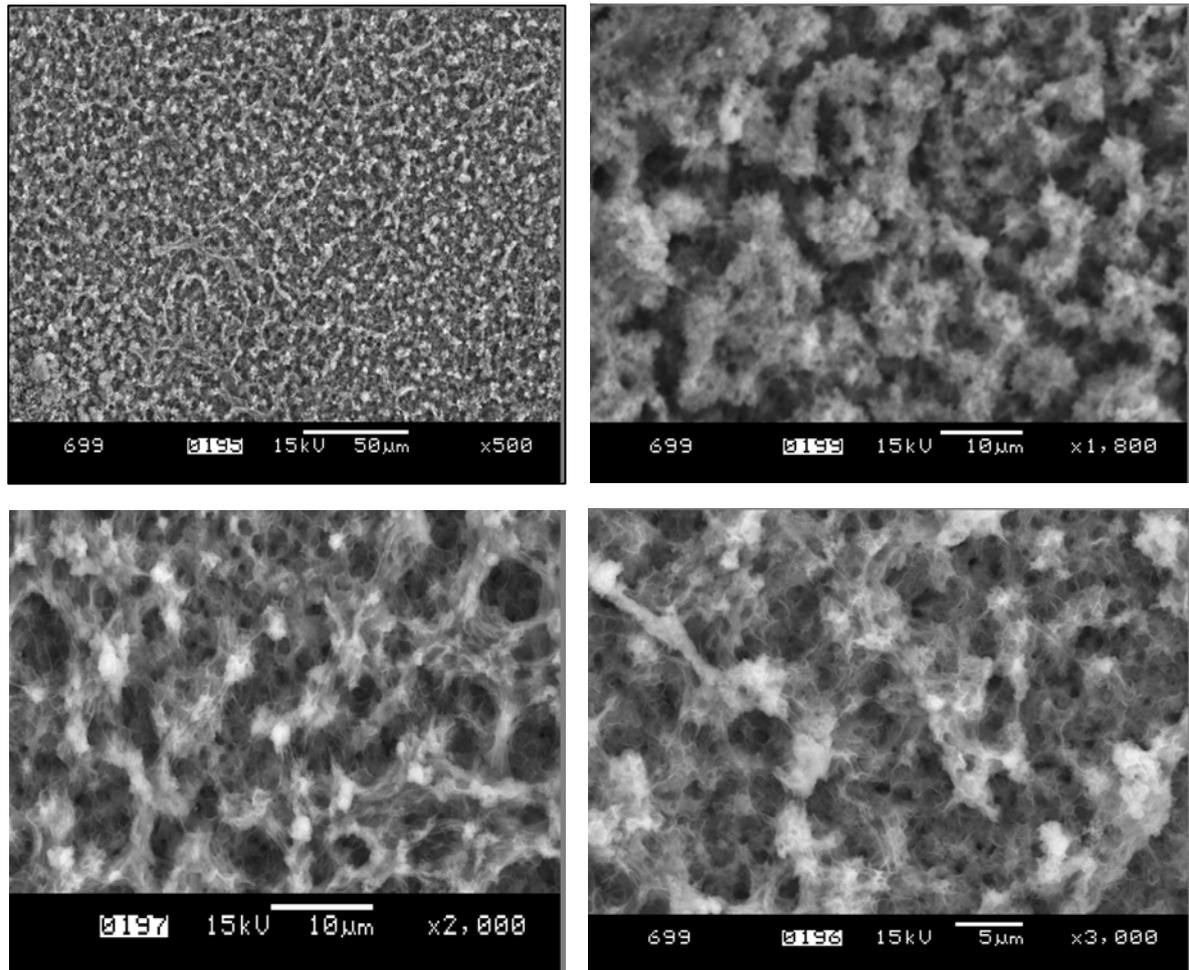
Des biofilms de BSR ont été mis en évidence sur les coupons d'acier après un mois d'incubation (Figures 35). La structure de ces biofilms n'est pas homogène, on voit clairement sur la photographie des structures en forme de microcolonies avec une couche d'exopolysaccharides et une sorte de canalisation entre les microcolonies qui permet l'échange des éléments nutritifs entre les différentes parties du biofilm. Dans les conditions naturelles, ces structures peuvent abriter d'autres types de bactéries aérobies et anaérobies rendant le biofilm plus hautement hétérogène et plus agressif pour les matériaux.

Une fois le biofilm décapé, les coupons d'acier montrent un aspect de corrosion localisée contenant des produits de corrosion (Figure 36) qui s'oxydent très rapidement avec de l'oxygène de l'air (Figure 37). Les résultats de nos expériences sont similaires à ceux retrouvés par Xu et al. [152], Yandecastel [153] et Miranda et al. [84] qui ont étudié la corrosion des aciers (acier inoxydable et aciers au carbone) en présence des BSR (Figure 38).

Les sections polies des coupons d'acier confirment l'observation de cet aspect de corrosion localisée qui se représente sous forme d'un creux rempli de produits de corrosion en présence des BSR par comparaison aux témoins stériles (Figure 39). Le contraste de phases permet de bien distinguer la couche de corrosion de l'acier.

Les observations au MEB des coupons d'acier montrent une couche de corrosion importante en présence des BSR (Figure 40). L'analyse EDS de cette couche (Figure 41) révèle 2 pics importants de soufre et de fer. L'absence de pic de soufre pour le témoin stérile suggère l'implication des BSR dans la présence du soufre à la surface de l'acier corrodé.

L'analyse DRX de la couche de corrosion confirme le résultat obtenu au MEB, notamment la présence de sulfure de fer comme produit de corrosion ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ,  $\text{FeS}$ ) en présence des bactéries mais pas pour le témoin stérile (figure 42). La présence de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$  est due à l'oxydation de l'échantillon pendant l'analyse qui est réalisée sous air.



*Figure 35 : photo MEB montrant la présence du biofilm de BSR sur le coupon d'acier corrodé en culture en batch pendant 1 mois sous hydrogène (COX/eau de COX).*

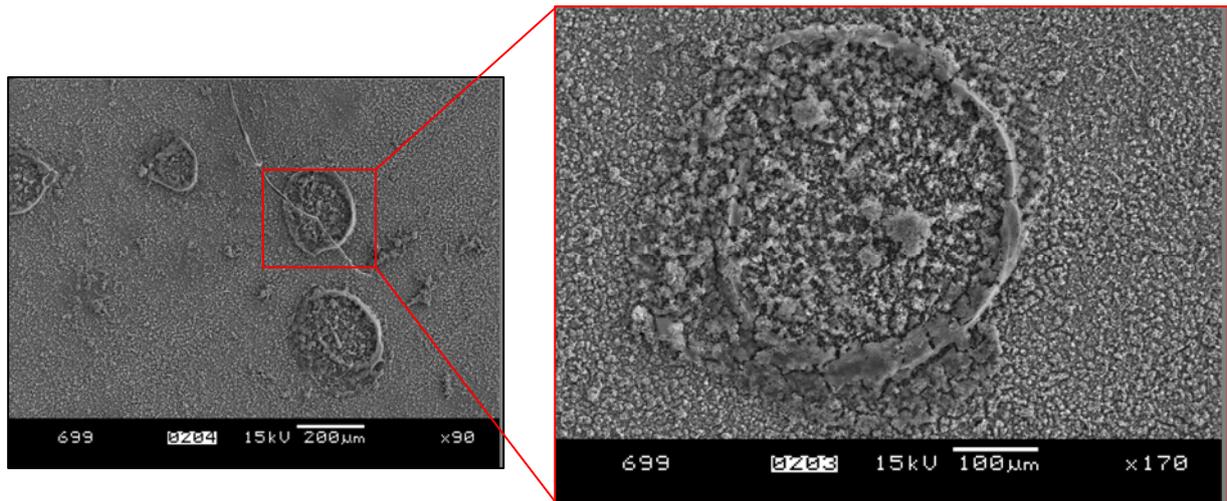


Figure 36 : photos MEB montrant un aspect de corrosion localisée contenant des produits de corrosion. Culture en batch pendant 1 mois sous hydrogène (COX/eau de COX).

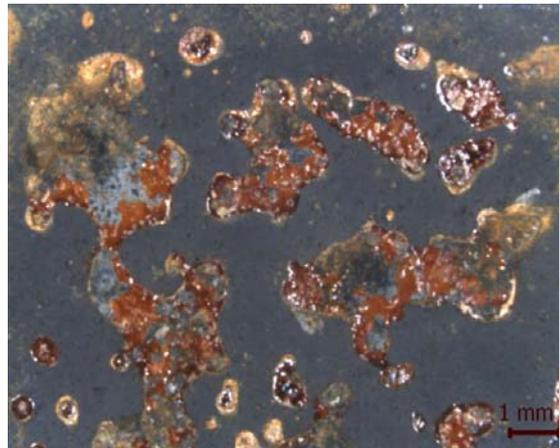


Figure 37 : oxydation non uniforme des coupons d'acier à l'air libre. Culture en batch pendant 1 mois sous hydrogène (COX/eau de COX).

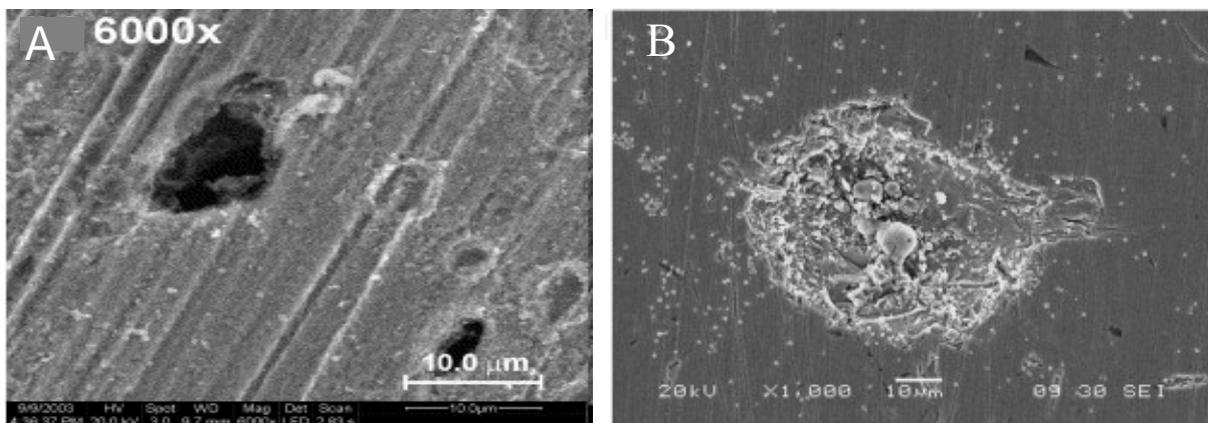
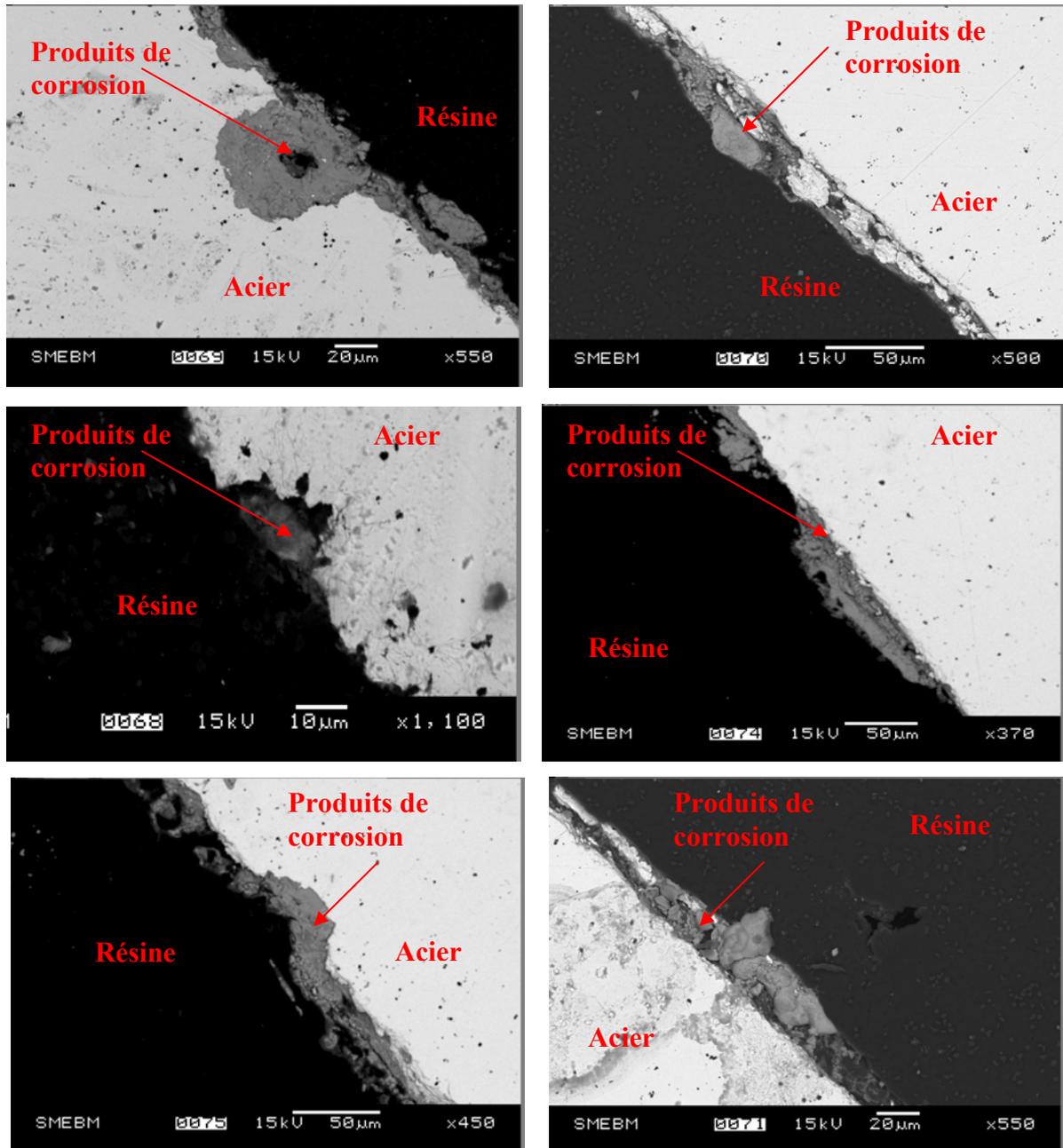


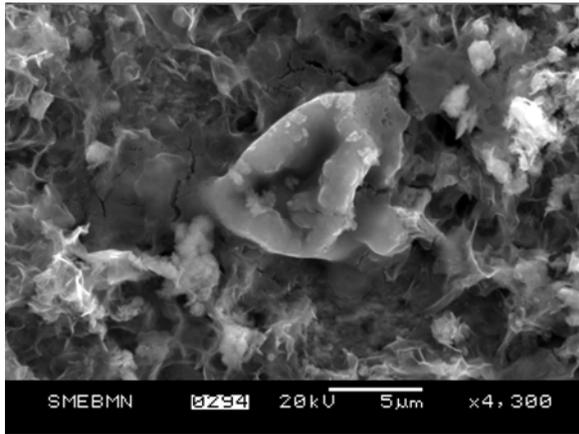
Figure 38 : photos MEB montrant la corrosion localisée des coupons d'acier après immersion pendant (A) 45 jours (acier au carbone)[84]; (B) 30 jours (acier inoxydable)[152] dans un milieu contenant des BSR.



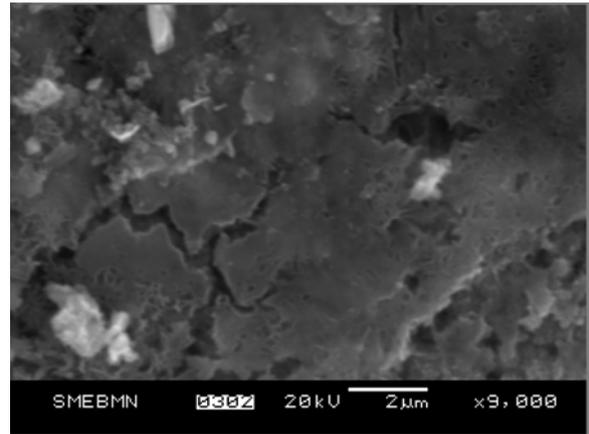
En présence des BSR

Témoin stérile

Figure 39 : sections polies montrant l'aspect de corrosion localisée observée en présence des BSR (creux remplis de produits de corrosion) par comparaison à un témoin stérile.

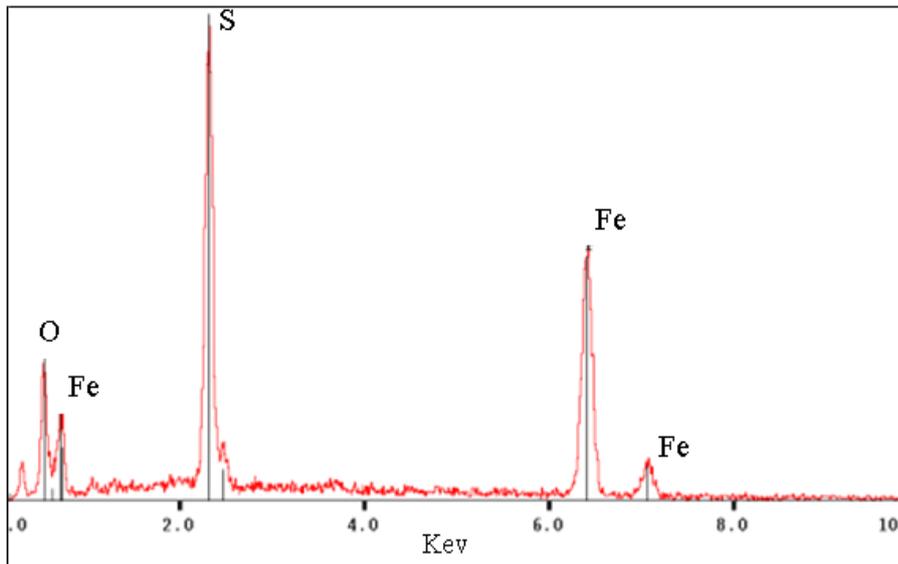


En présence des BSR

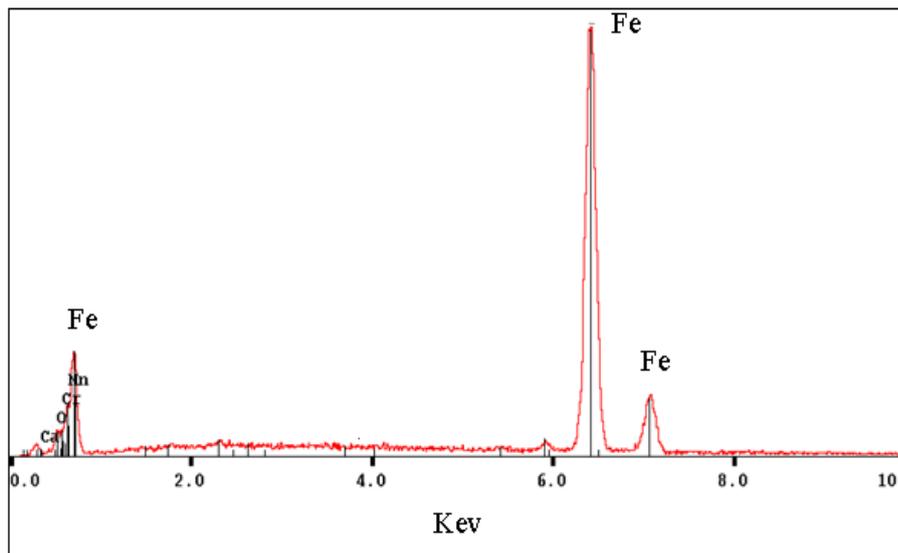


Témoin stérile

Figures 40 : photos MEB de la couche de corrosion en présence des BSR par comparaison au témoin stérile. Culture en batch pendant 1 mois sous hydrogène (COX/eau de COX).



En présence des BSR



Témoin stérile

Figure 41 : EDS de la couche de corrosion des coupons d'acier montrant un pic de soufre en présence des BSR mais pas pour le témoin stérile.

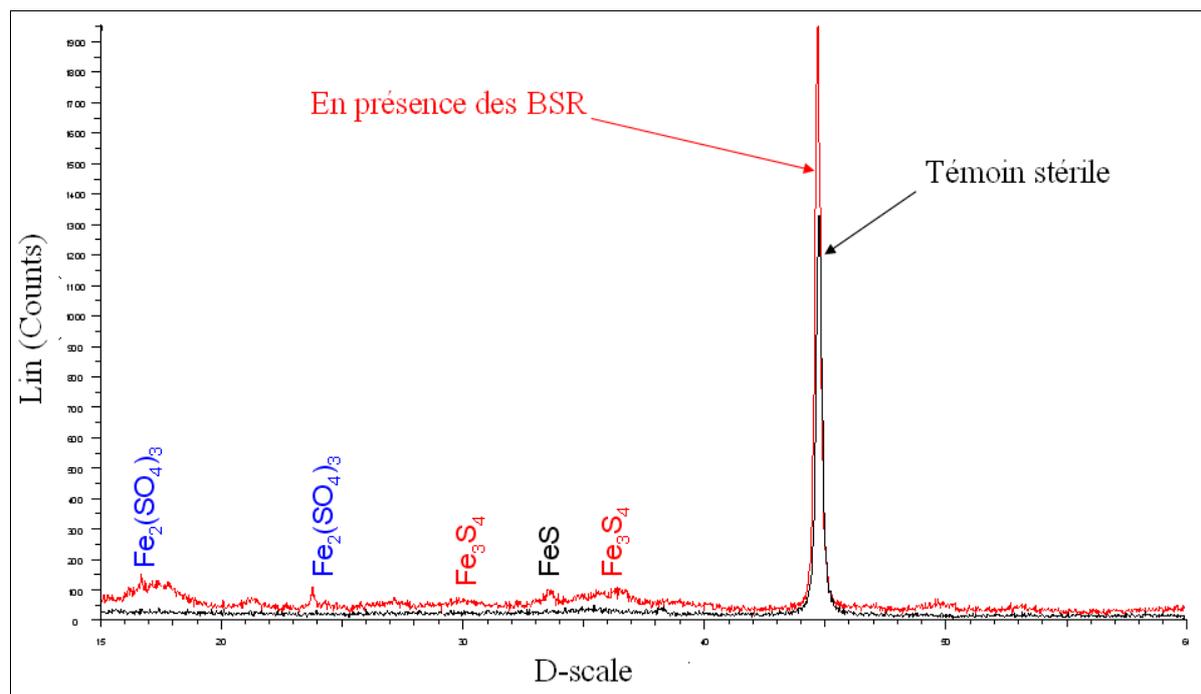


Figure 42 : DRX des coupons d'acier corrodés en présence des bactéries par comparaison à un témoin stérile. Culture en batch pendant 1 mois sous hydrogène (COX/eau de COX).

L'identification des produits de corrosion par DRX a été très difficile compte tenu de la nature complexe du milieu (eau de COX + COX + acier).

Les analyses  $\mu$ -Raman des coupons corrodés en présence de BSR montrent surtout une signature à 210 et 280 $\text{cm}^{-1}$  (Figure 43). Cette signature correspond bien à la signature de la mackinawite (FeS) retrouvée récemment dans une étude récente réalisée par Bourdoiseau et al. [139] qui consistait à caractériser par  $\mu$ -Raman les sulfures de fer résultant de la réaction de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ou bien de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  avec  $\text{Na}_2\text{S}$  en solution aqueuse avec un rapport de concentration Fe(II)/S de 0,1.

En revanche, d'autres produits de corrosion ont été identifiés par  $\mu$ -Raman pour le témoin stérile comme la lepidocrocite ( $\text{FeOOH}$ ) à 370-380 $\text{cm}^{-1}$  et la ferrihydrite ( $\text{Fe}_3\text{O}(\text{OH})$ ) 720 $\text{cm}^{-1}$  (Figure 44). Les analyses des témoins stériles ont montré aussi d'autres produits de corrosion comme la rouille verte et la goethite. Ces produits résultent surtout de l'oxydation de fer à cause des traces d'oxygène qui contaminent la solution.

Un essai d'observation de la mackinawite a été fait au MET. Ces observations montrent des particules cristallisées composées de fer et de soufre avec une taille de 1 $\mu\text{m}$  environ (Figure 43). Ce résultat confirme encore une fois la capacité des BSR à synthétiser la mackinawite par voie biologique.

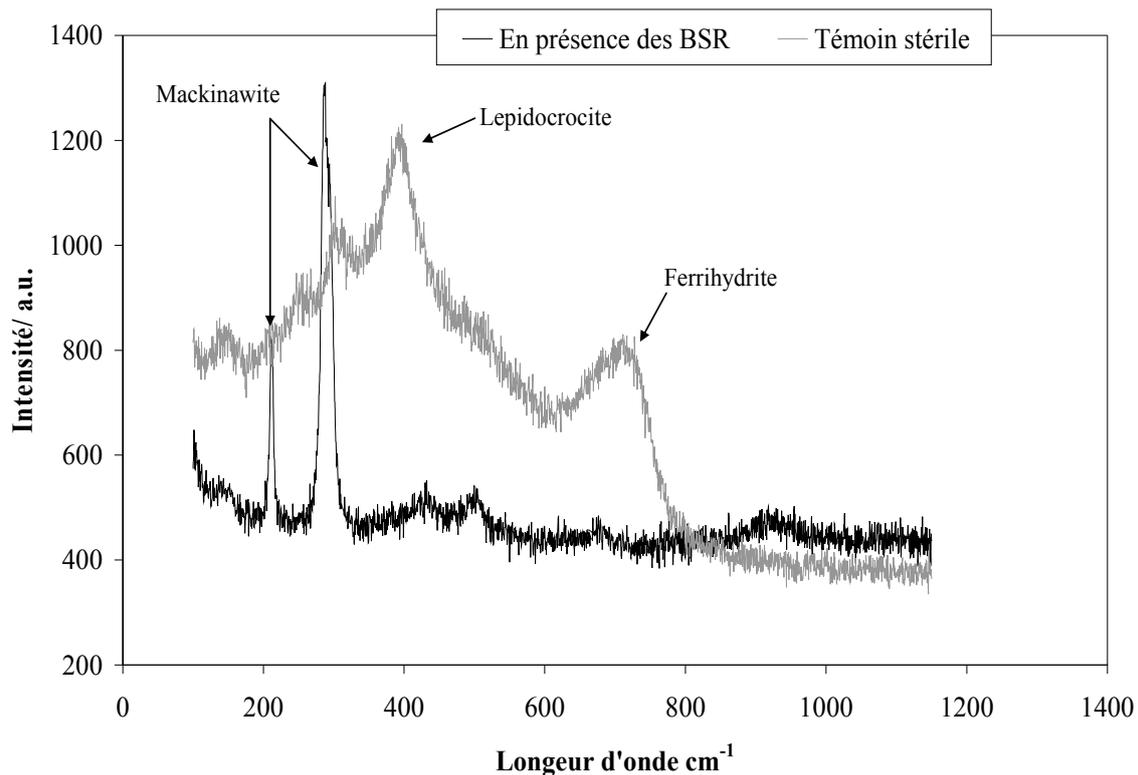


Figure 43 : spectre  $\mu$ -Raman montrant la présence de la mackinawite à 210 et 280  $\text{cm}^{-1}$  en présence de BSR, le témoin stérile montre plutôt la présence de produits d'oxydation de type hydroxyde de fer.

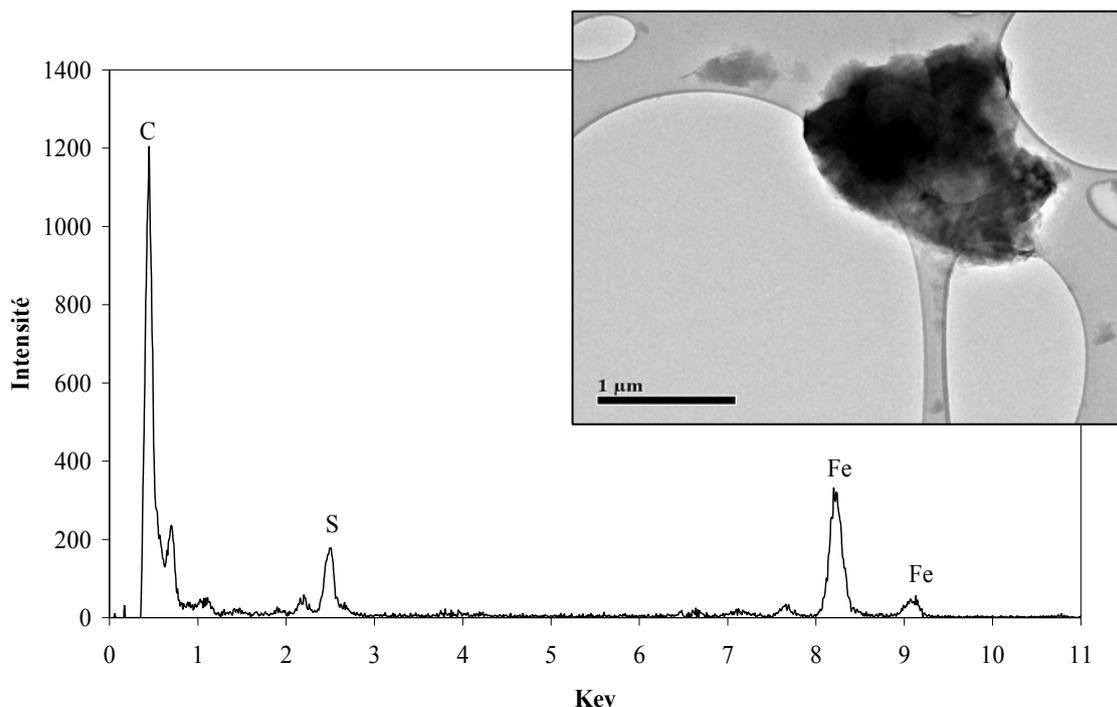


Figure 44 : particule de mackinawite observée en MET, l'analyse chimique de cette particule montre surtout la présence de Fe et de S. Le pic de carbone vient de la grille du MET

### **Discussion sur les cultures en batch**

Après 1 mois d'immersion des coupons d'acier P235GH dans de l'eau de COX en présence d'argilite (à 30°C dans des conditions anaérobies sous hydrogène), les résultats de vitesse de corrosion en présence des BSR ont montré un facteur double de corrosion par comparaison au témoin stérile.

D'autre part, la culture en batch sans ajout de BSR et de matières organiques dans la solution a montré que l'hydrogène bullé dans la solution ainsi que l'hydrogène provenant de la corrosion des coupons d'acier ont permis l'activation et la croissance des BSR. D'où, les valeurs de corrosion relativement similaires à celles retrouvées dans les cultures en batch inoculées de BSR.

La détection des produits de métabolisme tel que l'ion sulfure est un indicateur de l'activité des BSR. De plus, les différentes techniques d'analyses de surface utilisées dans notre expérience (MEB, MET, DRX) ont permis la révélation de sulfure de fer (la mackinawite) caractéristique de l'activité des BSR. Les observations au MEB suggèrent un aspect de corrosion généralisée sur une durée d'un mois.

La présence de mackinawite en présence des BSR a été confirmée par les analyses  $\mu$ -Raman. En effet, la réduction des sulfates par les bactéries et la production corrélative de sulfure d'hydrogène qui à son tour réagit avec les ions de fer présents dans la solution, contribue à la formation d'un précipité amorphe qui se cristallise avec le temps pour former la mackinawite FeS. La mackinawite est spécifique des BSR, on la retrouve surtout via leur métabolisme dans les sédiments via dans les systèmes hydrothermaux actifs et dans les océans et les eaux de mer [154].

La surconsommation de l'hydrogène par les BSR peut être un facteur accélérateur de la corrosion en favorisant l'oxydation du fer et la production de  $Fe^{2+}$ . L'accélération de la corrosion peut être sensible aussi à la sulfuration de la surface de l'acier notamment par la production du sulfure d'hydrogène et des sulfures de fer qui peuvent entraîner une acidification locale sur les coupons d'acier et changer les conditions physico-chimiques du milieu [80].

Les biofilms des BSR observés sur les coupons (figure 35) peuvent aussi influencer les phénomènes de biocorrosion. Beech et al. [49] ont montré que ces biofilms se développent 10 fois plus rapidement sur un acier non allié en carbone que sur de l'acier inoxydable. Ces

biofilms ne se forment pas d'une manière uniforme mais en mosaïque qui se traduit par un aspect de corrosion localisée comme cela a été observé dans nos expériences (figure 37).

En contexte de stockage des déchets radioactifs il reste cependant à étudier l'effet de plusieurs paramètres comme la température sur la survie microbienne dans le site de stockage où la température peut atteindre 90°C après la fermeture des galeries de stockage. Les températures élevées augmentent également le potentiel de corrosion des aciers [94].

Un autre aspect important à étudier est la succession aérobie-anaérobie résultant de la fermeture des galeries de stockage sur la biocorrosion de l'acier. En effet, après la fermeture des galeries, les microorganismes aérobies peuvent se développer dans les poches aérobies et provoquer la corrosion de l'acier avant le développement de conditions anaérobies favorables à la croissance de bactéries de type BSR. L'effet des bactéries aérobies sur la corrosion des aciers dépend des conditions physico-chimiques des milieux étudiés. Ainsi, dans certains cas le développement d'un biofilm en conditions aérobies peut jouer un rôle protecteur vis-à-vis de la biocorrosion en limitant l'accès de l'oxygène à la surface d'acier [155]. Dans d'autres cas, les biofilms aérobies peuvent abriter des consortiums de microorganismes aérobies et anaérobies qui accélèrent la biocorrosion de l'acier via les produits de métabolisme [152]. Pour tester le rôle des bactéries aérobies/anaérobies sur la biocorrosion de l'acier P235GH nous avons réalisé des expériences de succession milieu aérobies/anaérobies et dont les résultats sont présentés ci après.

#### **IV-2-2. Corrosion avec succession de conditions aérobie/anaérobie.**

Après 20 jours d'incubation en conditions aérobies continues et discontinues, une couche de corrosion marron s'est formée sur les coupons. Après transfert des coupons sous conditions anaérobies et en présence des BSR, les coupons deviennent complètement noirs (Figure 45).

Comme dans les expériences précédentes, la croissance des BSR s'accompagne d'une chute du taux de sulfates dans le milieu avec une production de sulfures. La mesure des vitesses de corrosion des coupons transférés de la phase aérobie (continue et discontinue) en milieu anaérobie montre aussi un facteur double de corrosion par comparaison aux témoins stériles (tableau 11). On remarque une légère augmentation de taux de corrosion de l'ordre de 5 à 8 microns par an par comparaison aux expériences précédentes, cela est probablement dû à la corrosion déjà initiée au cours de la phase aérobie ou bien à l'activité des BSR qui peuvent être présentes dans les conditions aérées [156].

Depuis la découverte des BSR par Beijerinck [157], la connaissance des liens que ces organismes entretiennent avec l'oxygène a en effet beaucoup évolué. Les BSR ont d'abord été décrites comme étant anaérobies strictes, c'est-à-dire selon la définition de Pasteur [158], qui meurent après une exposition à l'air. Néanmoins dans la nature, ces organismes se retrouvent également au niveau des interfaces oxiques-anoxiques.

La découverte d'une activité superoxyde dismutase et parfois de catalase chez certaines souches [159] du genre *Desulfovibrio* a permis dès les années 1970 de supposer que ces enzymes pouvaient constituer un mécanisme de défense utilisé lorsque ces microorganismes étaient accidentellement exposés à l'air [160].

A une température constante, Canfield a montré que la réduction de sulfates en conditions oxygénées pendant 24 heures est similaire à celles retrouvées en conditions anoxiques [156].

L'exposition des coupons d'acier pendant 20 jours à l'air n'a pas empêché le développement des BSR à leur surface en anaérobiose. Au contraire, la phase aérobie semble avoir fragilisé les coupons et a légèrement augmenté les vitesses de corrosion. On note la transformation des produits de corrosion formés en milieu aérobie (probablement des oxyhydroxydes de fer) en sulfures de fer après le passage en conditions anaérobies.



Phase aérobie

phase anaérobie

Figure 45: noircissement des coupons d'acier après transfert en conditions anaérobies et en présence des BSR inoculés dans le milieu.

Phase anaérobie (3 mois)	Taux de Corrosion (micron/an)
Coupons transférés de la solution aérobie continue	42,3 ± 0,25
Coupons transférés de la solution aérobie discontinue	42,2 ± 3
Témoin stérile des coupons transférés de la phase aérobie continue	20,5 ± 3
Témoin stérile des coupons transférés de la phase aérobie continue	20,9 ± 1

Tableau 11 : vitesse de corrosion moyenne des coupons transférés de la phase aérobie (continue et discontinue) en anaérobiose dans l'eau de COX en présence des BSR.

L'analyse MEB des coupons d'acier transférés en milieu anaérobie montre un pic de soufre en présence des BSR mais pas pour les témoins stériles (Figure 46). Le pic de fer observé en présence des BSR est moins intense à cause de la formation de la couche de sulfure de fer. Le pic d'oxygène observé sur le spectre EDS de l'acier du témoin stérile résulte des produits de corrosion formés au cours de la phase aérobie. Les analyses MEB sont confirmées par  $\mu$ -Raman suite à l'observation de la mackinawite en présence des BSR mais pas pour les témoins stériles (Figure 47).

Les sections polies des coupons montrent un aspect de corrosion par piqûre pour les coupons transférés de la phase aérobie en anaérobiose en présence des BSR. Les témoins stériles montrent plutôt une corrosion généralisée (Figure 48).

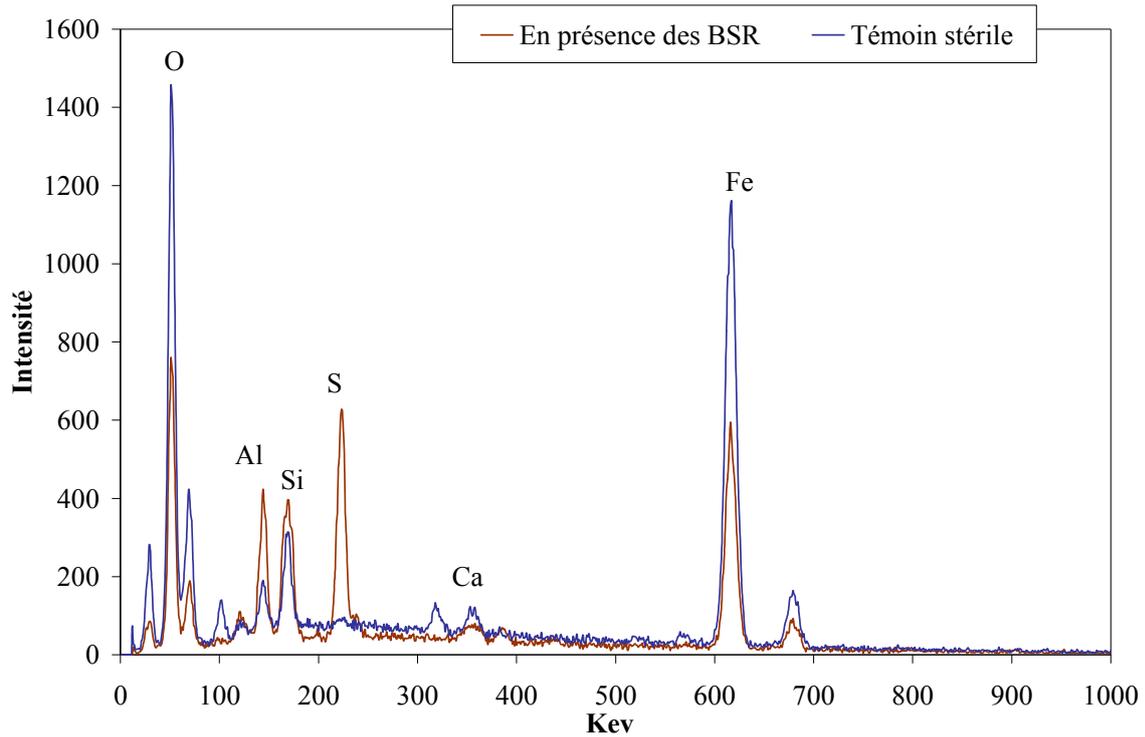


Figure 46 : EDS des coupons transférés de la phase aérobie montrant le soufre en présence des bactéries mais pas pour le témoin stérile.

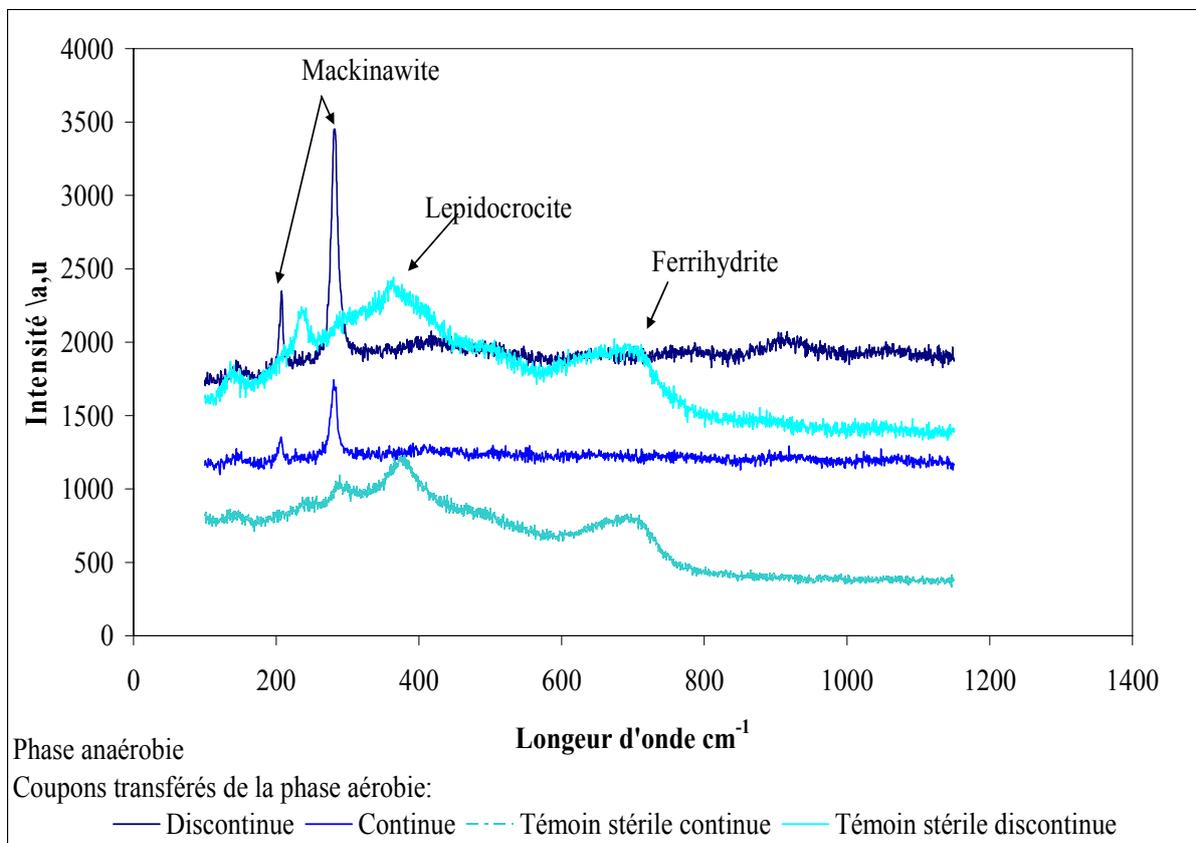
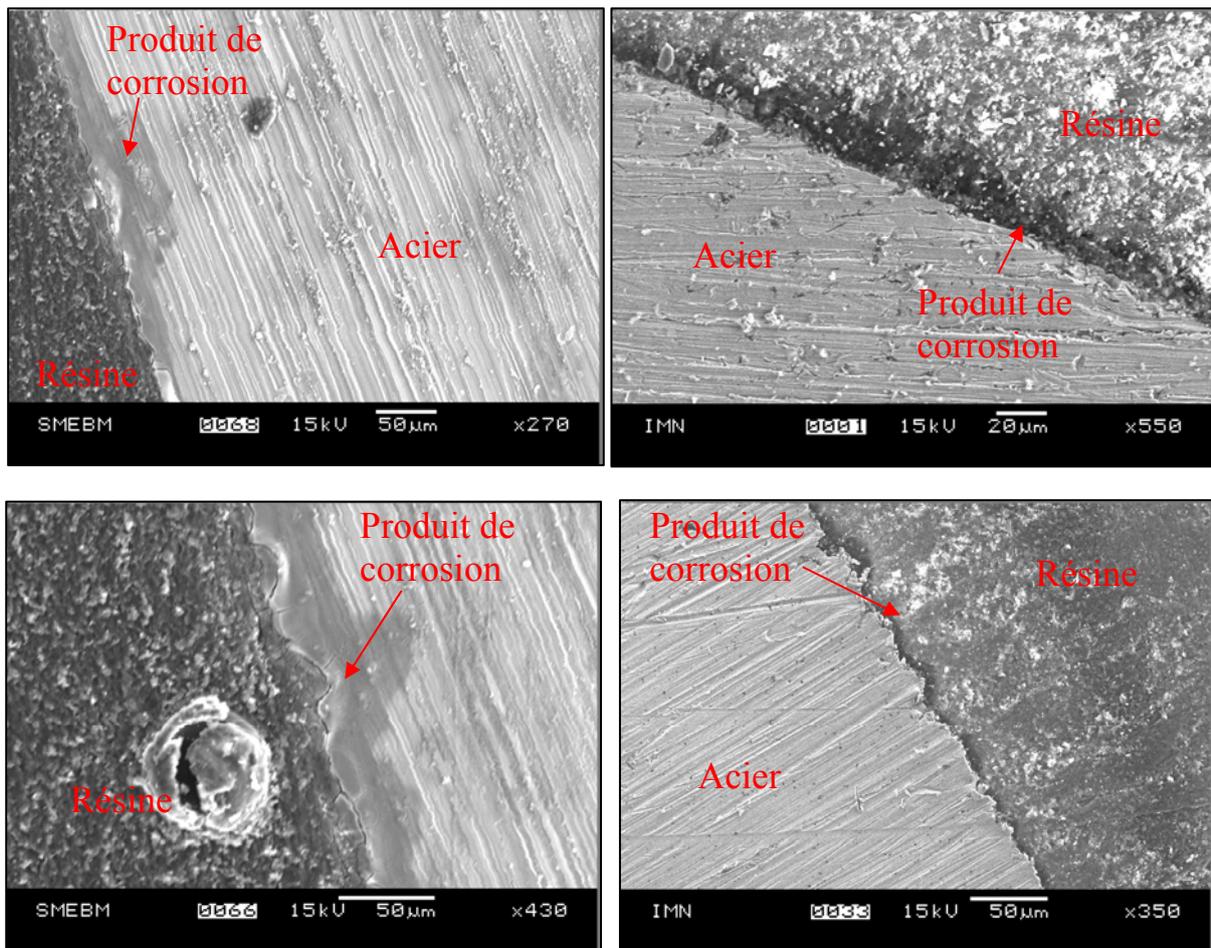


Figure 47 :  $\mu$ -Raman montrant la mackinawite sur les coupons transférés de la phase aérobie et incubé 3 mois dans l'eau de COX en présence des BSR en anaérobiose.



En présence des BSR

Témoin stérile

Figure 48 : sections polies montrant un aspect de corrosion par piqûre des coupons transférés de la phase aérobie et incubés 3 mois dans l'eau de COX en présence des BSR en anaérobiose.

### **IV-2-3. Expériences de corrosion abiotique de l'acier en présence de sulfure**

Afin d'évaluer le rôle des sulfures dans la corrosion de l'acier nous avons réalisé des expériences de corrosion de l'acier en présence de différentes concentrations d'acier (0-15 mg/L). Les vitesses de corrosion obtenues avec différentes concentrations de sulfures sont présentées dans le tableau 12. Ces résultats montrent que l'augmentation de la concentration de sulfures dans le milieu n'affecte pas la cinétique de corrosion. Le barbotage de l'hydrogène dans la solution ainsi que la présence de sulfures à des concentrations élevées induisent un rapport  $PCO_2 / PH_2S$  inférieur à 20, ce qui implique la formation d'une couche de sulfure de fer uniforme et protectrice qui bloquerait une éventuelle corrosion à partir de 1mg/l de sulfure dans le milieu.

A partir de 1mg/l de sulfures dans la solution, le produit de corrosion essentiel mis en évidence par analyse  $\mu$ -Raman sur les coupons est la mackinawite (Figure 49). Ce résultat est compatible avec celui retrouvé en présence des BSR où les valeurs de sulfure dissous provenant de leur métabolisme sont de l'ordre de 1,5mg/l.

<b>Concentration sulfure mg/l</b>	<b>Microns/an</b>
0	8,7 ± 2
1	35,4 ± 5
5	35,2 ± 2
10	29,8 ± 2
15	33,5 ± 3

*Tableau 12 : vitesse de corrosion moyenne en microns/an à différentes concentrations de sulfures.*

Le rôle des sulfures sur la corrosion des métaux a été également étudié par d'autres auteurs mais dans des conditions différentes des nôtres. Ainsi, Ren et al. [161] ont montré que la présence de sulfures dans la solution conduit à une corrosion localisée et une attaque corrosive et érosive de l'acier. L'effet protecteur de FeS a été également mis en évidence par Milliams et Kroese [162] qui ont montré que la corrosion des coupons en rotation en présence de  $H_2S$  implique une vitesse plus élevée que celle des coupons corrodés sans rotation. La rotation allant de 0 à 300 rpm accélère la corrosion en découpant au fur et à mesure le film FeS protecteur qui se forme sur les coupons. Ce phénomène est similaire à celui retrouvé en présence des bactéries qui se multiplient sur la surface métallique en formant des mosaïques de colonies, le décapage des colonies à cause du vieillissement de la base des biofilms laisse la place à l'installation d'un nouveau biofilm [163]. Ce cycle de décapage et de recolonisation

des bactéries accélère la détérioration du métal à cause de la corrosion continue de la surface par consommation de l'hydrogène et production de sulfure d'hydrogène.

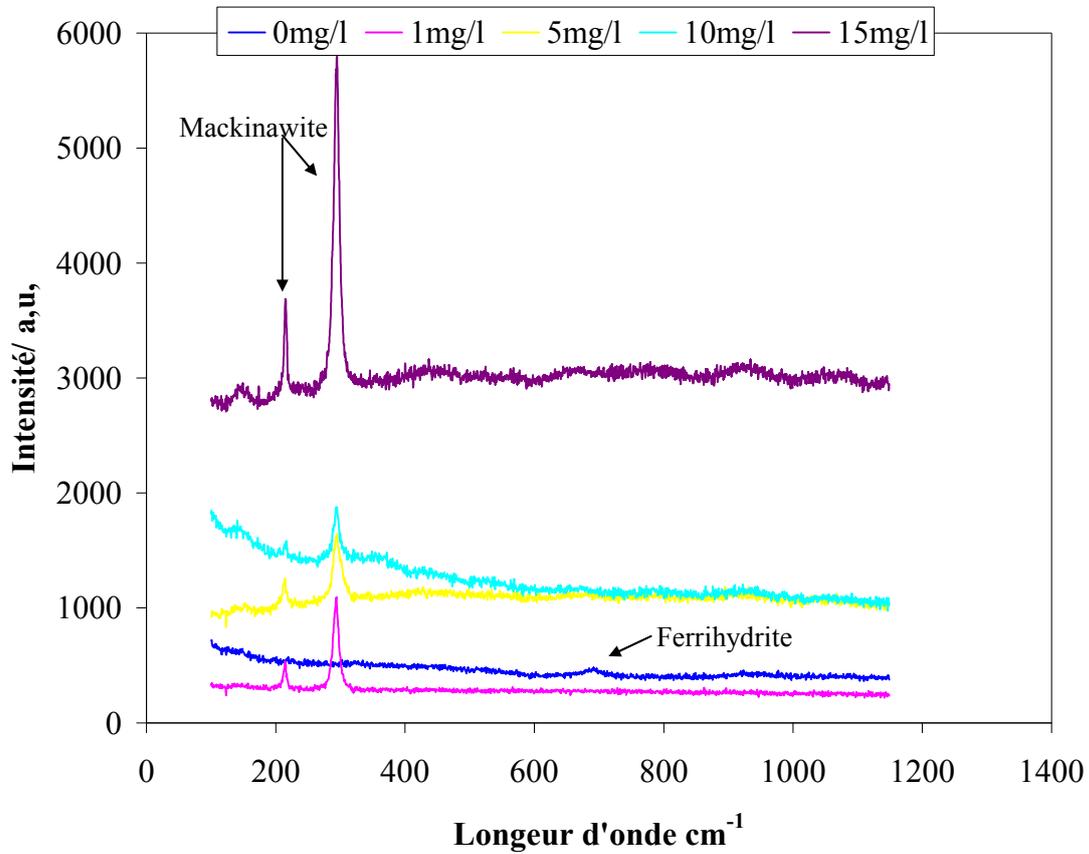


Figure 49 : spectres  $\mu$ -Raman des coupons d'acier à différentes concentrations de sulfure. Formation de la mackinawite à partir de 1mg/l de sulfures dans le milieu.

#### **IV-2-4. Influence des irradiations $\gamma$ sur la couche de biocorrosion**

Les études de sûreté de stockage incluent aussi l'étude de l'effet des radiations gamma sur la corrosion des conteneurs des déchets radioactifs. En présence des irradiations, l'eau se décompose en espèces chimiquement réactives comme  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , et  $\text{O}_2^\cdot$ . Ces éléments peuvent interagir avec l'acier des conteneurs et générer une oxydation et une dissolution du métal. Daub et al. [164] ont montré que le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est le produit clé de radiolyse qui contrôle la corrosion de l'acier à un pH de 10,6 et à une température ambiante. Une autre étude de l'effet des irradiations gamma sur la corrosion de l'acier avec un débit de dose de 0,48 KGy/h a montré une vitesse de corrosion six fois plus élevée par comparaison à un témoin non irradié. Les analyses MEB et DRX de ces coupons ont révélé la présence surtout de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  comme produit de corrosion [165].

Marsh et al. [166] ont montré en conditions de stockage l'absence d'effet notable d'une irradiation  $\gamma$  à des débits de dose de 3, 35 ou 103 Gy/h sur la corrosion d'un acier au carbone forgé dans une eau granitique synthétique désaérée à 90°C.

Remarquons aussi que le débit de dose est non seulement fonction de la nature et de la quantité des déchets radioactifs présents, mais aussi de l'épaisseur du conteneur [171]. Dans le cas des conteneurs des déchets HAVL en acier (55mm), le débit de dose attendu est relativement inférieur à 100 Gy/h [167].

Il n'existe pas de facteur seuil de dose d'irradiation conduisant à une destruction des activités bactériennes; c'est plutôt le débit de dose qui est limitant pour l'activité bactérienne que la dose d'irradiation. Des activités bactériennes ont été mesurées en présence de débits de dose de rayonnements de l'ordre de 100-200 Gy/h (peut-être même plus), mais un effet seuil de débit de dose n'a jamais été clairement démontré et il est par ailleurs mentionné que c'est l'exposition prolongée aux radiations qui accroît la radio-résistance d'une population bactérienne [168].

Après 1 mois d'incubation des coupons en présence de BSR et irradiation par une source gamma de débit de dose 437 Gy/h à 3 temps d'expositions (2h, 10h et 68h), les analyses  $\mu$ -Raman ont montré la présence de mackinawite dans les 3 cas d'irradiations (Figure 50). La couche de FeS formée par les BSR n'est donc pas altérée sous irradiations.

2 hypothèses sont possibles :

- Il est probable que les vitesses de corrosion observées en présence de BSR, de l'ordre de 30  $\mu\text{m}/\text{an}$ , sont suffisamment importantes pour ne pas être perturbées par l'irradiation. Comme

expliqué précédemment, en l'absence des bactéries, FeS a rôle protecteur vis-à-vis de la corrosion, ce qui met à l'abri les coupons de l'attaque des radicaux libres résultant de la radiolyse de l'eau, d'où les valeurs similaires de corrosion, pour les 3 doses utilisées.

- Les temps d'irradiation n'étaient pas assez suffisants pour que les radicaux de l'irradiation puissent oxyder complètement la couche de mackinawite avant de corroder l'acier. En effet, le bilan des espèces oxydo-réductrices produites par la radiolyse est difficilement accessible par les techniques de mesures classiques. Ce bilan dépend de la chimie de la solution des composés présents (acier, argilite et eau de COX), de la cinétique de formation et de consommation des espèces oxydantes et des conditions d'irradiation.

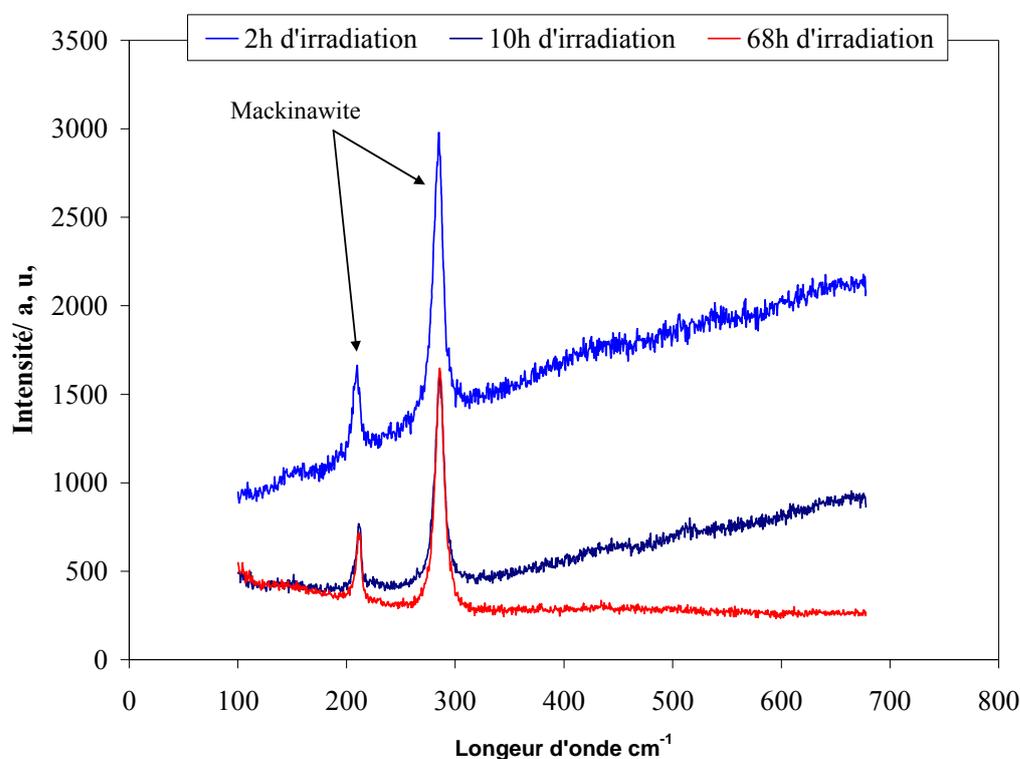


Figure 50 : spectre  $\mu$ -Raman des coupons d'acier irradiés pendant 2h, 10h et 68h après 1 mois d'incubation en présence des BSR.

### **IV-3. Conclusion**

Les BSR peuvent accélérer la corrosion surtout par la production de composés qui s'avèrent corrosifs pour l'acier comme le sulfure d'hydrogène et les sulfures de fer, la formation des cellules de concentration à la surface de l'acier et en particulier des cellules d'aérations différentielles (mosaïque de biofilms), et enfin par la stimulation directe des réactions cathodiques de corrosion par la consommation d'hydrogène.

L'expérience avec succession de conditions aérobies/anaérobies a montré qu'une période aérobie n'empêche a priori pas le développement d'une activité des BSR. La corrosion en présence de BSR (30  $\mu\text{m}/\text{an}$ ) montre un facteur double de corrosion par comparaison aux témoins stériles. La couche de corrosion oxydante formée directement après fermeture du site de stockage n'empêcherait pas l'installation des bactéries sulfato-réductrices sur les sur-conteneurs et les chemisages. Ces bactéries, après passage en conditions anaérobies en l'absence d'oxygène contribueraient à la formation des biofilms qui modifient ou accélèrent le mécanisme de corrosion. Les tests menés ont permis d'évaluer l'influence des BSR sur la vitesse de corrosion moyenne sur la durée totale du test (phase aérobie + phase anaérobie). Des tests complémentaires doivent être menés pour déterminer la vitesse de corrosion moyenne lors de la seule phase aérobie, et être ainsi en mesure de préciser l'influence des BSR sur la vitesse de corrosion sur la phase en conditions anaérobies.

La caractérisation des produits de corrosion par le MEB, la DRX et  $\mu$ -Raman a mis en évidence la présence de mackinawite en présence de BSR mais pas pour les témoins stériles. Les expériences de corrosion en présence de sulfures ont confirmé que les concentrations de sulfures produits par les bactéries ( $\sim 1,5\text{mg}/\text{l}$ ) sont suffisantes pour former de la mackinawite à la surface de l'acier. Par contre, l'augmentation de la concentration des sulfures en l'absence des bactéries n'a pas d'effet sur l'augmentation des vitesses de corrosion de l'acier, d'où le rôle important des bactéries dans l'accélération des phénomènes de corrosion.

La formation d'un dépôt de sulfure de fer et de mackinawite sur l'acier conduit à limiter l'effet des irradiations gamma sur la corrosion sur la durée des essais.

Enfin, en accord avec les données de la littérature, la corrosion induite par les BSR présente un certain aspect de corrosion localisée. Des expériences en batch à de plus longues durées permettront de préciser l'évolution de la corrosion au cours du temps via une analyse de surface (profondeur de piquûre et densité de piquûre cf. V-2) et de valider les vitesses moyennes de corrosion généralisée calculées jusqu'à présent.

---

**V- Expériences de percolation simulant les conditions de  
stockage**

---



## V. Expériences de percolation simulant les conditions de stockage

### V-1. Montage expérimental

Certaines études confirment une certaine capacité des bactéries et notamment les bactéries sulfato-réductrices à survivre dans des conditions compactées et sous hautes pression, d'où l'intérêt de réaliser des expériences dans des conditions simulant au mieux les conditions de stockage pour évaluer l'effet des BSR sur la corrosion de l'acier.

Les propriétés hydrogéologiques de la formation du Callovo-Oxfordien présentent une conductivité hydraulique très faible et une pression statique estimée à 41,24 bars [169]. Le calcul de la rétention de l'eau par l'argilite, facteur essentiel pour la croissance des bactéries, aboutit à une teneur en eau de l'ordre de 6 à 9 % ce qui est caractéristique d'une illite ou d'un interstratifié illite-smectite hydraté au maximum [170].

Les expériences sont réalisées dans des cellules de percolation en acier inoxydable 316-L résistant à de très hautes pressions. La cellule est formée d'un bouchon (entrée de la cellule), d'un corps et d'un embout femelle (sortie de la cellule). La cellule fait 42mm de longueur et 21,19mm de diamètre (Figure 51). A l'entrée et à la sortie de la cellule, deux frittés en acier inoxydable (316L) de 9 $\mu$ m de porosité avec des joints étanches sont mis en place pour éviter les fuites et l'injection d'impuretés dans les cellules.

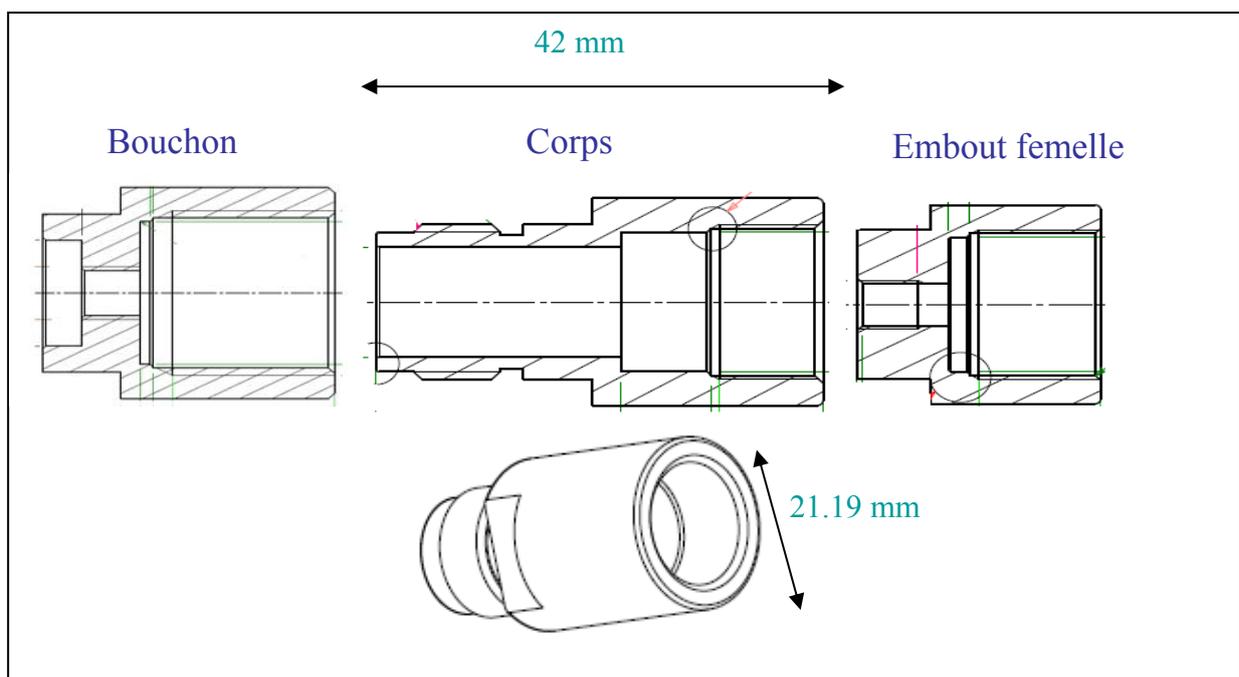
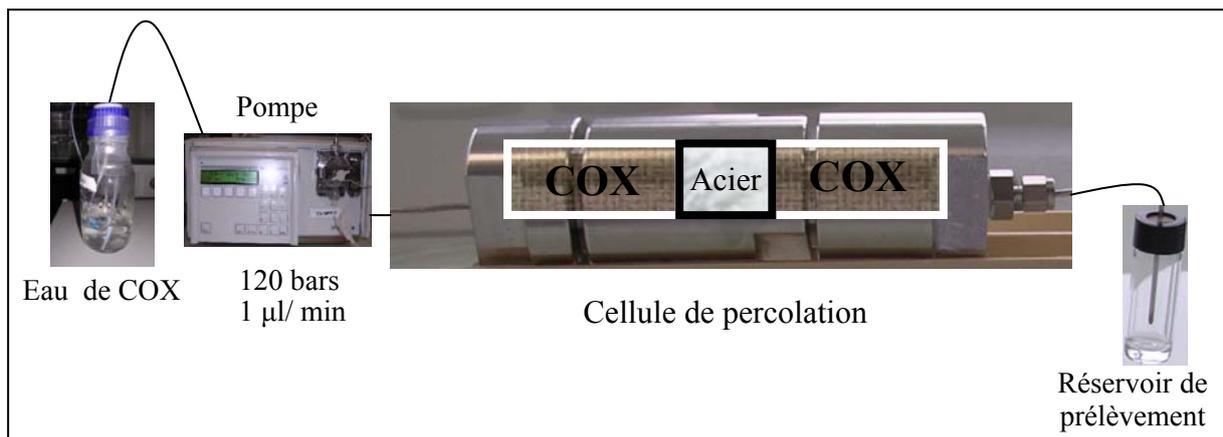


Figure 51 : coupe schématique de la cellule de percolation.

5 coupons en acier préparés et lavés comme déjà mentionné dans le chapitre 2 sont placés entre 2 carottes d'argilite EST 26459 (COX) usinées au service mécanique de notre laboratoire (Figure 52). Les carottes sont de 18,5mm de longueur et de 21 mm de diamètre. Avant utilisation, la surface des carottes a été décontaminée par une lampe UV pendant 15 minutes et par flamme pendant une dizaine de secondes.

Une solution d'eau argileuse synthétique (eau de COX) autoclavée, dégazée et sous pression d'un mélange de gaz H<sub>2</sub> (5%)/Ar est injectée dans la cellule de percolation à l'aide d'une pompe Gilson. L'injection est maintenue tout au long de l'expérience avec une pression de 120 bars et un faible débit de 1µl par minute. La pression utilisée est beaucoup plus élevée que la pression réelle du site de stockage pour assurer une percolation plus rapide de la solution injectée dans les carottes d'argilite. Le débit à la sortie de la cellule était de 270µl par jour, les prélèvements sont réalisés tous les 4 à 5 jours dans des réservoirs à prélèvement sous vide avec un bouchon septique étanche.



*Figure 52 : montage expérimental: eau argileuse synthétique (eau de COX) injectée avec une pression de 120bars et un débit de 1µl/min dans une cellule de percolation contenant 5 coupons d'acier placés entre 2 carottes d'argilite (COX).*

3 cas ont été envisagés :

A : Eau de COX inoculée des BSR isolées du COX/+COX.

B : Eau de COX stérile/+COX.

C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/+COX stérile (2 cycles d'autoclavage à 120°C).

Une semaine avant le début de l'expérience, la pression est augmentée par palier de 5 bars avec des débits d'injection de 1µl et 5µl/min jusqu'à atteindre la pression de 120bars. L'objectif de cette opération est d'une part de s'assurer que le système est complètement anoxique et qu'il n'y a pas de fuite dans le système, et d'autre part de saturer l'argilite en eau et d'assurer son gonflement et le remplissage de tous les espaces vides de la cellule.

En plus des techniques d'analyse de surface des coupons utilisées dans le chapitre précédent (MEB, MET,  $\mu$ -Raman), le profilomètre optique a été utilisé pour caractériser la surface des coupons.

Les analyses de profilométrie optique ont été réalisées au sein du service matériaux et mécanique des composants à EDF en utilisant le profilomètre optique 3D Nanotech Fogale. C'est un appareil de mesure de surface (Figure 53), il permet d'obtenir des mesures de rugosité, de profondeur de piqûres maximale ou moyenne et d'acquérir des images en relief de la surface des échantillons observés quelle que soit la brillance de l'échantillon (Réflectivité 1 à 99%). Sa résolution verticale est de 7 nm.

C'est un appareil avantageux sous plusieurs aspects :

- Résolution sub-nanométrique : mesure sans contact par interférométrie optique avec résolution verticale pouvant atteindre 0,1  $\mu\text{m}$ .
- Résultat rapide : mesure de très grande précision de surface en quelques secondes.
- Souplesse d'utilisation : tout type de matériaux peut être mesuré sans difficulté.
- Mesure sans contact : toutes les mesures sont non-destructives, répétables et ne nécessitent pas de préparation d'échantillon.
- Système très stable : grande stabilité métrologique grâce à l'utilisation de système anti-vibration.
- Logiciel d'analyse très puissant ; ensemble de logiciel Fogale 3D intuitif et interactif avec une grande puissance d'analyse métrologique.

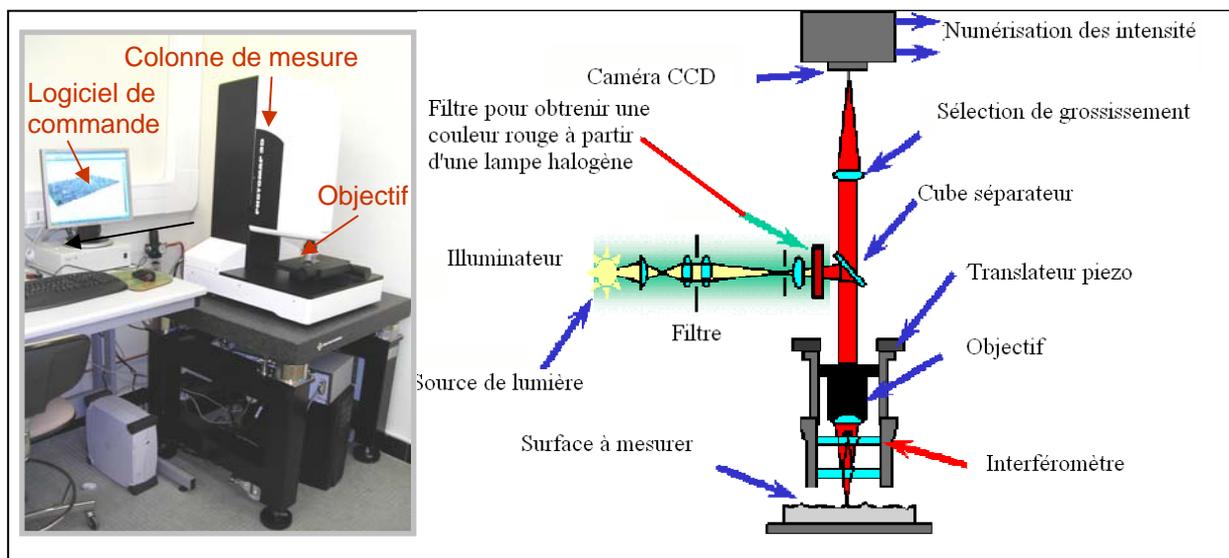


Figure 53 : architecture du profilomètre 3D nanotech Fogale.

Le principe du profilomètre 3D est lié à l'interférométrie (Figure 54) basée sur la nature ondulatoire de la lumière et la possibilité de faire interférer les ondes lumineuses. La source de lumière envoie le rayon lumineux dans un cube séparateur, celui-ci sépare la lumière en deux. D'un côté, il laisse passer la lumière jusqu'au miroir de référence et de l'autre, il envoie verticalement le rayon lumineux dans l'objectif qui l'achemine à son tour sur l'échantillon à analyser. Les deux rayons incidents sont alors réfléchis de nouveau jusqu'au cube séparateur qui les envoie à la caméra. On obtient alors notre image de surface que l'on récupère à l'aide d'un ordinateur.

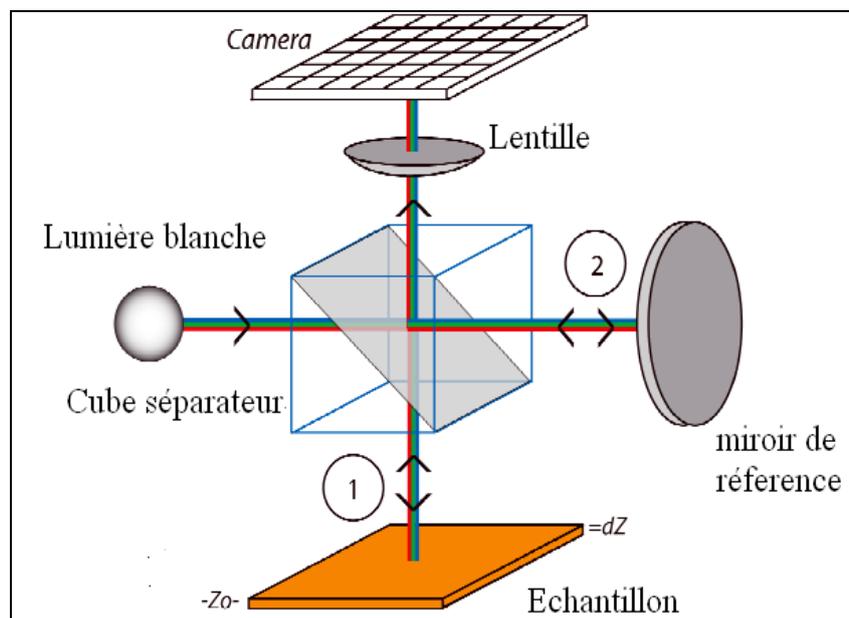


Figure 54 : principe de l'interférométrie optique

## V-2. Résultats

Dans les 3 cas envisagés, après stabilisation de la pression à 120 bars avec un débit de  $1\mu\text{l}/\text{min}$ , les premières gouttes de solution sont récoltées à la sortie de la cellule au bout d'une quinzaine de jours avec un débit de  $0,1$  à  $0,2\mu\text{l}/\text{min}$ .

La diffusion d'un ion dans un milieu poreux argileux et saturé dépend des propriétés électrochimiques de l'interface minéral/solution. Les minéraux argileux ayant de grandes surfaces spécifiques ont un excès de charges négatives en surface [171]. Cette charge négative des feuillets d'argilite explique le transport plus rapide des anions dans l'argile par rapport aux cations [172]. Les suivis de taux de sulfates et des sulfures seront aisés au cours de

l'expérience grâce à leur exclusion anionique des petits pores de l'argilite. L'acétate, un possible produit du métabolisme des BSR a été aussi mesuré pour évaluer la croissance et l'activité des BSR au cours des expériences.

Comme la montre la figure 55, après une augmentation du taux de sulfate pendant les 20 premiers jours suite au relâchement de sulfates des eaux porales de l'argilite, le taux de sulfate diminue dans les 3 cas avec une baisse plus importante dans les cas A et B que le cas C.

Dans le cas C, la concentration en sulfates atteint une valeur stationnaire de 1500mg/l au bout de 40 jours contrairement aux cas A et B où le taux de sulfates continue à baisser jusqu'au 60<sup>ème</sup> jour, avant de se stabiliser à une concentration de 800mg/l, concentration inférieure à celle injectée au début de l'expérience.

Le suivi de la production de sulfures et d'acétate (produits de métabolisme des BSR) montre la présence de ces derniers dans les cas A et B mais pas dans le cas C (figure56 et figure 57).

Le cas B, où on n'a pas inoculé de BSR, montre une réduction de sulfates similaire à celle du cas A. Ceci peut être expliqué par le fait que l'argilite contient des BSR et que l'apport en eau et en nutriments ainsi qu'en hydrogène provenant de la corrosion des coupons d'acier présents dans la cellule est largement suffisant pour l'activation de leur métabolisme et leur croissance. Les valeurs similaires de réduction de sulfates dans les cas A et B alors que le A est plus enrichi en BSR soulignent le fait que les carottes d'argilite sont riches en cellules bactériennes, capables de croître une fois au contact de l'eau argileuse.

L'absence de la réduction de sulfates et de la production de sulfures dans le témoin stérile C montre que l'autoclavage était efficace. Les concentrations de sulfures sont plus importantes dans le cas A que dans le cas B parce que dans le cas A, l'eau de COX injectée dans la cellule est inoculée de BSR, d'où une réduction possible des sulfate présents dans l'eau de COX dès le départ de l'expérience et donc des concentrations de sulfures plus élevées

Le suivi du fer dans les prélèvements de la cellule C (témoin stérile) montre plutôt une augmentation de ce dernier dans la solution, contrairement à la cellule A (en présence des BSR) où on observe une diminution (Figure 58). A partir du 50<sup>ème</sup> jour, où la concentration de sulfate pour la cellule A est stationnaire, le fer n'est plus détectable par analyse ICPMS dans la solution. Cela s'explique par la formation probable de sulfures de fer.

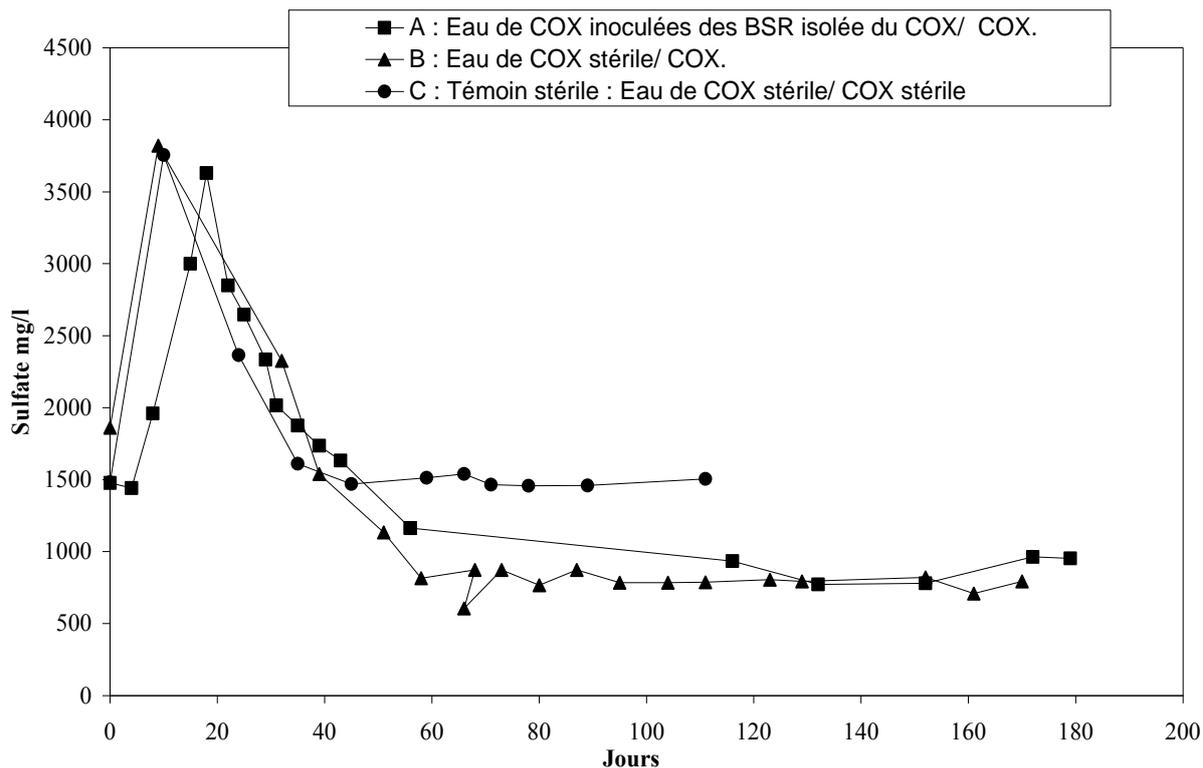


Figure 55 : concentration en sulfates en sortie de la cellule de percolation dans les 3 cas « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

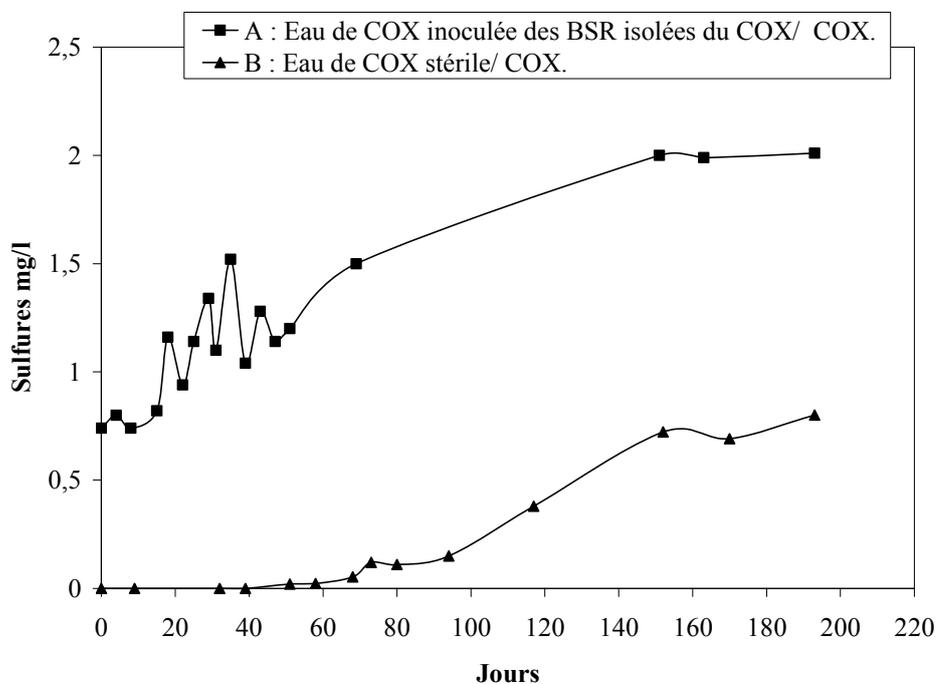


Figure 56: concentration en sulfures en sortie de la cellule de percolation dans les cas A: Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX et B : Eau de COX stérile/ COX. Pas de production de sulfures dans le cas C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile.

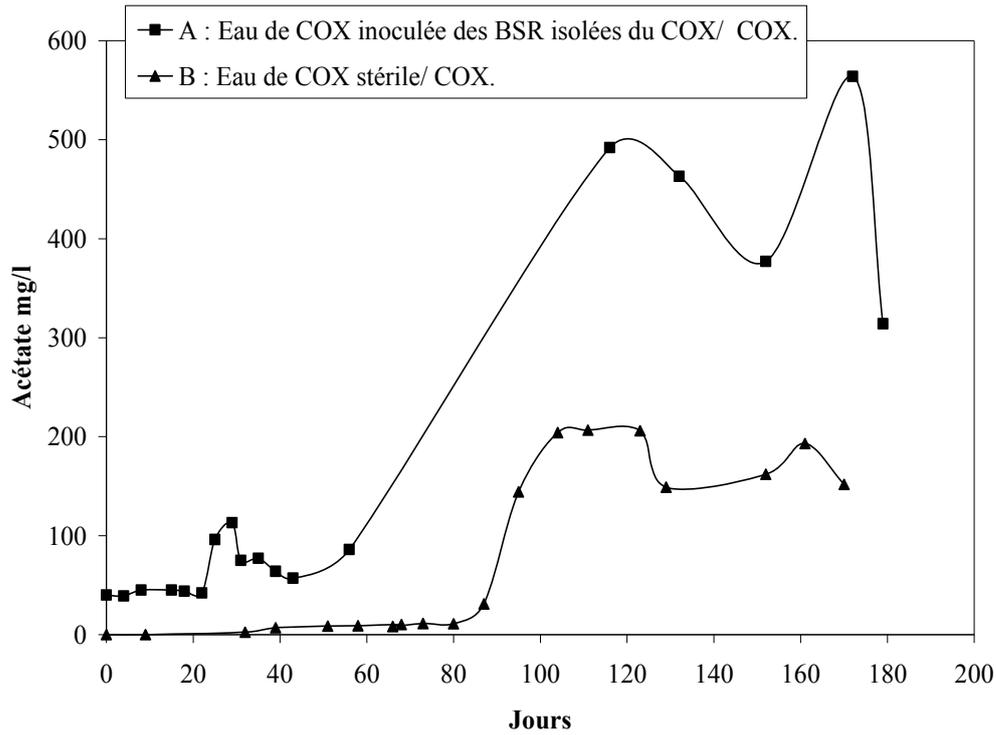


Figure 57: concentration en acétates en sortie de la cellule de percolation dans les cas A: Eau de COX inoculée avec des BSR isolée du COX/ COX et B : Eau de COX stérile/ COX. Pas de production d'acétate dans le cas C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile.

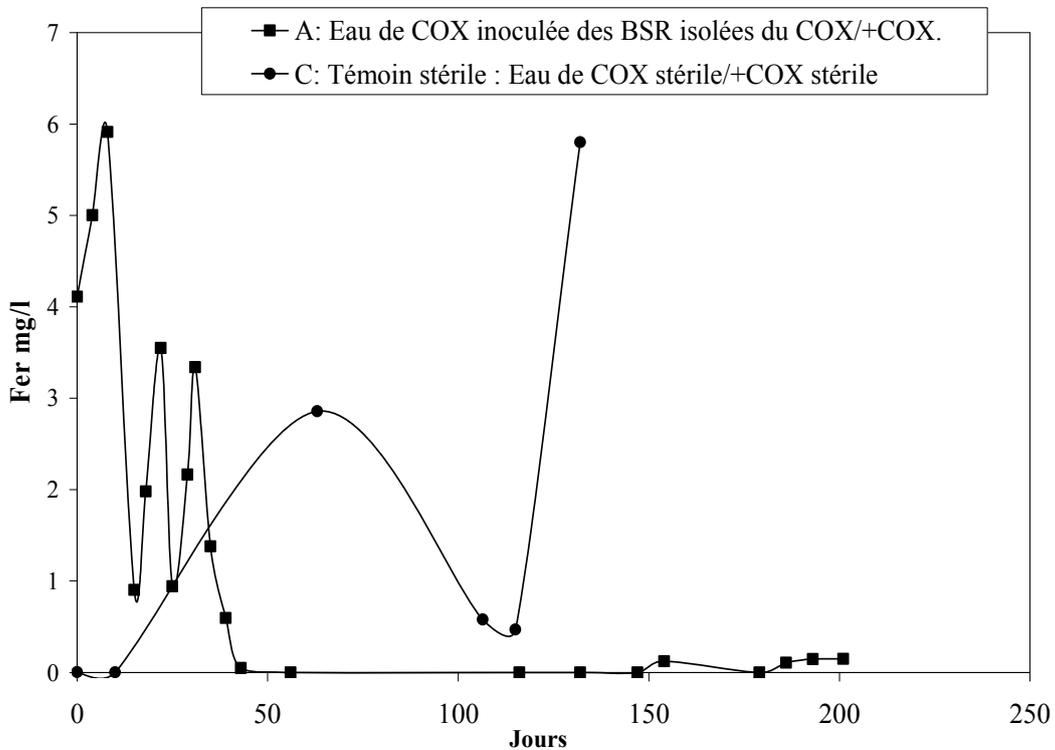


Figure 58: concentration en fer en sortie de la cellule de percolation dans les cas A: Eau de COX inoculée avec des BSR isolée du COX/ COX et C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile.

Après 300 jours, les cellules ont été démontées. Les coupons d'acier et la surface de l'argilite au contact sont devenus noirs contrairement au témoin stérile C où l'acier a presque conservé sa couleur et son aspect brillant (Figure 59). D'autre part, dans les cas A et B un noircissement complet de la surface ainsi que de l'intérieur de la carotte a été observé (Figure 60). Le noircissement des coupons et des carottes dans les deux cas A et B peut être expliqué selon trois hypothèses :

- L'activité des BSR n'était pas seulement limitée à la surface de la carotte et aux petits espaces libres de la cellule mais s'est également développée à l'intérieur des pores de la carotte. Cette hypothèse n'est cependant pas possible car la taille des BSR est plus grande que celle de la nanoporosité

- Développement microbien (biofilms) dans des chemins préférentiels dus à notre montage expérimental et formation de H<sub>2</sub>S qui diffuse dans le reste de la porosité y compris celle de taille nanométrique. Cette hypothèse est peu probable car dans nos expériences de percolation, le coefficient de perméabilité était de l'ordre de  $4,3 \times 10^{-13}$  m/s. Ce coefficient est proche des valeurs mesurées au niveau du site de laboratoire de Meuse / Haute-Marne (entre  $10^{-12}$  et  $10^{-14}$  m/s). Ce qui montre qu'il n'y avait pas des chemins préférentiels pour la circulation de l'eau à l'intérieur de la cellule. C'est donc le transfert des sulfures du métabolisme bactérien par diffusion qui a causé le noircissement de l'argilite. Ces sulfures peuvent provenir de l'eau de COX inoculée des BSR (cas A) ou bien du biofilm formé à l'entrée de la cellule ou bien dans les petits espaces libres (cas A et B).

- Développement des BSR dans les microporosités de l'argilite et transport des sulfures par diffusion dans l'argilite. C'est à nos yeux l'hypothèse la plus plausible.

Le calcul des vitesses de corrosion dans les 3 cas montre comme dans les cultures en batch un facteur double de corrosion en présence des BSR (cas A et B ~ 28 μm/an) par comparaison au témoin stérile (cas C ~ 13 μm/an) (tableau 13). La similarité des valeurs de vitesse de corrosion entre culture en batch (1 mois) et cellule de percolation (7 mois) peut être due à l'effet protecteur de la couche de sulfure de fer formée sur les coupons d'acier. C'est ce qu'on a pu démontrer dans l'expérience de culture en présence de sulfures (paragraphe IV-2-3), où on a observé que même en augmentant la concentration de sulfures dans la solution les valeurs de vitesse de corrosion restent relativement similaires.

Cellule de percolation	Taux de corrosion microns /an.
A : Eau de COX inoculée des BSR isolées du COX/+ COX.	27 ± 3
B : Eau de COX stérile/+ COX.	23 ± 2
C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/+ COX stérile	11 ± 2

Tableau 13: vitesse de corrosion moyenne (microns/an) dans les 3 cas de cellule de percolation.

Le même aspect de corrosion localisée a été observé en présence des BSR dans les cas A et B par comparaison au témoin stérile C (Figure 61).

Les analyses MEB des coupons montrent surtout des sulfures de fer dans les cas A et B mais pas pour le C (Figure 62). Comme c'est le cas dans les cultures en batch, le produit de corrosion essentiel retrouvé par  $\mu$ -Raman en présence des BSR dans les cas A et B est la mackinawite (Figure 63). En ce qui concerne le témoin stérile C seule la ferrihydrite a été détectée.

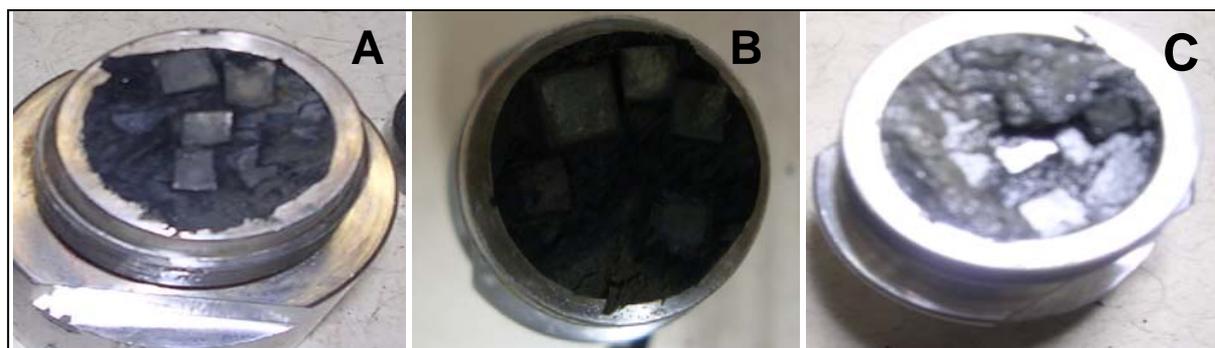


Figure 59: noircissement des coupons d'acier dans les cas A et B mais pas dans le C. « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

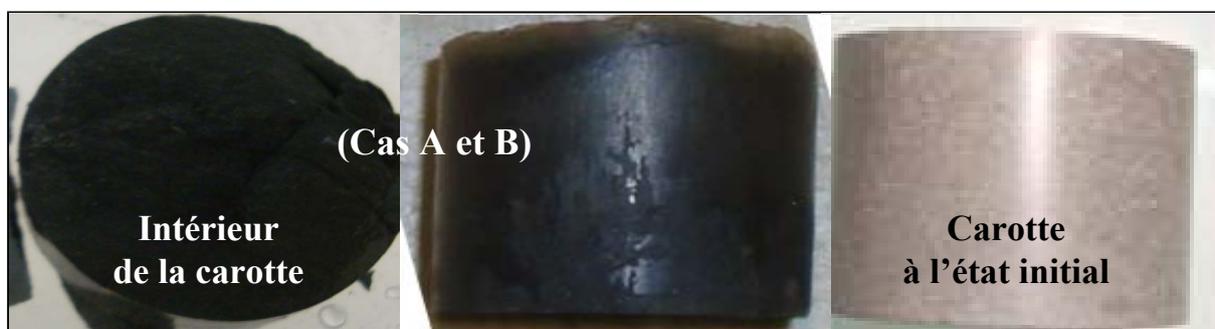


Figure 60: noircissement de l'intérieur et de la surface de la carotte d'argilite dans les cas A et B par comparaison à une carotte à l'état initial. « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX »

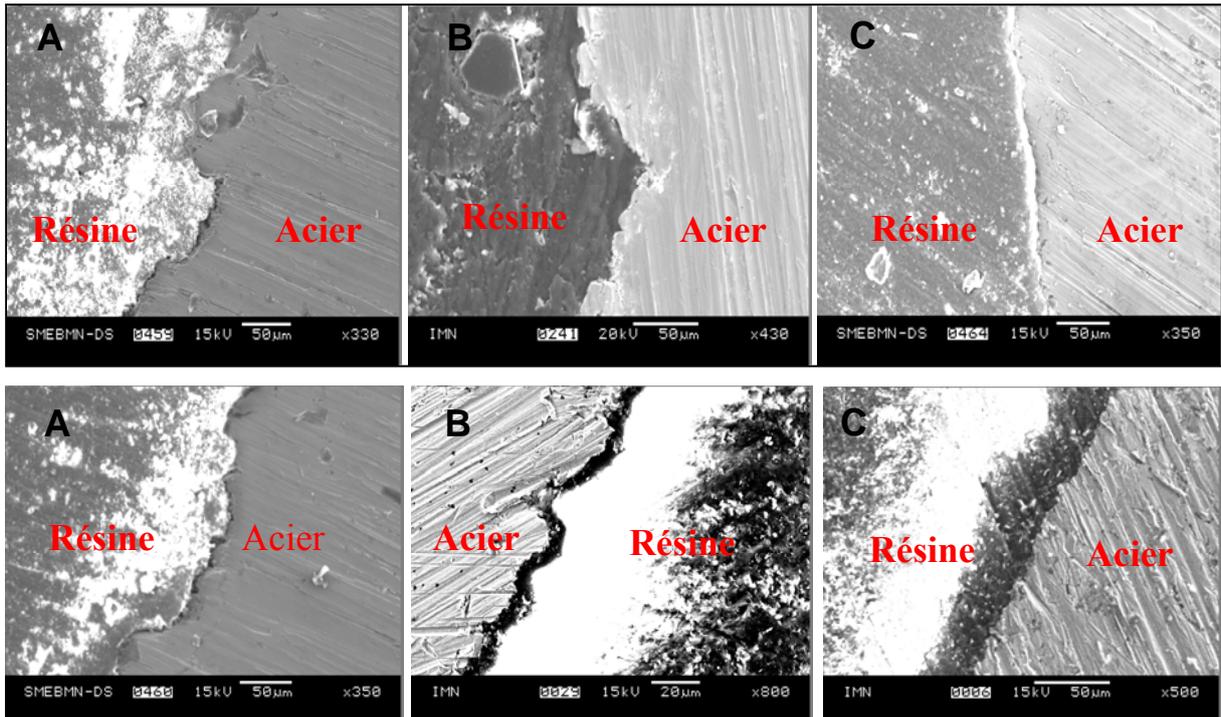


Figure 61: photo MEB des sections polies des coupons montrant un aspect de corrosion par piqure dans les cas A et B mais pas dans le C. « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

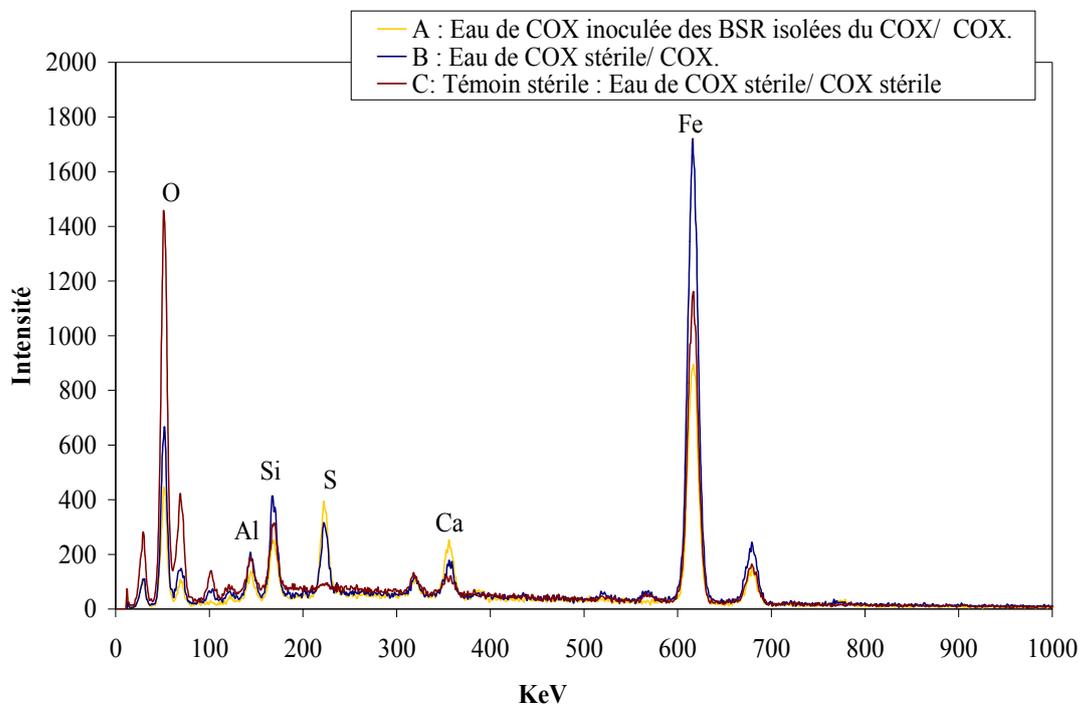


Figure 62 spectre EDS des coupons d'acier montrant la présence des sulfures de fer dans les cas A et B mais pas dans le C. « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

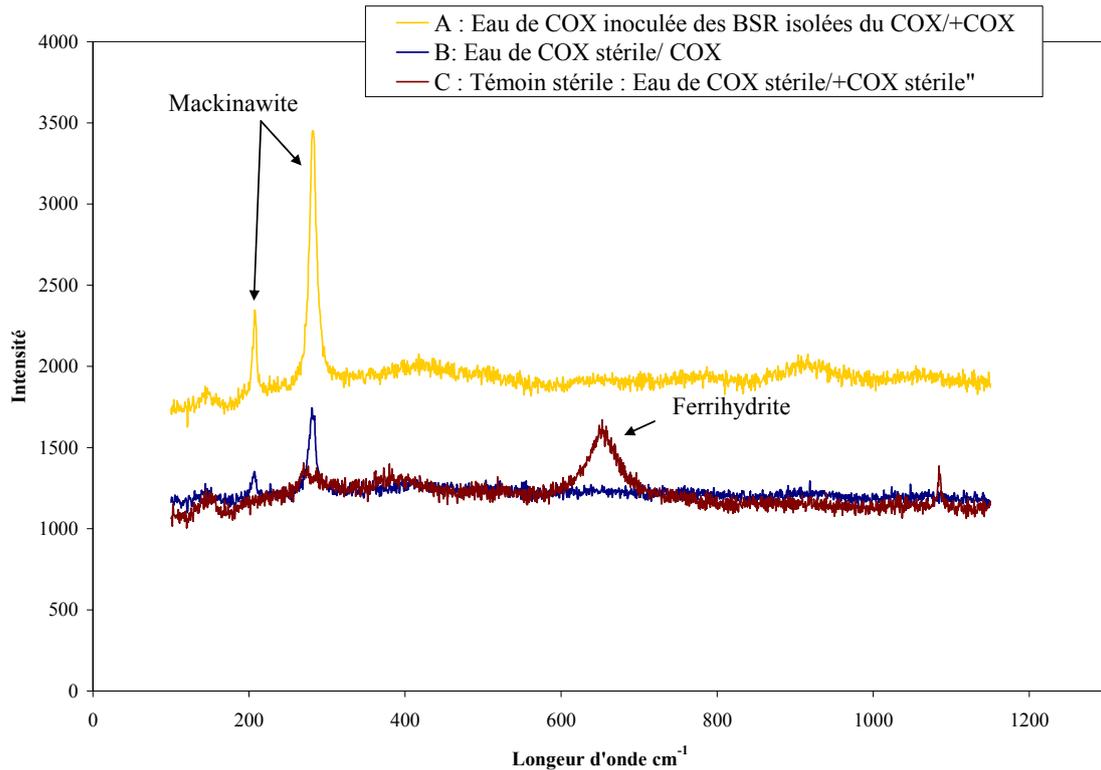


Figure 63 spectre  $\mu$ -Raman des coupons d'acier montrant la présence de la Mackinawite dans les cas A et B mais pas dans le C. « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

Les résultats d'analyse des coupons d'acier au profilomètre 3D sont représentés dans le tableau 14. Ces résultats montrent des valeurs de densité de piqûres proches dans les 3 cas d'études avec des valeurs légèrement plus importantes dans les 2 premiers cas (en présence des BSR). Dans les 3 cas, la profondeur de la majorité des piqûres est comprise entre 0 et 12 $\mu$ m (Figure 64) à l'exception du cas A où on a des piqûres variant entre 16 et 24  $\mu$ m de profondeur. Cela pourrait s'expliquer par l'apport supplémentaire en sulfures provenant de l'eau de COX (inoculée des BSR) injectée dans la cellule. La présence des piqûres dans le cas C (témoin stérile) peut être due à la présence des traces d'oxygène dans la cellule.

Cellule	Nombre de piqûres	Piqûre max ( $\mu$ m)	Profondeur moyenne ( $\mu$ m)	Surface observée ( $\text{mm}^2$ )	Densité de piqûres ( $\text{p}/\text{mm}^2$ )
A : Eau de COX inoculée des BSR isolées du COX/+COX.	1945	25,43	6,7	60,31	32,250
B : Eau de COX stérile/+COX.	1138	14,12	3,95	32,16	35,380
C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/+COX stérile	838	17,49	4,08	32,16	26,050

Tableau 14 : résultats des analyses au profilomètre optique 3D

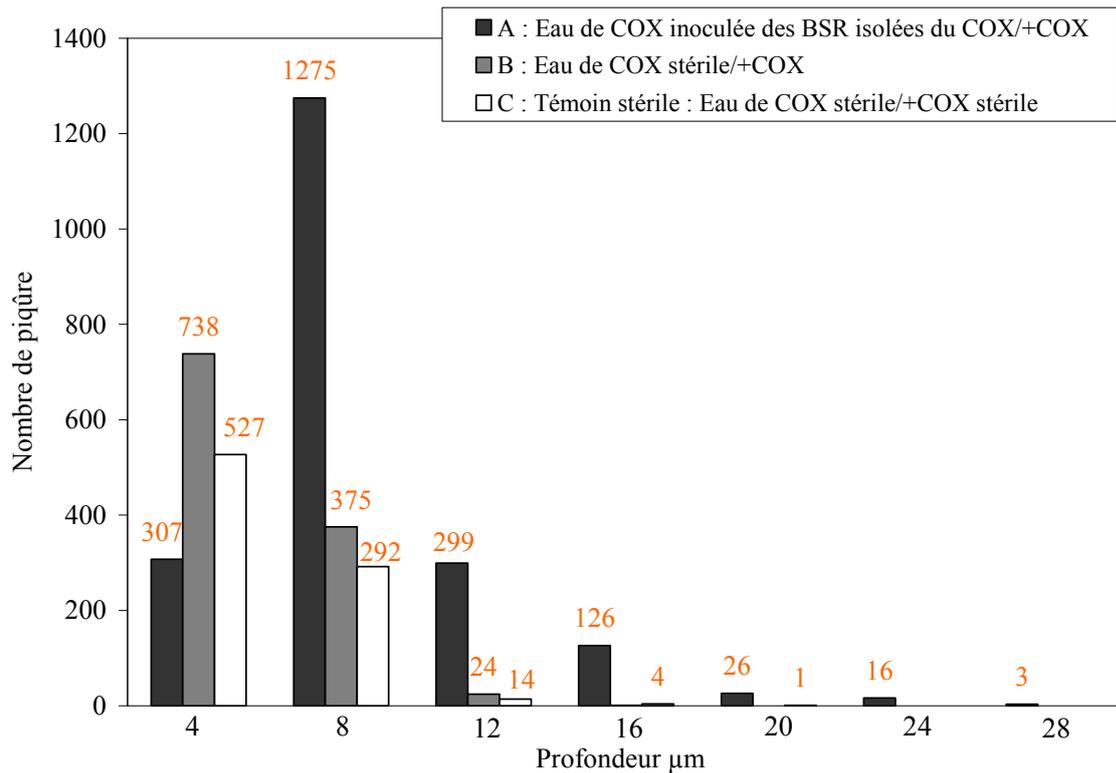


Figure 64 : nombre de piqûres en fonction de la profondeur dans les 3 cas A, B et C. « A : Eau de COX inoculée des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

En conclusion de ces analyses de profilométrie 3D, les BSR ont un rôle important dans l'accélération de la corrosion de l'acier mais on ne peut pas affirmer que le processus de biocorrosion qui prend place en présence des BSR est de la corrosion par piqûre.

### V-3. Discussion sur la survie microbienne en contexte de stockage

L'activité microbienne en conditions de stockage a été déjà étudiée pour la bentonite de la mine de Kamaishi au nord du Japon. Le nombre total de bactéries et de microorganismes viables a été recensé pour les eaux interstitielles de la roche échantillonnées à partir de six zones séparées hydrauliquement. Les six échantillons d'eau ont été prélevés dans deux forages horizontaux. Le nombre total de bactéries est compris entre  $8,6 \times 10^2$  et  $1,2 \times 10^6$  cellules/ml dont  $5,3 \times 10^2$  à  $3,9 \times 10^4$  bactéries/ml sont hétérotrophes, et  $4,9 \times 10^2$  à  $5,4 \times 10^4$  bactéries/ml sont des bactéries consommatrices de nitrates et sulfato-réductrices. Ainsi, l'étude de l'effet du couplage thermo-hydro-mécanique (THM) a été menée dans une expérience nommée « expérience de barrières ouvragées » pour examiner les performances in situ de la roche hôte. À la fin du chauffage et du refroidissement des phases, les échantillons

de bentonite ont été analysés afin de déterminer si la population microbienne présente naturellement dans la bentonite a survécu et résisté à la chaleur, au compactage et à la dessiccation. Les résultats ont confirmé que les bactéries hétérotrophes disparaissent des échantillons à faible teneur en eau (<12%). Ces résultats suggèrent que l'activité microbienne est très limitée à proximité des conteneurs des déchets pendant quelque temps en raison de la dessiccation et de la production de chaleur [173].

Une expérience sur l'interaction entre les argiles et les bactéries anaérobies facultatives et hétérotrophes a été réalisée dans une cellule anaérobie avec des ratios solide/liquide élevés. Cette expérience a été conçue pour simuler les environnements souterrains plus compactés qu'on peut avoir dans des sites de stockage de déchets radioactifs. Toutefois, les expériences indiquent que la teneur en eau de l'argile compactée a un effet prononcé sur la croissance bactérienne. Les conditions anaérobies ont été également favorables à la dissolution des phases minérales (notamment la calcite) et les précipitations synchrones de lépidocrocite (FeO(OH)) liées aux changements induits par les bactéries du pH et du Eh. Cette étude met en évidence l'importance dans l'évaluation de la sûreté des études biogéochimiques du stockage souterrain des déchets nucléaires [174].

Afin d'évaluer le rôle des conditions de stockage sur la viabilité des microorganismes, des suspensions de bentonite et de microorganismes (BSR,...) ont été préparées, installées dans un cylindre de 20mm de diamètre et de longueur et placées dans des blocs de bentonite exposés à de faibles (20-30°C) et hautes températures (50-70°C). L'ensemble a été ensuite placé dans des forages dans un laboratoire souterrain (HRL) en Suède. L'expérience a pris fin après 15 mois. Le principal résultat a été l'élimination des bactéries à l'exception des bactéries génératrices de spores. Toutes les bactéries sporulantes ont survécu à (20-30°C). Le nombre restant est cependant, beaucoup plus faible que les 100 millions de spores initialement introduits. Elles ont le plus probablement survécu sous forme de spores, qui sont métaboliquement inactifs et ne produisent pas de sulfure. Le nombre de spores viables diminue à compaction complète. Ces auteurs ont conclu qu'à terme la bentonite devient stérile. Cependant, il est fort probable que les microorganismes indigènes au site soient plus tolérants aux conditions les plus extrêmes [23].

Une étude au laboratoire souterrain Canadien, dédiée aux recherches sur le stockage géologique des déchets radioactifs, a examiné certaines conditions physico-chimiques

susceptibles de réduire voire de supprimer l'activité microbienne dans la bentonite compactée. Les expériences de 40 à 90 jours ont été réalisées pour déterminer les effets de la sécheresse, de la salinité de l'eau interstitielle, de la pression de gonflement élevée et de l'activité de l'eau sur la communauté microbienne cultivable et viable autochtone de la bentonite. Une activité d'eau faible ( $<0,96$ ) et un gonflement de pression  $> 2$  MPa semblent supprimer la cultivabilité en dessous des niveaux de fond. Dans ces conditions, les cellules susceptibles de survivre sont seulement les cellules dormantes ou sporulantes. Des observations dans les milieux naturels riches en argile appuient ces conclusions. L'échelle de temps sur laquelle peuvent survivre des microorganismes sous forme dormante est actuellement inconnue. Les microbes peuvent potentiellement s'adapter à un certain nombre de paramètres négatifs, y compris des températures plus élevées, des irradiations, des manques en éléments nutritifs et des conditions de salinité élevée mais ils doivent suffisamment rester actifs pour réaliser ces adaptations. Bien que les bactéries en dormance et sporulantes soient beaucoup plus tolérantes et résistantes aux conditions défavorables (en raison de leur petite taille, les parois cellulaires épaisses et matériel génétique condensé), elles vont finir par mourir. Cela peut être un processus très long, en fonction de la sévérité des conditions, et pourraient atteindre des échelles de temps géologiques dans les milieux naturels [31].

Johnson et al. [175] indiquent que cette survie à long terme est en fait étroitement liée à un faible niveau d'activité métabolique cellulaire et à la réparation de l'ADN cellulaire.

L'activité des bactéries sulfato-réductrices dans la bentonite MX-80 saturée avec l'eau souterraine a été étudiée in situ à 450m de profondeur. La bentonite a été compactée à la densité de 1,5, 1,8 et 2,0 g cm<sup>-3</sup>. Du lactate a été ajouté à la bentonite comme une source d'énergie et de carbone organique pour les BSR. Du sulfate radioactif (<sup>35</sup>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) a été utilisé comme traceur de la production de sulfures. Les sulfures produits ont été localisés et quantifiés par autoradiographie électronique [176]. Les résultats ont révélé que la bentonite a été une source de BSR. En outre, toutes les expériences ont démontré que l'augmentation de la compaction de la bentonite est en corrélation avec la baisse des taux de production de sulfure.

En dépit de la faible perméabilité des carottes d'argilite et de la haute pression à 120 bars, nos résultats des cellules de percolation confirment les résultats des expériences en batch : sur la durée de nos expériences, les bactéries peuvent agir par contact direct ou bien par l'intermédiaire de leurs produits de métabolisme au cas où leur diffusion est limitée dans les carottes sur la corrosion des coupons d'acier.

Dans les conditions de stockage, la fermeture des ouvrages initie le processus de resaturation du stockage par les eaux des argilites. La resaturation est un processus intrinsèquement lent, il rentre en compétition avec la production d'hydrogène de corrosion qui elle-même dépend de la présence d'eau. Malgré les faibles taux de corrosion, le transfert par dissolution et diffusion de l'hydrogène dans l'eau porale peut ne pas être suffisant pour évacuer en continu l'hydrogène produit pendant les premiers milliers d'années.

Le transfert de l'hydrogène dans la couche saine du Callovo-Oxfordien n'entraîne pas la désaturation ( $S > 97\%$  en champ proche et  $S > 99\%$  en champ lointain) [177]. La production d'hydrogène peut limiter la croissance bactérienne au contact des conteneurs en augmentant la pression interstitielle de l'argilite, qui peut créer localement des écoulements d'eau divergents dans les argilites en champ proche sur quelques mètres. En revanche la production d'hydrogène peut aussi jouer un rôle important dans la croissance des BSR suite à l'augmentation de la pression, cette dernière dilate la porosité et le gaz peut alors progresser dans la porosité de taille plus importante ainsi créée. Cette dilatation à l'échelle microscopique correspond à la formation des microfissures localisées qui permettent une restauration plus rapide de la roche [177].

Ainsi, la composition de l'eau porale peut avoir un effet limitant sur la croissance. Du point de vue chimique, la biomasse bactérienne est formée essentiellement de Carbone (50%), d'oxygène (20%), de nitrate (14%), d'hydrogène (8%), de phosphore (3%) et de soufre (1%). On peut retenir pour la biomasse bactérienne la formule  $C_5H_7O_2N_{0,75}P_{0,05}S_{0,025}$  [178]. La composition de l'eau de COX met en évidence l'absence d'azote et de phosphore, ceci amène donc à la conclusion que la composition chimique de cette eau ne permet pas le développement bactérien compte tenue de l'absence de ces 2 éléments. En revanche, de faibles teneurs en nitrate ( $>2\text{mg/l}$ ) et en ammonium (la forme d'azote la plus utilisée par les bactéries en tant que substrat nutritif) ont été mesurées au sein des expérimentations PAC 1001 de l'Andra. De plus, l'analyse de l'argilite du site de Meuse / Haute-Marne révèle la présence de forme phosphatée solide pouvant conduire au relâchement de forme soluble de phosphate [179]. Par conséquent, on ne peut pas exclure un développement microbien dans le site de stockage qui pourrait néanmoins être mineur.

En outre, l'alvéole de déchets HAVL est constituée d'autres matériaux contenant assez d'éléments nutritifs nécessaires à la croissance bactérienne. Le tableau 15 montre la teneur en éléments nutritifs en  $\text{mol/m}^3$  dans chaque sous élément de colis de stockage.

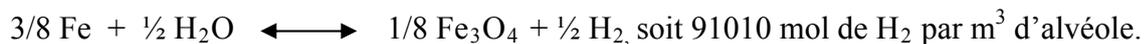
mol/m <sup>3</sup>	Verre	Conteneur	Surconteneur
C	34,89	7,13	446,27
N	-	-	28,69
P	414,71	1,04	27,04
S	10,94	0,84	15,67

Tableau 15 : concentration des éléments nutritifs en mol/m<sup>3</sup> dans chaque sous élément de colis de stockage [179].

En plus de ces éléments nutritifs essentiels aux bactéries pour la fabrication de leur membrane et leurs matériels cellulaires, le sulfate et l'hydrogène sont indispensables pour la respiration et la multiplication des BSR et la fabrication de l'ATP (carburant énergétique) en anaérobiose).

Bazer-Bachi et al. [180] ont montré sur 2 échantillons d'argilite, dans trois expériences (batch, percolation et diffusion) que la sorption de sulfate est faible et réversible sur l'argilite du Callovo-Oxfordien. Toutes les études menées par l'Andra montrent que l'équilibre hydraulique est atteint rapidement à l'échelle du stockage.

Le donneur d'électrons majoritaire des BSR est l'hydrogène provenant de la corrosion de l'acier des matériaux de stockage des déchets. La quantité d'hydrogène disponible est évaluée à partir de fer métallique disponible dans un m<sup>3</sup> d'alvéole selon la réaction [179]:



L'accepteur final d'électrons des BSR, le sulfate, est fourni par l'eau du site et des déchets vitrifié soit 15,7 mol/m<sup>3</sup>.

La quantité de sulfate présente dans un m<sup>3</sup> d'alvéole permet d'estimer la biomasse des BSR produite en utilisant la formule C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N<sub>0,75</sub>P<sub>0,05</sub>S<sub>0,025</sub>, soit 624 g de BSR par m<sup>3</sup>.

En l'absence des matières organiques comme source d'énergie (lactate pour les BSR), ce résultat montre que les quantités de biomasse produites sont très inférieures à celles qui peuvent être calculées sur la base des substrats nutritifs de l'eau de COX et du tableau 14. Les quantités d'hydrogène consommé seront faibles (5%) par rapport à la quantité totale susceptible d'être produite par la corrosion.

Suite à ces constatations, il apparaît que d'un point de vue énergétique, le développement des BSR est faible si l'on se base sur les substrats énergétiques en présence après la phase de

resaturation de l'argilite. Par contre, pendant la phase d'exploitation ou bien après le scellement des alvéoles, au début de la phase de corrosion des aciers, des conditions mixtes seront rencontrées (mélange de bactéries aérobies ferro-oxydantes et anaérobies sulfato-réductrices). La présence d'un tel biofilm sur les surfaces des conteneurs crée des conditions favorables à l'établissement de cellules de concentration, et en particulier d'aération différentielle et d'échange de nutriment et de matières organiques entre les bactéries.

Sur la totalité de la surface de l'alvéole de stockage et indépendamment de la formation des sulfures de fer et de la mackinawite, les BSR peuvent contribuer dans des zones proches et des zones lointaines des colis à la formation de  $H_2S$ , qui pourrait augmenter de façon importante la pénétration en hydrogène, et accroître ainsi le risque de fragilisation par l'hydrogène[181]. La fragilisation par l'hydrogène pourrait se manifester sous forme de rupture différée ou par une fissuration interne.

L'augmentation de la température peut être aussi un facteur limitant ou favorable à la croissance des BSR. Après la mise en place des colis de stockage, la charge thermique est rapidement uniforme dans l'alvéole et en champ proche (de quelque centaine à mille années). Les températures maximales ( $90^\circ C$ ) sont atteintes avant la resaturation complète de l'alvéole. La décroissance thermique s'amorce au cours de la phase de resaturation. Par contre, la charge thermique peut entraîner aussi la précipitation du gypse et la dissolution du quartz contenu dans l'argilite, mais ces processus restent locaux (interface avec le chemisage) et limités notamment au regard de la faible quantité de quartz dans l'argile (<3%) [13]. De manière générale, la température est un paramètre important dans la dissolution progressive des minéraux et dans la perte des propriétés du gonflement [182], ce qui engendre plus d'espace à la croissance bactérienne.

La phase thermique et d'instauration de l'argilite au contact des conteneurs de stockage n'exclut pas la possibilité d'avoir une croissance des BSR dans les champs lointains. Les produits de métabolisme des BSR peuvent diffuser à travers l'argilite et accélérer la corrosion de l'acier des chemisages et des sur-conteneurs.

Après atteinte de la resaturation complète du site, un équilibre hydraulique se met en place dans le stockage et dans le Callovo-Oxfordien environnant. Les expériences de percolation simulant ces conditions ont montré que les BSR existant dans l'argilite peuvent être en dormance à l'état sporulant non actif et une fois que les conditions redeviennent favorables, elles s'activent et peuvent former des biofilms et changer la chimie du milieu par la production des sulfures et la formation de  $FeS$ . Ces conditions accélèrent la corrosion de

l'acier, on se retrouve avec un facteur double de corrosion en présence des BSR par comparaison à un témoin stérile avec la précipitation de la mackinawite (FeS) comme produit essentiel de corrosion.

---

## **VI- Conclusion générale et perspectives**

---



## VI. Conclusion générale et perspectives

Cette étude a montré l'existence des bactéries sulfato-réductrices (BSR) dans des échantillons d'argilite du Callovo-Oxfordien prélevés au laboratoire de Meuse / Haute-Marne (- 500 m de profondeur). Il faut toujours se rappeler qu'une bactérie a au minimum besoin de trois sources vitales pour son développement : une source de carbone, une source d'énergie et une source d'électrons pour sa respiration. Les bactéries BSR n'échappent pas à la règle dans ces biotopes souterrains complexes, mais elles doivent développer des activités métaboliques originales pour subvenir à leurs besoins. Comme on a déjà montré dans nos expériences, les BSR peuvent tirer leur énergie de l'oxydation de composés inorganiques réduits ( $H_2$ ). Cette oxydation fournit aussi les électrons nécessaires à leur respiration. Les BSR sont fortement impliquées dans le cycle naturel du soufre, leur croissance s'accompagne d'une réduction de sulfates et une production de sulfures dans les conditions anoxiques (Figure 65) [183].

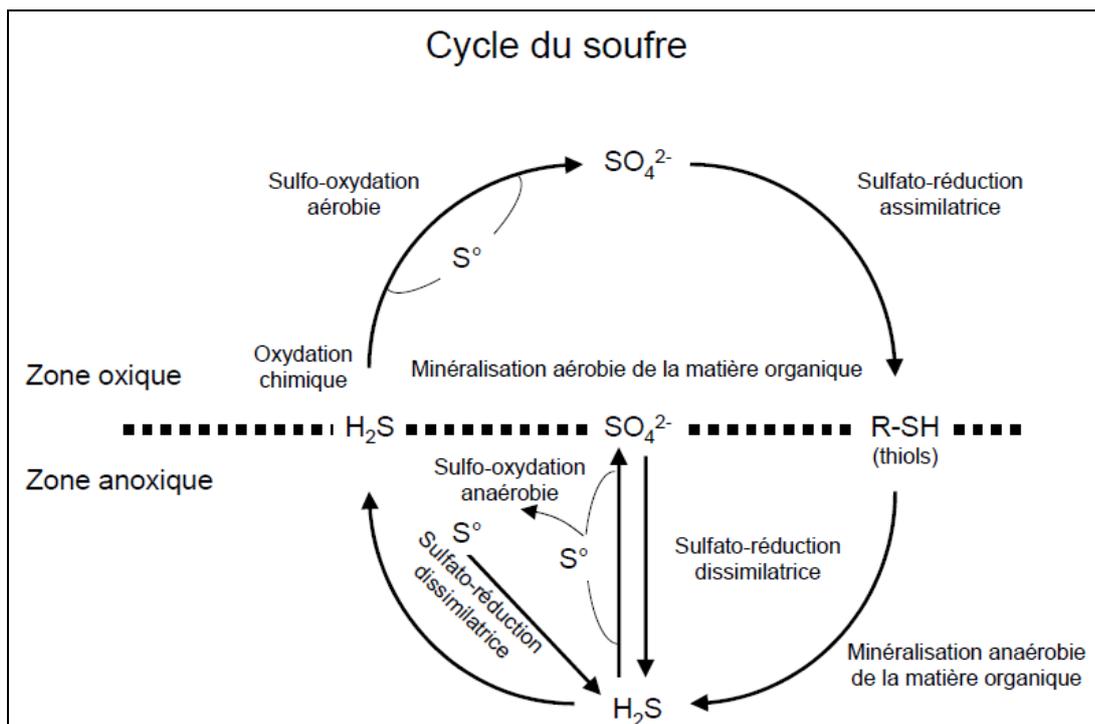


Figure 65 : rôle essentiel des BSR dans le cycle du soufre.

Plusieurs hypothèses sont envisagées pour expliquer la présence de bactéries sulfato-réductrices dans les échantillons prélevés :

- une migration depuis la surface, soit par un processus naturel géologique, soit par les opérations de forage ;

- une migration latérale ou verticale avec l'eau de surface via les infiltrations, les flux hydrodynamiques et les mouvements d'eau profonde (plusieurs km),
- ou enfin capture dans les sédiments lors de leur formation.

Dans ces conditions, les microorganismes se logent dans les pores, les fractures et les inclusions fluides.

L'étude de caractères génétiques permet une identification génotypique des BSR isolées. Cette méthode est actuellement la plus fiable puisqu'elle compare non seulement des homologies structurelles entre des séquences d'ADN dans le chromosome bactérien, mais elle permet également d'établir une phylogénie entre certaines espèces. Les BSR identifiées dans cette étude (*Desulfosporosinus*, *Desulfotomaculum* et *Thermosubterraneum*) sont des bactéries retrouvées surtout dans les cavités souterraines et aquifères profonds, sédiments profonds, sous-sol océanique et continental, réservoirs d'huile et de pétrole...

La pression est un paramètre important en profondeur. L'effet de la pression hydrostatique sur l'activité des BSR issues d'habitats profonds doit être pris en compte dans le site de stockage à plus de 400m de profondeur. A de telles profondeurs, les processus sont lents et limités par la diffusion. Les caractéristiques physico-chimiques de l'habitat (température, pression, pH, porosité...) sont des facteurs limitants de la vie microbienne.

Les BSR isolées au cours de cette étude ont montré des résultats de croissance similaires en culture en batch ainsi qu'en cellules de percolation simulant les conditions de stockage (haute pression, faible débit), mais sur une durée d'essais limitée (< 2 ans).

Cette étude avait avant tout pour objectif de préciser l'influence des BSR sur la corrosion de l'acier P235GH actuellement retenu pour la fabrication des surconteneurs des déchets HAVL. Les résultats obtenus montrent que la présence des BSR est susceptible d'augmenter la vitesse de corrosion d'un facteur 2 environ, par l'intermédiaire de leurs activités enzymatiques et/ou de leurs produits de métabolisme avec la formation d'un biofilm induisant très localement des quantités très importantes de sulfures et notamment de sulfures de fer.

Dans des cultures en batch, dans des cultures avec succession de conditions aérobie/anaérobie et dans des cellules de percolation sous haute pression, à court et à long terme, les vitesses de corrosion moyennes calculées sur la durée des essais sont de l'ordre 30 microns/an en

présence des BSR. Le produit de corrosion formé est essentiellement la mackinawite qui n'est pas observée dans les essais stériles.

La couche de mackinawite formée après un mois de corrosion en présence de BSR semble protéger l'acier d'une accélération de la corrosion par rayonnement gamma sur la durée de nos essais (< 70 h).

Les observations au MEB des échantillons corrodés en batch ou en cellules de percolation révèlent un aspect de corrosion localisée. Cependant, une analyse plus fine des profondeurs et des densités ne permet pas d'affirmer que les BSR induisent une corrosion par piqûre de l'acier P235GH. Beaucoup des piqûres observées, tant sur les échantillons corrodés en milieu stérile qu'en présence de BSR, sont petites et peuvent résulter de la préparation des échantillons. Les écarts observés entre les échantillons corrodés en conditions stériles et en présence de BSR peuvent être simplement dus au caractère aléatoire de la corrosion par piqûre.

Des essais batch complémentaires, sur des durées plus longues (e.g. 3 mois, 6 mois) permettraient de juger de la propagation ou non des piqûres observées.

Il existe d'autres facteurs limitants à la vie microbienne dans les environnements profonds. Le pH, la salinité, la nature du matériau de l'aquifère et l'ensemble des caractéristiques de l'habitat ont une influence sur les communautés bactériennes. La température est la limite principale de vie ou de survie pour les bactéries dans les environnements profonds. Autour de 100°C, les molécules de faibles poids moléculaire et thermolabiles (ex : ATP ou NAD) et les acides aminés tels que la cystéine ou la glutamine sont détériorés : la survie bactérienne à de hautes températures résulte de la capacité de synthèse de ces composés par les microorganismes [184].

L'isotherme de température autour d'une alvéole des déchets de haute activité et à vie longue est représentée dans la figure 66 [7]. On notera que l'évolution de la température entre 0 et 600 ans en paroi d'alvéole, au point le plus chaud de l'argilite fait apparaître un retour sur le seuil de 70°C avant 1000 ans. Les bactéries thermophiles et sporulantes comme certaines BSR peuvent ainsi se développer. De plus, l'apport de bactéries des milieux environnants où la température est restée faible peut conduire à un développement microbien.

Les BSR isolées dans notre travail sont thermophiles et sporulantes. Elles peuvent résister à des températures de l'ordre de 70°C (- de 5m des colis de stockage). Ainsi, pour étudier l'effet

de la température sur la croissance des BSR, deux cellules de percolation à 90°C et à 50°C ont été lancées pour une durée d'un an.

Des résultats complémentaires pourront également être obtenus via les nombreux essais de corrosion actuellement menés dans le cadre du groupement de laboratoires Verre/Fer/Argile à 90°C. Ces essais sont menés au CEA et ce sont des essais de corrosion sur le long terme en conditions de stockage géologique profond et en milieu anoxique [185]. Les vitesses moyennes de corrosion obtenues au cours de ces essais après 7 mois sont comprises entre 6 et 18 µm/an, variant selon la configuration des échantillons. Les plus faibles vitesses de corrosion ont été obtenues sur les cylindres internes simulant les surconteneurs exposés indirectement au milieu extérieur en cas de fuite du chemisage. Pour les échantillons simulant le chemisage des galeries, quelle que soit la configuration, des vitesses avoisinant 15µm/an ont été obtenues. Les analyses MEB combinées à l'EDS de la surface externe des échantillons mettent en évidence une corrosion généralisée non uniforme. Plus précisément, la couche de produits de corrosion est composée d'une couche d'oxyde de fer, revêtue d'une couche d'oxyde de fer localement enrichie en silicium, recouverte d'une couche de sidérite calcinée, comme déjà observé lors des études précédentes dans des conditions similaires. Dans aucun de ces essais des traces de sulfures ou bien de la mackinawite ont été détectées.

Les écarts observés au cours de nos expériences par rapport aux résultats de CEA (vitesse de corrosion plus élevés, production de sulfures) peuvent être dues à la différence des conditions expérimentales : toutes nos expériences ont été menées à 30°C ou bien à température ambiante (température idéale pour la croissance bactérienne) alors que les expériences du CEA sont faites à 90°C. L'eau du COX utilisée au cours de nos expériences a été préparé selon la composition de établie par le BRGM à 25°C sous H<sub>2</sub>/Ar en 2007 [108] alors que pour les expériences menée au CEA, l'eau du COX en température modélisée en 2008 a été utilisé [186], l'acidité et le potentiel redox de cette solution étant contrôlés par l'introduction d'une couverture gazeuse contenant du gaz carbonique et de l'hydrogène.

L'eau de COX utilisée dans l'expérience de percolation à 90°C en cours a été préparée en suivant les mêmes consignes de CEA pour comparaison des résultats.

En outre, le concept développé en France prévoit une limitation de l'augmentation de la température à 90°C en tout point de stockage et un retour à 40°C dans 6000 ans. Il apparaît donc nécessaire d'étudier le comportement des BSR lors d'une phase de décroissance thermique. Une expérience complémentaire est envisagée avec une diminution de la

température de 90°C à 30°C pour savoir si les BSR sont capables de reprendre une croissance normale à 30°C après une exposition à une température de 90°C.

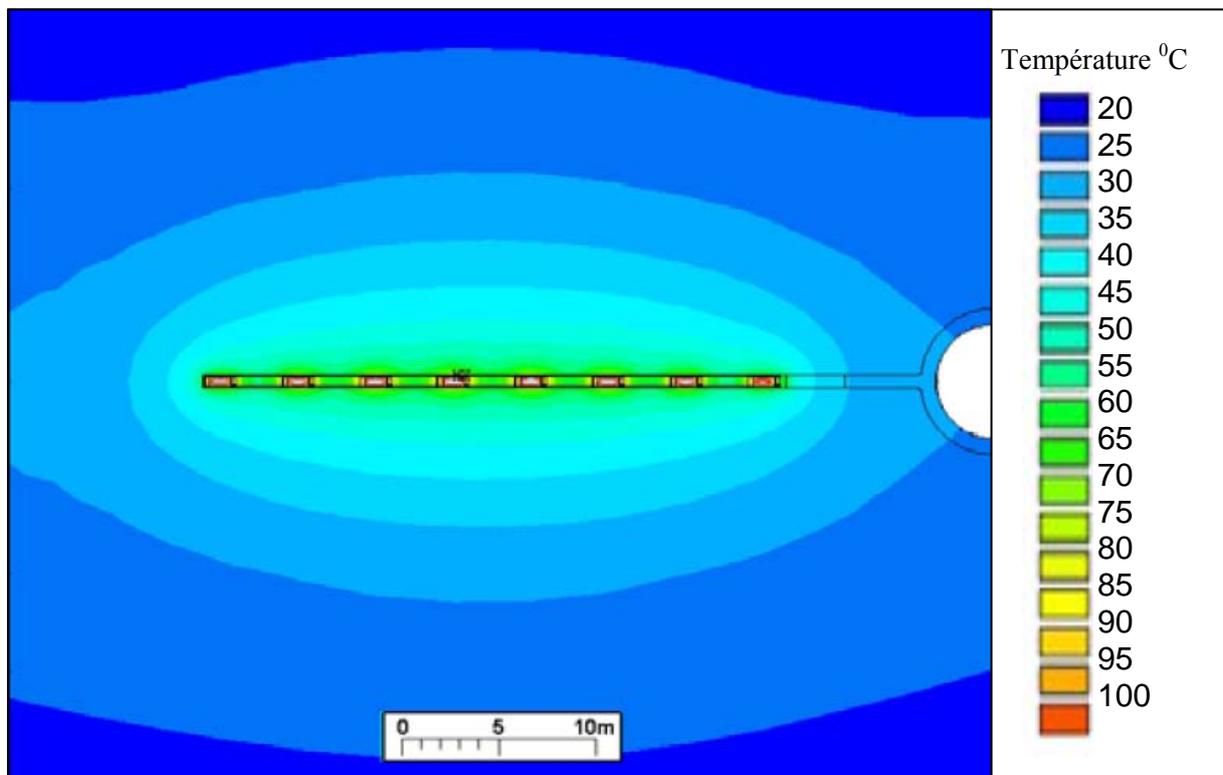


Figure 66 : isotherme de température autour d'une alvéole.

A la lumière des points décrits avant on peut supposer que les BSR (autochtones ou introduites durant le creusement) pourraient croître en conditions de stockage. Cependant, une des conditions les plus importantes est la présence d'eau liquide, indispensable pour le transport des nutriments et des déchets du métabolisme bactérien, de l'espace et une température favorable pour la croissance.

Par conséquent, si la durée de sous saturation en eau liquide est supérieure à la durée de vie des structures en acier en conditions abiotiques, le rôle des microorganismes dans le phénomène de biocorrosion sera insignifiant.

Enfin, c'est bien le scénario de stockage qui conditionnera le rôle des microorganismes sur la corrosion des aciers du stockage (température, disponibilité d'eau et de nutriments, espace...).

Beaucoup de questions persistent sur la présence et l'activité des BSR dans l'argilite du Callovo-Oxfordien profond :

- Les communautés microbiennes présentes, isolées et caractérisées sont-elles indigènes à ces habitats ?

- Est-ce qu'elles sont propres à une zone ou une région donnée ou ont-elles migrées depuis la surface au cours de la sédimentation ou ont-elles été introduites par les forages et l'exploitation du sous sol par l'homme ?

- De quelle manière les flores microbiennes ont-elles évoluées et se sont-elles adaptées à ce type d'écosystème ?

- Est-ce que les irradiations alpha et gamma des déchets radioactifs ont un effet sur la survie des BSR dans l'argilite.

- Est-ce que les facteurs regroupés (température, BSR, irradiations) ont un effet plus important sur la corrosion des matériaux de stockage ?

- Le rôle des BSR dans la migration des radioéléments ?

- ... ?

---

## Références

---



## Références

1. Turlay, R. (1997). Les déchets nucléaires. Les éditions de physique *Un dossier scientifique*, 4-10.
2. Schapira, J.P. (1989). Long-Term Nuclear waste Management : Present Status and Alternatives. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A280*.
3. Abdelouas, A. (2006). Uranium Mill tailings. *Geochemistry, Mineralogy and Environmental impact*. 2, 335-341.
4. Kuang, F., Wang, J., Yan, L., and Zhang, D. (2007). Effects of sulfate-reducing bacteria on the corrosion behavior of carbon steel. *Electrochimica Acta* 52, 6084-6088.
5. Dewonck, S. (2005). Expérimentation DIR - Synthèse des résultats obtenus sur les forages EST208, DIR2001, DIR2002 et DIR2003 au 30/09/05 - Laboratoire de recherche souterrain de Meuse/Haute-Marne. Rapport ANDRA D.RP.ADPE.05-0719.
6. Vinsot, A., and Mettler, S. (2005). Caractérisation de la composition de l'eau interstitielle du Callovo-Oxfordien, Experiences PAC. Rapport ANDRA.D.RP.ADPE.05.0870.
7. Andra (2005). Architecture et gestion du stockage géologique. *Dossier argile 2005*.
8. Thury, T., and Bossart, P. (1999). The Mont terri rock laboratory, a new international research project in a mezozoic shale formation in switzerland. *Engineering geology* 52, 347-359.
9. 91-1381, L.n. (1992). Loi n° 91-1381 du 30 décembre 1991 relative aux recherches sur la gestion des déchets radioactifs. . J.O. de la République française du 1er janvier 1992.
10. Guillocheau, F., Robin, C., Allemand, P., Bourquin, S., Brault, N., Dromart, G., Friedenberg, R., Garcia, J.-P., Gaulier, J.-M., Gaumet, F., Grosdoy, B., Hanot, F., Le Strat, P., Mettraux, M., Nalpas, T., Prijac, C., Rigollet, C., Serrano O., and Grandjean. G. (2000). Meso-Cenozoic geodynamic evolution of the Paris Basin: 3D stratigraphic constraints. *Geodin. Acta* 13, 189–246.
11. Bradbury, M.H., and Baeyens, B. (1998). A Physicochemical Characterisation and Geochemical Modelling Approach for Determining Porewater Chemistries in Argillaceous Rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62, 783-795.
12. Sombret, C. (1979). Les verres en tant que structure amorphe, utilisés pour le conditionnement des déchets radioactifs. *Journal of Nuclear Materials* 82, 163-171.
13. Andra (2005). référentiel des matériaux d'un stockage de déchets à haute activité et à vie longue. Rapport Andra C.RP.AHVL.04.0006.
14. Jaxq, F. ( 2003 ). La gestion des déchets radioactifs en France. *Revue des Ingénieurs*, 10-13.

15. Andra (2009). Options de conception du stockage en formation géologique profonde. Rapport C.NSY.ASTE.08.0429, 2009.
16. Bailey, S.W. (1980). Summary of Recommendations of AIPEA Nomenclature Committee. *Clays and Clay Minerals* 28, 73-78.
17. Van Damme, H. (2002). L'eau et sa représentation in *Mécanique des Sols non saturés*. Hermès Science Publication, Lavoisier.
18. Revil, A., and Glover, P.W.J. (1998). Nature of surface electrical conductivity in natural sands, sandstones and clays. *Geophys. Res. Lett* 25 691–694.
19. Balier Plaindoux, C., Tessier, D., and M., G. (1998). Propriétés mécaniques des roches argileuses carbonatées : importance de la relation calcite-argile = Mechanical properties of carbonatic clayey rocks : importance of the calcite-clay relation. *Geomaterials/Geomaterial* 326, 231-237.
20. Cazemier, A., Wagenaars, S., and Steeg, P. (2001). Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of Applied Microbiology* 90, 761-770.
21. Yamamoto, H. (2000). Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-sporeforming bacteria, and its modeling. *J Infect Chemothe* 6, 112-114.
22. Stackebrandt, E., Sproer, C., Rainey, F.A., Burghardt, J., Päufer, O., and Hans., H. (1997). Phylogenetic Analysis of the Genus *Desulfotomaculum*: Evidence for the Misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and Description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 47, 1134-1139.
23. Pedersen, K., Motamedi, M., Karnland, O., and Sandén, T. (2000). Cultivability of microorganisms introduced into a compacted bentonite clay buffer under high-level radioactive waste repository conditions. *Engineering Geology* 58, 149-161.
24. Masurat, P., Eriksson, S., and Pedersen, K. (2008). Evidence of indigenous sulphate-reducing bacteria in commercial Wyoming bentonite MX-80. *Applied Clay Science* 47, 51-57.
25. Boivin-Jahns, V., Ruimy, R., Bianchi, A., Daumas, S., and Christen, R. (1996). Bacterial diversity in a deep-subsurface clay environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3405-3412.
26. Jocker, N., and Wiezorek, K. (2002). Gas generation measurements in the FEBEX project. *Clays in Natural and Engineered Barriers for Radioactive Waste Confinement*, 109–110.
27. Russell, R.A., Holden, P.J., Payne, T.E., and McOrist, G.D. (2004). The effect of sulfate-reducing bacteria on adsorption of <sup>137</sup>Cs by soils from arid and tropical environments. *J. Environ. Radioact.* 74, 151–158.

28. Poulain, S. (2006). Caractérisation microbiologique de l'argile à Opalinus du Mont Terri et de l'argilite du Callovo-Oxfordien de Meuse/Haute-Marne. Thesis Univ. Bordeaux I, (FORPRO n°2006/18).
29. Pitonzo, B.J., Castro, P.S., Amy, P.S., Southam, G., Jones, D.A., and Ringelberg, D. (2004). Microbiologically influenced corrosion capability of bacteria isolated from Yucca Mountain. *Corrosion* 60, 64–74.
30. Bruhn, D.F., Frank, S.M., Roberto, F.F., Pinhero, P.J., and Johnson, S.G. (2009). Microbial biofilm growth on irradiated, spent nuclear fuel cladding. *Journal of Nuclear Materials* 384, 140-145.
31. Stroes-Gascoyne, S., Hamon, C.J., Maak, P., and Russell, S. (2010). The effects of the physical properties of highly compacted smectitic clay (bentonite) on the culturability of indigenous microorganisms. *Applied Clay Science* 47, 155-162.
32. Sammartino, S., Bouchet, A., Prêt, D., Parneix, J.C., and Tevissen, E. (2003). Spatial distribution of porosity and minerals in clay rocks from the Callovo-Oxfordian formation (Meuse/Haute-Marne, Eastern France)—implications on ionic species diffusion and rock sorption capability. *Clay Microstructure. Proceedings of a Workshop held in Lund, Sweden, 15-17 October 2002* 23, 157-166.
33. Yang, D. (2008). caractérisation par la mesure de perméabilité au gaz de l'endommagement mécanique et hydrique de l'EDZ des argilites de Callovo-Oxfordien. thèse, Geologie de l'ingénieur, Ecole des mines de Paris.
34. ANDRA. (2005). Evaluation de la faisabilité du stockage géologique en formation argileuse. Report Andra C.RP.ADS.04.00.22.
35. Blümling, P., Bernier, F., Lebon, P., and Derek Martin, C. (2007). The excavation damaged zone in clay formations time-dependent behaviour and influence on performance assessment. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 32, 588-599.
36. Davy, C.A., Skoczylas, F., Barnichon, J.D., and Lebon, P. (2007). Permeability of macro-cracked argillite under confinement: Gas and water testing. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 32, 667-680.
37. Fredrickson, J.K., and Onstott, T.C. (1996). Microbes deep inside the Earth. *Scientific American*, 68-73.
38. Andra (2005). Spécification technique de besoin d'un stockage en formation argileuse profonde- Site de Meuse/haute-Marne. Rapport Andra C.NT.AHVL.04.0030.
39. 2005, A. (2005). Dossier 2005 argile-tome évaluatiuon de sureté de stockage géologique 421-430.
40. Daumas, S., Lombart, R., and Bianch, A. (1986). Bacteriology study of geothermal spring waterdating from the Dogger and Trias period in teh Paris bassin. *Geomicrobiology journal* 4, 423-433.

41. Lloyd, J.R., and Macaskie, L.E. (2002). The biochemical basis of radionuclide-microbe interactions. In "Microbiology and Radioactivity. Elsevier 313-342.
42. Gadd, G.M., and White, C. (1989). Uptake and intracellular compartmentation of thorium in *saccharomyces cerevisiae*. *Environmental Pollution* 61, 187-197.
43. Abdelouas, A., Grambow, B., Fattahi, M., Andrès, Y., and Leclerc-Cessac, E. (2005). Microbial reduction of <sup>99</sup>Tc in organic matter-rich soils. *Science of The Total Environment* 336, 255-268.
44. Lloyd, J.R., Lovley, D.R., and Macaskie, L.E. (2004). Biotechnological application of metal-reducing bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 53 85.
45. Francis, A.J., Dodge, C.J., Gillow J.B., and Papenguth, H.W. (2000). Biotransformation of Uranium Compounds in High Ionic Strength Brine by a Halophilic Bacterium under Denitrifying Conditions. *Environmental science and technology* 34, 311–2317.
46. Geesey, G.G., and Jang, L. (1990). extracellular polymers for metalbinding. *Microbial Mineral Recovery*, MCGraw Hill, New york, 223-247.
47. Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Balkwill, D.L., Kennedy, D., Li, S.W., Kostandarithes, H.M., Daly, M.J., Romine, M.F., and Brockman, F.J. (2004). Geomicrobiology of High-Level Nuclear Waste-Contaminated Vadose Sediments at the Hanford Site, Washington State *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4230-4241.
48. Ivanov, M.V. (2004). Microbiological methods for methane control in coal mines. *Proceedings of the Winogradsky Institute of Microbiolog* 12, 149-159.
49. Beech, I.B. (2004). Corrosion of technical materials in the presence of biofilms--current understanding and state-of-the art methods of study. *International Biodeterioration & Biodegradation* 53, 177-183.
50. Lee, W., Lewandowski, Z., Nelsenp, H., and Hamilton, W.A. (1995). Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: a review. *Biofouling* 8, 165-194.
51. Xu, C., Zhang, Y., Cheng, G., and Zhu, W. (2007). Localized corrosion behavior of 316L stainless steel in the presence of sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria. *Materials Science and Engineering: A* 443, 235-241.
52. Angell, P., and Urbanc, K. (2000). Sulphate-reducing bacterial activity as a parameter to predict localized corrosion of stainless alloys. *Corrosion science* 42, 897-912.
53. Mansfeld, F. (2007). The interaction of bacteria and metal surfaces. *Electrochim. Acta* 52, 7670-7680.
54. Thauer, R.K., and Morris, J.G. (1984). Metabolism of chimotrophic anaerobes: old views and new aspects. *The microbe*, Cambrige university press 2.
55. Mohan, S.V., Rao, N.C., Prasad, K.K., and Sarma, P.N. (2005). Bioaugmentation of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) with immobilized sulphate

- reducing bacteria (SRB) for the treatment of sulphate bearing chemical wastewater. *Process Biochemistry* 40, 2849-2857.
56. Oyekola, O.O., van Hille, R.P., and Harrison, S.T.L. (2009). Study of anaerobic lactate metabolism under biosulfidogenic conditions. *Water Research* 43, 3345-3354.
  57. Voordouw, G., Armstrong, S.M., Reimer, M.F., Fouts, B., Telang, A.J., Shen, Y., and D., G. (1996). Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 623-1629. .
  58. Castro, H.F., Williams, N.H., and Ogram, A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 31, 1-9.
  59. Fauque, G., and Olivier, B. (2004). Anaerobe; the sulphate reducing bacteria as an exemple of metabolic diversity. *Microbial diversity and bioprospecting ASM press Washington*, 169-176.
  60. Le Gall, J., and Xavier, V. (1996). Anaerobe response to oxygen: The sulfate reducing bacteria *Anaerobes* 2, 1-9.
  61. Singleton, R.J. (1993). The sulfate-reducing bacteria: an overview. *The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives*. Springer-Verlag, New York, 1-20.
  62. Widdel, F., and Plenning, N. (1984). The dissimilatory sulfate and sulfur-reducing bacteria. *Bergey's manual of systematic bacteriology Williams and Wilkins*, 663-679.
  63. Stephens, C. (1998). Bacterial sporulation : a question of commitment ? *Current Biology* 8, 45-48.
  64. Leuschner, R.G.K., and Lillford, P.J. (2001). Investigation of bacterial spore structure by high resolution solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy and transmission electron microscopy. *International Journal of Food Microbiology* 63, 35-50.
  65. Lin, L.-H., Slater, G.F., Sherwood Lollar, B., Lacrampe-Couloume, G., and Onstott, T.C. (2005). The yield and isotopic composition of radiolytic H<sub>2</sub>, a potential energy source for the deep subsurface biosphere. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 893-903.
  66. Volbeda, A., Charo, M.H., Piras, C., Hatchikian, E.C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J.C. (1995). Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373, 580-587.
  67. Postgate, J.R. (1984). *The sulfate-reducing bacteria*. Cambridge University. Press 2, 1-208.
  68. Richardson, D.J. (2000). bacterial respiration: A flexible process for a changing environment. . *Microbiology* 146, 551-571.
  69. Magot, M., Ravot, G., Campaignolle, X., Ollivier, B., Patel, B.K.C., Fardeau, M.L., Thomas, P., Crolet, J.L., and Garcia, J.L. (1997). *Dethiosulfovibrio Peptidovorans* Gen.

- Nov., a New Anaerobic, Slightly Halophilic, Thiosulfate-Reducing Bacterium from Corroding Offshore Oil Wells. *Bacteriol* 47, 818-824.
70. Reis, M.A.M., Almeida, J.S., Lemos, P.C., and Carrondo, M.J.T. (1992). Effect of Hydrogen Sulfide on Growth of Sulfate Reducing Bacteria. *Biotechnol. Bioeng* 40, 593-600.
71. Michel-Savin, D., Marchal, R., and Vandecasteele, J.P. (1990). Butyrate Production in Continuous Culture of *Clostridium Tyrobutyricum*: Effect of End-Product Inhibition. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 33, 127-131.
72. Baier, R.E. (1972). Influence of the initial surface condition of materials on bioadhesion. *Proceedings of the Third International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Gaithersburg*, 633-639.
73. Kobrin, G.A. (1993). A practical manual on microbiologically influenced corrosion. NACE, International, Houston.
74. Hamilton, W.A. (1987). *Biofilms, microbial interactions and metabolic activities*. Cambridge University Press, 361-383.
75. Costerton J. W., Geesey G. G., and J., C.K. (1978). How bacteria stick. *Science Am* 238, 86-95.
76. Fletcher, M., and Pringle, J.H. (1985). The effect of surface free energy and medium surface tension on bacterial attachment to solid surfaces. *Colloid Interface Sc* 104, 5-14.
77. Compere, C. (1999). Biofilm en milieu marin. *Techniques Sciences Méthodes*. 11, 48-54.
78. Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis* 8, 881-890.
79. Chantereau, J. (1980). Corrosion bactérienne. *Technique et documentation*. 151-170.
80. Marchal, R. (1999). Rôle des bactéries sulfurogènes dans la corrosion du fer. *Oil and gas science and technology-Rev IFP* 54, 649-659.
81. Von Wolzogen Kuehr, C.A.H., and Van der Vlugt, L.S. (1934). The graphitization of cast iron as electrochemical process in anaerobic soils *Den Haag* 16, 147-165.
82. Booth, G.H., and Tiller, A.K. (1960). Polarisation studies of mild steel in cultures of sulphate bacteria. *Trans Faraday* 56, 1689-1696.
83. Wanklyn, J.N., and Spruit, C.P.J. (1952). Influence of sulphate-reducing bacteria on the corrosion potential of iron. *Nature*, 928-929.
84. Miranda, E., Bethencourt, M., Botana, F.J., Cano, M.J., Sánchez-Amaya, J.M., Corzo, A., de Lomas, J.G., Fardeau, M.L., and Ollivier, B. (2006). Biocorrosion of carbon steel alloys by an hydrogenotrophic sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio*

- capillatus isolated from a Mexican oil field separator. *Corrosion Science* 48, 2417-2431.
85. Martin, R.L. (1999). Inhibition of vapour phase corrosion in gas pipelines. *European Federation of corrosion* 26, 433.
86. Waard, C.D., and Williams, D.E. (1975). Carbonic acid corrosion of steel. *Corrosion* 5, 177.
87. Hausler, R.H. (2004). contribution to the understanding of H<sub>2</sub>S corrosion. *Corro-Consulta* 04732.
88. Crolet, J.L. (1990). *Matériaux et Techniques*,. Spécial Biocorrosion 9.
89. Belay, N.L. (1990). Daniels, Antonie van leeuwenhoek 57
90. Booth, G.H., and Wormell, F. (1962). Corrosion of mild steel by reducing bacteria. *International congress on metallic corrosion*, 341-344.
91. Costello, J.A. (1974). Cathodic depolarisation by sulphate reducing bacteria. *S, Afr, J ,Sci* 70, 202-204.
92. Iverson, W.P. (1968). *Nature* () 217 1265.
93. Beech, I.B., and Cheung, C.W. (1995). *Inter. Biodeter. Biodeg*, 35
94. Baroux, M., and Orlandi, M.C. (1982). *Matériaux et techniques*.
95. Philibert, J. (1998). *Métallurgie, du minerai au matériau*. Masson.
96. Dumas, S., Crousier, J., and Crousier, J.P. (1988). Influence de bactéries sulfato-réductrices actives sur le potentiel de corrosion d'un acier = Influence of active sulfato-reductor bacteria on steel corrosion potential. *Métaux. Corrosion industrie* 63, 1-3.
97. Franklin, M.J., White, D.C., and Isaacs, H.S. (1991). *NACE annual conf, corrosion* 91. 115.
98. Freiter, E. (1991). *NACE annual conf. corrosion* 91. 584.
99. Andra (2005). Analyse fonctionnelle externe d'un stockage en formation argileuse profonde- Site de Meuse/Haute Marne. Report Andra C.RP.AHVL.00.140.
100. Crusset, D. (2005). La corrosion des composants métalliques d'un stockage: (sur)conteneurs de colis des déchets vitrifiés et de combustibles usés et les infrastructures métalliques -Site de Meuse/Haute Marne. Report Andra C.NT.ASCM.03.0046.
101. Andra (2009). Rapport à mi-parcours du Groupement de Laboratoires Verre/Fer/argile, C.RP.ASCM.09.0003.

102. Didot, A. (2008). corrosion sous contrainte des aciers non alliés dans les condition du stockage géologique. These. Mécanique avancée. Université de technologie de Compiègne.
103. Feron, D., Compère, C., Dupont, I., and Magot, M. (2002). Biodétérioration des matériaux métalliques ou biocorrosion. Corrosion des métaux et alliages, Lavoisier Hermès sciences, 385-405.
104. Elion, P. (2005). Le modèle géologique du Callovo-Oxfordien à l'état initial - Site de Meuse/Haute-Marne. . Rapport Andra C.NT.ASMG.03.0101.
105. Altmann, S., Hotett, N., and Troutlier, A. (2001). Referentiel géologique du site de Meuse/Haute-Marne. Tome 4. Rapport Andra C.RP.ADS.99.005.
106. Muurinen, A., Karnland, O., and Lehtikainen, J. (2004). Ion concentration caused by an external solution into the porewater of compacted bentonite. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 29, 119-127.
107. Motellier, S., Ly, J., Gorgeon, L., Charles, Y., Hainos, D., Meier, P., and Page, J. (2003). Modelling of the ion-exchange properties and indirect determination of the interstitial water composition of an argillaceous rock. Application to the Callovo-Oxfordian low water- content formation. *Applied Geochemistry* 18, 1517-1530.
108. Gaucher, E., Lerouge, C., Blanc, P., and Tournassat, C. (2007). Caractérisation géochimique des forages PAC et nouvelles modélisations THERMOAR BRGM/RP-54416-FR, 97-97.
109. Tournassat, C., Gailhanou, H., Cruzet, C., Braibant, G., Gautier, A., Lassin, A., Blanc, P., and Gaucher, E. C. (2007). Two cation exchange models for direct and inverse modelling of solution major cation composition in equilibrium with illite surfaces. *Geochim.Cosmochim. Acta* 71, 1098-1114.
110. Courdouan, A., Christl, I., Meylan, S., Wersin, P., and Kretzschmar, R. (2007). Isolation and characterization of dissolved organic matter from the Callovo-Oxfordian formation. *Applied Geochemistry* 22, 1537-1548.
111. Courdouan, A., Christl, I., Meylan, S., Wersin, P., and Kretzschmar, R. (2007). Isolation and characterization of dissolved organic matter from the Callovo-Oxfordian formation. *Applied Geochemistry* 22, 1537-1548.
112. Andra (2007). Fiche technique de fin de forage -For 1118. Galerie section 4C- Puits auxiliaires. D-FI ALS 07 0495.
113. Miehe, B. (2004). Modélisation de la zone endommagée induite par le creusement du puits d'accès au laboratoire souterrain de Meuse/Haute-Marne. Thèse de l'école de Paris.
114. Valés, F. (2004). effet de la désaturation sur le comportement mécanique des argilites. Rapport Andra C.RP.01.MS.04.001.
115. Shen, Y., and Buick, R. (2004). The antiquity of microbial sulfate reduction. *Earth-Science Reviews* 64, 243-272.

116. Mauclaire, L., McKenzie, J.A., Schwyn, B., and Bossart, P. (2007). Detection and cultivation of indigenous microorganisms in Mesozoic claystone core samples from the Opalinus Clay Formation (Mont Terri Rock Laboratory). *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 32, 232-240.
117. DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de).
118. Marchandin, H. (2007). *Physiologie bacterienne. bacteriologie*, Faculté de medecine Montpellier. 7.
119. Tiffreau, C., and Libert, M. (2006). Evaluation d'une activité bacterienne au sein des colis C en situation de stockage profond: Influence de l'environnement de stockage. Rapport CEA. DTNSMTMLMTE/2006-05.
120. Galès G, L.M., Sellier R, Cournac L, Chapon V, Heulin T. (2004). Molecular hydrogen from water radiolysis as an energy source for bacterial growth in a basin containing irradiating waste. *FEMS Microbiol Lett.* 240(2), 155-162.
121. Libert, M., Sellier, R., and Marty, V. (1999). Hydrogen consumption by denitrifying bacteria in nuclear environment. International Symposium Subsurface Microbiology-Vail-Colorado.
122. Esnault, L., Libert, M., Mustin, C., and Jullien, M. (2009). Availability of nutrients sources for bacterial development in deep clayed environments. *Geochimica Cosmochimica Acta Special Issue Goldschmidt A338*.
123. Cline, J.D. (1969). Spectrofluorometric determination of hydrogen sulphide in natural waters. *Limnology and Oceanography.* 14, 454-458.
124. Chamkh. F., Hanne H., Lorquin J., Labat M., Tholozan J. L., and Qatibi, A.L. (2008). Partiel caracterisation of a new sulphate-reducing bacteria isolated from a basin treating olive-growing water of the semi-arid area of Marrakech by natural evaporation. *Microbiol, In, San et Environn.* 2, 45-54.
125. Rau, W., and Lichte, H. (1999). High resolution off-axis electron holography. Klumer Academic/Plenum Publishers, New York, 201-209.
126. Tailliez, P., Beaud, D., and Ogier, J.C. (1981). Le point sur les outils moléculaires de classification et d'écologie microbienne = Molecular approaches for microbial classification and ecology. *Sciences des aliments*, Lavoisier.
127. Stackebrandt, E., and Goebel, B.M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44 846-849.
128. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51
129. Birch, D.E. (1996). Simplified hot start PCR. *Nature* 381, 445-446.

130. Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press 3.
131. Herbert, A.P. (1962). Solubility of iron sulfide. *Atomic Energy Division* 7.
132. Wilkin, R.T., and Barnes, H.L. (1997). Iron sulfide- arsenic interactions: adsorption behavior into iron monosulfides and controls on arsenic accumulation in pyrite *American Journal of Science* 297, 620-650.
133. Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., and Bollet, C. (2000). *Précis de bactériologie clinique Editions ESKA 2000*.
134. Kaksonen, A.H., Spring, S., Schumann, P., Kroppenstedt, R.M., and Puhakka, J.A. (2006). *Desulfotomaculum thermosubterraneum* sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from an underground mine located in a geothermally active area. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 56, 2603-2608.
135. Karnachuk, O.V., Gerasimchuk, A.L., Banks, D., Frengstad, B., Stykon, G.A., Tikhonova, Z.L., Kaksonen, A., Puhakka, J.A., Yanenko, A.S., and Pimenov, N.V. (2009). Bacteria of the sulfur cycle in the sediments of gold mine tailings, Kuznetsk Basin, Russia *Springer Science-Business Media LLC*. 78, 483-491.
136. Suzuki, Y., Kelly, S., Kemner, K.M., and Banfield, J.F. (2003). Microbial Populations Stimulated for Hexavalent Uranium Reduction in Uranium Mine Sediment *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1337-1346.
137. Cayol, J.L., and Garcia, G.L. (1995). Study of strict anaerobic bacteria isolated from hypersaline or thermophilic extreme environments. *Thèse université d'Aix-Marseille 95 AIXI 1009*.
138. Adams, M.E., and Postgate, J.R. (1959). A New Sulphate-Reducing *Vibrio*. *Journal of General Microbiology* 20, 252-257.
139. ZelJner, G., Messner, P., Kneifel, H., and Winter, J. (1989). *Desulfovibrio simplex* spec. nov., a new sulfate-reducing bacterium from a sour whey digester. *Arch Microbiol* 152, 229-334.
140. Zobell, C.E. (1975). Ecology of sulfate-reducing bacteria, In : *Sulfate-reducing bacteria, their relation to the secondary recovery of oil*. Science symposium, St Bonaventure College. St Bonaventure. New York, 1-24.
141. Camefort, H. (1951). Structure of the vegetative point of *Ginkgo biloba* in the period of activity. *Hebd Seances Acad Sc* 1, 88-90.
142. Ghosh , J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B.M., Islam, N.M., Sarkar, S.N., Dasgupta, S., and Kirsebom, L.A. (2009). Sporulation in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci* 26, 106.
143. Kimura, M. (1986). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, 34-55.

144. ASTM, s. (1966). Coupon test method D 2 328-65 T. ASTM international standards worldwide.
145. Oatley, C.W. (1972). The Scanning electron microscope. Cambridge University Press ISBN 0521085314.
146. Ernst, R. (1980). The early Development of Electron Lenses and Electron Microscopy S. Hirzel 3-7776-0364-3.
147. Cullity, B.D. (1958). Elements of X-ray Diffraction. Addison-Wesley, 379.
148. Caussin, P., Nusinovici, J., and Beard, D.W. (1988). Using digitized X-ray powder diffraction scans as input for a new PC-AT Search/match program. X-Ray Anal. 31, 423–430.
149. Lan Lanford, J., and Louër, D. (1996). Powder diffraction, vol. , pp ,. Rep. Prog. Phys. 59, 131-234.
150. Raman, C.V. (1928). A New Radiation. Indian Journal of Physics 2, 387.
151. Raman, C.V., and Krishnan, K.S. (1928). A new type of secondary radiation. Nature 121, 501.
152. Xu, C., Zhang, Y., Cheng, G., and Zhu, W. (2008). Pitting corrosion behavior of 316L stainless steel in the media of sulphate-reducing and iron-oxidizing bacteria. Materials Characterization 59, 245-255.
153. Yandecastel, J.P. (2005). Microbiologie pétrolière, concept, implications environnementales, Applications industrielles. IFP publications TECHNIP, 655-670.
154. Brigham, R.J., and Tozer, E.W. (1973). Corrosion (NACE). 29, 33.
155. Chongdar, S., Gunasekaran, G., and Kumar, P. (2005). Corrosion inhibition of mild steel by aerobic biofilm. Electrochimica Acta 50, 4655-4665.
156. Canfield, D.E., and Des Marais, D.J. (1991). Aerobic sulfate reduction in microbial mats. Science 251 1471–1473.
157. Beijerinck, M.W. (1895). Zentralbl. Bakteriol. Abt. I, 49-59.
158. Pasteur, L. (1861). Les ferments. Bulletin de la Société chimique de Paris, 61-63
159. Labrenz, M.L., Druschel, G.K., Thomsen-Ebert, T., Gilbert, B., Welch, S.A., Kemner, K.M., Logan, G.A., Summons, R., De Stasio, G., Bond, P.L., Lai, B., Kelly, S.D., and Banfield, J.F. (2000). Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria. Nature 290 1744–1747.
160. Cypionka, H. (2000). Oxygen respiration by Desulfovibrio species. Annu. Rev. Microbiol 54 827–848.

161. Ren, C., Liu, D., Bai, Z., and Li, T. (2005). Corrosion behavior of oil tube steel in simulant solution with hydrogen sulfide and carbon dioxide. *Materials Chemistry and Physics* 93, 305-309.
162. Milliams, D.E., and Kroese, D.J. (1979). Aqueous corrosion of steel by H<sub>2</sub>S/CO<sub>2</sub> mixtures. 3<sup>ème</sup> Conférence Internationale sur la protection interne et externe des pipelines, London BHRA fluid engineering, 5-7.
163. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol* 2, 95-108.
164. Daub, K., Zhang, X., Noël, J.J., and Wren, J.C. (2008). Effects of [gamma]-radiation versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on carbon steel corrosion. *Electrochimica Acta* 55, 2767-2776.
165. Fujita, N., Matsuura, C., and Saigo, K. (2000). Irradiation-enhanced corrosion of carbon steel in high temperature water -- in view of a cell formation induced by [gamma]-rays. *Radiation Physics and Chemistry* 58, 139-147.
166. Marsh, G.P., Pinard-Legry, G., Smailos, E., Casteels, F., Vu Quang, K., Cripps, J., and Haijink, B. (1985). HLW container corrosion and design, in *Radioactive Waste Management Disposal*,. Proceedings of the 2nd European Community Conf., Luxembourg.
167. J.N.C (2000). project to establish the scientific and technical basis for HLW disposal in Japan. Supporting report 2. Repository design and engineering technology, Nuclear Cycle Development Institute Report.
168. Diosi, G., Telegdi, J., Farkas, G., Gazso, L.G., and Bokorn, E. (2003). Corrosion influenced by biofilms during wet nuclear waste storage. *International Biodeterioration and biodegradation* 51, 151-156.
169. Delay, J., Distinguin, M., and Dewonck, S. (2007). Characterization of a clay-rich rock through development and installation of specific hydrogeological and diffusion test equipment in deep boreholes. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 32, 393-407.
170. Bauer-Plaindoux, C., Tessier, D., and Ghoreychi, M. (1998). Propriétés mécaniques des roches argileuses carbonatées: Importance de la relation calcite-argile. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* 326, 231-237.
171. Kemper, W.D., and Rollins, J.B. (1966). Osmotic efficiency coefficients across compacted clays. *Soil Science Society American Proc* 30, 529-534.
172. Revil, A. (1999). Ionic Diffusivity, Electrical Conductivity, Membrane and Thermoelectric Potentials in Colloids and Granular Porous Media: A Unified Model. *Journal of Colloid and Interface Science* 212, 503-522.
173. Aoki, K., Sugita, Y., Chijimatsu, M., and Tazaki, K. (2010). Impacts of thermo-hydro-mechanical experiments on the microbial activity in compacted bentonite at the Kamaishi Mine, Northeast Japan. *Applied Clay Science* 47, 147-154.

174. Perdrial, J.N., Warr, L.N., Perdrial, N., Lett, M.-C., and Elsass, F. (2009). Interaction between smectite and bacteria: Implications for bentonite as backfill material in the disposal of nuclear waste. *Chemical Geology* 264, 281-294.
175. Johnson, S.S., Hebsgaard, M.B., Christensen, T.R., Mastepanov, M., Nielsen, R., Munch, K., Brand, T., Gilbert, M.T.P., Zuber, M.T., Brunce, M., Ronn, R., Gillichinsky, D., Froese, D., and Willerslev, E. (2007). Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci* 104 14401–14405.
176. Masurat, P., Eriksson, S., and Pedersen, K. (2010). Microbial sulphide production in compacted Wyoming bentonite MX-80 under in situ conditions relevant to a repository for high-level radioactive waste. *Applied Clay Science* 47, 58-64.
177. Andra (2005). Evolution phénoménologique du stockage géologique. Dossier 2005 argile.
178. Grogan.H.A. (1987). The significance of microbial activity in a deep repository for L/Lw Nagra. *Itermer Bericht* 87-85.
179. Libert, M., and Bildstein, O. (2008). Evaluation des potentialités d'activité bactérienne en stockage profond: analyse thermodynamique des expérimentations réalisées au laboratoire de Bure. Rapport CEA. DTNSMTMLMTE/2008-22., 11-13.
180. Bazer-Bachi, F., Descostes, M., Tevissen, E., Meier, P., Grenut, B., Simonnot, M.O., and Sardin, M. (2007). Characterization of sulphate sorption on Callovo-Oxfordian argillites by batch, column and through-diffusion experiments. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 32, 552-558.
181. Crusset, D. (2005). Référentiel des matériaux d'un stockage de déchets à haute activité et à vie longue. Corrosion des matériaux métalliques. Rapport Andra CRPASCMT3.
182. Michau, N. (2005). l'évolution chimique des ouvrages d'un stockage à base d'argile gonflante: alvéole de stockage des déchets C et combustibles usés et scellement des galeries et des puits. Site Meuse/Haute-Marne. Rapport Andra C.NT.ASCM.03.0043.
183. Caumette, P., Imhoff, J.F., Süling, J., and Matheron, R. (1997). *Chromatium glycolicum* sp. nov., a moderately halophilic purple bacterium that uses glycolate as substrate. *Arch.Microbiology* 167, 11-18.
184. Thomas, M., and Alba, L. (2007). Microbiologie appliquée aux géosciences. Biosphère profonde. Licence mention Science de la Matière parcours Géosciences, Université Henry Poincaré, 3-6
185. Martin, F., and Fenart, M. (2009). Essais de corrosion de longue durée en argilite : prélèvements à 7 mois, Rapport Intermédiaire CORRIDDA. Document Technique DEN,, NT DPC/SCCME 09-490-A.
186. Bataillon, C. (2008). Procédure de réalistaion d'une solution synthétique de Bure à 90°C. Rapport CEA NT DPC/SCCME 08-412.A



---

## Liste des figures et des tableaux

---



## Liste des figures

Figure 1 : le Callovo-Oxfordien, une couche argileuse profonde du bassin Parisien destinée à accueillir les déchets radioactifs de haute et moyenne activité et à vie longue

Figure 2 : Schéma d'un col de stockage de déchets HA

Figure 3 : L'alvéole des déchets HAVL, principaux composants et fonctions associées (en haut, alvéole en exploitation, en bas, alvéole scellée)

Figure 4 : section transversale de l'alvéole de stockage de déchets HA

Figure 5 : Exemple d'organisation générale du stockage

Figure 6 : schéma de la texture microporale de l'argilite du Callovo-Oxfordien[38].

Figure 7 schémas conceptuels classiques de l'EDZ

Figure 8: métabolisme des BSR utilisant le lactate comme donneur d'électrons pour réduire le sulfate (Communication personnelle Pedersen Karsten)

Figure 9 : les étapes de formation des biofilms: 1-Attachement ; 2- Adhésion irréversible; 3- formation des microcolonies; 4- Biofilm mature; 5- Détachement ([www.biofilm.montana.edu](http://www.biofilm.montana.edu)).

Figure 10 : évolution de la production des sulfures avec la croissance des BSR

Figure 11 : évolution du potentiel de corrosion de l'acier avec la croissance des BSR

Figure 12: observation d'une corrosion localisée initiée en 6 mois par des bactéries sulfato-réductrices sur un circuit en acier au carbone ([www.corrodys.com](http://www.corrodys.com)).

Figure 13 : Localisation du forage 1118 à l'origine des carottes d'argilite EST 26459 utilisées pour nos expériences

Figure 14 : Différents conteneurs utilisés pour le transport des échantillons d'argilites.

Figure 15 : Machine à cloche pour la conservation des carottes d'argilites.

Figure 16 : MET HF2000-FEG (IMN)

Figure 17 : colonie bien isolée de bactéries.

Figure 18 : positionnement des amorces sens D88 et anti-sens E94 dédiées à l'amplification par PCR de la séquence complète de 16sADN (1544 paire de base)

Figure 19: noircissement de l'argilite suite à la croissance des BSR dans le milieu de culture (tableau 5)

Figure 20 : solubilité de FeS à pH6 et pH

Figure 21: photos MET des bactéries isolées à partir de l'argilite du Callovo-Oxfordien.

Figure 22 : EDS des particules noires précipitées lors de la croissance des BSR.

Figure 23 : diminution du taux de sulfates pendant la croissance des BSR.

Figure 24 : production de sulfure suite à la réduction de sulfate par les BSR.

Figure 25 : potentiel redox mesuré dans le milieu d'enrichissement en présence des BSR par comparaison à un témoin stérile.

Figure 26 : précipité noir formé au cours de la croissance des BSR dans le milieu d'enrichissement ainsi que dans l'eau de COX synthétique.

Figure 27 : DO<sub>580</sub> associé à la croissance bactérienne dans les 3 cas de culture.

Figure 28 : gel d'électrophorèse des produits de PCR observé sous U.V.

Figure 29 MEB JEOL ltd 5800V

Figure 30 : diagramme énergétique présentant les transitions d'état vibrationnel possibles et le type de raies de diffusion qui leur sont associées

Figure 31 : sections polies de l'acier P235GH

Figure 32 : dispositif expérimental ; corrosion avec succession de conditions aérobies/anaérobies.

Figure 33 : cellule PEEK conçue pour les expériences d'irradiation  $\gamma$ .

Figure 34 : noircissement des coupons d'acier au contact des bactéries

Figure 35 : photo MEB montrant la présence du biofilm de BSR sur le coupon d'acier corrodé en culture en batch pendant 1 mois sous hydrogène (COX/eau de COX).

Figure 36 : photos MEB montrant un aspect de corrosion localisée contenant des produits de corrosion. Culture en batch pendant 1 mois sous hydrogène (COX/eau de COX).

Figure 37 : oxydation non uniforme des coupons d'acier à l'air libre. Culture en batch pendant 1 mois sous hydrogène (COX/eau de COX).

Figure 38 : photos MEB montrant la corrosion par localisée des coupons d'acier après immersion pendant (A) 45 jours (acier au carbone)[84]; (B) 30 jours (acier inoxydable)[152] dans un milieu contenant des BSR.

Figure 39 : sections polies montrant l'aspect de corrosion localisée observée en présence des BSR (creux remplis de produits de corrosion) par comparaison à un témoin stérile.

Figures 40 : photos MEB de la couche de corrosion en présence des BSR par comparaison au témoin stérile. Culture en batch pendant 1 mois sous hydrogène (COX/eau de COX).

Figure 42 : DRX des coupons d'acier corrodés en présence des bactéries par comparaison à un témoin stérile. Culture en batch pendant 1 mois sous hydrogène (COX/eau de COX).

Figure 43 : spectre  $\mu$ -Raman montrant la présence de la mackinawite à 210 et 280  $\text{cm}^{-1}$  en présence de BSR, le témoin stérile montre plutôt la présence de produits d'oxydation de type hydroxyde de fer.

Figure 44 : particule de mackinawite observée en MET, l'analyse chimique de cette particule montre surtout la présence de Fe et de S. Le pic de carbone vient de la grille du MET.

Figure 45: noircissement des coupons d'acier après transfert en conditions anaérobies et en présence des BSR inoculés dans le milieu.

Figure 46 : EDS des coupons transférés de la phase aérobie montrant le soufre en présence des bactéries mais pas pour le témoin stérile.

Figure 47 :  $\mu$ -Raman montrant la mackinawite sur les coupons transférés de la phase aérobie et incubé 3 mois dans l'eau de COX en présence des BSR en anaérobiose.

Figure 48 : sections polies montrant un aspect de corrosion par piqûre des coupons transférés de la phase aérobie et incubés 3 mois dans l'eau de COX en présence des BSR en anaérobiose.

Figure 49 : spectres  $\mu$ -Raman des coupons d'acier à différentes concentrations de sulfure. Formation de la mackinawite à partir de 1mg/l de sulfures dans le milieu.

Figure 50 : spectre  $\mu$ -Raman des coupons d'acier irradiés pendant 2h, 10h et 68h après 1 mois d'incubation en présence des BSR.

Figure 51 : coupe schématique de la cellule de percolation.

Figure 52 : montage expérimental: eau argileuse synthétique (eau de COX) injectée avec une pression de 120bars et un débit de 1 $\mu$ l/min dans une cellule de percolation contenant 5 coupons d'acier placés entre 2 carottes d'argilite (COX).

Figure 53 : architecture du profilomètre 3D nanotech Fogale.

Figure 54 : principe de l'interférométrie optique

Figure 55 : concentration en sulfates en sortie de la cellule de percolation dans les 3 cas « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

Figure 56: concentration en sulfures en sortie de la cellule de percolation dans les cas A: Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX et B : Eau de COX stérile/ COX. Pas de production de sulfures dans le cas C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile.

Figure 57: concentration en acétates en sortie de la cellule de percolation dans les cas A: Eau de COX inoculée avec des BSR isolée du COX/ COX et B : Eau de COX stérile/ COX. Pas de production d'acétate dans le cas C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile.

Figure 58: concentration en fer en sortie de la cellule de percolation dans les cas A: Eau de COX inoculée avec des BSR isolée du COX/ COX et C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile.

Figure 59: noircissement des coupons d'acier dans les cas A et B mais pas dans le C. « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

Figure 60: noircissement de l'intérieur et de la surface de la carotte d'argilite dans les cas A et B par comparaison à une carotte à l'état initiale. « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX »

Figure 61: photo MEB des sections polies des coupons montrant un aspect de corrosion par piqure dans les cas A et B mais pas dans le C. « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

Figure 62 spectre EDS des coupons d'acier montrant la présence des sulfures de fer dans les cas A et B mais pas dans le C. « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

Figure 63 spectre  $\mu$ -Raman des coupons d'acier montrant la présence de la Mackinawite dans les cas A et B mais pas dans le C. « A : Eau de COX inoculée avec des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

Figure 64 : nombre des piqures en fonction de la profondeur dans les 3 cas A, B et C. « A : Eau de COX inoculée des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

Figure 65 : rôle essentiel des BSR dans le cycle du soufre.

Figure 66 : isotherme de température autour d'une alvéole.

## Liste des tableaux

Tableau 1 : classification Française des déchets radioactifs.

Tableau 2 : composition minéralogique de l'argilite du Callovo-Oxfordien (proportions pondérales)

Tableau 3 : composition de référence à 25°C des eaux porales du Callovo-Oxfordien calculée selon le modèle THERMOAR

Tableau 4 : composition en matière organique des eaux porales du Callovo-Oxfordien [111]

Tableau 5 : composition du milieu d'enrichissement des BSR ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)).

Tableau 6 : concentration d'éléments relâchés par l'argilite dans l'eau ultra pure après une semaine d'équilibrage.

Tableau 7 : bactéries sulfato-réductrices identifiées à partir des expériences d'enrichissement utilisant l'argilite du Callovo-Oxfordien.

Tableau 8 : spécification des compositions en pourcentages massiques des aciers P235GH.

Tableau 9 : spécification des caractéristiques mécaniques des aciers P235GH.

Tableau 10 : vitesse de corrosion moyenne (microns/an) en présence des BSR par comparaison à deux témoins stériles.

Tableau 11 : vitesse de corrosion moyenne des coupons transférés de la phase aérobie (continue et discontinue) en anaérobiose dans l'eau de COX en présence des BSR.

Tableau 12 : vitesse de corrosion moyenne en microns/an à différentes concentrations de sulfures

Tableau 13: vitesse de corrosion moyenne (microns/an) dans les 3 cas de cellule de percolation

Tableau 15 : concentration des éléments nutritifs en mol/m<sup>3</sup> dans chaque sous élément de colis de stockage

Tableau 14 : résultats des analyses au profilomètre optique 3D



---

## **ANNEXES**

---



## • Résultats

Résultats en rapport avec la figure 23 : diminution du taux de sulfate pendant la croissance bactérienne

Milieu d'enrichissement + COX

Jours	SO <sub>4</sub> mg/l	Erreur
0	973,5	20
4	1062	21
8	500	30
12	489	23
16	507,5	32

Bactéries enrichies + COX + eau de COX stérile

Jours	SO <sub>4</sub> mg/l	Erreur
0	1139	30
4	1198	31
8	876	27
12	913	24
16	825	21

COX+ eau de COX stérile + hydrogène

Jours	SO <sub>4</sub> mg/l	Erreur
0	1282	23
4	1210	24
8	1010	25
12	944	56
16	920	56

Témoin stérile

Jours	SO <sub>4</sub> mg/l	Erreur
0	1200	20
4	1128	25
8	1146	33
12	1111	26
16	1125	28

Résultats en rapport avec la figure 24 : production de sulfure suite à la réduction de sulfate par les BSR.

Jours	Sulfures mg/l		
	Milieu d'enrichissement + COX	Bactéries enrichies + COX + eau de COX stérile	COX+ eau de COX stérile + hydrogène
0	0,02	0,02	0,05
2	0,095	0,02	0,04
4	1,3	0,0025	0,08
6	1,7	0,15	0,22
8	2,1	0,63	0,36
10	2,17	1,13	1,25
12	2,3	1,2	1,51

Résultats en rapport avec la figure 24: Potentiel redox mesuré dans le milieu d'enrichissement en présence des BSR par comparaison à un témoin stérile

Jours	présence des BSR	Témoin stérile
0	19	20
4	-104	30
8	-144	45,6
12	-148	92
16	-121	100,8

Résultats en rapport avec la figure 25 : DO<sub>580</sub> de la croissance bactérienne dans les 3 cas de culture.

Jours	DO <sub>580nm</sub>		
	Milieu d'enrichissement + COX	Bactéries enrichies + COX + eau de COX stérile	COX+ eau de COX stérile + hydrogène
0	0,0111	0,0143	0,0103
2	0,0656	0,0552	0,0147
4	0,0717	0,1061	0,0173
6	0,0996	0,1046	0,03
8	0,11	0,0954	0,0711
10	0,1096	0,1109	0,092

Résultats en rapport avec la figure 55: concentration de sulfate en sortie de la cellule de percolation dans les 3 cas « A : Eau de COX inoculée des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »

**A : Eau de COX inoculée des BSR isolée du COX/ COX**

Jour	Sulfate mg/l	Erreur
0	1477	0,71
4	1442	0,7
8	1960	0,82
15	3000	1,1
18	3630	1,2
22	2850	1,14
25	2647	0,97
29	2334	0,9
31	2016	0,86
35	1875	0,8
39	1737	0,77
43	1632	0,74
56	1163	0,13
116	934	0,13
132	772	0,12
152	780	39
172	964	0,36
179	954	0,29

**B : Eau de COX stérile/ COX**

Jours	Sulfate mg/l	Erreur
0	1861	0,2
9	3820	0,2
32	2325	0,39
39	1539	0,3
51	1134	0,26
58	816	0,23
68	873	0,23
66	605	0,24
73	874	0,22
80	767	0,22
87	874	0,22
95	784	0,15
104	784	0,15
111	788	0,15
123	805	0,14
129	793	0,14
152	821	0,15
161	709	0,14
170	793	0,15

**C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile**

Jours	Sulfate mg/l	Erreur
0	1482	0,37
10	3756	0,27
24	2365	0,22
35	1611	0,2
45	1470	0,21
59	1513	0,21
66	1539	0,21
71	1466	0,46
78	1458	0,46
89	1460	0,46
111	1505	0,47

Résultats en rapport avec la figure 56: concentrations de sulfures en sortie de la cellule de percolation dans les cas A: Eau de COX inoculée des BSR isolées du COX/ COX et B : Eau de COX stérile/ COX. Pas de production de sulfures dans le cas C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile.

**A: Eau de COX inoculée des BSR isolée du COX/ COX**

Jours	Sulfures mg/l
0	0,74
4	0,8
8	0,74
15	0,82
18	1,16
22	0,94
25	1,14
29	1,34
31	1,1
35	1,52
39	1,04
43	1,28
47	1,14
51	1,2
69	1,5
151	2
163	1,99
193	2,01

**B : Eau de COX stérile/ COX**

Jours	Sulfures mg/l
0	0
9	0
32	0
39	0
51	0,02
58	0,023
68	0,053
73	0,12
80	0,11
94	0,15
117	0,38
152	0,723
170	0,691
193	0,801

Résultats en rapport avec la figure 57 : concentration d'acétates en sortie de la cellule de percolation dans les cas A: Eau de COX inoculée des BSR isolée du COX/ COX et B : Eau de COX stérile/ COX. Pas de production d'acétate dans le cas C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile.

**A: Eau de COX inoculée des BSR  
iolée du COX/ COX**

Jours	Acétate mg/l	Erreur
0	40	0,14
4	39	0,14
8	45	0,14
15	45	0
18	44	0
22	42	0,14
25	96	0,14
29	113	0,15
31	75	0,14
35	77	0,14
39	64	0,14
43	57	0,16
56	86	0,21
116	492	0,21
132	463	0,2
152	377	0,14
172	564	0,16
179	314	0,12

**B : Eau de COX stérile/ COX**

Jours	Acétate mg/l	Erreur
0	0	0,01
9	0	0,09
32	2,4849	0,01
39	6,9548	0,184
51	8,5233	0,06
58	8,9895	0,045
68	10,2521	0,02
66	8,1634	0,02
73	11,16	0,34
80	11,09	0,34
87	31	0,34
95	144,2	0,57
104	204,2	0,68
111	206,7	0,72
123	206	0,72
129	149	0,56
152	162	0,51
161	193,2	0,66
170	151,9	0,59

Résultats en rapport avec la figure 58: concentration de fer en sortie de la cellule de percolation dans les cas A: Eau de COX inoculée des BSR isolée du COX/ COX et C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile.

**A: Eau de COX inoculée des BSR  
ioulée du COX/ COX**

**C : Témoin stérile : Eau de  
COX stérile/ COX stérile**

Jours	Fer mg/l	Erreur
0	4,1	0,03
4	5,0	0,02
8	5,9	0,03
15	0,9	0,01
18	1,9	0,01
22	3,5	0,03
25	0,9	0,01
29	2,1	0,01
31	3,3	0,02
35	1,4	0,05
39	0,5	0,02
43	0,05	0
56	0	0
116	0	0
132	0	0
147	0	0
154	0,12	0,009
179	0	0
186	0,10	0,029
193	0,1	0,02
201	0,1	0,06

Jours	Fer mg/l	Erreur
0	0,003	0,14
10	0,003	0,14
63	2,9	0,24
106,4	0,6	0,024
115	0,5	0,58
132	5,9	0,24

**Résultats en rapport avec la figure 64 : nombre des piqûres en fonction de la profondeur dans les 3 cas A, B et C. « A : Eau de COX inoculée des BSR isolées du COX/ COX ; B : Eau de COX stérile/ COX ; C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/ COX stérile »**

**A : Eau de COX inoculée des BSR isolées du COX/+COX.**

Profondeur de piqûres (µm)		Nbr de piqûres
0	4	307
4	8	1275
8	12	299
12	16	126
16	20	26
20	24	16
24	28	3

**B : Eau de COX stérile/+COX.**

Profondeur de piqûres (µm)		Nbr de piqûres
0	4	738
4	8	375
8	12	24
12	16	1

**C : Témoin stérile : Eau de COX stérile/+COX stérile**

Profondeur de piqûres (µm)		Nbr de piqûres
0	4	527
4	8	292
8	12	14
12	16	4
16	20	1

• **Loi de 28 juin 2006, continuité de la loi n° 91-1381 du 30 décembre 1991 relative aux recherches sur la gestion des déchets radioactifs**

Origine de la loi du 28 juin 2006 : la Loi « Bataille »

En France, c'est le vote d'une loi spécifique, le 30 décembre 1991 (dite « loi Bataille »), qui a initié un vaste programme de recherches sur la gestion des déchets hautement radioactifs, en fixant trois axes de recherche. Cette loi a aussi encadré d'autres éléments relatifs à la gestion des déchets radioactifs, notamment en termes de transparence, de procédures réglementaires, de participation du public, et d'organisation de la gestion des déchets : elle a ainsi fixé un certain nombre de principes et apporté de nombreuses garanties en ce qui concerne tant la rigueur que la transparence de la démarche. Il s'agit donc d'une loi fondatrice en matière de gestion des déchets radioactifs, et c'est ce cadre juridique qui a été refondu en 2006, après 15 ans de retour d'expérience, à travers la « loi déchets » du 28 juin 2006.

Adoption de la loi Bataille

La loi n°91-1381 du 30 décembre 1991 (par la suite codifiée au L. 542-1 et suivants du Code de l'environnement), appelée également « loi Bataille » (du nom de son rapporteur, le Député du Nord Christian Bataille), est la première loi à avoir fixé les grandes orientations relatives aux recherches sur la gestion des déchets radioactifs de haute activité et à vie longue.

Des recherches diversifiées

Cette loi prévoyait que des recherches seraient conduites selon trois axes, de manière à ce que le Parlement dispose de l'ensemble des données scientifiques nécessaires à une prise de décision, concernant l'éventuelle autorisation d'un centre de stockage géologique de déchets radioactifs. Ces trois axes de recherche (les seuls possibles, une fois écartés l'envoi dans l'espace, trop hasardeux, et l'injection dans les failles de subduction sous-marine, exclue par les conventions internationales) étaient les suivants :

**Axe 1 : la séparation et la transmutation des éléments radioactifs à vie longue.** Il s'agit d'étudier la possibilité de réduire le volume et la nocivité de ces déchets, en séparant les éléments à vie longue et en les transformant en éléments radioactifs de plus faible activité ou de durée de vie plus courte ;

**Axe 2 : les possibilités de stockage dans les formations géologiques profondes.** Il s'agit de démontrer l'aptitude géologique de ces formations à stocker, dans des conditions de sûreté optimales, les déchets hautement radioactifs et à durée de vie longue. Cette démonstration est menée en s'appuyant sur des résultats expérimentaux obtenus dans des laboratoires souterrains (à quelques centaines de mètres) à vocation uniquement de recherche et dans lesquels le stockage de déchets radioactifs est explicitement interdit. Ces laboratoires de recherche permettent d'étudier in situ les roches en les qualifiant sur le plan mécanique, chimique, hydrogéologique et thermique.

**Axe 3 : l'étude de procédés de conditionnement et d'entreposage de longue durée en surface.** Contrairement au stockage, l'entreposage est une solution provisoire, offrant une solution d'attente pour placer les déchets en sécurité sur une durée qui fait l'objet des recherches (à l'échelle de quelques dizaines voire centaines d'années), notamment dans la perspective de progrès scientifiques majeurs.

Dans le cadre de cette loi, les recherches sur le premier et le troisième axes étaient coordonnées par le Commissariat à l'énergie atomique (CEA), celles sur le second par l'Agence nationale pour la gestion des déchets radioactifs (Andra).

Un processus démocratique

La loi Bataille a donné un rôle important au Parlement en matière de décision. Il était ainsi prévu que, quinze ans après la promulgation de la loi (c'est à dire fin 2006), le Gouvernement transmettrait au Parlement un rapport global d'évaluation des recherches, accompagné d'un

projet de loi autorisant le cas échéant la création d'un centre de stockage des déchets radioactifs de haute activité à vie longue (déchets dits HAVL). Ce rapport serait établi par la Commission nationale d'évaluation (CNE), commission indépendante, chargée de l'évaluation scientifique des programmes de recherche. Par ailleurs, la loi a prévu l'établissement de rapports annuels d'analyse et de bilan des recherches en France comme à l'étranger.

En parallèle de l'évaluation scientifique par la CNE, le Parlement a exercé un contrôle de l'exécution de la loi du 30 décembre 1991, dont le suivi était confié à l'Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques (OPECST).

Un processus réglementaire transparent

La loi Bataille a par ailleurs défini un processus réglementaire précis devant s'appliquer lors de la recherche d'un site pour un laboratoire souterrain de recherches. Elle a ainsi prévu que toute caractérisation géologique sur le terrain en vue de l'installation d'un laboratoire souterrain doit donner lieu à une mission de concertation préalable avec les élus et les populations concernées, mission dont les modalités sont fixées par décret. Ultérieurement, la loi et ses décrets d'application ont prévu l'organisation d'une enquête publique et d'une consultation des collectivités locales concernées (communes, département, région) sur un dossier de demande d'autorisation d'installer et d'exploiter un laboratoire.

En outre, la loi a défini un statut juridique spécifique pour les laboratoires souterrains de recherches, dont les autorisations d'installation et d'exploitation, accordées à l'issue d'une étude d'impact et de l'enquête publique précitée, sont subordonnées à un décret en Conseil d'Etat.

L'information et la participation des populations

La création d'un Comité local d'information et de suivi (CLIS) autour de chaque laboratoire était prévue par la loi pour informer sur les objectifs, la nature, l'avancement et les résultats des recherches qui y sont effectuées. Présidé par le Préfet du département d'accueil, il était composé de représentants de l'Etat, de parlementaires, d'élus locaux, de membres d'associations, de représentants d'associations socioprofessionnelles. Ce Comité pouvait saisir la CNE ou faire procéder à des contre-expertises.

Un CLIS a ainsi été mis en place autour du laboratoire souterrain de Bure-Saudron en Meuse / Haute-Marne (finalement le seul laboratoire créé). La composition et les missions du CLIS ont depuis été revues par la loi du 28 juin 2006.

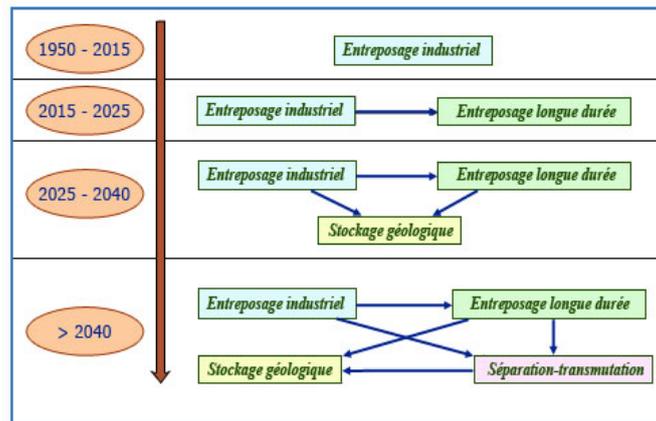
Les mesures d'accompagnement économique

La loi a également prévu des mesures d'accompagnement économique autour des laboratoires souterrains. En particulier, la loi a prévu la constitution de groupements d'intérêt public (GIP) permettant de mener des actions d'accompagnement et de gérer des équipements de nature à favoriser et à faciliter l'installation et l'exploitation de chaque laboratoire.

La création de l'Andra

La loi de 1991 a permis la création d'un établissement public en charge de la gestion à long terme des déchets radioactifs : l'Andra, l'Agence Nationale pour la gestion des Déchets RADioactifs ([www.Andra.fr](http://www.Andra.fr)). La création de l'Andra a conduit à la séparation et à l'autonomie de cet ancien département du CEA. Les missions précises de cet établissement ont été définies dans le décret n°92-1391 du 30 décembre 1992 (missions depuis complétées par la loi du 28 juin 2006).

• **Calendrier de gestion des déchets radioactifs de haute radioactivité et à vie longue.**



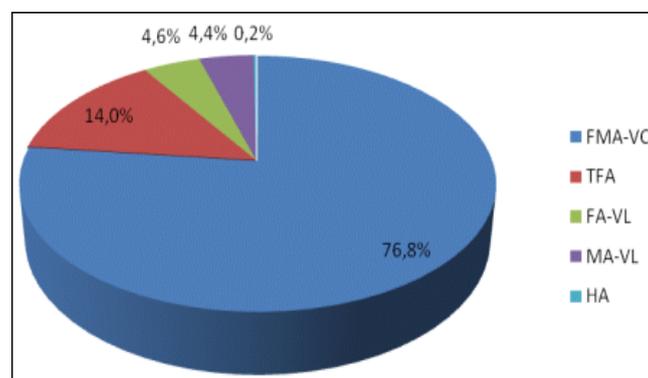
Ce calendrier, montre les options qui seraient ouvertes à l’avenir dans la gestion des déchets radioactifs du fait des dispositions proposées. Alors qu’aujourd’hui la seule option disponible pour les déchets de haute activité est leur entreposage comme celui pratiqué à la Hague, on disposerait après 2040, de toute la gamme des options avec le stockage géologique, l’entreposage de longue durée et la séparation-transmutation. ©OPCST

• **Répartition des déchets radioactifs**

les déchets sont classés en cinq catégories :

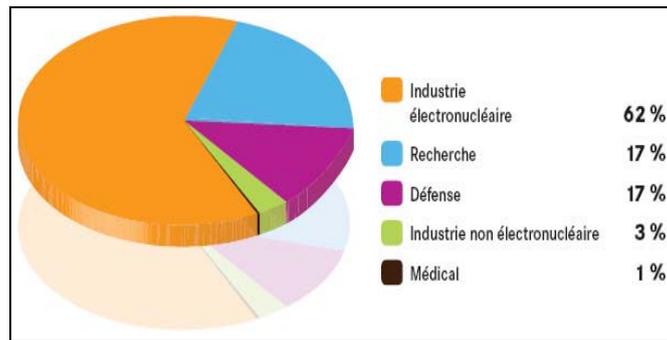
- 1. Haute activité HA
- 2. Moyenne activité à vie longue MA-VL
- 3. Faible et moyenne activité à vie courte FMA-VC
- 4. Faible activité à vie longue FA-VL
- 5. Très faible activité TFA

On obtient la répartition en volume suivante :



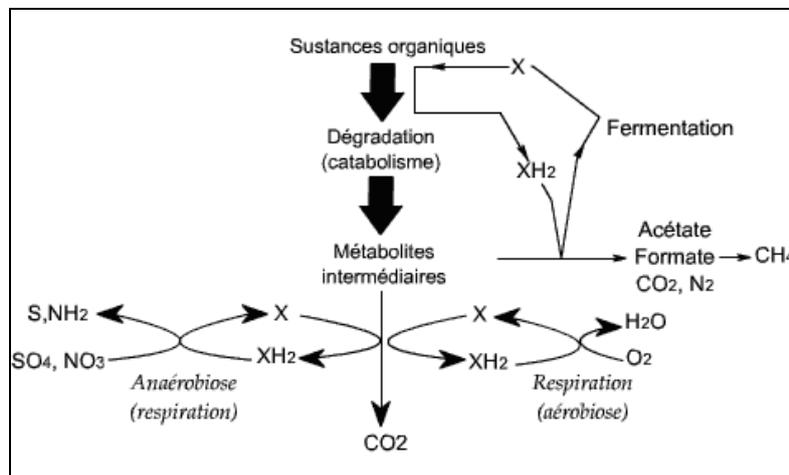
Volume par catégorie pour un total d’environ 1 millions de m3 en 2004

[www.Andra.fr](http://www.Andra.fr)



Estimation de la répartition des déchets radioactifs existant à fin 2007 par secteur économique en France, en volume

• Schéma général du métabolisme bactérien des composés organiques.



• Corrosion en présence des BSR (Hypothèse de dépolarisation cathodique)

