



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Master 2 GPRE - Sols, Eaux et Environnement

RAPPORT DE STAGE

Cinétique de l'utilisation microbienne du dihydrogène sous hautes pressions

Enseignant encadrant : Frédéric Jorand (LCPME)

Co-encadrant : Laurent Truche (G2R)

Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord Monsieur Alain WALCARIUS, Directeur du LCPME de m'avoir permis d'y effectuer mon stage.

Merci à mon encadrant, Frédéric Jorand de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Je le remercie pour l'intérêt qu'il a porté à mon étude ainsi que pour ses conseils et le temps qu'il m'a accordé pendant toute la durée de ce stage.

Je tiens à remercier également Laurent Truche pour tout l'aspect haute pression et hydrogène de mon stage ainsi que pour son encadrement, ses conseils, le temps, le matériel et la place qu'il m'a accordé au G2R.

Merci également à Marjorie Etique pour l'aide apportée pour le traitement des données cinétiques mais aussi pour nos nombreuses discussions et pour sa bonne humeur.

Merci à Paul-Philippe Remy, Baptiste Maitte et Jean-Sebastien Mondy de m'avoir fait une place dans leur bureau et aussi pour leurs conseils, leur bonne humeur et les bons moments passés ensemble.

Merci au bureau A630 du G2R et de ces occupants pour les quelques pauses reconstructives

Enfin je remercie l'ensemble du personnel du LCPME pour son accueil et sa sympathie.

Sommaire

1. Introduction	3
1.1 Le stockage de l'hydrogène	3
1.2 Les bactéries extrémophiles et hydrogénotrophes.....	4
1.1.1 La pression hydrostatique	5
1.1.2 Les hydrogénotrophes	5
1.1.3 <i>Shewanella oneidensis</i>	7
2. Matériels et méthodes	9
2.1 Synthèse de la lépidocrocite.....	9
2.2 Préparation de la suspension bactérienne.....	9
2.3 Bioréduction du Fe ^{III} par oxydation de l'hydrogène	9
2.3.1 Bioréduction à basse pression	9
2.3.2 Bioréduction à haute pression.....	10
2.4 Dosage du fer.....	11
2.5 Dénombrement et intégrité des bactéries	11
2.6 Caractérisation des solides par diffraction aux rayons X.....	12
3. Résultats	13
3.1 Bioréduction du Fe ^{III} à basse pression	13
3.2 Bioréduction de Fe ^{III} à haute pression	14
3.3 Dénombrement des cellules et estimation de l'intégrité membranaire.....	15
3.3.1 La concentration bactérienne.....	15
3.3.2 L'intégrité membranaire.....	16
3.3.3 Effets de la décompression.....	17
4. Discussion	19
4.1 Bioréduction du Fe ^{III} à basse pression	19
4.2 Bioréduction du Fe ^{III} à haute pression.....	19
4.3 Concentration bactérienne.....	20
5. Conclusion et perspectives.....	23
6. Références	25
7. Annexes	29

Tables des illustrations

Figure 1 : Autoclave utilisé pour la bioréduction à haute pression.....	10
Figure 2 : Vanne de prélèvement de l'autoclave reliée au capillaire de silice.....	12
Figure 3 : Evolution de la concentration en Fe^{II} au cours du temps à une pression de 2 bars, incubés à 30 °C. a) témoins : sans bactéries, sans hydrogène et sans fer ; b) Flacons de bioréduction contenant $3,9 \pm 1.2 \times 10^9$ ($n=5$) cellules mL^{-1} , H_2 en tant que donneur d'électrons et du Fe^{III} -citrate (soluble) ou de la lépidocrocite (solide)	13
Figure 4 : Evolution de la concentration en Fe^{II} en fonction du temps à 3, 45 et 100 bars	14
Figure 5 : Evolution de la concentration en cellules au cours du temps à 3, 45 et 100 bars	15
Figure 6 : Proportion de cellules non intègres par rapport au nombre total de cellules. « To » correspond en fait à un prélèvement effectué après 15 à 30 min de mise en pression.....	16
Tableau 1 : Processus métaboliques de base de l'utilisation d' H_2 par divers groupes de bactéries en présence de différents accepteurs d'électrons. Énergies libres de Gibbs en conditions standards (Amend et Choc, 2001).	6
Tableau 2 : Composition des flacons de bioréduction du Fe^{III} ($V_{total}= 50$ mL). Fe^{III} -citrate est soluble et γ - $FeOOH$ est sous forme solide.....	9
Tableau 3 : Composition des autoclaves à hautes pressions contenant 40 mL de Fe^{III} -citrate (50 mM), 60 mL de milieu de base ($V_{total}=100$ mL).....	11
Tableau 4 : Récapitulatif des vitesses de production du Fe^{II} et de consommation de l' H_2 à 2 bars d' H_2	14
Tableau 5 : Vitesse de consommation de l' H_2 par unité de biomasse à 3, 45 et 100 bars.....	15
Tableau 6 : Comparaison du nombre de cellules cultivables (UFC mL^{-1}) au nombre de cellules intègres (cellules mL^{-1}) à 45 et 100 bars après 72 heures d'incubation	17

Préambule

Le Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME, UMR 7564-CNRS-Université de Lorraine à Villers-lès-Nancy) a pour mission d'étudier les réactions physico-chimiques et microbiologiques aux interfaces eau-solide dans l'environnement. Les principales études portent sur les phénomènes d'interactions entre espèces dissoutes et aux interfaces, le transport des polluants organiques et minéraux dans les milieux naturels, les mécanismes d'agrégations des microorganismes en milieu hydrique, la cohésion des agrégats formés ou encore, l'impact des paramètres expérimentaux sur l'organisation de ces agrégats. Pour atteindre ces objectifs, l'unité est organisée en 3 équipes : Chimie et Spectrochimie des Interfaces (CSI), Chimie et Electrochimie Analytique (ELAN) et Microbiologie Environnementale (MIC). Cette troisième unité s'intéresse à l'activité des microorganismes dans l'environnement par l'étude des capacités d'adhésion et d'agrégation des microorganismes sur des surfaces minérales ou biologiques, par la caractérisation des interactions bactériennes avec les oxydes de fer, ainsi que par l'identification des facteurs physico-chimiques et biologiques impliqués dans la survie de ces microorganismes dans l'environnement et au cours du traitement des eaux. Il comprend 8 enseignants chercheurs, 8 permanents techniques et administratifs (IATUS) et 9 thésards ou post-doc. Il est réparti en 3 sites : Villers-lès-Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy (Pôle de l'eau) et Nancy (Faculté de Pharmacie).

L'étude présentée dans ce mémoire a été réalisée au sein de l'équipe MIC en partenariat avec le laboratoire de Géologie et Gestion des Ressources Minérales et Energétiques (G2R, UMR 7566-CNRS-Université de Lorraine à Vandœuvre-lès-Nancy) et s'inscrit dans un projet nommé HYDROGEN soutenu par l'ICEEL (Institut Carnot Energie et développement en Lorraine, M. Panfilov, coordinateur, LEMTA). Ce projet a pour but de traiter les phénomènes d'auto-organisation dans le transport bio-réactif multicomposant en milieux poreux : en application aux stockages souterrains de l'hydrogène. Il regroupe cinq laboratoires nationaux dont le LCPME.

1. Introduction

Le di-hydrogène (H_2) présente plusieurs avantages en tant que source d'énergie capable de compenser le déficit des énergies fossiles ; aussi bien d'un point de vue économique (haut potentiel calorifique, transport efficace, ressource illimitée) qu'écologique (pas d'émissions de CO_2) ou encore géopolitique (réduction de la dépendance des pays producteurs du pétrole).

A l'heure actuelle, la production de l'hydrogène et sa distribution ne représentent plus de problèmes techniques majeurs (*Large Hydrogen Underground Storage* ; 2011). L'industrie pourra produire de grands volumes d'hydrogène qui seront transportés aux consommateurs et stockés temporairement afin de régulariser la différence entre la production et la demande. Le stockage géologique de ce gaz dans les aquifères ou les cavités salines est considéré aujourd'hui comme la méthode la plus rentable pour les grands volumes, mais sa stabilité au cours du temps reste encore à explorer (Lord, 2009). En effet, l'hydrogène étant utilisé par les bactéries en tant que source d'électrons (bactéries hydrogénotrophes), il est probable que ces dernières provoquent ou contribuent au changement de la composition du gaz dans le réservoir. Ainsi, chez certaines bactéries ferriréductrices, l'oxydation de l'hydrogène est couplée à la réduction de Fe^{III} en Fe^{II} , l'énergie issue de ces réactions est convertie en énergie cellulaire pour les besoins du métabolisme. D'autres groupes métaboliques microbiens, tels que les bactéries méthanogènes, couplent l'oxydation de H_2 à la réduction de petites molécules carbonées telles que CO_2 ou acétate. Ces bactéries pourraient être actives dans les conditions physico-chimiques des zones de stockage, i.e. anaérobies, température élevée ($> 50^\circ C$), fortes pressions ($>$ plusieurs dizaines de bars).

Après avoir décrit le contexte du stockage de l'hydrogène, nous présenterons une analyse de la littérature sur les bactéries hydrogénotrophes, puis la partie expérimentale de ce projet, qui visera avant tout à évaluer des cinétiques de consommation de l'hydrogène sous hautes pressions.

1.1 Le stockage de l'hydrogène

Depuis les années 70, les énergies renouvelables sont recherchées pour pallier au déficit des énergies fossiles. Ces énergies renouvelables telles que l'énergie solaire ou éolienne sont fournies par des ressources naturelles comme le vent, l'eau ou le soleil et permettent de produire de l'énergie électrique. Elles sont appelées « énergies propres » car elles ne puisent pas de carbone fossile et ne produisent donc pas de CO_2 contribuant à l'effet de serre (Panfilov, 2010). Elles ont l'avantage d'être disponibles en quantités illimitées car renouvelables, contrairement aux énergies fossiles. Par contre leur production est discontinue. Afin de gérer ces intermittences de production, des systèmes de stockages doivent être mis en œuvre.

L'énergie électrique ne pouvant être stockée, une alternative est de convertir l'énergie électrique en énergie stockable. Ainsi, le stockage géologique massif de l'hydrogène pourrait représenter une solution intéressante (Crotogino *et al.*, 2010), l'hydrogène ne représentant alors pas la source d'énergie mais le vecteur d'énergie, c'est-à-dire qu'il doit être transformé pour produire l'énergie utile.

L'hydrogène est le plus léger des gaz, avec une masse moléculaire de 2 g/mol, et il a la plus faible des densités (0,071 g/L à $0^\circ C$ et 1 atm). Il a le meilleur rapport énergie/poids par rapport à tous les combustibles et sa combustion ne produit que de la vapeur d'eau. En revanche, il est le plus inflammable et le plus explosif des gaz et à cause du faible rayon de sa molécule, il diffuse très facilement (Hollmuller, 2005).

Le stockage souterrain d'hydrogène n'est pas un concept nouveau puisque Stone *et al.* (2009) en 1976, lors d'une conférence (*World Hydrogen Energy*), comparaient le stockage de l'hydrogène dans le sous-sol avec celui du gaz naturel existant. Par ailleurs, une importante étude du stockage souterrain

d'hydrogène gazeux avait également été menée par le *Gas Technology Institute* (GTI) aux Etats-Unis en 1979 (Foh *et al.*, 1979).

Au cours des dernières décennies, il y a eu plusieurs cas de stockages souterrains d'hydrogène (Panfilov, 2006 ; Bulatov, 1979; Carden and Paterson, 1979; Lindblom, 1985; Paterson, 1983). Citons l'exemple du stockage d'H₂ pur dans le sol russe à 90 bars pour les besoins de l'industrie aérospatiale (Ponomarev-Stepnoi, 2004). Ces exemples ont montré que le stockage d'hydrogène ne présente pas de particularité majeure par rapport au stockage de gaz naturel. Cela reste le moyen le moins coûteux pour stocker de grandes quantités d'hydrogène gazeux (Taylor *et al.*, 1986).

Stone *et al.* (2009) ont récemment fait un recensement des structures pouvant contenir de l'hydrogène. Il peut être stocké dans des cavités salines, dans des aquifères, ou encore adsorbé sur les minéraux dans les pores de la roche encaissante et sous formes d'hydrure. Il reste néanmoins, pour ce type de stockage, à mieux connaître et à mieux comprendre les phénomènes qui pourraient altérer la ressource en quantité et en qualité. Il peut s'agir des fuites liées à la grande mobilité de la molécule d'hydrogène, des phénomènes diffusifs au travers des encaissants (sel, marnes, argiles) ainsi que les processus de bioconsommation de l'hydrogène.

C'est ce dernier point qui fera l'objet du travail présenté ici à savoir si l'hydrogène peut être utilisé par les microorganismes présents dans les sites de stockage et à quelle vitesse. Du fait de la pression et de la température très différente de celles de la surface terrestre, les conditions régnant à ces profondeurs sont dites « extrêmes », et les microorganismes capables de s'y développer « extrémophiles ». Parmi ces derniers, certains sont hydrogénotrophes.

1.2 Les bactéries extrémophiles et hydrogénotrophes

La présence de microorganismes dans les sous-sols terrestres, les sources chaudes continentales et les réservoirs pétroliers a été mise en évidence depuis plusieurs années par des études géochimiques, biologiques, hydrologiques et géophysiques (Chapelle et Lovley, 1992 ; Jakobsen et Postma, 1994 ; Chapelle *et al.*, 1996). Cette biosphère profonde active marine ou continentale suscite un grand intérêt chez les biologistes ainsi que chez les géologues. Les approches microbiologiques ont rapidement permis de décrire un grand nombre de nouveaux genres et de nouvelles espèces microbiennes appartenant à des métabolismes variés : hydrogénotrophes, thermophiles et hyperthermophiles aérobies et anaérobies, piézophiles, piéztolérants, ferriréducteurs, etc. Ces microorganismes sont capables de subvenir à leur fonctions vitales dans les environnements extrêmes de hautes températures (50 à 100 °C) et de moyenne à haute pression (>1 bars) en présence d'énergie, de nutriments et d'électrons (Hunter *et al.*, 1998). Elles sont dites chimio-lithotrophes, c'est-à-dire qu'elles puisent leur énergie dans l'oxydation de substances minérales (hydrogène, composés azotés ou soufrés, fer ou oxyde de carbone) qui sont les donneurs d'électrons et utilisent une source de carbone inorganique. Ces bactéries peuvent vivre dans un environnement purement minéral.

Ces métabolismes ont souvent été étudiés notamment pour l'utilisation du fer en tant que donneur d'électrons.

Certains microorganismes sont capables de générer de l'énergie en couplant la réduction du Fe^{III} en Fe^{II} avec l'oxydation de matière organique (Lovley and Phillips, 1988 ; Myers and Nelson, 1988). Aujourd'hui, les oxydes de fer sont considérés comme les accepteurs d'électrons les plus abondants pour l'oxydation de la matière organique dans les environnements sédimentaires en anoxie (Nealson and Saffarini, 1994) plaçant la réduction du fer comme un processus biogéochimique important dans les sédiments, les sols submergés et les aquifères (Lovley and Chapelle, 1995 ; Canfield *et al.*, 1993).

1.1.1 La pression hydrostatique

La pression hydrostatique est, dans notre cas, la pression exercée dans un fluide sur un solide, une culture bactérienne en l'occurrence et plus précisément sur sa membrane.

Cette pression dépend de la profondeur. Ainsi, elle augmente de 10 MPa km⁻¹ dans une colonne d'eau et de 15 à 30 MPa km⁻¹ dans la lithosphère supérieure. Des microorganismes ont été détectés à une profondeur de 1 626 m sous le plancher océanique dans les sédiments au large de Terre-Neuve, soit une pression de 24,4 MPa (Roussel *et al.*, 2008). Ils sont donc capables de vivre dans des conditions de pression élevée. Ce sont des organismes dits piézophiles ou piézotolérants. DeLong *et al.* (1997) et Kato et Qureshi (1999) ont isolé et caractérisé six espèces de bactéries psychrophiles et piézophiles : *Shewanella benthica*, *S. Violaca*, *Photobacterium profundum*, *Colwellia hadaliensis*, *Moritella japonica* et *M. yayanosii*.

La pression hydrostatique est un paramètre qui peut influencer l'activité microbienne et qui est étudié depuis le milieu du 20^{ème} siècle. En 1979, la première souche de bactérie (souche CNPT-3) adaptée à la pression a été isolée par Yayanos *et al.* (1979). Aujourd'hui, l'amélioration de l'échantillonnage et l'instrumentation en laboratoire permettent d'étudier les processus moléculaires liés à la croissance et à la survie des microorganismes dans les océans profonds (Allens and Bartlett, 2010). L'effet de la pression sur la membrane cellulaire, les protéines et l'expression des gènes sont étudiés en détail chez ces organismes. Les faibles températures et les pressions élevées diminuent la fluidité membranaire et affectent les processus associés à la membrane comme les flux d'ions et des éléments nutritifs et associés à la réplication d'ADN (Bartlett, 1992).

Il a été montré que plusieurs microorganismes supportant ou vivant à des pressions élevées synthétisent des acides gras poly-insaturés dans leur membrane cellulaire tels que l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosaénoïque qui permettent de conserver la structure et la perméabilité de la membrane cellulaire à basse température et/ou haute pression (Kamimura *et al.*, 1993 ; Fang *et al.*, 2000). La pression hydrostatique influe également sur l'abondance des protéines de surface cellulaire. Une bactérie modérément barophile, *Photobacterium* SS9 régule l'abondance de protéines (OMP) sur leur membrane externe en réponse à la pression hydrostatique (Chi et Bartlett, 1993). D'autres du genre *Shewanella* spp. possèdent un opéron régulé par la pression (Nakasone *et al.*, 1998).

1.1.2 Les hydrogénotrophes

De nombreux microorganismes sont également capables d'utiliser H₂ comme donneur d'électrons. La consommation microbienne de l'hydrogène est peu étudiée par rapport à la bioproduction de ce gaz pour des besoins industriels.

Quelques études montrent néanmoins que certaines bactéries appartenant à différents groupes métaboliques (méthanogènes, sulfato-réductrices, ferriréductrices et homoacétogéniques) sont capables de consommer l'hydrogène en anaérobie ou en aérobie (Tableau 1) (Ruwisch *et al.*, 1988 ; Libert *et al.*, 2011).

Tableau 1 : Processus métaboliques de base de l'utilisation d'H₂ par divers groupes de bactéries en présence de différents accepteurs d'électrons. Énergies libres de Gibbs en conditions standards (Amend et Choc, 2001).

Groupes métaboliques	Réaction	ΔG ⁰ kJ / mole electron (25°C)
Bactérie aérobie oxydant l'hydrogène (e.g. : <i>Ralstonia sp.</i>)	2H ₂ + O ₂ = 2H ₂ O	-119,1
Bactérie dénitrifiante (e.g. : <i>Paracoccus denitrificans</i>)	5H ₂ + 2 NO ₃ ⁻ + 2H ⁺ = N ₂ + 6H ₂ O	-118
Bactérie ferri-réductrice (e.g. : <i>Shewanella sp.</i>)	H ₂ + 2FeOOH + 4H ⁺ = 2Fe ²⁺ + 4H ₂ O	-91,25
Bactérie sulfato-réductrice (e.g. : <i>Desulfovibrio sp.</i>)	4H ₂ + SO ₄ ²⁻ + 2H ⁺ = H ₂ S + 4H ₂ O	-24
Bactérie méthanogène (e.g. : <i>Methanobacterium sp.</i>)	4H ₂ + CO ₂ = CH ₄ + 2H ₂ O	-21,95
Bactérie acétogène (e.g. : <i>Acetobacterium sp.</i>)	4H ₂ + 2CO ₂ = CH ₃ COOH + 2H ₂ O	-18

Parmi ces bactéries, des ferriréductrices sont capables d'utiliser le Fe^{III} comme accepteur d'électrons et de le réduire en Fe^{II} en présence d'hydrogène comme seul donneur d'électron (Lovley *et al.*, 1999 ; Vargas *et al.*, 1998 ; Slobodkin *et al.*, 1999). Chez *E. coli*, cette réaction peut être couplée à une navette à électrons ou un médiateur appelé le rouge neutre, une biomolécule réduite par une hydrogénase au travers de la membrane cytoplasmique (McKinlay and Zeikus, 2004) mais ne permettrait pas de supporter la croissance de la bactérie.

D'autres bactéries comme *Pyrobaculum islandicum*, *Thermotoga maritima*, *Pyrococcus furiosus* et *Shewanella spp.* sont capables de réduire un oxyde de fer en présence d'hydrogène (Vargas *et al.*, 1998 ; Libert *et al.*, 2011 ; Zegeye *et al.*, 2005). La réduction du Fe^{III} par ces bactéries peut alors conduire à la formation d'oxydes de fer mixtes : magnétite (Fe₃O₄) ou rouille verte (« Fe₅OH₁₂ »)(Zang *et al.* 1997 ; Zegeye *et al.* ; 2005).

Zegeye *et al.*(2005) ont montré qu'en présence de différentes concentrations en lépidocrocite (γ-FeOOH) (de 30 à 100 mM) comme accepteur d'électrons et H₂ comme seul donneur d'électrons, à pression atmosphérique et 30 °C, *Shewanella putrefaciens* réduit le Fe^{III} avec une vitesse de 0,05 à 0,12 mM Fe^{II} h⁻¹. Ils ont montré également une diminution de la cultivabilité au cours du temps. La densité cellulaire initiale était de 1,8×10⁸ UFC mL⁻¹ et diminue jusqu'à 10⁶ UFC mL⁻¹ au bout de 14 jours. Cela pourrait provenir du manque de nutriments puisque ni carbone ni phosphate n'ont été ajoutés. Ou les UFC ont été sous-estimées du fait d'interactions entre les oxydes de fer et les bactéries.

1.1.3 *Shewanella oneidensis*

L'espèce *Shewanella oneidensis* MR-1 a été choisie comme souche piezosensible de référence car c'est l'une des espèces de bactéries ferriréductrices mésophiles la plus caractérisée.

Cette espèce a été isolée dans le lac Oneida (état de New York, USA) et dans la Mer Noire (Myers and Nealson, 1988 ; Nealson *et al.*, 1991) où elle peut atteindre des concentrations atteignant 10^5 cellules/ml.

En anaérobiose, plusieurs espèces du genre *Shewanella* sont aptes à réduire un certain nombre de composés comme accepteur d'électrons incluant le *N*-oxyde de triméthylamine, le soufre, l'oxyde de manganèse, l'oxyde de chrome, le fer, l'uranium, le thiosulfate ou l'oxyde de fer et cette réduction est couplée à la production d'énergie. C'est d'ailleurs l'étude de la souche MR-1 (souche type de *Shewanella oneidensis*) qui a permis de démontrer que la réduction de l'oxyde de fer ou de l'oxyde de manganèse pouvait être couplée à une production d'énergie (Myers and Nealson, 1990).

S. oneidensis est constitués de bacilles non sporulants à coloration de gram négative, de 2 à 4 μm de longueur sur 0,4 à 1 μm de diamètre, mobiles grâce à un unique flagelle polaire (Venkateswaran *et al.*, 1999). Sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 40°C et elle est neutrophile pour le pH. Elle est non fermentaire et à respiration obligatoire.

D'autre part, les bactéries ferriréductrices du genre *Shewanella* ont été identifiées dans des environnements marins profonds vivant dans des conditions de pressions supérieures à 40 bars (Kato *et al.*, 1995 ; Ikegami *et al.*, 2000).

Une étude récente (Picard *et al.*, 2012) montre que *Shewanella oneidensis* (10^8 cellules mL^{-1}) incubée à 30°C dans un milieu complexe en présence de 5 mM de fer-citrate est capable de réduire le Fe^{III} jusqu'à des pressions de 1000 bars. Dans un milieu de culture à base de peptone et d'extrait de levure (donneurs d'électrons), elle réduit totalement le Fe^{III} jusqu'à 700 bars et au-dessus de 700 bars, le taux de réduction diminue avec l'augmentation de pression. Les vitesses initiales de réduction varient de 0,33 à 1,62 mM h^{-1} en fonction de la pression. Dans cette même étude, il est montré que le taux de croissance diminue avec l'augmentation de pression. A pression atmosphérique 100% des cellules cultivent alors qu'à 500 bars, aucune ne se développe. La difficulté de cette étude est l'étape de décompression des cellules qui n'est pas entièrement maîtrisée pour des raisons liées au protocole expérimental de mise sous pression.

Shewanella oneidensis a la capacité d'utiliser des substrats organiques comme donneur d'électrons ainsi que d'utiliser l'hydrogène moléculaire. Elle possède, en effet des hydrogénases au niveau de sa membrane externe permettant de fixer et d'oxyder H_2 et de récupérer les électrons de la réaction (Shi L. *et al.*, 2011 ; Heidelberg J.F. *et al.*, 2002).

Dans l'étude présentée ici, le Fe^{III} est choisi comme accepteur d'électron soit sous forme solide, soit sous forme soluble.

La forme solide est sous forme de lépidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$). C'est un oxyhydroxyde de Fe^{III} présent quasi exclusivement dans les sols hydromorphes faiblement drainés et connaissant une alternance saisonnière de conditions aérobie et anaérobie. En période pluvieuse, les conditions anaérobies se développent et amènent à la formation de Fe^{II} qui est oxydé au contact de l'air et précipite sous forme de lépidocrocite. Sa structure repose sur un assemblage octaédrique de $\text{FeO}_4(\text{OH})_2$ qui s'organise en feuillets ondulés (Gaboriaud et Ehrhardt, 2003). La forme soluble est représentée par du Fe^{III} -citrate.

La problématique de l'étude présentée ici vise à calculer la vitesse de consommation de l'hydrogène. N'ayant pas la possibilité de doser directement l' H_2 . C'est en dosant le Fe^{II} que la consommation d' H_2 a été obtenue indirectement sur la base de l'équation [1].



2. Matériels et méthodes

2.1 Synthèse de la lépidocrocite

La lépidocrocite (γ -FeOOH) est synthétisée selon la méthode décrite par Misawa *et al.*, (1974) par oxydation d'hydroxyde ferreux en milieu alcalin. Quarante gramme de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sont dissouts dans 500 mL d'eau distillée où sont progressivement ajoutés 1000 mL d'une solution de NaOH à 0,8 M. Afin d'optimiser l'oxygénation de la solution, la réaction se fait sous agitation magnétique (1200 rpm). Au cours de la réaction, le $\text{Fe}(\text{OH})_2$, en présence d' O_2 , se transforme peu à peu en rouille verte chlorurée, puis en oxyhydroxyde ferrique. Après environ 5h, le précipité obtenu est lavé deux fois par centrifugation puis séchée 48 h à 50°C. Enfin, il est finement broyé au mortier et caractérisé par diffraction aux rayons X (DRX).

2.2 Préparation de la suspension bactérienne

La souche utilisée est *Shewanella oneidensis* MR 1 (conservée à -80°C). Après deux subcultures sur milieu Trypcase Soy Agar (TSA) (BioMérieux), des colonies sont récoltées pour réaliser deux fois 200 mL de pré-culture dans du Trypcase Soy Broth (TSB) (BioMérieux) à 30°C sous une agitation de 160 rpm. Après 14h, un réacteur de 4L (Biolaflite) contenant 3L de milieu de culture TSB (BioMérieux) estensemencé par les deux erlenmeyers de 200 mL de pré-culture. Le milieu est agité à 300 rpm et aéré par barbotage d'air stérile à 30°C. A 24h, la phase stationnaire est atteinte, la totalité des cellules est alors collectée par centrifugation (10000 $\times g$, 10 min) et le culot est lavé deux fois par 40 mL de milieu de base exempt d' O_2 (préalablement dégazé à l'azote pendant 30 min).

Le culot bactérien est repris dans un volume de milieu de base suffisant pour obtenir une densité cellulaire d'environ 5×10^{10} cellules mL^{-1} estimée par mesure de la DO_{600} nm sur la base de la relation [2] (donnée interne au LCPME).

$$1 \text{ unité de } \text{DO}_{600} \approx 5,5 \times 10^8 \text{ cellules } \text{mL}^{-1} \quad [2]$$

2.3 Bioréduction du Fe^{III} par oxydation de l'hydrogène

2.3.1 Bioréduction à basse pression

Des essais sont réalisés à 2 bars avant ceux à haute pression pour comparer la réaction de réduction du fer dans les flacons de bioréduction à celle dans les autoclaves.

Afin de contrôler que la réduction du Fe^{III} ne peut pas être due à d'autres phénomènes que la bioréduction en présence d'hydrogène, différents témoins sont également réalisés. Un témoin sans bactérie, un témoin sans hydrogène et un témoin sans fer (Tableau 2).

Tableau 2 : Composition des flacons de bioréduction du Fe^{III} ($V_{\text{total}} = 50 \text{ mL}$). Fe^{III} -citrate est soluble et γ - FeOOH est sous forme solide

				Témoin sans fer	Témoins sans bactérie		Témoins sans hydrogène	
		Fer-citrate 50 mM	γ -FeOOH 300 mM		Fer-citrate 50 mM	γ -FeOOH 300 mM	Fer-citrate 50 mM	γ -FeOOH 300 mM
Hydrogène	bars	2	2	2	2	2	0	0
	mM	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	0	0
	cm^3	68	68	68	68	68	0	0
Densité bactérienne (cellules mL^{-1})		$3,9 \pm 1.2 \times 10^9$ (n=5)			0	0	$3,9 \pm 1.2 \times 10^9$ (n=5)	

Dans un réacteur de 100 mL est ajouté au milieu de base, dont la composition est détaillée dans l'annexe 1, un accepteur d'électrons : Fe^{III} , sous forme soluble (Fer-citrate) à 50 mM ou sous forme solide (lépidocrocite $\gamma\text{-FeOOH}$) à 300 mM. La lépidocrocite est dispersée par un traitement aux ultra-sons 2×20 secondes à 40 W dans 20 mL de milieu de base (sonde de 19 mm, VCX 600, Vivracell[®], Bioblock Scientific, Illkirch, France) afin de disperser les agrégats des particules de lépidocrocite. Les flacons sont alors stérilisés par la chaleur (121 °C) pendant 15 minutes.

La suspension bactérienne à 5×10^{10} cellules mL^{-1} est alors ajoutée afin d'obtenir une concentration d'environ 10^9 cellules mL^{-1} dans chaque flacon.

L'atmosphère est ensuite saturée en H_2 (100 %) par 15 min de barbotage puis la pression est ajustée à 2 bars d' H_2 (100%) contrôlé à l'aide d'un manomètre. Ce moment correspond au temps initial T_0 . Ce flacon contient 68 cm^3 d' H_2 ce qui correspond à 79,4 mM. Les flacons sont incubés à une température de 30°C.

Fe^{II} est mesuré au cours du temps, des prélèvements de 1 mL sont réalisés à l'aide d'une aiguille et d'une seringue de 1 mL directement placés dans 1mL d' H_2SO_4 (6M). La quantité d' H_2 métabolisé est calculée selon la stœchiométrie de la réaction [1] et selon le Fe^{III} consommé.

Pour obtenir une consommation d' H_2 par unité de biomasse, la concentration bactérienne est mesurée en microscopie à épifluorescence par comptage des cellules marquées par des fluorochromes (selon la procédure BacLight : Sybr Green et iodure de propidium) (voir section 2.5).

D'autres flacons sont réalisés en remplaçant le milieu de base par une solution de NaCl 0,9% en présence de fer-citrate (50 mM) ou de lépidocrocite (300 mM) pour évaluer l'influence des composants du milieu de base sur la bioréduction du Fe^{III} .

Des essais contenant une concentration croissante en lépidocrocite (100, 200, 300, 400 et 600 mM) sont suivis au cours du temps par la même méthode, pour déterminer l'influence de l'augmentation de Fe^{III} sur la cinétique de consommation de H_2 .

2.3.2 Bioréduction à haute pression

Après les différents témoins, la réaction de réduction du fer a été analysée à différentes pression (3, 45 et 100 bars) dans un autoclave en inox 316L équipé d'un seau en téflon permettant d'éviter tout contact entre la solution et la paroi de la cuve (Figure 1). Ce réacteur dispose d'une ligne de prélèvement des fluides et des gaz. La pression est contrôlée par un manomètre.

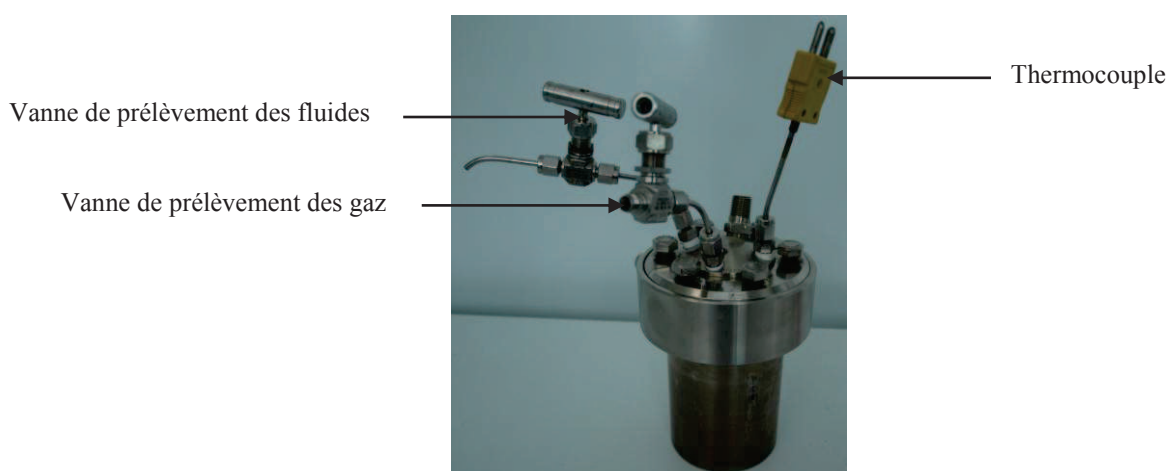


Figure 1 : Autoclave utilisé pour la bioréduction à haute pression

Chaque autoclave contient du milieu de base et du fer-citrate à 50 mM avant d'être stérilisé par la chaleur à 121 °C pendant 15 min. Une suspension bactérienne est ensuite ajoutée afin d'obtenir une concentration d'environ 10^9 cellules mL^{-1} .

L'atmosphère est ensuite saturée en hydrogène pur, dans un premier temps, par barbotage pendant 15 min (évacuation de l'O₂ dissous ou présent dans le ciel de gaz) puis la pression est ajustée à 3 bars (H₂ 100%). C'est à ce moment que le temps est décompté. Ce flacon contient 148 cm³d'H₂, ce qui correspond à 119 mM et à 2,3 mmole d'H₂ dissout. La pression à l'intérieur de l'autoclave est ensuite augmentée par ajout d'argon pur jusqu'aux valeurs indiquées dans le Tableau 3.

Les autoclaves sont incubés à 30 °C sans agitation dans un bain marie pendant 5 jours. La température est contrôlée à l'aide d'un thermocouple intégré et la pression est réajustée à 24 heures avec de l'argon 100 %.

Tableau 3 : Composition des autoclaves à hautes pressions contenant 40 mL de fer^{III}-citrate (50 mM), 60 mL de milieu de base (V_{total}=100 mL)

Pression totale	3 bars	45 bars	100 bars
Pression partielle en argon (bars)	0	42	97
Pression partielle en hydrogène (119 mM)	3	3	3
Concentration bactérienne (cellules mL ⁻¹)	4,5 × 10 ⁹ ± 0,2 (n=4)	4,5 × 10 ⁹ ± 0,2 (n=4)	4,5 × 10 ⁹ ± 0,2 (n=4)

De la même façon que pour les essais témoins, le Fe^{II} produit est dosé au cours du temps par prélèvement de 1 mL directement dans 1 mL d'H₂SO₄ (6M) grâce à des vannes de prélèvement montées sur l'autoclave. La concentration d'H₂ consommée est alors calculée à partir de la production de Fe^{II} dosée.

Des contrôles sans H₂ ou sans cellules permettent de s'assurer que la réduction de Fe^{II} est bien dépendante de la consommation d'H₂.

2.4 Dosage du fer

Le dosage du fer est réalisé à partir de prélèvements de 1 mL conservés à température ambiante à l'obscurité en présence de H₂SO₄ (3 M) afin de minimiser l'oxydation du Fe^{II} restant par l'O₂ et de solubiliser les solides à base de fer.

La méthode de dosage du fer utilisée est celle proposée par Fadrus et Maly (1975), par la phénanthroline. Cette méthode consiste à mesurer par spectrophotométrie, la présence d'un complexe stable formé entre le Fe²⁺ et la phénanthroline : la ferroïne. Dans des fioles de 50 mL, des prises d'essai contenant 0,02 à 1 mL sont mélangées à 10 mL d'une solution de phénanthroline (25 µM), glyocolle (0,5 M) et NTA (0,1 M). Le volume est ajusté à l'eau distillée et après 30 min à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 510 nm. La concentration dans l'échantillon testé est obtenue grâce à une droite étalon.

2.5 Dénombrement et intégrité des bactéries

Le nombre total de bactéries ainsi que le nombre de bactéries présentant une membrane intègre sont déterminés à l'aide de deux méthodes complémentaires.

- Le nombre total de cellules est déterminés par marquage au SYBR Green II, un fluorochrome spécifique des acides nucléiques qui colore toutes les cellules en vert. Ce marquage a l'avantage de pouvoir être effectué sur un échantillon prélevé quelques jours avant dans lequel 4 % de glutaraldéhyde ont été ajoutés lors du prélèvement pour fixer les bactéries.
- Le nombre de cellules présentant une membrane intègre est déterminé par le test LIVE/DEAD BacLight reposant sur deux colorants : le syto 9 et l'iodure de propidium (IP). Le premier colore les acides nucléiques de toutes les cellules en vert, le second colore ceux des cellules dont la membrane est altérée (perméable) en rouge. Par la suite les cellules rouges seront appelées « non intègres » et les cellules seulement vertes seront nommées « intègres ».

Lors du marquage au SYBR Green II, 10 μL de la solution mère diluée au $100^{\text{ème}}$ sont ajoutés à 1 mL d'échantillon. Alors que seulement 3 μL du mélange syto 9/IP sont ajoutés à 1 mL d'échantillon pour le marquage au BacLight. Le syto 9 (3,34 mM) est préalablement dilué par 2 et l'IP (20 mM) par 12. Pour les deux types de marquage, après 15 min à l'obscurité et à température ambiante, l'échantillon marqué est filtré sur membrane de nylon (0,22 μm) et rincée à l'eau apyrogène. La membrane est ensuite montée entre lame et lamelle avec une goutte d'huile de montage. L'observation est effectuée au microscope à épifluorescence. Environ 20 images sont traitées afin de dénombrer les cellules.

La totalité des cellules est d'abord dénombrée (verte et rouge) et représente le nombre total de bactéries dans l'échantillon. Et seules les cellules ayant une fluorescence rouge sont dénombrées comme étant des bactéries présentant une membrane altérée.

L'intégrité membranaire est également déterminée sur des prélèvements réalisés grâce à une vanne reliée à un capillaire de silice fin (diamètre interne de 100 μm) (Figure 2). Une goutte de BacLight est ajoutée et centrifugée préalablement dans ce capillaire. Ce système est conçu pour que les bactéries ne subissent pas la décompression lors du prélèvement et qu'elles soient marquées par les fluorochromes du BacLight (Syto 9 et IP) lors de leur contact avec le fluorochrome. Le capillaire est ensuite observé au microscope à épifluorescence pour constater l'état et l'intégrité des bactéries telles qu'elles se trouvent dans l'autoclave sous pression.

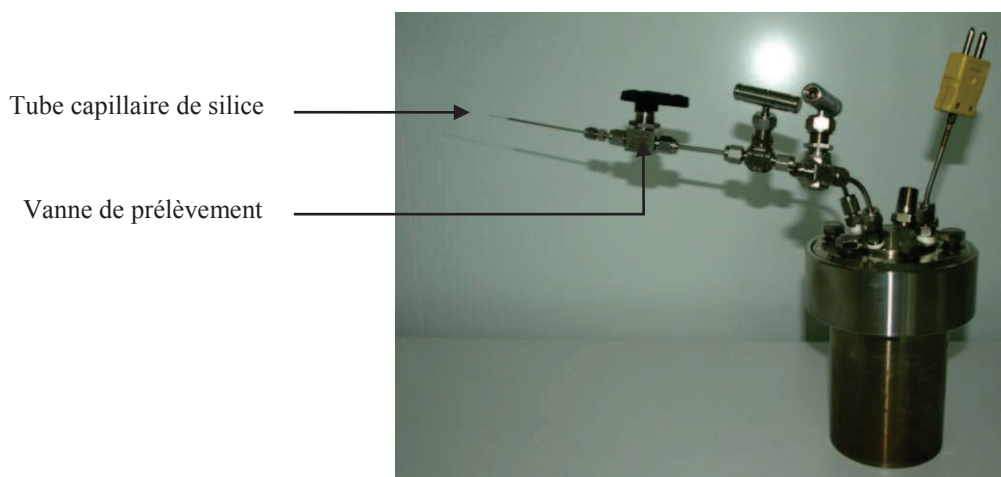


Figure 2 : Vanne de prélèvement de l'autoclave reliée au capillaire de silice

Un dénombrement en milieu solide est également réalisé afin de compter les UFC (unité formant colonie) qui indiquent le nombre de bactéries cultivables. L'étalement est réalisé par incorporation dans un milieu gélosé (Trypcase Soy Agar (TSA) (BioMérieux)) après dilution de l'échantillon prélevé. Une fois la gélose solidifiée, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 48 h à 30 °C.

2.6 Caractérisation des solides par diffraction aux rayons X

L'enregistrement des diffractogrammes se fait à température ambiante dans un intervalle de 3 à 64° pour 2θ en utilisant une anode au cobalt ($\lambda \text{ K}\alpha 1 = 0,17902 \text{ nm}$) par un diffractomètre D8 Bruker. Cette technique d'analyse permet théoriquement d'observer l'arrangement des atomes au sein des cristaux. Pour cela, l'échantillon sous forme de poudre est irradié par un rayonnement X émis par un tube possédant une longueur d'onde caractéristique du métal composant l'anode. Les rayons X sont diffractés par les cristaux présents dans l'échantillon puis détectés et leur intensité est mesurée. Il existe pour une longueur d'onde donnée, une correspondance entre l'angle de diffraction et la nature du réseau cristallin. L'analyse de ces données permet de caractériser le solide formé par cet arrangement de cristaux. Les mesures ont été réalisées au LEM (UMR 7569-CNRS-INPL à Vandœuvre-lès-Nancy).

3. Résultats

3.1 Bioréduction du Fe^{III} à basse pression

La réduction du Fe^{III} (solide et soluble) par les bactéries est suivie par dosage colorimétrique du Fe^{II} produit pendant 10 jours. Une série de contrôles permet de s'assurer que la réaction observée est bien spécifique de la présence d'hydrogène. Ces témoins sont réalisés à 2 bars et à 30 °C (Figure 3).

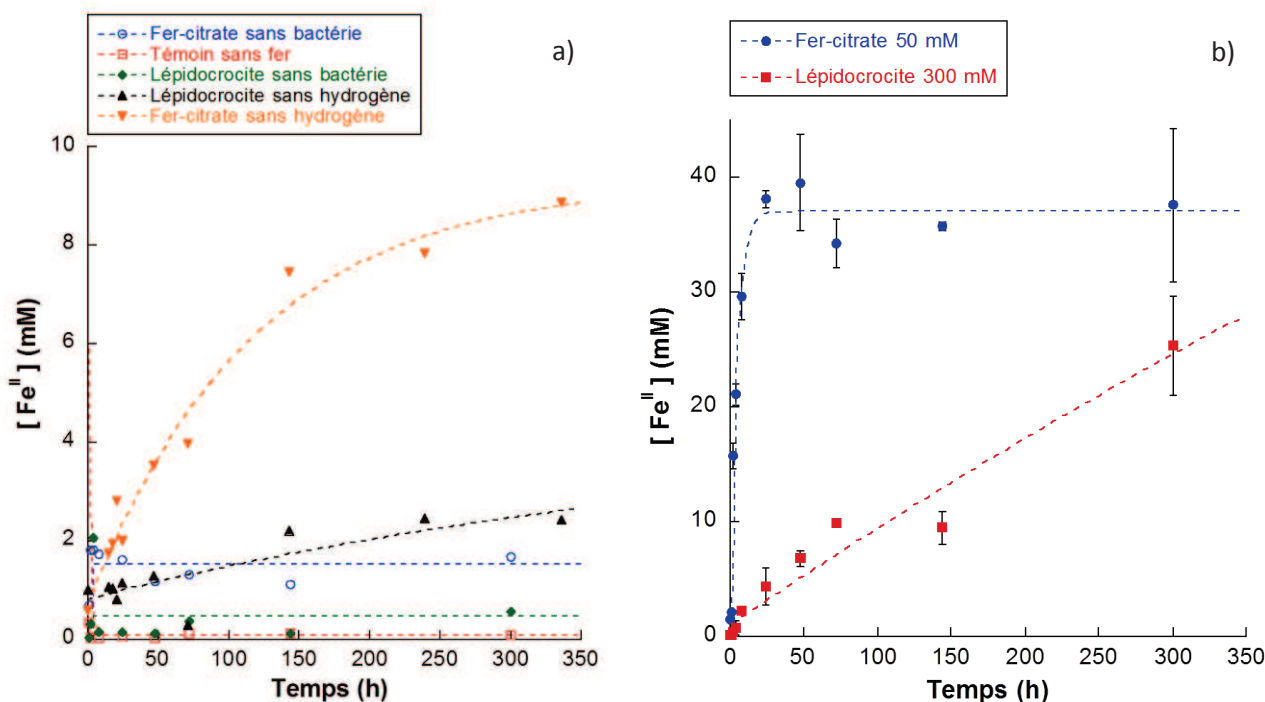


Figure 3 : Evolution de la concentration en Fe^{II} au cours du temps à une pression de 2 bars, incubés à 30 °C. a) témoins : sans bactéries, sans hydrogène et sans fer ; b) Flacons de bioréduction contenant $3,9 \pm 1,2 \times 10^9$ (n=5) cellules mL^{-1} , H_2 en tant que donneur d'électrons et du Fe^{III} -citrate (soluble) ou de la lépidocrocite (solide)

Lorsqu'il n'y a pas de bactérie, la concentration de Fe^{II} n'évolue pas significativement au cours du temps, que le Fe^{III} soit sous forme solide ou sous forme soluble (Fig. 3a). Sans H_2 mais avec 10^9 cellules mL^{-1} , la concentration en Fe^{II} augmente légèrement au cours du temps. Elle atteint 8,5 mM avec le Fe^{III} -citrate et 2,4 mM avec la lépidocrocite (Fig. 3a) ce qui correspond à un taux de réduction du Fe^{III} de 17 et 0,5 % respectivement. Les bactéries sont donc capables de réduire le Fe^{III} en Fe^{II} sans donneur d'électrons ajoutés.

Par ailleurs, la concentration en Fe^{II} en présence de bactéries et de H_2 comme seul donneur d'électrons, évolue différemment selon la forme de Fe^{III} ajoutée (Fig. 3b). En présence de Fe^{III} -citrate comme accepteur d'électron, la concentration en Fe^{II} augmente plus rapidement (de 0 mM à 37 mM en 24 heures) au cours du temps qu'en présence de lépidocrocite comme accepteur d'électrons (Fig. 3b). La réduction du fer est donc différente selon la forme solide ou soluble de Fe^{III} . Comme attendu, le Fe^{III} soluble est donc plus facilement disponible pour les bactéries.

La concentration maximale obtenue en Fe^{II} est de 38 mM (Fig. 3b). Or la concentration initiale en Fe^{III} -citrate est de 50 mM. La réaction est donc incomplète. Un manque d'hydrogène pourrait expliquer cette différence. En présence de lépidocrocite, la réaction étant beaucoup plus lente. En effet, à 300 heures, la concentration maximale n'est pas atteinte et la concentration en Fe^{II} augmente encore après 5 jours d'incubation.

La vitesse initiale de production du Fe^{II} en présence de Fe^{III} -citrate et de lépidocrocite est déterminée par ajustement selon une réaction d'ordre 1 de 0 à 8 heures (Annexe 2). Elles sont respectivement de 2,6 $mM h^{-1}$ et 0,4 $mM h^{-1}$.

Selon l'équation [1], en présence de fer^{III}-citrate, la vitesse de consommation d'hydrogène est de 1,3 mM h⁻¹ et de 0,2 mM h⁻¹ en présence de lépidocrocite.

S. oneidensis est donc bien capable de réduire le Fe^{III} avec H₂ à des vitesses de réduction différentes selon que le fer est sous forme solide ou sous forme soluble (Tableau 4).

Tableau 4 : Récapitulatif des vitesses de production du Fe^{II} et de consommation de l'H₂ à 2 bars d'H₂

	Fe ^{III} -citrate (50 mM)	Lépidocrocite (300 mM)
Vitesse de production du Fe ^{II} (mM h ⁻¹)	2,6	0,4
Vitesse de consommation de l'H ₂ (mM h ⁻¹)	1,3	0,2

Des essais réalisés dans les mêmes conditions mais avec des concentrations croissantes en lépidocrocite montrent que plus la concentration en lépidocrocite augmente, plus la réaction de réduction du Fe^{III} est rapide (Annexe 3). Donc la concentration en lépidocrocite est bien un facteur limitant la vitesse de consommation de H₂.

3.2 Bioréduction de Fe^{III} à haute pression

La réduction du Fe^{III} (Fe^{III} citrate) par *S. oneidensis* MR-1 a été suivie pendant 72 heures à différentes pressions (3, 45 et 100 bars) (Figure 4).

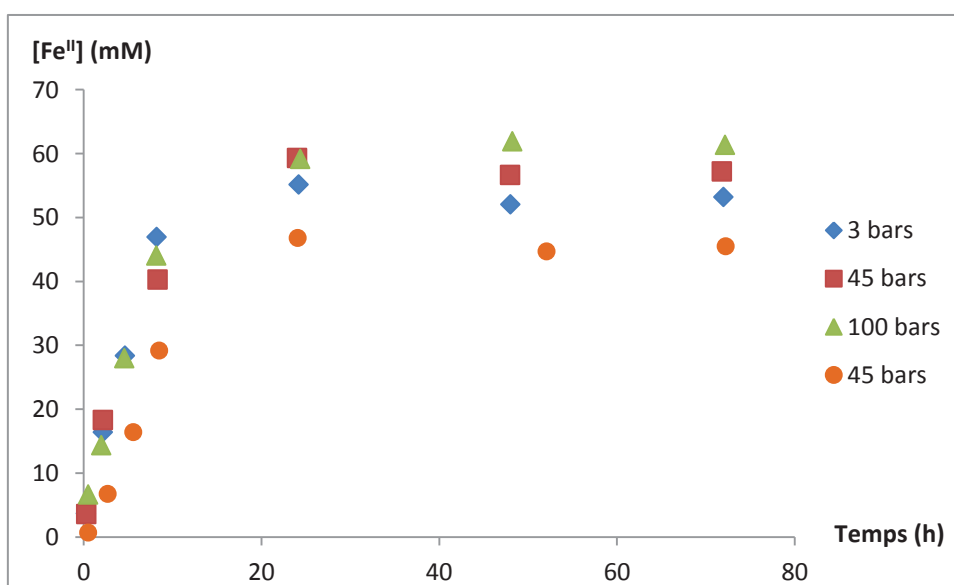


Figure 4 : Evolution de la concentration en Fe^{II} en fonction du temps à 3, 45 et 100 bars

Quelles que soient les pressions que subissent les bactéries, la réduction du Fe^{III} est significativement la même. Excepté pour un essai à 45 bars (ronds pleins, Fig. 4) où la concentration en Fe^{II} est systématiquement inférieure aux valeurs des autres essais. Il n'est pas impossible que la pression ait été moins bien contrôlée, ou que la concentration en Fe^{III} citrate ait été sous-estimée dans cet essai qui était le premier de la série à hautes pressions. Cet essai a été reconduit et les valeurs des concentrations en Fe^{II} de second essai à 45 bars se superposent à celles des essais à 3 et 100 bars (Fig. 4). A partir de 24 heures, la concentration en Fe^{II} atteint un plateau à environ 58 mM. Cette concentration est supérieure à la concentration en Fe^{III} estimée au départ. Cette concentration de départ doit donc être plus importante que celle escomptée.

De la même façon que pour les essais à basse pression, les vitesses initiales de production de Fe^{II} ont été déterminées par régression linéaire de chaque courbe de 0 à 9 heures (Annexe 4). Dans les premières

heures, la vitesse de production du Fe^{II} est de $5,33 \text{ mM h}^{-1}$ à 3 bars, $4,88 \text{ mM h}^{-1}$ à 45 bars et $4,32 \text{ mM h}^{-1}$ à 100 bars. Ces différences ne sont pas significatives et la vitesse initiale moyenne de production du Fe^{II} est de $4,8 \text{ mM h}^{-1}$. D'après la réaction [1], la vitesse initiale de consommation de l'hydrogène est de $2,4 \text{ mM h}^{-1}$.

3.3 Dénombrement des cellules et estimation de l'intégrité membranaire

3.3.1 La concentration bactérienne

La concentration bactérienne dans chaque autoclave a été mesurée à différents temps par marquage au Sybr Green II (Figure 5).

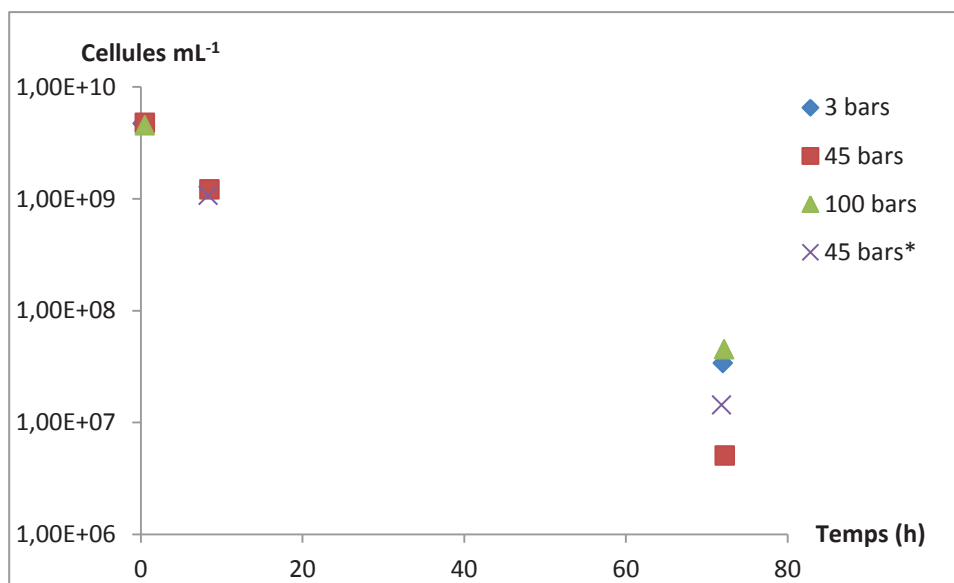


Figure 5 : Evolution de la concentration en cellules au cours du temps à 3, 45 et 100 bars

La concentration cellulaire diminue au cours du temps d'un facteur 100 que ce soit à 3, 45 ou 100 bars. Au départ, $1,0 \times 10^9$ à $4,7 \times 10^9$ cellules mL^{-1} sont injectées dans les autoclaves et seulement $5,0 \times 10^7$ à $1,5 \times 10^7$ cellules mL^{-1} sont mesurées en fin d'expérience au bout de 72 heures.

Grâce à la concentration en bactérie qui est connue, la vitesse de production du Fe^{II} peut être normalisée au nombre de cellules initiales et d'après l'équation [1], la vitesse de consommation de l' H_2 est calculée par unité de biomasse. On obtient les résultats présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Vitesse de consommation de l' H_2 par unité de biomasse à 3, 45 et 100 bars.

	3 bars	45 bars	100 bars
Concentration en cellules/mL	$4,7 \times 10^9$	4×10^9	$4,53 \times 10^9$
Pression partielle en H_2 en bars (119 mM)	3	3	3
Vitesse de production du Fe^{II} $\text{mM Fe}^{\text{II}} \text{ h}^{-1} \text{ cellule}^{-1}$	$1,13 \times 10^{-9}$	$1,22 \times 10^{-9}$	$9,54 \times 10^{-10}$
Vitesse de consommation d'hydrogène $\text{mM H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cellule}^{-1}$	$5,65 \times 10^{-13}$	$5,39 \times 10^{-13}$	$5,38 \times 10^{-13}$

La vitesse de consommation de l' H_2 est approximativement la même à 3, 45 et 100 bars. Elle est de l'ordre de $5,5 \times 10^{-13} \text{ mM H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ cellule}^{-1}$. Ces pressions n'ont donc pas d'effets sur la vitesse de consommation de l' H_2 par les bactéries.

3.3.2 L'intégrité membranaire

L'intégrité des membranes bactériennes est déterminée par marquage au BacLight®. Rappelons qu'il s'agit d'un double marquage par des fluorochrome (SYTO 9 et iodure de propidium, IP) qui se fixent à l'ADN et leur donne un aspect fluorescent au microscope à épifluorescence. Le Syto 9 pénètrent dans toutes les cellules intègres ou non et colorent les cellules en vert, celles ayant une membrane considérée comme endommagée car perméable laissent passer l'IP et colorent les cellules en rouge. Le rouge masquant la coloration verte, les cellules en vert sont considérées comme « intègres » et celles en rouge comme ayant une membrane altérée. Ce test est réalisé au cours du temps afin d'observer l'effet de la pression sur l'intégrité membranaire.

La figure 6 montre la proportion de bactéries non-intègres (rouge) dans un échantillon juste après la mise sous pression et après 72 heures d'incubation à 3, 45 et 100 bars.

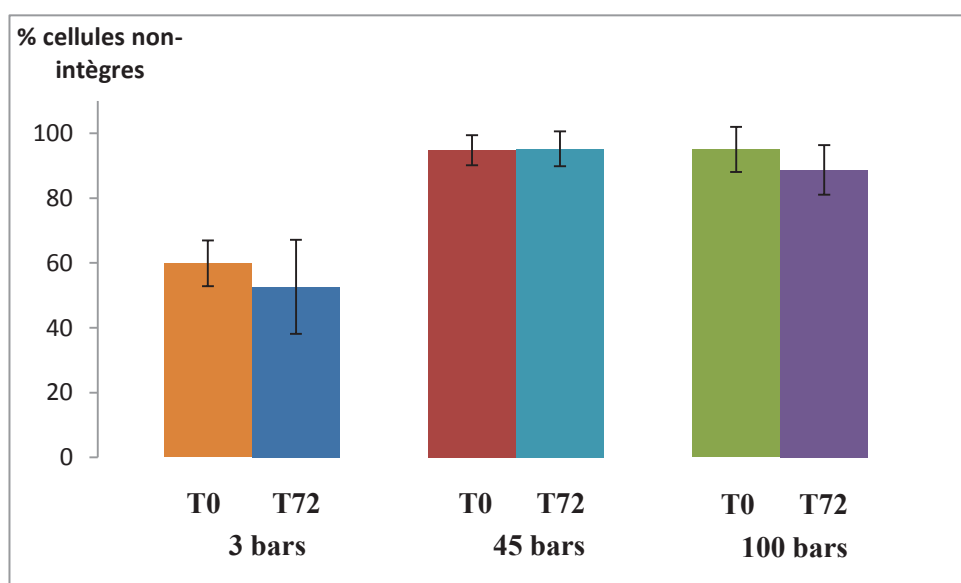


Figure 6 : Proportion de cellules non intègres par rapport au nombre total de cellules. « T0 » correspond en fait à un prélèvement effectué après 15 à 30 min de mise en pression.

A 3 bars, 50 % des cellules apparaissent rouges au microscope à épifluorescence dès le début de l'expérience. Ce qui indique que la membrane des cellules est donc devenue perméable à l'IP. Après 72 h la proportion de cellules endommagées est la même. Par contre, à 45 bars et 100 bars, la majorité des cellules sont abîmées. En effet, plus de 90% des bactéries apparaissent rouge au début et après 72 h d'incubation.

L'état des cellules diffère selon que la pression soit à 3 bars ou à 45 et 100 bars et pourtant la vitesse de production de Fe^{II} est la même aux trois pressions.

Une série de dénombrement par étalement sur boîte a été réalisée afin de comparer le nombre de cellules intègres au nombre de cellules cultivables (UFC, unité formant colonies). Cette approche permet de considérer une autre technique caractérisant la viabilité des cellules, une baisse de cultivabilité pouvant être associée à une baisse de viabilité.

Par manque de temps, ce dénombrement n'a été réalisé que sur deux prélèvements : après 72 h d'incubation à 100 bars et à 45 bars. Le nombre de cellules intègres est déterminé à partir du nombre de cellules total et du pourcentage de cellules non-intègres (rouges). Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Comparaison du nombre de cellules cultivables (UFC mL⁻¹) au nombre de cellules intègres (cellules mL⁻¹) à 45 et 100 bars après 72 heures d'incubation

	45 bars	100 bars
Nombre de cellules cultivables (UFC mL⁻¹)	(4,2± 0,9)×10 ⁴ (n=3)	(3,0± 0,6) ×10 ⁴ (n=4)
Nombre de cellules intègres (cellules mL⁻¹)	(6,9±2.0) ×10 ⁵ (n=20)	(5,0±5,6)×10 ⁶ (n=10)

Avant de comparer le nombre de cellules cultivables avec le nombre de cellules intègres, ces résultats montrent qu'après 72 h d'incubation à 45 bars, la quantité de cellules intactes est de $6,9 \times 10^5$ cellules mL⁻¹ et de $5,0 \times 10^6$ cellules mL⁻¹ à 100 bars.

Le dénombrement sur milieu solide indique une quantité d'UFC de $4,2 \times 10^4$ à 45 bars et de 3×10^4 à 100 bars. C'est-à-dire que la quantité de cellules considérées comme intègres est supérieure à la quantité de cellules cultivables.

Donc sur plus de 90 % de cellules dont la membrane est abîmée (Figure 6), il reste $3,0 \times 10^4$ à $4,2 \times 10^4$ de bactéries capables de se développer en milieu complexe. Ce qui correspond à 0.0010 % du nombre de cellules présentes au départ à 45 bars et à 0.0006 % à 100 bars. Ces bactéries encore actives pourraient être responsables de toute la réduction du Fe^{III} observée sur la Figure 4. Donc les bactéries sont en excès puisque $3,0 \times 10^4$ à $4,2 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ suffiraient à réduire la totalité du Fe^{III} en Fe^{II}.

3.3.3 Effets de la décompression

Afin de savoir si l'altération de l'intégrité cellulaire pouvait être liée à la décompression subite que subissent les bactéries plutôt qu'aux fortes pressions, un système permettant de recueillir les cellules dans un capillaire transparent pour les observer sans variation de pression a été adapté au réacteur. Les prélèvements ont été alors réalisés à partir d'une vanne reliée à ce capillaire de silice dans lequel une goutte de BacLight a été ajoutée au préalable. Lors de l'observation au microscope à épifluorescence, le capillaire s'est cassé sous le poids de la vanne sur laquelle il est collé. Le contenu s'est vidé sous la pression à l'intérieur.

Une unique observation a pu être réalisée en ayant préalablement détaché le capillaire de la vanne en le coupant. Cette étape décomprime le milieu instantanément et annule l'avantage de cette méthode puisque les bactéries subissent la décompression. Les bactéries sont tout de même identiques à celles observées sur filtre. L'unique observation n'a pas permis de faire de dénombrement mais permet d'affirmer qu'une observation est possible au travers du capillaire de silice.

4. Discussion

4.1 Bioréduction du Fe^{III} à basse pression

Les différents essais réalisés à basse pression montrent que, dans cette étude, *Shewanella oneidensis* est responsable de la réduction du fer observée. Lorsqu'elle est absente, aucune réduction n'a lieu. Si des bactéries sont ajoutées au milieu, sans donneur d'électrons, elles sont capables de réduire le Fe^{III} en Fe^{II} . Or, les bactéries ont besoin d'accepteur d'électrons et de donneur d'électrons pour pouvoir faire la respiration. Une hypothèse serait que *S. oneidensis* utilise des réserves d'électrons stockés dans le cytoplasme. Il s'agirait alors d'une respiration endogène.

Dans cette même étude, la réduction du fer est différente selon la forme de Fe^{III} de départ. *S. oneidensis* réduit plus rapidement le fer sous forme soluble (fer-citrate) que sous forme solide (lépidocrocite). Le Fe^{III} en solution est plus facilement disponible pour les bactéries. Ce résultat est confirmé en présence de bactéries et d' H_2 comme unique donneur d'électrons.

Cette étude permet également de confirmer la capacité de *Shewanella oneidensis* à utiliser l' H_2 en tant que donneur d'électrons. Elle est capable d'oxyder cette molécule grâce à ses hydrogénases situées au travers de sa membrane (Shi *et al.*, 2011 ; Heidelberg *et al.*, 2002).

Les vitesses de consommation d' H_2 sont de 1,3 mM h⁻¹ en présence de fer-citrate et de 0,2 mM h⁻¹ en présence de lépidocrocite. En 2005, Zegeye *et al.* (2005) calculaient une vitesse de consommation de l'hydrogène de 0,06 mM h⁻¹ en présence de lépidocrocite à 30°C et pression atmosphérique. Cette différence peut s'expliquer par la différence de concentration. Dans l'étude présentée ici, la concentration en lépidocrocite est de 300 mM alors que Zegeye *et al.* utilisaient une concentration de 80 mM. Les essais comparant la cinétique de production de Fe^{II} en fonction de la concentration en lépidocrocite et une étude présentée par Zegeye *et al.* confirment cette hypothèse. En effet, plus la concentration en Fe^{III} est importante plus la vitesse de production du Fe^{II} est élevée et plus la vitesse de consommation d' H_2 augmente (Zegeye *et al.*, 2005).

A pression faible, la concentration en Fe^{II} finale est plus faible que la concentration en Fe^{III} initiale. La réaction est incomplète et pourtant, un plateau est atteint. Un manque d'hydrogène pourrait expliquer cette différence. En effet, lors des différents prélèvements une faible quantité de gaz s'échappe. A la fin de l'expérience, la somme de tous les prélèvements peut suffire à créer un manque d'hydrogène.

Cette stabilisation n'est pas observée en présence de lépidocrocite. Dans ce flacon de bioréduction l'hydrogène n'est pas limitant. Les prélèvements sont réalisés de la même façon pour chaque flacon mais les fuites de gaz sont aléatoires suivant les prélèvements. Ces fuites sont évitées à haute pression grâce à l'utilisation d'un autoclave spécifique constitué de vanne de prélèvements étanches.

4.2 Bioréduction du Fe^{III} à haute pression

Après les essais à basse pression (2 bars d' H_2), la réaction de réduction du Fe^{III} en Fe^{II} par l'oxydation de l'hydrogène est suivie à différentes pressions de plus en plus importantes (3, 45 et 100 bars). Dans ces essais, la concentration en Fe^{III} est de 50 mM (Fe^{III} -citrate) et la concentration en H_2 est de 119 mM (2,3 mmole en solution). La pression totale est ajustée grâce à de l'argon.

Quel que soit la pression, la concentration en Fe^{II} évolue de la même façon. *S. oneidensis* est capable de réduire le Fe^{III} en présence d' H_2 à la même vitesse à 3, 45 ou 100 bars. En effet, la vitesse initiale de production de Fe^{II} est de $1,1 \times 10^{-9}$ mM h⁻¹ cellule⁻¹ en moyenne (± 0.1).

En augmentant la pression partielle d' H_2 de 2 bars (basse pression) à 3 bars (haute pression) la vitesse de réaction est multipliée par 1,8 à concentration bactérienne initiale quasi identique. Cette augmentation de la vitesse est donc du même ordre de grandeur que l'augmentation de pression ($\times 1,5$). Pour mieux discuter ce point, il serait intéressant de tester avec une concentration de 5 ou 10 bars d' H_2 .

Picard *et al.* (2012) s'intéressent à la réduction du Fe^{III} (fer-citrate) en présence de peptone comme donneur d'électrons par *S. oneidensis* en fonction de la pression. Ils montrent des vitesses de production de Fe^{II} de l'ordre de $1,1 \times 10^{-8}$ mM h⁻¹ cellule⁻¹ entre 1 et 50 bars en présence de fer^{III}-citrate. Cette différence peut être due à la différence de concentration en fer^{III}-citrate utilisée. Picard *et al.* utilisent 5 mM de fer-citrate contrairement à 50 mM dans l'étude présentée ici. De plus, le donneur d'électron n'est pas H₂ mais des peptones et de l'extrait de levure ce qui va influencer fortement l'activité bactérienne.

Des mécanismes de défense sont observés chez certains microorganismes face à la pression élevée. En effet, des acides gras poly-insaturés sont synthétisés chez certaines bactéries pour conserver la structure et la perméabilité de leur membrane à haute pression (Kamimura *et al.*, 1993 ; Fang *et al.*, 2000). Nakasone *et al.*, (1998) montrent que le genre *Shewanella* possède un opéron régulé par la pression. Dans l'étude présentée ici, aucun moyen n'est mis en place pour observer ce mécanisme mais les résultats suggèrent que la membrane bactérienne est endommagée bien que l'activité cellulaire reste constante. La synthèse d'acides poly-insaturés sous hautes pressions pour conserver la structure de la membrane est donc mis en doute par contre l'opéron pourrait réguler des protéines impliquées dans la respiration bactérienne puisque la respiration du Fe^{III} par l'H₂ est maintenue à haute pression.

4.3 Concentration bactérienne

La concentration bactérienne totale est déterminée par marquage au Sybr Green II. Elle est mesurée en début d'expérience, après 24 h et en fin d'expérience, après 72 h d'incubation.

La concentration cellulaire diminue au cours du temps d'un facteur 100 que ce soit à 3, 45 ou 100 bars. Cette diminution peut s'expliquer par la nature du milieu utilisé. En effet, le milieu ne contient pas de source de carbone qui est indispensable à la multiplication des bactéries. De ce fait, les bactéries ne se développent pas et celles qui sont encore présentes sont en stress nutritif et donc en quelque sorte en survie.

L'étude réalisée par Zegeye *et al.* en 2005, montre également le même taux de diminution du nombre d'UFC au cours du temps en présence d'un milieu minimum à pression atmosphérique. La quantité d'UFC diminue d'un facteur 100 en 3 jours et d'un facteur 1000 en 6 jours.

Si les bactéries sont incubées dans un milieu complexe contenant une source de carbone, du tryptone, de l'extrait de levure comme présenté dans l'étude de Picard *et al.* (2012), le taux de croissance à ces pressions représente 100 à 90 % de celui obtenu à pression atmosphérique et le taux de survivant (sur la base du calcul des UFC) est de 100 % également à ces pressions (0 à 100 bars). Picard *et al.* ont dénombré les UFC à des pressions allant jusqu'à 1000 bars. Après 500 bars, le taux de croissance de *Shewanella oneidensis* est nul. Le taux de survivant diminue à 80 % à 500 bars, à 40 % à 800 bars et plus que 5 % survivent à 1000 bars. Donc l'espèce *Shewanella oneidensis* est bien considérée comme étant piezosensible. Elle est capable de se développer depuis de pressions atmosphériques jusqu'à 500 bars.

Le teste au BacLight permet de différencier les cellules dont la membrane est abîmée, des cellules intactes. Ce test est réalisé en début d'expérience, une fois la pression ajustée à la valeur voulue et après 72 h d'incubation à 30°C. Les résultats de ce test montrent qu'à 3 bars déjà 50 % des bactéries sont endommagées et qu'à 45 et 100 bars plus de 90 % des cellules ont une membrane perforée. Mais au cours du temps, ces valeurs ne changent pas. Le temps d'incubation à haute pression n'a pas d'effet sur la membrane des bactéries contrairement à la montée en pression. Cette augmentation de pression subit par les bactéries est brutale. L'atmosphère est chargée rapidement aux différentes pressions. Des essais en augmentant la pression progressivement pourraient être réalisés afin d'étudier si les bactéries supportent des pressions aussi élevées mais amenées progressivement.

Malgré l'état affecté des bactéries, la réaction de réduction du Fe^{III} a lieu. Avec 10 % des cellules, à 45 et 100 bars, la vitesse de réduction du Fe^{III} est la même qu'à 3 bars. L'état des bactéries ne semble pas affecter la vitesse de production du Fe^{III} est donc la vitesse de consommation de l'H₂.

Ces résultats peuvent s'expliquer par deux hypothèses. La première hypothèse serait l'imprécision du test du BacLight car il ne semble pas que les cellules marquées en rouge soient toutes inactives. Donc l'IP pourrait traverser la membrane sans qu'il n'y ait une relation avec la viabilité de la cellule.

La deuxième hypothèse serait que les bactéries à l'intérieur de l'autoclave soient intactes et que l'endommagement de la membrane cellulaire se fasse lors du prélèvement qui implique une décompression instantanée.

Puisque que *Shewanella* est considérée comme piezosensible, une pression de 100 bars ne devrait pas l'affecter. Cette hypothèse peut être démontrée en évitant aux bactéries, une décompression lors du prélèvement. Picard *et al* (2012) décomprime la totalité du milieu progressivement pour que les bactéries ne subissent pas de décompression brutale. Dans notre cas, d'autres prélèvements doivent être effectués après l'étude de l'effet de la décompression donc cette méthode n'est pas retenue. Par ailleurs, cette méthode implique une manipulation exacte et identique à chaque décompression, or la vanne de prélèvement utilisée n'est pas suffisamment contrôlable pour permettre ce type de manipulation. C'est pourquoi, le système du tube capillaire de silice relié à la vanne de prélèvement a été développé. Grâce à ce tube rempli d'une goutte de fluorochromes BacLight, la solution contenue dans l'autoclave est prélevée grâce à la vanne de prélèvement directement dans le capillaire. Le diamètre du capillaire est trop fin pour provoquer une décompression du milieu. Ce tube peut ensuite être observé au microscope à épifluorescence. Cette technique prometteuse est en cours de développement pour permettre une observation au microscope dans de meilleures conditions. La plupart de ces points ont été résolus et permettent des perspectives intéressantes.

5. Conclusion et perspectives

Shewanella oneidensis est donc capable d'utiliser l' H_2 en tant qu'unique donneur d'électron couplé à la réduction du Fe^{III} en Fe^{II} . Cette utilisation est possible en présence de fer solide comme de fer soluble. *Shewanella* a cependant une spécificité plus forte vis-à-vis du fer soluble qui est plus disponible que le fer solide. En effet, la vitesse de consommation de l' H_2 en présence de fer soluble est d'environ $2,95 \times 10^{-13}$ mM H_2 h^{-1} cellule $^{-1}$ par rapport à $3,8 \times 10^{-14}$ mM H_2 h^{-1} cellule $^{-1}$ en présence de lépidocrocite à 2 bars d' H_2 .

Le stockage de l' H_2 étant le plus souvent réalisé en profondeur, la vitesse de consommation de ce gaz est suivie par l'intermédiaire de la réduction du Fe^{III} en Fe^{II} à des pressions croissantes : 3, 45 et 100 bars. Quelle que soit la pression, la vitesse de consommation de l' H_2 en présence de fer soluble est d'environ $5,5 \times 10^{-13}$ mM H_2 h^{-1} cellule $^{-1}$. Donc la pression n'influence pas la consommation de l' H_2 mais semble cependant avoir un impact sur l'intégrité membranaire des cellules.

Des essais supplémentaires sont nécessaires afin d'améliorer l'étude de l'influence de la pression sur l'intégrité des membranes. Des études sur la croissance bactérienne peuvent également apporter des informations intéressantes, notamment sur l'influence du nombre de bactéries sur la consommation de l' H_2 . Une source de carbone organique peut également être ajoutée aux expériences en adéquation avec les quantités retrouvées en sous-sol.

Il serait judicieux d'utiliser de la lépidocrocite plus semblable à ce que l'on peut trouver dans les sous-sols pour suivre la consommation de l' H_2 au travers de la réduction du minéral. Il s'agit, en définitive, d'apporter au modélisateur les données nécessaires pour estimer si une telle activité est susceptible d'altérer le stockage des gaz.

6. Références

- Allen E.E. et Bartlett D.H.; 2010; Piezophiles: Microbial adaptation to the deep-sea environment; Extremophiles, Vol III.
- Amend J.P. et Shock E.L.; 2001; Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria; FEMS Microbiol. Rev, 25 (2), 175-243.
- Bartlett D.H.; 1992; Microbial life at high pressures; Sciences Pregree, 76, 479-496.
- Bulatov G. G., 1979, Underground storage of hydrogen, thesis Moscow Gubkin Oil and Gs University.
- Canfield D.E., Jorgensen B.B., Fossing H., Glud R., Gundersen J., Ramsing N.B., Thamdrup B., Hansen J.W., Nielson L.P. et Hall P.O.J.; 1993; Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments; Mar. Geol., 113, 27-40.
- Carden P. O. et Paterson L.; 1979, Physical, chemical and energy aspects of underground hydrogen storage, J. Hydrogen Energy, 4, 559-569.
- Chi E. et Bartlett G.H.; 1993; Use of a reporter gene to follow high pressure signal transduction in the deep-sea bacterium *Photobacterium SS9*; J Bacterial, 175, 7533-7540.
- Chapelle F. H., Haack S. K., Adriaens P., Henry M. A., et Bradley P. M.; 1996, Comparaison of Eh and H₂ measurements for delineating redox processes in a contaminated aquifer, Environ. Sci. Technol., 30, 3565-3569.
- Chapelle F. H. et Lovley D. R.; 1992, Competitive exclusion of sulfite reduction by Fe(III)-reducing bacteria: a mechanism for production discrete zones of high-iron ground water, Ground Water, 30, 59-36.
- Crotogino F. et Huebner S.; 2008, Energy Storage in Salt Caverns/Developments and Concrete Projects for Adiabatic Compressed Air et for Hydrogen Storage, Solution Mining Research Institute Technical Conference, 28-29.
- DeLong E.F., Francks D.G. et Yayanos A.A.; 1997; Evolutionary relationship of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria; Appl. Environ. Microbiol., 63, 2105-2108.
- Esnault L. ; 2010, Réactivité géomicrobiologique des matériaux et minéraux ferrifères : conséquences sur l'évolution à long terme des matériaux d'un stockage de déchets radioactifs en milieu argileux.
- Facrus H. et Maly J. ; 1975 ; Rapid extraction-photometric determination of traces of iron(II) and iron(III) in water with 1,10-phenanthroline ; Analytica Chimica Acta., 77, 315-316.
- Fang et al ; 2000 ; Biochemical function and geochemical significance of novel phospholipid isolated from extremely barophilic bacteria from the Mariana Trench at a depth of 11,000 meters. Deep Sea Res., Part I, 47, 1173-1182.
- Foh S., Novil M., Rockar E. et Randolph P.; 1979, Underground hydrogen storage final report, Institute of Gas Technology,
- Gaboriaud F. et Ehrhardt J.J.; 2003 Effects of different crystal faces on the surface charge of colloidal goethite (γ -FeOOH) particles: An experimental and modeling study. Geochimica et Cosmochimica Acta., Vol. 26, 421-434.
- Heidelberg J.F. et Fraser C.M. et al.; 2002 Genome sequence of the dissimilatory metal iron reduction bacteria *Shewanella oneidensis*, Nature Biotechnol, 11, 1118-23.
- Hollmuller P., L'Achal B., Romerio F., Weber, W. et Zraggen J-M. ; 2005, L'hydrogène, future vecteur énergétique ?, Journée du CUEPE, p 102.
- Hunter K. S., Wang Y. et Van Capellen P.; 1998, Kinetic modeling of microbially-driven redox chemistry of subsurface environments: coupling transport, microbial metabolism and geochemistry, Journal of Hydrology, 209, 53-80.
- Ikegami A., Nakasone K., Kato C., Nakamura Y., Yoshikawa I., Usami R et Horikoshi K.; 2000, Glutamine synthetase gene expression at elevated hydrostatic pressure in a deep-sea piezophilic *Shewanella violacea*, FEMS Microbiol Lett, 192, 91-95.

- Jakobsen R. et Postma D.; 1994, In situ rates of sulfate reduction on an aquifer (Rømø, Danmark) and applications for the reactivity of organic matter, *Geology*, 22, 1103-1106.
- Jeanthon C., Reysenbach A.L., L'Haridon S., Gambacorta A., Pace N.R., Glenat P. et Prieur D.; 1995, *Thermotoga subterranea* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir, *Arch Microbiol*, 164, 91-97.
- Kamimura K., Fuse H, Takiura O. et Yamaoka Y; 1993; Effets of growth pressure and temperature on fatty acid decomposition of a barotolerant deep-sea bacteria; *Appl. Environ. Microbiol.*;59, 924-926.
- Kato C. et Qureschi M.H.; 1999; Pressure Response in Deep-sea Piezophilic Bacteria; *J. Molec. Biotechnol.*, 87-92.
- Kato C., Sato T. et Horikoshi K.; 1995, Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples, *Biodiv. Conserv.*, 4, 1-9 Lindblom U. E., 1985, A conceptual design for compressed hydrogen storage in mined caverns, *J. Hydrogen Energy*, 10, 667-675.
- Institut für Kraft-fahr-zeuge RWTH Aachen University; 2011; Large Hydrogen Underground Storage
- Libert M., Bildstein O., Esnault L., Jullien M., et Sellier R.; 2011; Molecular hydrogen: An abundant energy source for bacterial activity in nuclear waste repositories; *Physics and Chemistry of the Earth*, 36, 1616-1623.
- Lovley D.R. et Chapelle F.H.; 1995; Deep surface microbial processes. *Rev. Geophys.*, 33, 365-381.
- Lovley D. R., Kashefi K., Vargas M., Tor, J. M., Blunt-Harris E. L., 1999, Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganisms, *Chemical Geology*, 169, 289-298.
- Lovley D.R. et Phillips E.J.P.; 1988; Manganese inhibition of microbial iron reduction in an anaerobic sediment; *Geomicrobiol.*, 6, 145-155.
- Lord A.S.; 2009; Overview of geologic storage of natural gas with an emphasis on assessing the feasibility of storing hydrogen; Sandia Report, 5878.
- Misawa T., Hashimoto K. et Shimodaira S.; 1974; The mechanism of formation of iron oxide and oxyhydroxides in aqueous solutions at room temperature; *Corrosion Science*, 14, 131-149.
- McKinlay J.B. et Zeikus J.G.; 2004; Extracellular Iron Reduction is Mediated in Part by Neutral Red and Hydrogenase in *Escherichia coli*; *Applied and Environmental Microbiology*, 3467-3474.
- Myers C.R. et Nealson K.H.; 1988, Microbial reduction of manganese oxides: Interaction with iron and sulfure, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 11, 2727-2732.
- Myers C.R. et Nealson K.H.; 1990, Respiration-Linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1; *Journal of Bacteriology*, 6232-6238.
- Nakasone K., Ikegami A., Kato C., Usami R. et Horikoshi K.; 1998; Mechanisms of gene expression controlled by pressure in deep-sea microorganisms; *Extremophiles*, 2, 149-154.
- Nealson K. H., Myers C. R. et Wimpee B. B.; 1991, Isolation and identification of manganese-reducing bacteria and estimates of microbial Mn(IV)-reducing potential in black sea, *Deep-Sea Res.*, 38, 439-443.
- Nealson K.H. et Saffarini D.A.; 1994; Iron and manganese in anaerobic respiration; *Annu Rev Microbiol.*, 48, 311-343.
- Panfilov M.; 2010, Underground Storage of Hydrogen: In Situ Self-Organisation and Methane Generation, *Transp Porous Med*, 85, 841-865.
- Panfilov M., Gravier G., et Fillacier S.; 2006, Underground storage of H₂ and H₂-CO₂-CH₄ mixtures. *Proceeding 10th European Conference on the Mathematics of Oil Recovery*, 4-7.
- Paterson L.; 1983, The implications of fingering in underground hydrogen storage, *J. Hydrogen Energy*, 8, 53-59.
- Picard A., Testemale D., Hazemann J.L. et Daniel I.; 2012; The influence of high hydrostatic pressure on bacterial dissimilatory iron reduction; *Geochimica et Cosmochimica Acta.*, 04.030.
- Ponomarev-Stepnoi N. N.; 2004, Nuclear-hydrogen energy, Kurchatov Institute.
- Roussel E.G., Bonavita M.A., Querellou J., Cragg B.A., Webster G., Prieur D. et Parkes R.J. ; 2008 ; extending the sub-sea-floor biosphere, *Science*, 320, 1046.

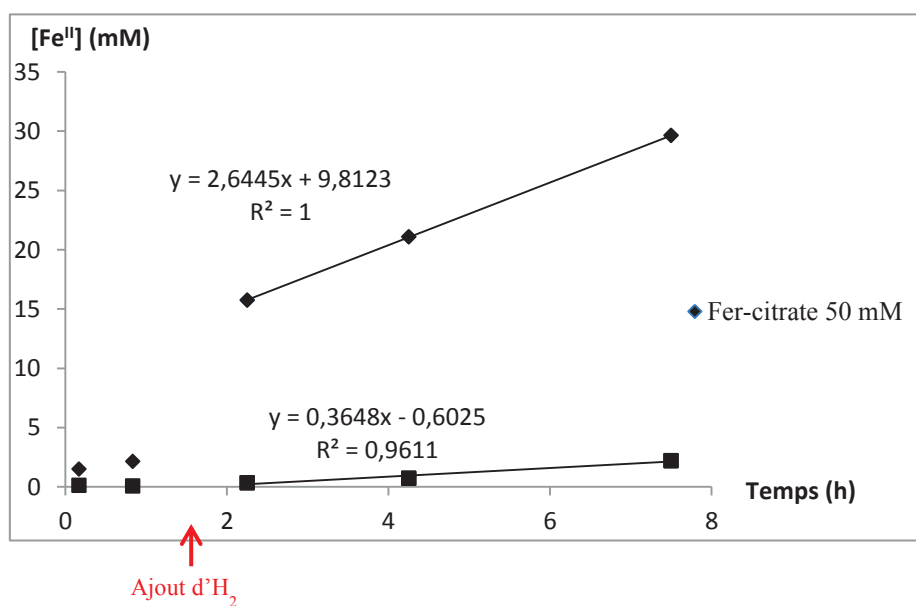
- Ruwisch R.C., Seitz H.J. et Conrad R.; 1988; The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor; *Arch Microbiol*, 149, 350-357.
- Shi L., Belchik S.M., Plymaite T.E., Heald S., Dohnalkova A.C., Sybima K., Bottin H., Squier T.C., Zachara J.M. et Fredrickson J.K.; 2011 Purification and characterization of the [NiFe]-hydrogenase of *Shewanella oneidensis* MR-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 16, 5584-90.
- Slobodkin A., Campbell B., Cary S. C., Bonch-Osmolovskaya E., et Jeanthon C.; 2001, Evidence for the presence of thermophilic Fe(III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13°N (East Pacific Rise), *FEMS Microbiology Ecology*, 36, 235-243.
- Slobodkin A. L., Jeanthon C., L'Haridon S., Nazina T., Miroshnichenko M., et Bonch-Osmolovskaya E.; 1999, Dissimilatory Reduction of Fe(III) by Thermophilic Bacteria and Archaea in Deep Subsurface Petroleum Reservoirs of Western Siberia, *Current Microbiology*, 39, 99-102.
- Stone H. B. J., Veldhuis I. et Richardson R. N.; 2005, Underground hydrogen storage in the UK, *Proceedings International Hydrogen Energy Congress and Exhibition IHEC*.
- Taylor J. B., Alderson J. E. A., Kalyanam K. M., Lyle A. B. et Phillips L. A.; 1986, Technical and economic assessment of methods for the storage of large quantities of hydrogen, *J. Hydrogen Energy*, 11, 5-22.
- Venkateswaran K., Moser D. P., Mollhappf M. E., Lies D. P., Saffarini D. A., McGregor B. J., Ringelberg D. B., White D. C. Nishijima M., Sano H., Burghardt J., Stackebrandt E. et Nealson K. H.; 1999, Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis*. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 49, 705-724.
- Vargas M., Kashefi K., Blunt-Harris E.L. et Lovley D. R.; 1998, Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth, *Nature*, 395, 65-67.
- Zegeye A., Ona-Nguema G., Carteret C., Huguet L., Abdelmoula M. et Jorand F. ; 2005 ; Formation of hydroxysulfate green rust 2 as a single iron (II-III) mineral in microbial culture ; *Geomicrobiology Journal* ; 22, 389-399

7. Annexes

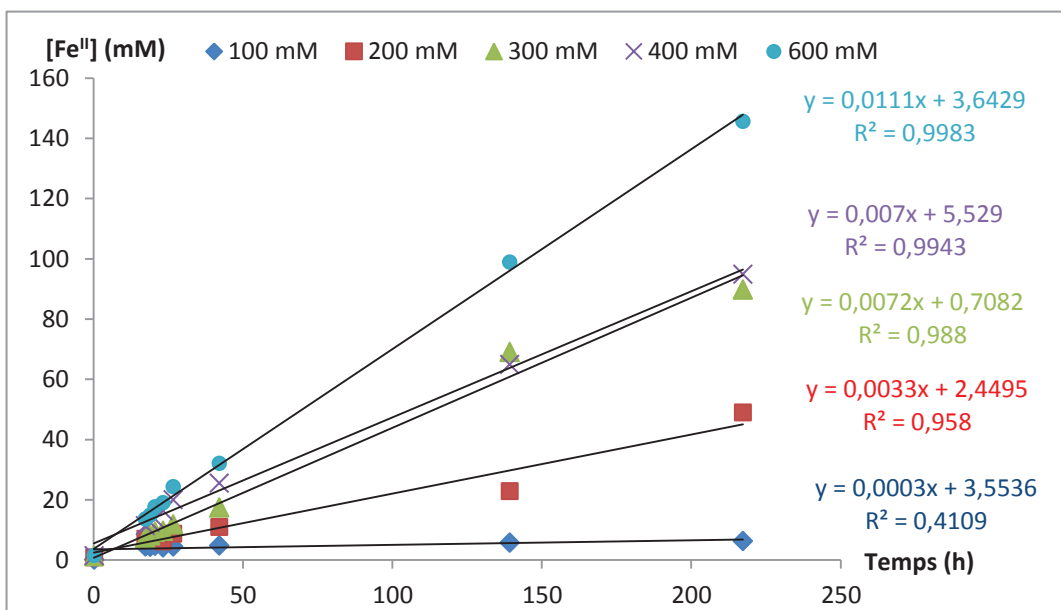
Annexe 1 : Composition du milieu de base

Composés	Concentration mol L ⁻¹
NH ₄ Cl	2.20×10 ⁻²
NaCl	1.50×10 ⁻³
KCl	1.20×10 ⁻³
MgSO ₄	1.10×10 ⁻³
CaCl ₂	6.70×10 ⁻⁴
MnSO ₄	2.70×10 ⁻⁴
ZnCl ₂	8.60×10 ⁻⁵
CoSO ₄ .7H ₂ O	3.80×10 ⁻⁵
FeSO ₄ .7H ₂ O	3.20×10 ⁻⁵
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	9.3×10 ⁻⁶
NiCl ₂ .6H ₂ O	9.1×10 ⁻⁶
NaWO ₂ .2H ₂ O	6.8×10 ⁻⁶
CuSO ₄ .5H ₂ O	3.6×10 ⁻⁶
AlK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	1.9×10 ⁻⁶
H ₃ BO ₃	1.5×10 ⁻⁶

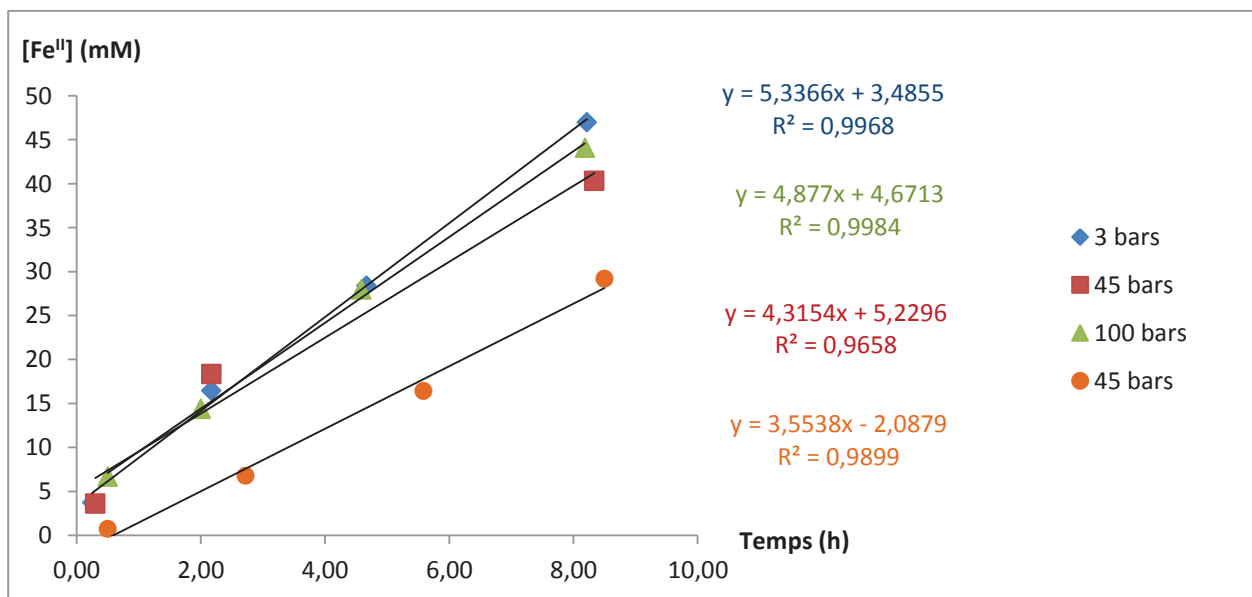
Annexe 2 : Cinétique de production du Fe^{II} en fonction du temps à 2 bars et 30 °C.



Annexe 3 : Evolution de la concentration en FeII au cours du temps en fonction de la concentration en lépidocrocite.



Annexe 4 : Cinétique de production de FeII en fonction du temps et des pressions (3, 45 et 100 bars)



Cinétique de l'utilisation microbienne du di-hydrogène sous hautes pressions

Résumé

L'hydrogène est un gaz qui peut être utilisé en tant que vecteur d'électricité et être utile pour pallier au déficit des énergies fossiles. Son stockage est longuement étudié, notamment dans des cavités souterraines. Pour ce type de stockage, les phénomènes altérant la ressource en quantité et en qualité restent encore à mieux connaître et mieux comprendre. Parmi ces phénomènes, il y a le processus de bioconsommation de l'hydrogène qui est celui étudié dans l'étude présentée ici.

En effet, l'hydrogène peut être utilisé par différents microorganismes de différents groupes métaboliques, notamment les ferriréducteurs qui couplent la réaction d'oxydation de l'hydrogène à la réduction du Fe^{III} . Ces stockages souterrains sont dans des conditions de pression et de température dites extrêmes dans lesquelles des microorganismes sont capables de vivre.

La souche bactérienne utilisée est *Shewanella oneidensis* MR-1. Dans un premier temps, la capacité de cette bactérie à réduire le Fe^{III} en Fe^{II} en présence d'hydrogène à pression atmosphérique a été démontrée. Dans un second temps, la même réaction sera testée à haute pression (3, 45 et 100 bars). La vitesse de la consommation de l'hydrogène sera calculée dans les deux cas.

Mots clés : consommation de l'hydrogène, *Shewanella oneidensis*, haute pression, bioréduction du fer.