



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-theses-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>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

Ecole Doctorale SESAMES

(Synthèse, Expérience, Simulations, Applications : de la Molécule aux Edifices
Supramoléculaires)

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Mention Chimie

par **Marjorie ETIQUE**

Effets de l'activité bactérienne réductrice du fer ferrique et des nitrates sur les transformations des produits de corrosion magnétite et sidérite de l'acier non allié

Soutenue publiquement le 28 Novembre 2014 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Karim BENZERARA

Directeur de Recherche, CNRS, Paris, FRANCE

M. Philippe REFAIT

Professeur, Université de La Rochelle, FRANCE

Examineurs :

M. Philippe BAVEYE

Professeur, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, New York, USA

M. Ruben KRETZSCHMAR

Professeur, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, SUISSE

M. Nicolas MICHAU

Docteur, Andra, Châtenay-Malabry, FRANCE

M. Mustapha ABDELMOULA

Docteur (co-directeur de thèse), CNRS, Nancy, FRANCE

M. Frédéric JORAND

Professeur (co-encadrant de thèse), Université de Lorraine, FRANCE

M. Christian RUBY

Professeur (directeur de thèse), Université de Lorraine, FRANCE



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

Ecole Doctorale SESAMES

(Synthèse, Expérience, Simulations, Applications : de la Molécule aux Edifices
Supramoléculaires)

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Mention Chimie

par **Marjorie ETIQUE**

Effets de l'activité bactérienne réductrice du fer ferrique et des nitrates sur les transformations des produits de corrosion magnétite et sidérite de l'acier non allié

Soutenue publiquement le 28 Novembre 2014 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Karim BENZERARA

Directeur de Recherche, CNRS, Paris, FRANCE

M. Philippe REFAIT

Professeur, Université de La Rochelle, FRANCE

Examineurs :

M. Philippe BAVEYE

Professeur, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, New York, USA

M. Ruben KRETZSCHMAR

Professeur, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, SUISSE

M. Nicolas MICHAU

Docteur, Andra, Châtenay-Malabry, FRANCE

M. Mustapha ABDELMOULA

Docteur (co-directeur de thèse), CNRS, Nancy, FRANCE

M. Frédéric JORAND

Professeur (co-encadrant de thèse), Université de Lorraine, FRANCE

M. Christian RUBY

Professeur (directeur de thèse), Université de Lorraine, FRANCE

Remerciements

Je remercie chaleureusement les deux rapporteurs de ce manuscrit de thèse, Mr Karim Benzerara et Mr Philippe Refait, pour le temps consacré et le jugement apporté à travers leurs regards passionnés. J'adresse aussi mes remerciements aux membres de mon jury de thèse : Mr Philippe Baveye et Mr Ruben Kretzschmar pour avoir parcouru ces milliers de kilomètres afin d'assister à ma soutenance et conduire à l'ouverture internationale de ce travail ; Mr Nicolas Michau, Mr Frédéric Jorand et Mr Christian Ruby d'avoir été présents à ma soutenance et d'avoir tenu le coup durant ces quatre heures d'échanges intenses et enthousiastes. Merci aussi à Mr Antoine Pourbaix pour sa présence en salle lors de ma soutenance, son œil avisé d'expert en corrosion, et sa chaleur humaine.

Un grand merci à toi, Christian, qui d'abord fut mon directeur de stages de Master 1 et 2, avant de devenir mon directeur de thèse durant ces trois dernières années. Merci d'avoir su m'accorder ta confiance, respecter ma liberté d'action, et de m'avoir fait voyager à travers le monde pour présenter avec une grande passion mes travaux. Sans ce coup de téléphone passé début mai 2010 lorsque j'étais en première année de Master, nous ne nous serions jamais rencontrés et jamais je n'aurais pu découvrir l'Univers merveilleux de la Recherche. Tu as su révéler en moi cette grande ferveur scientifique et cette honnêteté intellectuelle que je souhaite conserver pour toujours.

Frédéric, nous nous sommes découverts au cours de mon stage de Master 2 lorsque j'ai commencé à me passionner pour les interactions bactéries/minéraux. Tu m'as initié avec patience et pédagogie à la microbiologie environnementale, tu m'as accompagné aussi bien à la paillasse qu'à l'écriture de publications, et tu m'as transmis avec ardeur ton goût pour la géomicrobiologie ainsi que tes valeurs humaines. Sans toi, je n'aurais pu éclore et m'épanouir ainsi ! Tu as su en tant que co-directeur de thèse me redonner confiance en moi, rendre visible ce que j'avais d'enfoui et m'apporter toute l'attention nécessaire à ma réalisation ! Un simple mot écrit avec un sentiment profond de reconnaissance suffit : Merci !

Je suis également très reconnaissante envers les deux directeurs successifs du laboratoire que j'ai eus le plaisir et l'honneur de connaître, Mr Jean-Claude Block et Mr Alain Walcarius. Merci de m'avoir ouvert les portes du laboratoire les jours fériés ou durant les congés. J'ai eu un grand plaisir à

partager des chocolats, de grands Bordeaux et des bières Belges avec vous, et à admirer chaque instant votre rayonnement international, par delà les océans !

J'adresse aussi mes remerciements à l'Andra pour avoir financé mon salaire et quelques compléments au cours de ces trois années de thèse, ainsi que les fonds propres du laboratoire qui m'ont permis de mener à bien cette entreprise.

Ce travail de thèse reposant sur les interactions bactéries/minéraux à base de fer, j'ai donc été « découpée » sans commune mesure et « répartie singulièrement » en 33 % et 67 % respectivement dans les équipes de Microbiologie Environnementale (MTE), et de Chimie et Spectrochimie des Interfaces (CSI). Cette division administrative s'est avérée à l'opposé du fractionnement de mon cœur où je me suis sentie plus écoutée, valorisée et épanouie au sein de l'équipe MTE durant ces trois années de thèse. Il est donc tout naturel que je remercie vivement le directeur de l'équipe MTE, Mr Christophe Gantzer, et les membres fidèles aux 36 brainstorming des vendredis midis ayant eu lieu au cours de ma thèse : Sandrine Banas, Xavier Bellanger, Isabelle Bertrand, Jean-Claude Block, Frédéric Jorand, Baptiste Maitte, Laurence Mathieu, Christophe Merlin, Stéphane Pinck, Paul-Philippe Remy, et Romain Rivet. Merci à tous pour tous les bons moments partagés, notamment l'accueil chaleureux au Pôle de l'Eau (je pense aussi à Fanny, Edith et David), les pauses déjeuner et café au RU, les pizzas commandées et les Made In France dégustés ! Et oui, on se restaure aussi au cours d'une thèse !

D'une manière générale, je souhaite remercier tous les acteurs de l'équipe CSI, dirigée par Mr Christian Ruby, avec qui j'ai pu travailler et avoir de nombreuses discussions, en particulier Cédric Carteret (sans qui mes coupons n'auraient pu être analysés en spectroscopie Raman), Manuel Dossot (merci pour avoir résolu le mystère du facteur « 6000 »), Martine Mallet et Aurélien Renard les XPSiens, Grégory Francius et Jalal Bacharouche AFM Men (et tous les doux plaisirs gustatifs et musicaux de la Swada), Erwan Andre et Romain Coustel (les deux compères), Sébastien Naille (plus à l'interface « liquide » que « solide »), et Jérôme Grausem (spectroscopie vibrationnelle...champion en natation). Je pense aussi à mes collègues de bureau Racha Ahmad, Jean Fahel et Morgan Ferté, merci pour toutes ces belles découvertes culturelles, sportives et la gastronomie Libanaise. Ce fut un réel plaisir et je vous souhaite un bel avenir ! Bienvenu au futur membre de ta famille Racha ! Je souhaite enfin une grande réussite dans l'aboutissement de leur travail de thèse à Mido (Muayad Al Jaberi), Kela Boumaiza, Arnaud Di Bitetto, Oona Freudenthal, et Dima.

Je suis aussi grandement reconnaissante aux membres de l'équipe de Chimie et Electrochimie Analytique (ELAN), animée par Mr Alain Walcarius, qui n'ont pas hésité à m'aider et me faire bénéficier de leurs compétences tout au long de ma thèse. Merci pour la patience et toute la pédagogie développée par Christelle Despas pour que je réussisse à « maîtriser » la chromatographie ionique (il y en a eu des fuites mais tel un vrai Super Mario Bros tu as su en venir à bout). Et comment ne pas faire le lien avec Michel Perdicakis ! Merci Michel pour tes conseils de mesure de potentiel rédox. J'adresse aussi mes remerciements à Mathieu Etienne, Grégoire Herzog, Lukasz Poltorak et Yoan Valkulko pour leur implication lors de mes balbutiements en électrochimie. Enfin, je te remercie vivement Neus Vila pour m'avoir soutenue lors de ma candidature en Suisse et avoir pris le temps de corriger mes documents... Résultat : Bienvenue chez les Helvètes (au 1^{er} septembre 2015 j'intégrerai la prestigieuse école polytechnique de Zurich) !

Une thèse se déroule aussi grâce aux « partenaires de thèse » : Pépé et Baptounet je vous remercie de m'avoir fait tant rire durant ces trois années, de m'avoir fait chanter (« tomber d'en haut, comme une p'tite goutte d'eau... »), de m'avoir donné de drôles d'idées (dead bacteria inside the microwave... paaaaannn !), de m'avoir fait boire (on n'en dira pas plus), et d'avoir aussi travaillé ensemble ! J'espère pouvoir être présente à vos soutenances très prochaines !

Une pensée toute particulière aux filles du « Kfé » : Christelle Ruh, Marie Fercier, Christelle Despas et Jacqueline Druon ! Merci pour ces fous rires matinaux qui en ont surpris plus d'un (n'est-ce pas Marc ?) et les douceurs briochées ! Et comment ne pas penser aux mecs de l'atelier : Papi JP, Gégé, et Patrick ! Sans vous, la vie au labo serait moins chouette, j'vous l'ai dit ! Merci.

La thèse, c'est sport ! Alors je remercie les membres de notre Team Smash qui a mis une volée aux étudiants de la fac de Sciences : Claire Bertrand, Cyril Bontemps, Damien Blaudez ! Qui c'est les plus forts c'est ... ? La Team Smash ! Un grand merci aussi aux autres collègues du bad : Virginie Libante, Grégory Koff, Maxime Foussaint, Emilie Piotrowski et Henri Pégéot !

La thèse, c'est aussi des collaborateurs : Pick (Patrick Billard, LFC), Laurent Truche (Géoresources), Isabelle Bihannic (LFC), Renaud Hley (LFC), Jaafar Ghanbaja (IJL), Sylvie Migot (IJL), Christophe Cloquet (CRPG), Nicolas Estrade (UBG), Jennyfer Miot (I.M.P.M.C), Alexandre Romaine (LaSIC)... Merci à vous tous !

La thèse, c'est aussi les plaisirs ! Merci à toute mon équipe de salsa : Thomas & Sidonie (mes profs), Grég & Valou (mes boulangers/pâtisseries préférés et leurs deux enfants adorables Valentin et Laurie), Karim & Valérie, Michel & Pascale, Philippe & Mélina, Amélie, Olivier and so on. Merci à mes amis Jul' & Bichounet (les Queen du monde médical), Sylvia (la Reine de la douceur et du partage), Mylène (qui termine sa thèse au SRSMC dans l'équipe MoBAT, et avec qui j'ai eu la chance de découvrir les joies de la ferme et les plaisirs culinaires de la campagne), Alice, Lucas, Thomas, Pierre, pour toutes les sorties, les soirées et les vacances que l'on a passées ensemble ! Et comment ne pas penser à « Be » (Brian) & Victorine... Que de souvenirs mémorables et de moments de détente !

La thèse, c'est aussi la Famille ! Je la remercie du fond de mon cœur, et tout particulièrement mes Bouboulettes (Isa & Philippe), ma Tante Val', mon Frère Vic' et ma grand-mère Mamet qui ont assisté à ce moment crucial dans la vie d'un chercheur ! Ils ont pu observer avec leurs yeux bienveillants et aimants l'aboutissement de trois ans de travail, d'une fille adoptive, d'une nièce, d'une grande sœur et d'une petite fille ! Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir accueilli pour les vacances passées loin de ma Famille qui vit à la Réunion : mes parents et le plus petit de mes frères Timothé ! Vous me manquez et malgré la distance et les difficultés, je me suis battue pour atteindre mon rêve : faire de mes passions scientifiques mon travail ! Mi aim a zot é mwen na besoin d'soley dan l'hèr ! Merci aussi à Tonton Oliv' & Tata Val', à mon Jujú, ma Romanette et ma Laurinette pour tous les merveilleux moments passés ensemble ! Que de souvenirs aussi gravés dans ma mémoire lors de nos traditionnelles « Cousinades » : Soso, Lolo, Mimi, Sylvo, Aurel, Théo, Tonton Oliv', Tata Gigi, Tata Micheline, ... les barbecues, les guitares au coin du feu (« Je m'baladais sur l'avenue, le cœur ouvert à l'inconnu, j'avais envie de dire bonjour à n'importe qui... »), les parties de jeu, ... Je remercie aussi ma Belle-Famille (Mado & Gilbert, Cath' & Sylvain, Natacha, Anouk, Yves) ainsi que Papi et Mamie. J'ai aussi une énorme pensée à mon grand-père Papet, à Tata Bernadette et à Tonton Henri qui, je l'espère, sont fiers de moi à travers les étoiles !

Et une thèse, ça se termine par quelques mots tendres destinés à celui qui partage ma vie depuis plus de deux ans... Comme le martinet noir, tu ne cesses de faire virevolter ma vie à travers de petits bonheurs et de grandes joies ! Jamais le martinet noir ne se repose et son cri estival retenti à mes côtés chaque année grâce à Toi ! La vie est plus douce, plus sereine et tu me fais tourner au gré de tes ravissements ! C'est donc du plus profond de mon cœur que je te dédie ce travail et mon éclosion !



Table des matières

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION GÉNÉRALE | 17 |
| CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 23 |
| I. L'ENFOUISSEMENT DES DÉCHETS RADIOACTIFS EN MILIEU ARGILEUX EN FRANCE | 25 |
| I.1. Les enjeux..... | 25 |
| I.2. Les concepts développés et les matériaux employés..... | 26 |
| I.3. Problématique de la biodétérioration des surconteneurs de stockage des déchets radioactifs..... | 29 |
| II. LA CORROSION DE L'ACIER NON ALLIÉ EN MILIEU ANOXIQUE | 31 |
| II.1. Les processus de corrosion en milieu anoxique | 32 |
| II.1.1. La corrosion généralisée ou uniforme..... | 32 |
| II.1.2. La corrosion localisée..... | 33 |
| II.2. Les produits de corrosion | 34 |
| II.2.1. Les oxydes de fer..... | 34 |
| II.2.2. Les oxyhydroxydes ferriques | 36 |
| II.2.3. Les rouilles vertes..... | 37 |
| II.2.4. Les sulfures de fer | 40 |
| II.2.5. Produits de corrosion carbonatés : sidérite, chukanovite | 40 |
| III. REACTIVITÉ DE L'ACIER NON ALLIÉ EN FORMATION GÉOLOGIQUE PROFONDE..... | 41 |
| III.1. Interactions fer/argile : principes et processus..... | 41 |
| III.1.1. Les argiles et argilites | 41 |
| III.1.2. Réactivité des argilites : smectites et phases porteuses de fer | 43 |
| III.1.3. Corrosion d'un colis de stockage au sein de l'argilite du Callovo-Oxfordien..... | 44 |
| III.2. L'activité microbienne en stockage profond argileux | 47 |
| III.2.1. Métabolisme bactérien en sous-sol profond | 47 |
| III.2.2. Impacts de la radioactivité et de la température à proximité des alvéoles sur les microorganismes | 52 |
| III.2.3. Activités des microorganismes attendues à l'interface fer/argilite du Callovo-Oxfordien | 53 |

| | |
|--|-----------|
| III.2.3.a. Interactions fer et communautés bactériennes des biofilms en milieu anoxique..... | 53 |
| III.2.3.b. Bioréduction du fer ferrique des smectites | 57 |
| III.2.3.c. Biocorrosion ou corrosion influencée par les bactéries | 58 |
| III.2.3.c.(i) Influence de la corrosion de l'acier non allié par les bactéries sulfato et thiosulfatoréductrices (SRB et TRB)..... | 58 |
| III.2.3.c.(ii) Les bactéries ferriréductrices (IRB) et leur rôle dans la dégradation des produits de corrosion du fer constitutifs de la couche passivante | 60 |
| III.2.3.c.(iii) Implication des bactéries ferroxydantes (IOB) dans la continuité du processus de biocorrosion | 62 |
| III.2.3.c.(iv) Rôle des bactéries ferroxydantes nitrate-réductrices (IONRB) dans la corrosion microbienne | 62 |
| III.2.3.c.(v) Intervention des bactéries réductrices des nitrates (NRB) dans les processus de corrosion | 64 |
| III.2.3.c.(vi) Récapitulatif de l'action des groupes métaboliques IRB, IOB et IONRB sur les transformations des produits de corrosion | 66 |
| CHAPITRE II : OBJECTIFS DE LA THESE ET DEMARCHE EXPERIMENTALE..... | 67 |
| CHAPITRE III : OXYDATION INDIRECTE DE LA SIDERITE PAR L'ACTIVITE DES BACTERIES REDUCTRICES DES NITRATES (NRB)..... | 75 |
| I. INTRODUCTION | 77 |
| II. MATERIELS ET METHODES..... | 78 |
| II.1. Préparation de la suspension de <i>Klebsiella mobilis</i> et des milieux d'incubation..... | 78 |
| II.2. Numération des bactéries, analyses chimiques et instrumentation | 80 |
| II.3. Calcul de la vitesse initiale r_0 d'oxydation des espèces Fe(II)..... | 83 |
| III. RESULTATS ET DISCUSSION | 85 |
| III.1. Oxydation du fer ferreux et bioréduction des nitrates | 85 |
| III.2. Réduction des nitrates en ammonium par les espèces Fe(II)..... | 88 |
| III.3. La rouille verte carbonatée : une phase transitoire de l'oxydation indirecte du fer ferreux | 90 |
| III.4. Réactivité de la rouille verte carbonatée avec les nitrites et/ou les nitrates..... | 93 |
| III.5. Nucléation des cristaux de rouilles vertes carbonatées à la surface des bactéries | 97 |

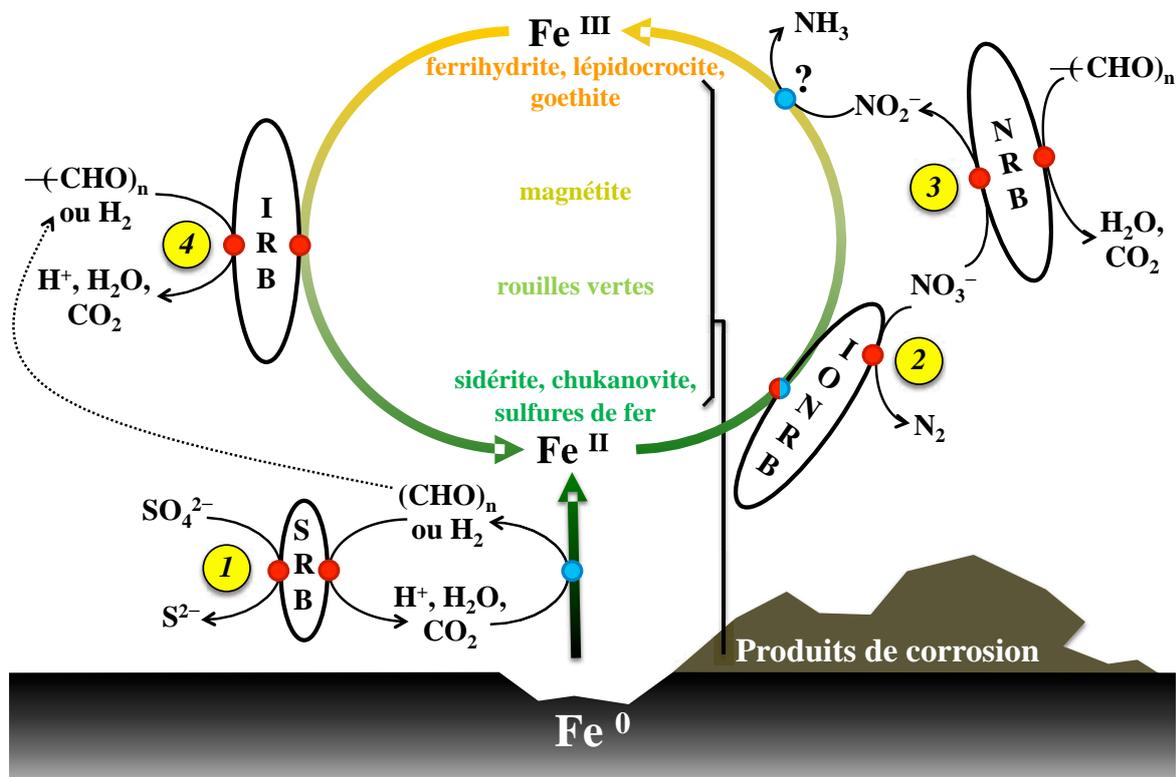
| | |
|---|------------|
| III.6. Formation de rouille verte carbonatée par <i>Klebsiella mobilis</i> en présence de donneurs organiques d'électrons | 99 |
| IV. CONCLUSION | 111 |
| CHAPITRE IV : REDUCTION DIRECTE DE LA MAGNETITE PAR LA RESPIRATION DES BACTERIES FERRIREDUCTRICES (IRB) EN PRESENCE DE DIHYDROGENE..... | 115 |
| I. INTRODUCTION | 117 |
| II. MATERIELS ET METHODES..... | 119 |
| II.1. Préparation de la suspension de <i>Shewanella putrefaciens</i> et des milieux de bioréduction | 119 |
| II.2. Synthèse des magnétites..... | 121 |
| II.2.1. Magnétite formée par coprécipitation de sels de fer ferreux et ferrique | 121 |
| II.2.2. Magnétite issue de l'oxydation de la rouille verte carbonatée par les nitrates..... | 121 |
| II.2.3. Bioréduction de la lépidocrocite et formation de biomagnétite | 121 |
| II.3. Analyses chimiques et instrumentation..... | 122 |
| III. RESULTATS ET DISCUSSION | 123 |
| III.1. Caractérisation des nanoparticules de magnétite synthétisées..... | 123 |
| III.2. Suivi de la bioréduction du fer ferrique | 125 |
| III.2.1. Influence de la densité bactérienne sur la cinétique de bioréduction de la magnétite..... | 125 |
| III.2.2. Impact de la cinétique de bioréduction de la magnétite par les variations de surfaces spécifiques | 131 |
| III.2.3. Effets de la concentration bactérienne et des surfaces spécifiques des magnétites sur le potentiel rédox et le pH..... | 133 |
| III.3. La rouille verte carbonatée et la sidérite : des minéraux secondaires biogénérés lors de la réduction microbienne de la magnétite | 136 |
| III.4. Diagramme de Pourbaix : validation du processus de dissolution/reprécipitation au cours de la réduction microbienne de la magnétite..... | 141 |
| IV. CONCLUSION | 147 |

| | |
|---|------------|
| CHAPITRE V : ACTIVITES DES NRB SUR LES FILMS DE MAGNETITE/SIDERITE A LA SURFACE DE L'ACIER NON ALLIE | 151 |
| I. INTRODUCTION | 153 |
| II. MATERIELS ET METHODES..... | 154 |
| II.1. Génération par polarisation anodique à courant imposé d'un film de magnétite/sidérite à la surface d'un coupon en acier non allié..... | 154 |
| II.2. Culture de <i>Klebsiella mobilis</i> et préparation des milieux d'incubation en présence des films de magnétite/sidérite sous atmosphère H ₂ | 158 |
| II.3. Analyses chimiques et instrumentation..... | 159 |
| III. RESULTATS ET DISCUSSION | 160 |
| III.1. Caractérisation de la bicouche magnétite/sidérite à la surface de l'acier non allié ... | 160 |
| III.2. Incubation de <i>Klebsiella mobilis</i> en présence de films magnétite/(sidérite-chukanovite) sous atmosphère en dihydrogène | 167 |
| III.2.1. Absence de variations du potentiel d'électrode E_h et du pH au cours de la période d'incubation bactérienne | 167 |
| III.2.2. Transformation de la bicouche magnétite/(sidérite-chukanovite) en mackinawite et greigite par <i>Klebsiella mobilis</i> | 168 |
| IV. CONCLUSION | 174 |
| CONCLUSIONS - DISCUSSION | 177 |
| RÉFÉRENCES..... | 185 |

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'Andra (Agence nationale pour la gestion des déchets radioactifs) a pour mission de gérer à long terme les déchets radioactifs produits en France. Après avoir conclu en 2005 à la faisabilité du stockage en sous-sol profond pour les déchets de haute activité à vie longue (HAVL) et de moyenne activité à vie longue (MAVL), l'Andra a été chargée de la conception et de l'implantation d'un centre de stockage souterrain pour ces déchets, appelé Cigéo (Centre industriel de stockage géologique profond). La mise en service industrielle doit se faire à l'horizon 2025. La roche hôte étudiée se situe en bordure Est du Bassin de Paris, à environ 500 m de profondeur : les argilites du Callovo-Oxfordien. Les déchets HAVL sont les résidus vitrifiés du retraitement des combustibles usés. Ils seront coulés dans un conteneur primaire en acier inoxydable avant d'être chemisés par un surconteneur en acier non ou faiblement allié, puis glissés dans des galeries de stockage cylindriques du Callovo-Oxfordien (Andra, 2005). Au cours de ces quinze dernières années, de nombreux travaux ont été menés afin de comprendre et modéliser le plus fidèlement possible les mécanismes de corrosion d'un tel acier enfoui dans le milieu argileux du Callovo-Oxfordien. Les colis de déchets radioactifs subiront différents types de détériorations durant leur stockage pendant plusieurs centaines d'années (Andra, 2005). Malgré le fait que les processus purement électrochimiques soient relativement bien établis et leurs cinétiques détaillées, à ce jour, l'influence des microorganismes sur ces mécanismes a fait l'objet de relativement peu d'études et les réactions mises en jeu font encore débat. Ainsi, la prédiction de la corrosion des structures en acier sur ce long terme ne repose bien souvent que sur la base d'une surévaluation empirique de la dégradation moyenne due aux processus abiotiques.

Dans le laboratoire de recherche souterrain de Meuse/Haute-Marne de l'Andra, diverses souches bactériennes susceptibles de contribuer à une dégradation du surconteneur ont été identifiées (Poulain, 2006 ; Vinsot *et al.*, 2008 ; El Hajj, 2010). Il s'agit de bactéries sulfatoréductrices (SRB) et thiosulfatoréductrices (TRB). Ces groupes métaboliques sont connus pour intervenir dans la « corrosion microbienne » (ou MIC pour *Microbially Influenced Corrosion*) où ils créent des conditions propices à l'apparition de processus de corrosion et/ou inhibent/accélèrent des mécanismes de corrosion déjà en place (Crolet, 1995 ; Beech & Sunner, 2004).



- ① Réduction des sulfates en sulfures par les bactéries sulfatoréductrices (SRB) entraînant la formation de sulfures de fer
 - ② Réduction des nitrates couplée à l'oxydation du fer ferreux par les bactéries ferroxydantes nitrates-réductrices (IONRB)
 - ③ Réduction des nitrates en nitrites par les bactéries nitrate-réductrices (NRB)
 - ④ Réduction du fer ferrique en fer ferreux par les bactéries ferriréductrices (IRB)
- Réaction biotique (catalysée enzymatiquement)
 - Réaction biotique/abiotique ?
 - Réaction abiotique

Figure 1. Contribution des groupes métaboliques bactériens anaérobies aux transformations des espèces du fer en milieu anoxique.

La génération de sulfures par les SRB et TRB (**réaction n° 1, Figure 1**) provoque un transfert d'électrons depuis le fer métallique vers les sulfures de fer – produits de corrosion issus de la précipitation du fer ferreux avec les sulfures – formant ainsi une pile galvanique (Marchal, 1999 ; Beech & Sunner, 2007).

Lors du creusement de l'ouvrage souterrain, l'intrusion et la diffusion d'oxygène atmosphérique au sein de l'excavation contenant les colis de déchets radioactifs imposeraient des conditions oxydantes très brèves sur l'échelle des temps géologiques (de 7 à 10 ans). Suite à cette période oxydante, les conditions réductrices (- 500 mV, pH 7) et anoxiques prévaleront à nouveau (Andra, 2005). A ce niveau, il est essentiel de considérer l'ensemble des mécanismes de corrosion susceptibles de se produire pour renseigner au mieux les modèles permettant de prédire les cinétiques de corrosion. Les bactéries sont susceptibles de contribuer à certains de ces mécanismes et, en particulier, celles qui sont en relation avec le cycle biogéochimique du fer en anoxie (**Figure 1**). Dans le milieu de stockage des HAVL, les concentrations en nitrates attendues sont estimées à moins d'un millimolaire (Vinsot *et al.*, 2008). Bien que ces concentrations soient relativement faibles pour entretenir significativement un métabolisme respiratoire, les interactions des bactéries avec les nitrates doivent être prises en compte car elles intéressent directement le cycle biogéochimique du fer en anoxie (**réaction n° 3, Figure 1**). En effet, l'ion nitrate étant l'oxydant présentant le potentiel rédox le plus élevé en l'absence d'oxygène, il est capable d'être utilisé par l'activité microbienne et peut entraîner une oxydation, directe (**réaction n° 2, Figure 1**) ou indirecte (**réaction n° 3, Figure 1**), des espèces Fe(II). La capacité des bactéries à respirer, *i.e.* réduire, les nitrates en nitrites en anoxie et à pH neutre (**réaction n° 3, Figure 1**) étant en général bien représentée parmi les communautés bactériennes du sol, il nous a semblé pertinent de s'intéresser à ce groupe métabolique des NRB (*nitrate-reducing bacteria*), d'autant plus que les nitrites générés présentent une plus forte réactivité que les nitrates envers les espèces Fe(II).

Des phénomènes de corrosion induits par des groupes métaboliques utilisant directement le fer, telles les bactéries ferroxydantes et les bactéries ferriréductrices, ont aussi été recensés dans la littérature (Beech & Gaylarde, 1999). A l'heure actuelle, la contribution de ces groupes métaboliques dans les processus de corrosion est peu documentée, voire

absente en ce qui concerne les bactéries ferroxydantes nitrates-réductrices ou IONRB. En dehors des silicates de fer issus des interactions avec les argiles – que nous n’avons pas considérés ici – les produits de corrosion sidérite (FeCO_3) et magnétite (Fe_3O_4) sont attendus à la surface de l’acier corrodé en milieu anoxique (Necib Ammour, 2013) et pourraient jouer un rôle passivant et protecteur envers les processus de corrosion. Ce rôle pourrait être compromis par l’activité des IRB (**réaction n° 4, Figure 1**) et/ou des IONRB (**réaction n° 2, Figure 1**) susceptibles, respectivement, de réduire ou d’oxyder le fer de ces minéraux. En absence d’oxygène se pose donc la question de la réactivité des microorganismes anaérobies avec ces produits de corrosion. Est-ce que les bactéries générant des espèces réactives de l’azote comme les nitrites (**réaction n° 3, Figure 1**) ou utilisant le fer en tant qu’accepteur (**réaction n° 4, Figure 1**) ou donneur (**réaction n° 2, Figure 1**) d’électrons sont capables de déstabiliser les films de produits de corrosion FeCO_3 et Fe_3O_4 ? Nous verrons que la réalité d’une oxydation enzymatique des espèces Fe(II) par les nitrates est largement discutable (**réaction n° 2, Figure 1**), la réaction du fer ferreux avec les nitrites issus de la respiration des nitrates ayant vraisemblablement laissé croire à une telle réaction. De fait, nous n’avons pas exploré l’activité du groupe métabolique IONRB – représenté par des bactéries telles que *Acidovorax* BoFeN1 (Kappler *et al.*, 2005) ou *Azospira oryzae* (Chaudhuri *et al.*, 2001) – dont l’existence est de plus en plus remise en question.

Afin d’apporter les éléments de réponse à cette question fondamentale de la déstabilisation des films de sidérite et de magnétite par l’activité bactérienne réductrice des nitrates ou du fer ferrique, le manuscrit a été organisé en cinq parties :

La synthèse bibliographique (**Chapitre I**) commence par rappeler la démarche retenue par l’Andra pour le stockage des déchets radioactifs dans des colis en acier non allié enfouis en formation géologique profonde en France. Au cours de leur entreposage, les processus de corrosion auxquels ces colis sont susceptibles d’être exposés se dérouleraient principalement en conditions anoxiques. La formation de produits de corrosion attendus dans ces conditions établit le second volet de l’étude bibliographique. Les interactions entre certains groupes métaboliques du sol et l’acier non allié ou les produits de corrosion, en tant que sources de donneurs ou accepteurs d’électrons impliqués au cœur des mécanismes de

conversion énergétique bactériens, sont mises en avant dans un dernier pan consacré à la corrosion influencée par les bactéries ou MIC.

L'état de l'art ainsi établi, les objectifs de la thèse, les verrous scientifiques à lever, et la stratégie expérimentale adoptée seront développés dans le **Chapitre II**. Cette thèse a pour objectif de mettre en évidence les transformations de la sidérite et de la magnétite liées à l'activité de microorganismes anaérobies (NRB et IRB). Étudiés séparément et en souches pures, les NRB et IRB ont dans un premier temps été inoculées respectivement en présence de poudre de sidérite (**Chapitre III**) et de magnétite (**Chapitre IV**) avant d'analyser leurs effets sur les films de sidérite/magnétite (**Chapitre V**). Les **chapitres III, IV et V** constituent donc les parties expérimentales du projet.

Au contact de *Klebsiella mobilis*, utilisée comme modèle du groupe métabolique des NRB, la sidérite particulière a été progressivement oxydée en rouille verte carbonatée et/ou goethite (**Chapitre III**). L'importance de la densité bactérienne, des concentrations en nitrates et donneurs d'électrons organiques sur la « bifurcation réactionnelle » est discutée. Un mécanisme de formation de ces minéraux secondaires, jusqu'ici encore inconnu, a été proposé selon une oxydation indirecte du fer ferreux liée à la production de nitrites par la respiration bactérienne des nitrates.

La magnétite, considérée jusqu'à présent comme un oxyde de fer ultime non bioréductible, a été réduite en rouille verte carbonatée et sidérite par *Shewanella putrefaciens*, bactérie modèle du groupe métabolique des IRB (**Chapitre IV**). En plus de déterminer l'impact de la concentration bactérienne sur les quantités de fer ferrique réduit, diverses poudres de magnétite ont été synthétisées en laboratoire afin d'étudier l'influence de leurs surfaces spécifiques. Une telle étude systématique avec suivi du potentiel rédox et du pH au cours de la réduction microbienne de la magnétite a permis de valider le processus de dissolution/re-précipitation évoqué depuis la fin des années 90.

Enfin, élaborés par polarisation anodique à courant imposé, les films de sidérite/magnétite ont été incubés en présence de *Klebsiella mobilis* (**Chapitre V**). Bien que préliminaires, ces premières études se distinguent de celles menées sur poudre. Les films de sidérite/magnétite au contact des NRB ont été totalement transformés en mackinawite et greigite (des sulfures de fer) au lieu des phases rouille verte carbonatée et goethite attendues.

Ce présent manuscrit de thèse se clôture par les conclusions générales du point de vue fondamental (complétude du cycle biogéochimique du fer par cinq nouvelles réactions ; remise en cause de l'existence même du groupe métaboliques des bactéries ferroxydantes réductrices des nitrates IONRB, telles que la souche *Acidovorax* BoFeN1) et du point de vue du stockage (paramètres physicochimiques du milieu ; souches bactériennes représentatives des activités réductrices du fer ferrique et des nitrates ; conditions de carence nutritive ; donneur inorganique d'électrons tel que le dihydrogène), et finalement les perspectives ouvertes par ce travail.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I. L'enfouissement des déchets radioactifs en milieu argileux en France

I.1. Les enjeux

L'énergie nucléaire, à la base de la production électrique en France, est la source primaire d'émission de déchets radioactifs (~ 85 % des déchets nucléaires). Ceux-ci sont qualifiés d'ultimes lorsque, issus de l'énergie nucléaire après retraitement du combustible usé et revalorisation de l'uranium et du plutonium, ils sont constitués de produits de fission et d'actinides (3 – 5 % des déchets nucléaires). Ces derniers sont alors piégés dans une matrice en verre via un procédé de vitrification. Des sources secondaires issues par exemple du domaine médical ou d'activités de recherches peuvent également générer des déchets radioactifs.

En France, la classification des déchets radioactifs repose sur le niveau de rayonnement et la durée de radioactivité des nucléides présents dans le déchet (**Tableau 1**).

Tableau 1. Mode de stockage des déchets radioactifs en France selon leur durée de vie et leur niveau de radioactivité.

| Type de déchet | Durée de vie | |
|--------------------------------------|--|--|
| | Courte (VC) ($t_{1/2} < 30$ ans) | Longue (VL) ($t_{1/2} > 30$ ans) |
| Très faible activité (TFA) | Surface (centre de Morvilliers, Aube) | Surface (centre de Morvilliers, Aube) |
| Faible Activité (FA) | Surface (centre de Soulaines, Aube) | Faible profondeur (- 15 m à - 200 m ; en 2019) |
| Moyenne Activité (MA) | Surface (centre de Soulaines, Aube) | Profondeur (- 400 m à - 500 m ; centre Cigéo, Meuse/Haute-Marne en 2025) |
| Haute Activité (HA) | Profondeur (- 400 m à - 500 m ; centre Cigéo, Meuse/Haute-Marne en 2025) | Profondeur (- 400 m à - 500 m ; centre Cigéo, Meuse/Haute-Marne en 2025) |

Les déchets à haute activité et vie longue (HAVL) et moyenne activité à vie longue (MAVL) seront stockés en profondeur (~ – 500 m) sur le site Cigéo (en Meuse/Haute-Marne, France). Les HAVL présentent un niveau de radioactivité d'environ 10^{12} Bq/g et un temps de demi-vie de l'ordre de 1 000 ans.

L'Andra – Agence nationale pour la gestion des déchets radioactifs – s'est vue confier la conception et la démonstration de la faisabilité du stockage de ces deux types de déchets radioactifs HAVL et MAVL en formation profonde (loi Bataille du 30 décembre 1991, Annexe 2). Ces recherches sont effectuées sous le contrôle de l'ASN – Autorité de Sureté Nucléaire – et avec l'appui technique de l'IRSN – Institut de Radioprotection et de la Sureté Nucléaire. Au niveau européen, plusieurs encaissants sont étudiés actuellement : granite (Suède et Finlande), dômes de sels (Allemagne), et argile (Suisse, Belgique et France). La formation géologique retenue devra assurer le confinement des déchets radioactifs sur de très longues années – supérieur à 100000 ans – afin d'éviter la dissémination des radionucléides contenus dans les colis de stockage. Une mise en service du stockage des déchets radioactifs en formation géologique profonde est prévue en 2025 par la France.

I.2. Les concepts développés et les matériaux employés

Le stockage géologique en profondeur est conçu pour limiter le relâchement et la migration des radioéléments sur de longues échelles de temps. Celui-ci repose sur le principe de multi-barrières qui consiste en la superposition de plusieurs couches de protection (**Figure 2**) :

1. Une matrice vitreuse en verre borosilicaté R7/T7 contenant les déchets radioactifs ;
2. Un conteneur en métal inoxydable dans lequel seront coulés les déchets vitrifiés (colis primaire) ;
3. Un surconteneur en acier non ou faiblement allié ;
4. La formation argileuse : barrière naturelle de l'encaissant.

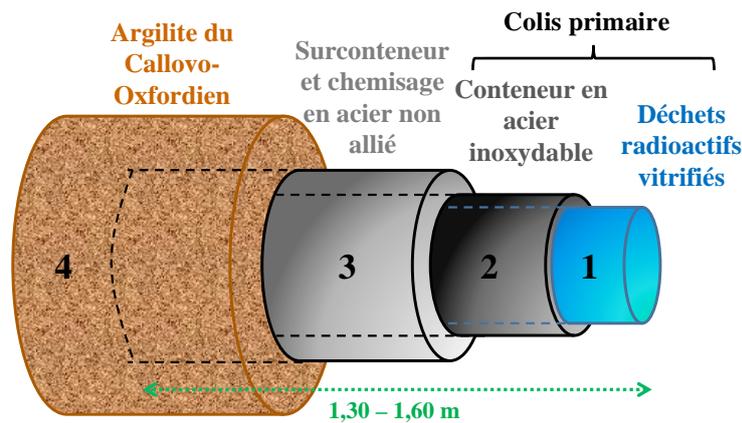


Figure 2. Illustration du concept multi-barrières des déchets radioactifs HAVL (adapté de Andra, 2005) 1 – matrice vitreuse en verre borosilicaté contenant les déchets radioactifs ; 2 – conteneur en acier inoxydable (75 mm d'épaisseur) dans lequel sont coulés les déchets radioactifs vitrifiés ; 3 – surconteneur en acier non allié (55 mm d'épaisseur) réceptionnant le colis primaire ; 4 – milieu de stockage des colis de déchets radioactifs, l'argilite du Callovo-Oxfordien.

Le concept multi-barrières ne se limite pas au colis de stockage et s'étend aussi sur une échelle plus grande qu'est le milieu encaissant. Sur le site de Bure, le milieu argileux étudié est l'argilite du Callovo-Oxfordien. Il est situé à – 500 m entre deux couches calcaires : le Dogger sous-jacent et l'Oxfordien carbonate sus-jacent (**Figure 3**). Cette formation géologique a été mise en place à l'ère du Jurassique, soit de – 158 à – 152 Ma. Il s'agit d'un dépôt détritique composé de 60 % en masse de minéraux argileux, de quartz fins et de carbonates (Yven *et al.*, 2007). Cet encaissant a été retenu car il présente de très bonnes propriétés de confinement pour le stockage des déchets radioactifs sur le long terme. Très faiblement perméable, homogène sur une grande surface, cette formation n'est affectée par aucune faille détectable dans l'environnement immédiat du laboratoire souterrain de Bure, environnement également caractérisé par une très faible sismicité. Dans les formations calcaires sus- et sous-jacentes aux argilites du Callovo-Oxfordien, les circulations d'eaux souterraines sont faibles à très faibles, sans connexion avec la surface ou via les argilites. Cette dernière se déforme peu suite aux perturbations dues au creusement minier et face aux impacts thermiques et radioactifs des déchets et matériaux de stockage (Poulain, 2006).

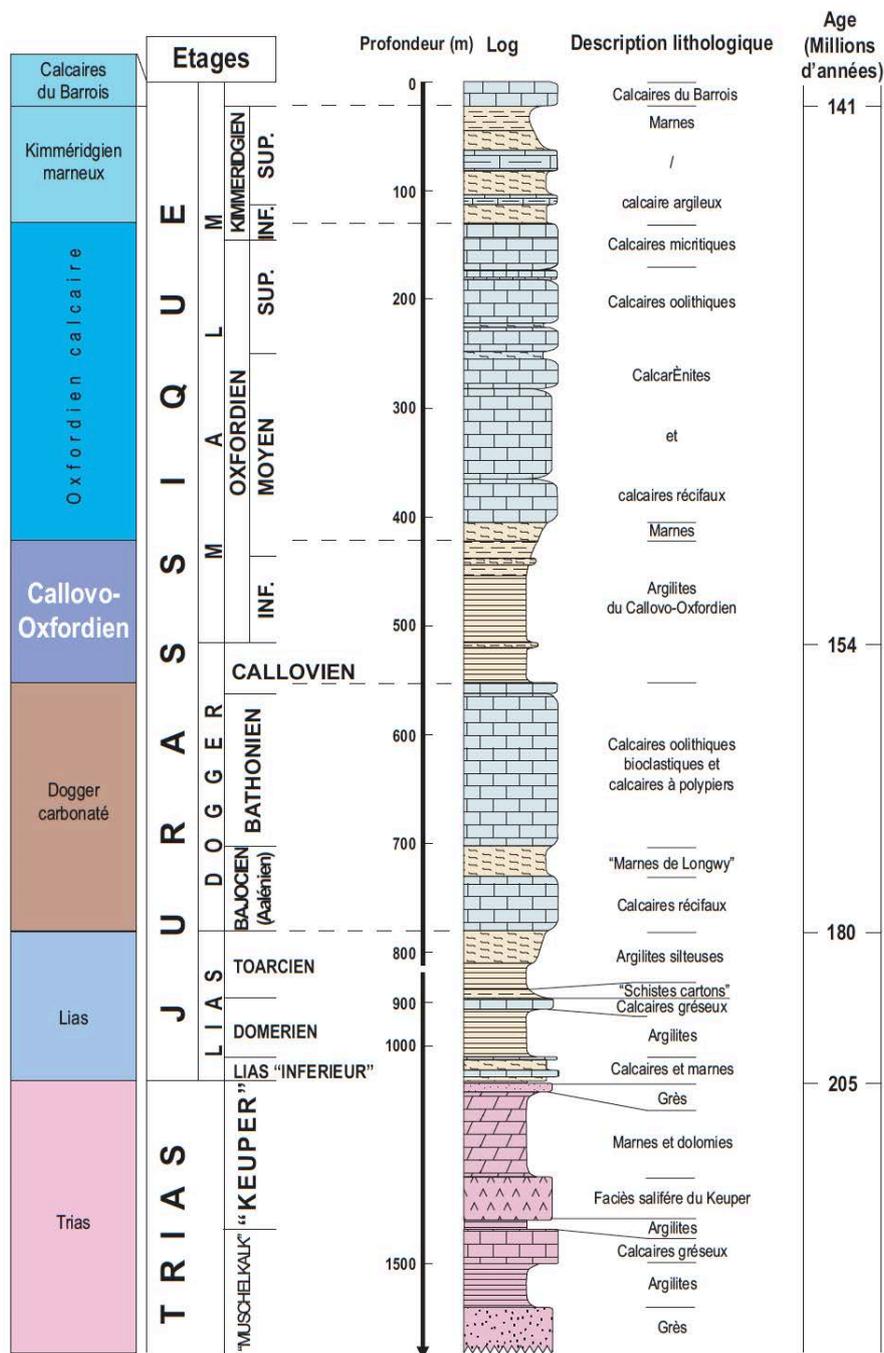


Figure 3. Coupe géologique transversale effectuée sur le site du laboratoire de recherche souterrain de Bure (Andra, 2005).

Les déchets radioactifs HAVL et MAVL ne seront pas enfouis sur les mêmes zones de stockage sur le site de Meuse/Haute-Marne, au sein des alvéoles (**Figure 4**). Les zones de stockage seront réparties sur un seul niveau du Callovo-Oxfordien permettant une égale protection des colis de stockage par les couches géologiques inférieures et supérieures. L'alvéole contenant 3 à 4 colis HAVL sera clôturée par un bouchon métallique permettant une protection radiologique, par un bouchon en argile assurant une fonction hydrologique et par un bouchon en béton garantissant un maintien mécanique de la structure.

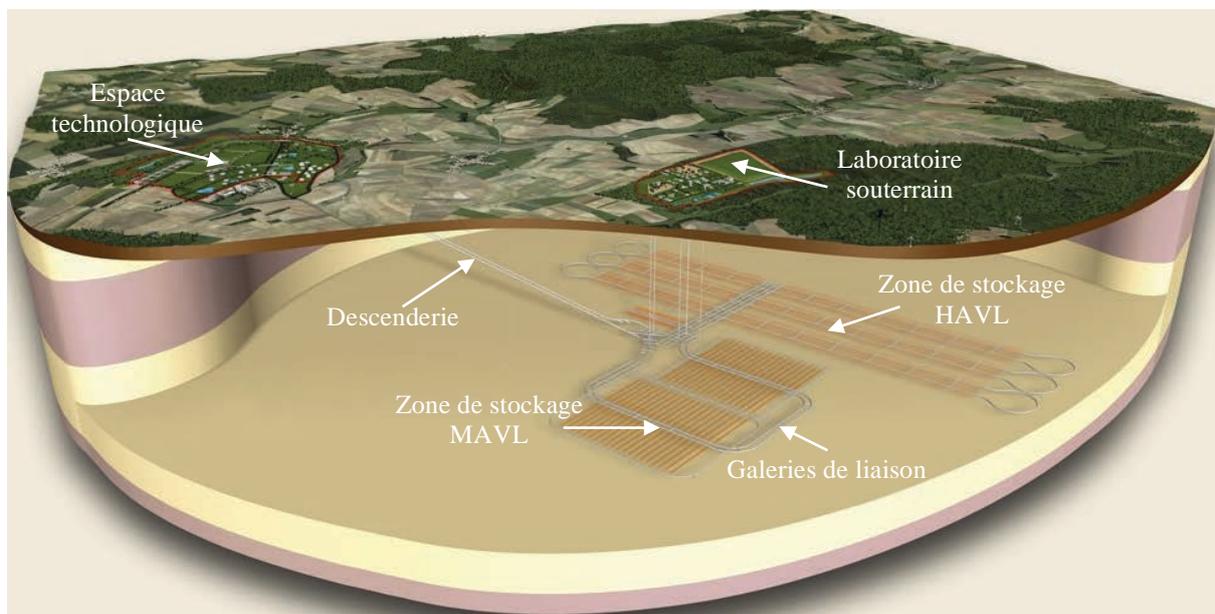


Figure 4. Disposition des zones de stockage des déchets MAVL et HAVL sur le site Cigéo : les installations de surfaces comprennent le laboratoire souterrain de Meuse/Haute-Marne ainsi qu'un espace technologique duquel part la descenderie qui permettra d'acheminer les colis HAVL et MAVL sur leurs zones de stockage respectives, reliées entre elles par des galeries de liaison.

I.3. Problématique de la biodétérioration des surconteneurs de stockage des déchets radioactifs

Au cours du stockage en milieu argileux profond, les colis de déchets radioactifs vont subir une succession de conditions physico-chimiques provoquant leur détérioration. Comment s'assurer que ceux-ci ne vont pas s'altérer avant la fin de l'activité radioactive des déchets ? Les processus d'altération sont multiples et complexes, et ont fait l'objet de

nombreuses études. Parmi les mécanismes potentiels, l'activité microbienne est un paramètre qui reste encore à approfondir. Celle-ci est reconnue pour influencer la corrosion du colis de stockage entraînant plusieurs phénomènes : i) une évolution géochimique des matériaux (ici, l'acier non allié constituant le surconteneur), ii) une modification chimique de l'environnement de stockage, iii) une accélération/un ralentissement des mécanismes de corrosion/dissolution à l'interface fer/argile, iv) la production de différents produits de réactions (oxydes de fer, gaz, ...) (Geesey & Flemming, 1991 ; Videla, 1996 ; Javaherdashti, 2008).

Le Groupement de Laboratoires Verre Fer Argile (GL-VFA) créé et géré par l'Andra étudie les phénomènes de corrosion du surconteneur de stockage, dont la corrosion influencée par les bactéries. D'après les recherches précédemment menées, il apparaît que la taille des pores de l'encaissant serait trop petite pour permettre un développement ainsi qu'une croissance des microorganismes loin des alvéoles (El Hajj, 2010). En revanche, à proximité de celles-ci il y a une possibilité de croissance bactérienne car l'espace disponible entre les matériaux est plus grand pour leur survie, les nutriments dont les sources de donneurs d'électrons potentiels sont présents (inorganiques et organiques). Les microorganismes peuvent être autochtones ou introduits par les activités humaines lors de la construction des alvéoles.

La littérature recense une altération des oxydes et métaux par l'activité bactérienne (Geesey & Flemming, 1991 ; Crolet, 1995 ; Bachofen *et al.*, 1998 ; Beech & Gaylarde, 1999 ; Lee & Newman, 2003). En conditions anoxiques, la croissance des microorganismes peut entraîner une acidification du milieu par la production d'H₂S ou d'acides organiques accélérant ainsi la corrosion des matériaux (Videla, 1996 ; Castaneda & Benetton, 2008). L'identification de bactéries sulfatoréductrices (SRB) et thiosulfatoréductrices (TRB) alliée à la présence de produits de corrosion spécifiques (sulfures de fer) dans les expérimentations menées en laboratoire souterrain de Meuse/Haute-Marne suggère que ces groupes métaboliques peuvent participer aux processus de corrosion des colis de stockage HAVL (Necib Ammour, 2013). Sont-ils cependant les seuls microorganismes qui pourraient être impliqués ? Est-ce que d'autres groupes métaboliques comme les bactéries ferroxydantes

(IOB) et les bactéries ferriréductrices (IRB), pourraient aussi influencer cette corrosion ? Qu'en est-il également des bactéries réductrices des nitrates (NRB) en présence de fer ?

Par ailleurs, la formation d'une couche passivante constituée de magnétite est attendue lors de la corrosion de l'acier (Neff *et al.*, 2010). Cette couche est-elle susceptible d'être déstabilisée en étant transformée en sidérite ou autres produits secondaires carbonatés et sulfurés sous l'action d'une ou plusieurs activités bactériennes ?

Les colis de déchets radioactifs enfouis dans un milieu géologique profond seront dans des conditions anoxiques. Quels processus de corrosion s'opèrent alors à la surface de l'acier non allié et comment l'activité des communautés microbiennes les influencent-elles ? L'analyse bibliographique qui suit développera dans un premier temps les processus généraux de corrosion en absence d'oxygène et les produits de corrosion ainsi générés à la surface d'un métal (ici, le fer métallique), avant de se recentrer sur le cas de la corrosion d'un conteneur en acier non allié stocké en milieu profond en développant les interactions fer/argiles et fer/bactéries.

II. La corrosion de l'acier non allié en milieu anoxique

La norme ISO 8044 : 1999 définit la corrosion comme étant « l'interaction physico-chimique entre un métal et son milieu environnant entraînant des modifications dans les propriétés du métal et souvent une dégradation fonctionnelle du métal lui-même, de son environnement ou du système technique constitué par les deux facteurs ». La corrosion est un phénomène irréversible qui résulte d'un principe fondamental de la thermodynamique selon lequel un système matériel isolé tend toujours vers un état d'entropie maximale. Ainsi, en présence d'eau, un atome métallique tendra toujours à se dissocier en son cation et ses électrons périphériques, définissant ainsi le phénomène d'oxydation (Baroux, 2014). Celle-ci peut-être influencée par l'activité microbienne au sein du milieu de stockage mais les mécanismes fondamentaux gouvernant la corrosion restent globalement les mêmes. Il est donc nécessaire de comprendre ceux-ci avant de s'atteler à décrire la contribution des microorganismes dans les processus de corrosion.

II.1. Les processus de corrosion en milieu anoxique

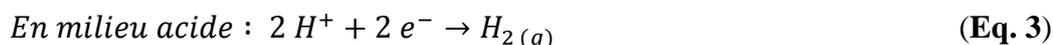
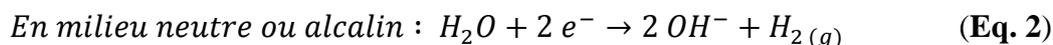
II.1.1. La corrosion généralisée ou uniforme

Facilement détectable et prévisible, la corrosion généralisée se manifeste avec les mêmes vitesses de corrosion en tous points du métal entraînant ainsi une diminution régulière de son épaisseur. Ce phénomène physico-chimique est le plus répandu et il consiste en une réaction anodique et une réaction cathodique se produisant toutes deux sur le matériau métallique :

A l'anode, oxydation du métal (**Eq. 1**) :



A la cathode, réduction d'un agent oxydant présent dans le milieu anaérobie (**Eq. 2 et 3**) :



Il existe de nombreux oxydants dans les environnements aqueux privés d'oxygène : l'eau et ses protons, les nitrates, les ions ferriques, les sulfates, la matière organique, le dioxyde de carbone, ... En présence de plusieurs oxydants, les processus d'oxydoréduction sont concomitants mais leurs cinétiques diffèrent. Elles sont dépendantes du potentiel rédox des couples ainsi que de la concentration de l'oxydant à la surface du métal.

Ces deux réactions de corrosion peuvent se produire à différents endroits de la surface étant donné que le métal est un bon conducteur. Cela est aussi dû en partie à un problème d'encombrement à la surface du métal résultant de la précipitation des produits de corrosion issus de la réaction anodique. La présence de tels produits peut conduire à un ralentissement des réactions de corrosion. Cette dernière est contrôlée par le transport des

ions du métal vers la solution à travers les produits de corrosion. La vitesse de corrosion d'un métal est régie par la réaction la plus lente entre les réactions anodique et cathodique. Dans la majorité des cas, les métaux ou alliages ne doivent leur longévité qu'à la formation en surface d'une couche d'oxydes, appelée couche de passivation, qui joue un rôle de barrière entre le milieu oxydant et la surface du matériau. La vitesse de corrosion est ainsi réduite à une valeur négligeable ce qui stabilise l'épaisseur de la couche d'oxyde et donc la durée de vie du matériau.

II.1.2. La corrosion localisée

La corrosion localisée se concentre, comme son nom l'indique, préférentiellement sur des sites discrets de la surface d'un métal ou alliage exposé à un milieu corrosif (Marcus, 2012 ; Baroux, 2014). Des exemples de corrosion localisée sont :

- La piqûration ou corrosion par piqûres : une dissolution localisée du métal s'effectue en formant des trous en présence d'ions agressifs (Cl^- par exemple) et/ou de défauts de surface du matériau (rayures, inclusions, etc). La quantité de métal corrodée est faible mais peut conduire à une rapide perforation de la structure. C'est un phénomène très redouté car peu visible et entraînant des dommages conséquents.
- La corrosion cavernieuse ou par effets de crevasse a lieu dans les interstices du métal. La crevasse est une zone de confinement de faible volume où les échanges de matières avec l'extérieur sont ralentis. La dissolution du métal, par exemple le fer métallique, entraîne l'accumulation de fer ferreux au sein de la crevasse. Ceci induit une baisse de pH, donc une acidification du milieu, et un processus d'autocatalyse se met en place.
- La fissuration ou corrosion sous contrainte : dans un milieu corrosif et en présence de contraintes mécaniques, selon la nature de l'acier, celui-ci peut se fissurer et se dégrader prématurément.

II.2. Les produits de corrosion

Les produits de corrosion d'un acier non allié sont constitués de fer, ce qu'on appelle communément « rouille ». Ce terme, emprunté au langage courant, désigne une réalité scientifique complexe. La rouille est un mélange de différentes phases et sa composition varie selon le milieu et le matériau considérés. Les constituants principaux de la rouille sont les oxydes de fer, regroupant les oxyhydroxydes de fer et les oxydes de fer au sens strict, lui conférant cette coloration orangée-brune si caractéristique. Deux états de valence du fer sont impliqués : Fe^{II} et Fe^{III} ; les composés de fer ferreux Fe^{II} et ceux à valence mixte ferreux-ferriques $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ sont les précurseurs transitoires à partir desquels se forment les composés ferriques Fe^{III} en milieu oxydant (Cornell & Schwertmann, 2003 ; Marcus, 2012).

Ce paragraphe constitue une liste non exhaustive des produits de corrosion les plus fréquemment rencontrés dans les environnements anoxiques. Ici, ne seront pas décrits l'akaganéite ($\beta\text{-FeO}_{1-x}(\text{OH})_{1+x}\text{Cl}_x$), la ferroxyste ($\gamma\text{-FeOOH}$) et l'hydroxychlorure de fer ferreux ($\beta\text{-Fe}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$), minéraux répertoriés comme produits de corrosion chlorurés d'objets archéologiques (Guilminot *et al.*, 2012 ; Grassini *et al.*, 2013).

II.2.1. Les oxydes de fer

Les oxydes de fer au sens strict sont des composés constitués uniquement de fer et d'oxygène. Les trois oxydes de fer les plus fréquemment rencontrés sont la magnétite, la maghémite et l'hématite.

La magnétite, de couleur noire, est un oxyde de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ ferrimagnétique dont la structure de type spinelle inverse a été établie par diffraction des rayons X (DRX) par Bragg (1915). Elle cristallise dans un système cubique faces centrées (CFC) où le paramètre de maille a vaut 0,839 nm. Les ions ferreux Fe^{2+} occupent les sites octaédriques (Oh) et les ions ferriques Fe^{3+} sont répartis à la fois dans les sites octaédriques et tétraédriques (Td) du réseau cristallin (Cornell & Schwertmann, 2003). Les atomes d'oxygène sont quant à eux distribués le long de l'axe [1 1 1]. La formule générale de la magnétite est donc $\text{Fe}^{3+}_{\text{Td}}[\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}]_{\text{Oh}}\text{O}_4$.

Cette dernière est qualifiée de stœchiométrique lorsque le Fe^{3+} occupe les sites tétraédriques et octaédriques en proportion égale, et que le ratio $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 0,5$.

Lorsqu'un acier non allié est corrodé en conditions anoxiques, la couche de corrosion formée à la surface du métal est le plus souvent de la magnétite (Cornell & Schwertmann, 2003 ; Neff *et al.*, 2010). La magnétite peut être formée par voie abiotique (**Figure 5a**) (Regazzoni *et al.*, 1981 ; Maher & Taylor, 1988 ; Etique *et al.*, 2014a) ou biotique (**Figure 5b**) (Fassbinder *et al.*, 1990 ; Zegeye *et al.*, 2007).

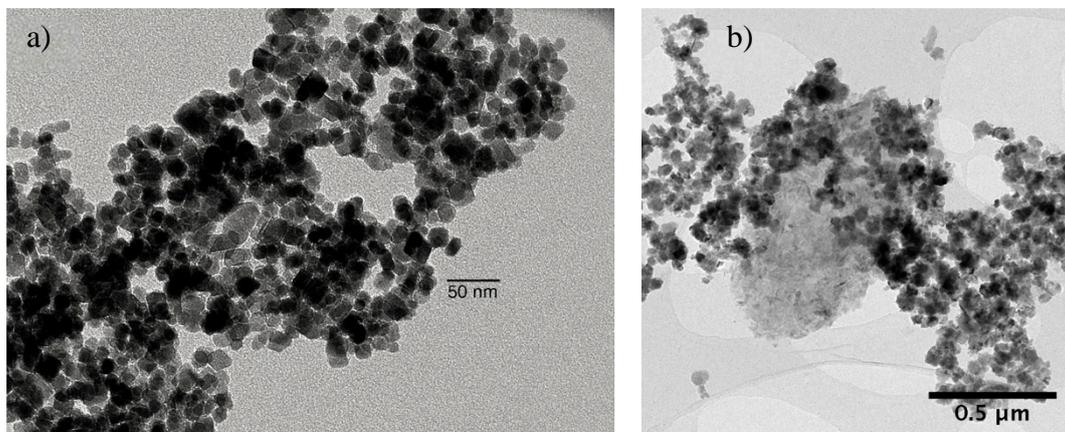


Figure 5. Micrographies de particules de magnétite formées par oxydation de la rouille verte carbonatée (a) ou issues de l'activité biologique de la souche *Acidovorax* BoFeN1 (b) (Miot *et al.*, 2014b ; Etique *et al.*, in preparation).

La maghémite, elle aussi ferrimagnétique, constitue la phase $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et présente une structure similaire à celle de la magnétite. La seule différence réside dans le fait que l'ensemble des atomes de fer est dans un état trivalent. Dès lors, des lacunes cationiques sont mises en place afin de compenser l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} . La maghémite cristallise également dans un système CFC où le paramètre de maille a vaut 0,834 nm (Cornell & Schwertmann, 2003). De nombreux auteurs ont rapporté que la maghémite comportait environ 2 % d'eau, exhibant ainsi la formule générale suivante : HFe_5O_8 (Cornell & Schwertmann, 2003). La structure de la maghémite serait ainsi stabilisée par l'eau. Résultant le plus souvent de l'oxydation de la magnétite (maghémite non poreuse), elle peut être aussi obtenue par déhydroxylation de la lépidocrocite (maghémite méso poreuse).

L'hématite, légèrement ferromagnétique et de couleur rouge, représente la phase α - Fe_2O_3 . Elle cristallise dans un système hexagonal où les paramètres de maille a et c valent respectivement 0,5034 nm et 1,375 nm (Bragg & Bragg, 1918). Cependant, on peut aussi l'indexer dans un système rhomboédrique avec $a_{Rh} = 0,5427$ nm et un angle $\alpha = 55,3^\circ$ (Cornell & Schwertmann, 2003). L'hématite est considérée comme l'oxyde le plus stable d'un point de vue thermodynamique (Cornell & Schwertmann, 2003). Celle-ci peut être obtenue selon plusieurs méthodes : transformation hydrothermale de la ferrihydrite, déhydroxylation de la goethite ou encore oxydation à chaud de la magnétite (Aissa, 2004).

II.2.2. Les oxyhydroxydes ferriques

Les oxyhydroxydes de fer à l'état d'oxydation +3 sont des composés chimiques dont la formule de base est $\text{FeOOH} \cdot n\text{H}_2\text{O}$. La goethite, la lépidocrocite et la ferrihydrite sont des oxyhydroxydes ferriques observés dans les produits de corrosion.

La goethite est l'oxyhydroxyde ferrique le plus répandu dans les sols aérobies et anaérobies de part sa grande stabilité thermodynamique. Antiferromagnétique et de couleur jaune-brunâtre, la goethite représente la phase α - FeOOH (Cornell & Schwertmann, 2003). Cette dernière cristallise dans le système orthorhombique où les paramètres de maille valent : $a = 0,9956$ nm, $b = 0,30215$ nm et $c = 0,4608$ nm (Goldsztaub, 1932 ; Sampson, 1969).

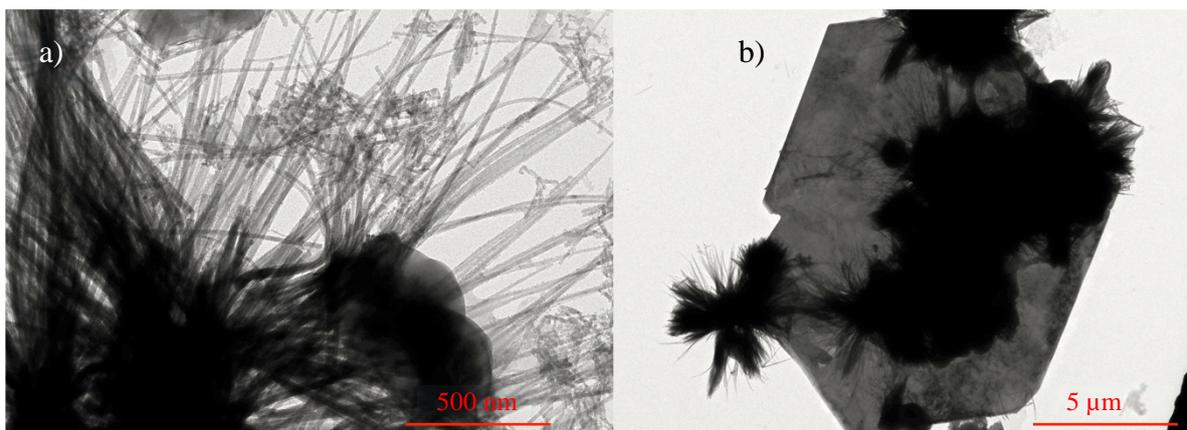


Figure 6. Micrographie d'aiguilles de goethite (a) prenant naissance sur les tranches des cristallites de rouille verte s'oxydant (b) (Etique *et al.*, 2014a).

Avec la magnétite et la lépidocrocite, la goethite est l'un des principaux produits d'oxydation des rouilles vertes (**Figure 6**) (Drissi *et al.*, 1995 ; Abdelmoula *et al.*, 1996 ; Etique *et al.*, 2014a).

La lépidocrocite est un composé de couleur orange, paramagnétique et de formule γ -FeOOH. Celle-ci est moins répandue dans les sols en comparaison à la goethite. On la trouve principalement dans les environnements hydromorphes – alternance de conditions oxydantes et réductrices (Cornell & Schwertmann, 2003). Lors des périodes anaérobies, le Fe^{2+} se forme et celui-ci se retrouve oxydé en Fe^{3+} au cours des périodes aérobies. La lépidocrocite est métastable et son système cristallin est orthorhombique : $a = 1,2520$ nm, $b = 0,3873$ nm et $c = 0,3071$ nm (Ewing, 1935).

La ferrihydrite est un oxyhydroxyde ferrique métastable brun/noir/jaune qui peut se former dans les gleysols – sols anaérobies alternativement mouillés et secs (Cornell & Schwertmann, 2003). Elle présente une faible cristallinité et deux types de ferrihydrite sont généralement retenus. Elles se distinguent selon leurs diffractogrammes : 2 raies (ferrihydrite la moins cristalline) et 6 raies. La ferrihydrite est observable lors de l'oxydation rapide du Fe^{2+} à un $\text{pH} < 5$ (Schwertmann & Thalmann, 1976).

II.2.3. Les rouilles vertes

Les rouilles vertes, hydroxysels ferreux-ferriques, sont des composés métastables susceptibles d'adsorber ou d'échanger divers anions. Leur identification dans l'environnement naturel n'a été que rarement rapportée en raison de leur forte réactivité vis-à-vis de l'oxygène, due à la présence d'ions ferreux au sein de leur structure. Les rouilles vertes appartiennent à la famille des hydroxydes doubles lamellaires où s'alternent des couches d'hydroxydes $[\text{Fe}^{\text{II}}_{(1-x)}\text{Fe}^{\text{III}}_x(\text{OH})_2]^{x+}$ et des interfeuillets de molécules d'eau et d'anions $[(x/n)\text{A}^n \cdot m\text{H}_2\text{O}]^{x-}$ qui restaurent la neutralité électrique du cristal (Allman, 1970 ; Taylor, 1973 ; Mullet *et al.*, 2008). Il existe deux grandes familles de rouilles vertes. Celles-ci se distinguent sur la base de clichés de DRX : les rouilles vertes de type 1 (RV1) et celles de type 2 (RV2) (Bernal *et al.*, 1959).

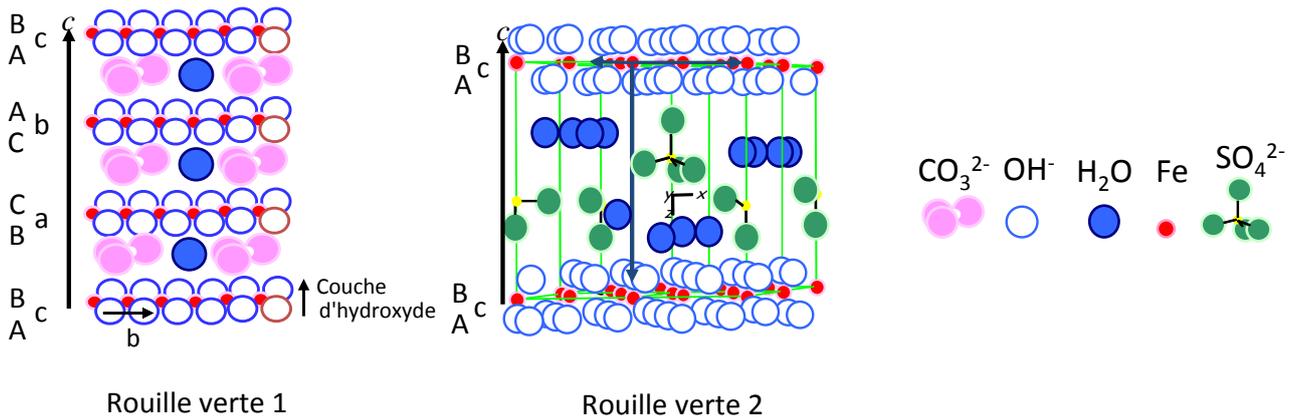


Figure 7. Séquences d'empilement des couches des rouilles vertes de type 1 et 2 (Refait *et al.*, 1998 ; Simon *et al.*, 2003).

Cette classification met en évidence deux formes de cristallographies différentes (**Figure 7**) :

- La rouille verte de type 1 avec une structure rhomboédrique et une séquence d'empilement ... AcB (intercouche, e.g. Cl^- , CO_3^{2-}) BaC (intercouche) CbA ... ;
- La rouille verte de type 2 avec une structure hexagonale et une séquence d'empilement ... AcB (intercouche, e.g. SO_4^{2-}) AcB ...

La rouille verte carbonatée (RV1 CO_3^{2-}) a été identifiée comme produit de corrosion dans les canalisations d'eau du réseau urbain (Figure 8a) (Stampfl, 1969 ; Appenzeller, 2002 ; Świetlik *et al.*, 2012) et présente une composition bien définie de formule $[\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}] \cdot [\text{CO}_3 \sim 3\text{H}_2\text{O}]$ (Drissi *et al.*, 1995 ; Abdelmoula *et al.*, 1996). La rouille verte sulfatée (RV2 SO_4^{2-}) de formule $[\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}] \cdot [\text{SO}_4 \sim 8\text{H}_2\text{O}]$ a quant à elle été observée comme produit de corrosion en milieu marin (Génin *et al.*, 1992 ; Refait *et al.*, 2003 ; Pineau *et al.*, 2008 ; Refait *et al.*, 2011).

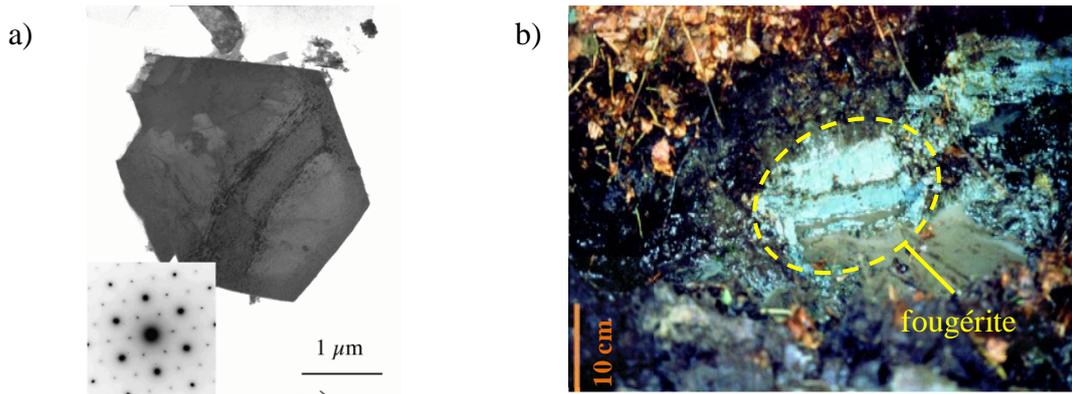


Figure 8. Rouille verte identifiée dans une canalisation de réseau d'eau urbain (Appenzeller, 2002) (a) et dans un sol hydromorphe dont l'analogue est la fougérite (bleu-vert) à Fougères (b) (Bretagne, FRANCE) (IMA 2003-057).

Retrouvées dans les sols hydromorphes (**Figure 8b**), les rouilles vertes peuvent être aussi générées par voie chimique (**Figure 9a-b**) (Olowe & Génin, 1990 ; Bourrié *et al.*, 1999 ; Aissa, 2004 ; Aissa *et al.*, 2006 ; Ruby *et al.*, 2006 ; Etique *et al.*, 2014b) ou biologique (**Figure 9c-d**) (Fredrickson *et al.*, 1998 ; Kukkadapu *et al.*, 2001 ; Parmar *et al.*, 2001 ; Ona-Nguema *et al.*, 2002 ; Zegeye *et al.*, 2005 ; Zegeye *et al.*, 2007 ; Zegeye *et al.*, 2010 ; Jorand *et al.*, 2011 ; Miot *et al.*, 2014b).

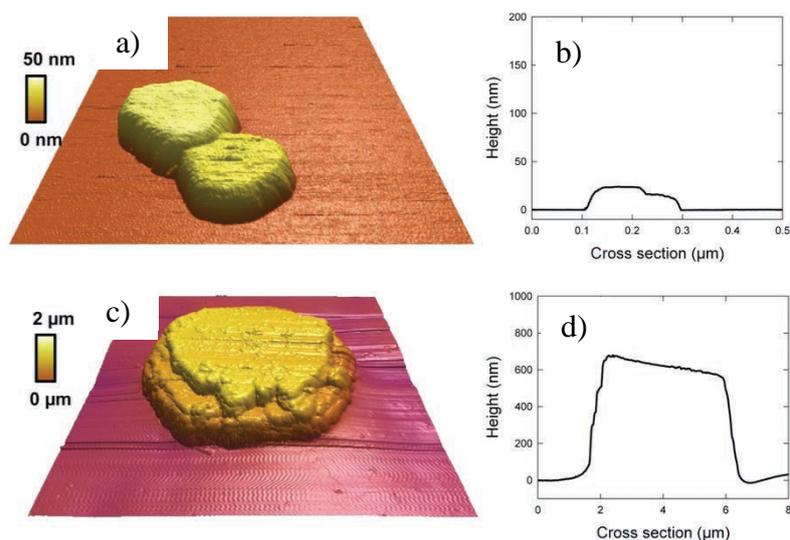


Figure 9. Images obtenues par microscopie à force atomique de particules de rouille verte carbonatée synthétisées soit par coprécipitation de sels ferreux-ferrique en solution carbonatée basique (a-b), soit par bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* (c-d) (Zegeye *et al.*, 2014).

II.2.4. Les sulfures de fer

Les sulfures de fer font partie du système binaire $\text{Fe}_{(1-x)}\text{S}$ ou $\text{FeS}_{(1+x)}$ et se distinguent les uns des autres soit par leur ratio Fe/S, soit par leur structure cristallographique. Ces produits de corrosion sont présents dans les environnements recensant notamment des bactéries sulfatoréductrices (SRB) ou thiosulfatoréductrices (TRB). Ces dernières couplent la réduction des sulfates (SO_4^{2-}) ou des thiosulfates ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) à l'oxydation de la matière organique (e.g. acétate, lactate). Les sulfures (S^{2-}) ainsi produits précipitent avec les ions Fe^{2+} à la surface de l'acier non allié pour former des sulfures de fer. Ces derniers ont aussi été mis en évidence à la surface d'objets archéologique en fer (Neff, 2003 ; Rémazeilles *et al.*, 2009). L'Andra a déjà recensé la présence de SRB et de TRB associées à de la pyrite (FeS_2) et de la mackinawite (FeS) dans le milieu encaissant des colis de déchets radioactifs (El Hajj, 2010).

II.2.5. Produits de corrosion carbonatés : sidérite, chukanovite

Dans les environnements anaérobies carbonatés, de la sidérite ou encore de la chukanovite sont recensés comme produits de corrosion à la surface d'un acier non allié. Ceux-ci rentrent dès lors en compétition avec la formation de rouille verte carbonatée, un des principaux produits de corrosion d'un acier non allié en absence d'oxygène (Refait *et al.*, 2006 ; Saheb *et al.*, 2010). La sidérite, de formule FeCO_3 cristallise dans un système rhomboédrique où les paramètres de maille sont : $a = 0,469$ nm et $c = 1,538$ nm (Azoulay *et al.*, 2013). En revanche, la chukanovite est un composé carbonaté découvert récemment sur des objets archéologiques ferreux, mais aussi sur des aciers placés en milieu argileux à une température de 90 °C (Savoie *et al.*, 2001 ; Remazeilles & Refait, 2009 ; Neff *et al.*, 2010). De formule $\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$, celle-ci cristallise dans un système monoclinique avec les paramètres de maille : $a = 1,239$ nm, $b = 0,940$ nm et $c = 0,321$ nm (Pekov *et al.*, 2007). Une étude récente a permis d'intégrer le domaine d'existence de la chukanovite au diagramme de Pourbaix du fer en milieu carbonaté (Azoulay *et al.*, 2012). L'obtention de la sidérite ou de la chukanovite est à présent bien contrôlée par voie abiotique (Saheb *et al.*, 2011 ; Romaine *et al.*, 2013). La formation de chukanovite et de sidérite est observée aussi dans des systèmes biologiques réducteurs du fer (Roh *et al.*, 2003).

III. Réactivité de l'acier non allié en formation géologique profonde

III.1. Interactions fer/argile : principes et processus

III.1.1. Les argiles et argilites

Anciennement, les argiles désignaient tous les minéraux présentant un diamètre inférieur à 2 μm . Cette définition basée sur la taille apparaît obsolète puisqu'elle englobe des minéraux divers (oxydes, hydroxydes). Celle-ci a donc été revisitée et le terme d'argile qualifie des minéraux constitués d'un empilement de feuillets d'alumino-silicates en couches tétraédriques siliceuses (T) et octaédriques alumineuses (O) (Konhauser, 2007). Des espaces interfoliaires contenant des cations monovalents (Na^+ , K^+) ou divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) sont répartis de part et d'autre d'une succession de feuillets T-O-T et restaurent le déficit de charge.

Les minéraux argileux, ou encore phyllosilicates, sont présents sous trois structures distinctes : TO (groupes des kaolins et serpentines), TOT (groupes des smectites, pyrophyllites, vermiculites, ...) et TOTO (groupe des chlorites) (Velde & Meunier, 2008) (Figure 10).

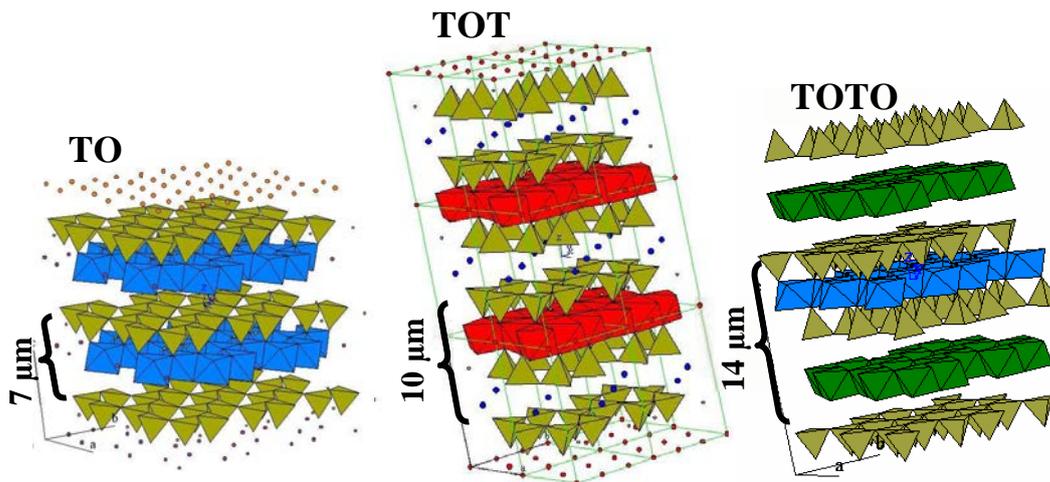


Figure 10. Trois modes d'empilement des couches tétraédriques de silicium et des couches octaédriques d'aluminium des phyllosilicates : TO = groupe des kaolins et serpentines ; TOT = groupe des smectites, pyrophyllites, vermiculites ; TOTO = groupe des chlorites (Kohler, 2005).

Les argilites sont définies comme étant une roche argileuse indurée cimentée par des cristaux de quartz et/ou de carbonates. Les argilites du Callovo-Oxfordien se situe à – 500 m de profondeur environ et est âgée de 155 Ma. Celle-ci a été retenue comme matériau encaissant hôte pour contenir les colis de déchets nucléaires car elle possède les caractéristiques suivantes (Andra, 2005) :

- Très faible perméabilité (10^{-12} à 10^{-14} m s⁻¹) ;
- Circulation d'eau très lente ;
- Capacité de rétention élevée des éléments radioactifs ;
- Bonne résistance mécanique ;
- Régularité sur une grande surface ;
- Environnement géologique stable depuis sa formation.

Composée de grains fins (qui peuvent atteindre une taille de 20 µm après broyage, **Figure 11**), l'argilite du Callovo-Oxfordien présente une teneur en argile de type smectite comprise entre 30 % et 45 % (Deniau *et al.*, 2008). Les smectites constituent une des phases réactives des argilites.

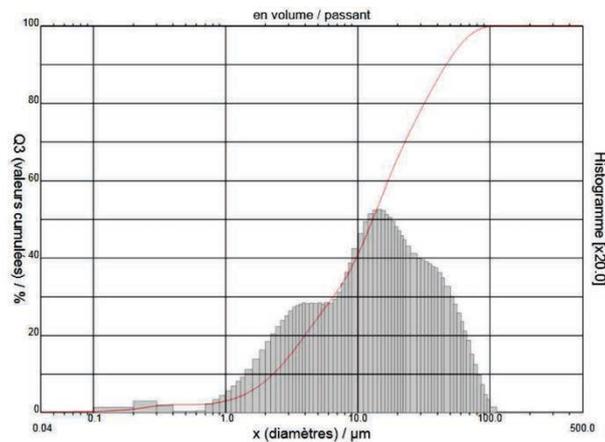


Figure 11. Distribution de la taille des particules d'argilites du Callovo-Oxfordien après broyage (Romaine, 2014).

III.1.2. Réactivité des argilites : smectites et phases porteuses de fer

Une propriété fondamentale des argiles de type smectite est le défaut de charge que présentent certaines unités cristallines. Des substitutions des cations interfoliaires entraînent une perte de l'électroneutralité du feuillet. Il s'agit d'ions en position échangeable et ceux-ci conditionnent les propriétés d'adsorption des minéraux argileux substitués (capacité d'échange cationique), ainsi que les propriétés de gonflement (hydratation des cations compensateurs). Les smectites sont donc des phyllosilicates hydratés et gonflants. Leur réactivité provient de l'eau interfoliaire et des protons libres ou structuraux qui les composent. Contrairement aux autres types d'argiles, les smectites sont définies par un pH caractéristique – de l'ordre de 4 – au lieu d'un pKa global (Fripiat *et al.*, 1965). Celles-ci joueront donc un rôle important dans les processus de corrosion en tant que source de protons.

Cependant, dans les phases argileuses le fer est un des éléments importants intervenant dans les substitutions cationiques. Au niveau des feuillets octaédrique O, le Mg^{2+} est substitué par du Fe^{2+} et le Al^{3+} est remplacé par du Fe^{3+} , tandis que le Si^{4+} peut être remplacé par du Fe^{3+} créant ainsi un déficit de charge et donc un déséquilibre électrique au niveau du feuillet tétraédrique T. Les deux états de valence du fer, Fe^{2+} et Fe^{3+} , peuvent exister au sein d'une même phase argileuse. Le fer structural des phases argileuses du Callovo-Oxfordien lui confère donc une réactivité soit dans les processus de corrosion direct de l'acier non allié du surconteneur (les espèces Fe^{3+} étant un agent oxydant du Fe^0 dans un milieu anaérobie) ou dans les processus de biocorrosion dus aux activités microbiennes ferriréductrices (IRB) ou ferroxydantes (IOB).

La réactivité des argilites peut être aussi due aux phases minérales ferrifères présentes : pyrite, sidérite, dolomite ferrifère, et oxydes de fer principalement.

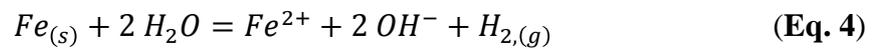
III.1.3. Corrosion d'un colis de stockage au sein de l'argilite du Callovo-Oxfordien

Lors du creusement d'un ouvrage souterrain tel que le stockage des déchets radioactifs, la mise à l'affleurement de sédiments naturels place les argiles dans des conditions différentes de celles de leur gisement entraînant des modifications de leurs propriétés. Les conditions physico-chimiques de la barrière argileuse du Callovo-Oxfordien à proximité des conteneurs (*Excavation Damaged Zone*) se trouvent modifiées : variation de la teneur en eau et de la composition chimique de l'eau interstitielle au contact de l'argile, changement de l'environnement biologique et surtout des conditions d'oxydoréduction. L'intrusion d'oxygène atmosphérique et sa diffusion au sein de l'excavation contenant les colis de déchets radioactifs correspond à la période oxydante. Selon l'Andra, ce scénario serait très bref sur l'échelle des temps géologiques puisqu'il s'étendrait sur une dizaine d'années tout au plus (Andra, 2005). Suite à cette période, les conditions réductrices prévaleront à nouveau dans le milieu de stockage.

Dans les conditions de pH (7 à 9) et E_h (- 400 à - 600 mV) attendues après fermeture du stockage, la formation de produits de corrosion tels que la magnétite Fe_3O_4 et la sidérite $FeCO_3$ est pressentie. Ce sont les phases thermodynamiquement les plus stables dans ces conditions. Ce phénomène de corrosion métallique s'étend sur toute la durée de vie du fer zéro-valent. Elle dépend de la quantité d'eau disponible dans l'argile ainsi que de l'environnement du colis. De l'hydrogène résultera aussi de la corrosion métallique du fer et les quantités de dihydrogène produites par alvéole de stockage par an sont estimées à $10^1 - 10^2 \text{ mol an}^{-1} \text{ alvéole}^{-1}$ (Talandier, 2005). L'apparition de ce gaz dans le milieu environnant de l'alvéole constitue un « risque » : H_2 va migrer au travers de l'argilite sous forme dissoute ou bien au sein de la galerie de l'alvéole à l'état gazeux. D'après Talandier (2005), la fraction de dihydrogène pouvant se répandre dans l'argilite par diffusion est comprise entre 7 et 20 % pour des vitesses de corrosion du fer métallique de 2 à 4 $\mu\text{m}/\text{an}$. La formation d'une poche de gaz pourrait fissurer et créer des chemins préférentiels au sein du concept multicouche. Une migration éventuelle des radionucléides serait ainsi possible. Boulin (2008) a modélisé le transfert de dihydrogène dans les argilites. Une porosité accessible au gaz représentant moins de 1 %, voire moins de 0,1 % de la porosité totale a été calculée dans les argilites proches de

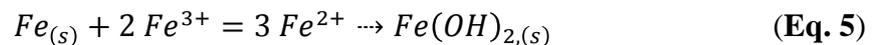
la saturation. Le diamètre des pores a été établi entre 50 nm et 200 nm et il est suffisant pour laisser passer le gaz. Les mesures de perméabilité au gaz (10^{-22} m^2 à 10^{-20} m^2) ont permis de démontrer que la pression maximale de dihydrogène par alvéole était de $P_{\text{max.H}_2,\text{alvéole}} = 8,3$ MPa. Celle-ci reste inférieure à la pression de microfissuration de l'alvéole $P_{\mu\text{fract.alvéole}} = 9$ MPa et à la pression de fracturation de l'argilite $P_{\text{fract.argilite}} = 12$ MPa.

Le fer métallique du surconteneur en acier non allié peut donc être corrodé par l'eau interstitielle du milieu encaissant selon la réaction d'oxydoréduction (**Eq. 4**):



Mais d'autres processus de corrosion du fer métallique interviennent en présence de l'argilite du Callovo-Oxfordien. En effet, la littérature recense l'existence d'une oxydation des espèces Fe^0 au contact des agents oxydants Fe^{3+} et H^+ issus de la smectite (Lantenois, 2003 ; Esnault, 2010).

La réaction entre les espèces Fe^{3+} et Fe^0 débute à une température de 40°C et est significative à partir de 80°C . Le Fe^{3+} structural de la smectite va s'adsorber via ses faces latérales sur le fer métallique et la réaction d'oxydoréduction suivante se produit (**Eq. 5**) :



Par ailleurs, les protons structuraux de la smectite ou provenant de l'espace interfoliaire réagissent aussi au contact du fer zéro-valent. Trois types de réaction ont été décrits par (Lantenois, 2003) :

- Fe^0/H^+ au bord des feuillets de la smectite ;
- Fe^0/H^+ structuraux des feuillets ;
- Fe^0/H^+ interfoliaires.

Ces derniers ont aussi menés des expériences à pH basique – faible quantité de protons – et ont noté la présence d’un phénomène de corrosion en présence de smectites dioctaédriques. Celles-ci sont les smectites les plus réactives vis-à-vis du fer métallique. Les ions H^+ sont donc accessibles, mobilisables et délocalisables. Suite à ces divers types de corrosion aqueuse et « argileuse », les smectites se transforment en gels réticulés à l’intérieur desquels peuvent nucléer des serpentines riches en fer (Rivard, 2011). Les smectites ainsi « dissoutes » induiraient une augmentation de la porosité de l’argilite.

Des modélisations de ces processus géochimiques ont été effectuées par Marty (2010) et Bildstein (2006) via les codes de calculs respectifs « KIRMAT » et « CRUNCH ».

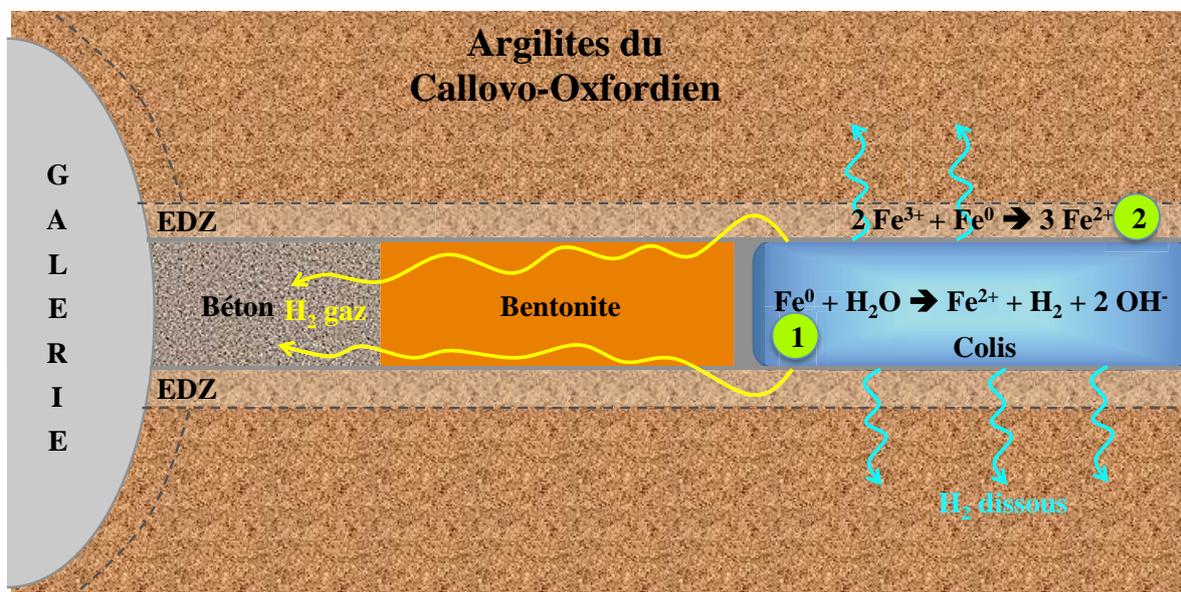


Figure 12. Corrosions aqueuse (réaction n° 1) et « argileuse » (réaction n° 2) d'un colis de stockage enfoui dans l'argilite du Callovo-Oxfordien conduisant à la production de dihydrogène diffusant sous forme de gaz dans les matériaux de scellement (bentonite et béton) et sous forme dissoute dans le milieu encaissant. EDZ signifie *excavation damaged zone*.

Dans la réactivité du fer métallique en milieu géologique profond (Figure 12), un paramètre autre que la présence des smectites dans l’argilite du Callovo-Oxfordien est à prendre en compte : l’activité des microorganismes, et plus particulièrement des bactéries. Ces dernières agissent comme des catalyseurs, rendant possible des réactions thermodynamiquement favorables mais cinétiquement lentes. Cependant, ces activités

microbiennes n'auront lieu que si les conditions physiques et chimiques sont compatibles avec la vie bactérienne. En d'autres termes :

- Les conditions physiques et chimiques présentes au cours du stockage autorisent-elles le développement des bactéries ?
- Quels groupes métaboliques sont susceptibles d'influencer la corrosion du fer ?

III.2. L'activité microbienne en stockage profond argileux

La découverte de microorganismes dans des sédiments de plusieurs millions d'années ou dans des environnements profonds du sous-sol a repoussé les limites connues où la vie est possible dans les milieux extrêmes (Templeton, 2011). La capacité du monde bactérien à s'adapter aux changements de l'environnement explique la très grande diversité des habitats occupés par les bactéries. Ainsi, des activités microbiennes sont possibles dans des intervalles de températures aussi larges que -5 °C à 126 °C ou pour des pressions allant jusqu'à $1\ 100\text{ atm}$ (**Tableau 2**). Des environnements aussi hostiles que les déserts (Heulin *et al.*, 2003 ; Benzerara *et al.*, 2004) ou les eaux ultrapures (Kulakov *et al.*, 2002 ; Tóth *et al.*, 2014) permettent non pas la survie, mais bien la croissance de certaines bactéries.

Cependant, la question d'une activité bactérienne significative en stockage profond, dans un milieu confiné, reste encore largement ouverte.

III.2.1. Métabolisme bactérien en sous-sol profond

La mise en place du stockage des déchets radioactifs peut engendrer à proximité d'alvéoles dans la couche argileuse du Callovo-Oxfordien une stimulation de l'activité des bactéries indigènes. En effet, des perturbations physiques de l'encaissant telles que l'apparition de fissures et des variations géochimiques du milieu comme une augmentation de la température, une variation de pH, etc. sont attendues. La circulation des hommes et du matériel au sein du système amènera inévitablement des bactéries allochtones.

Tableau 2. Exemples d'extrêmophiles ayant des capacités ferriréductrices (IRB), ferro-oxydantes (IOB), réductrices des nitrates (NRB) ou des sulfates (SRB) (inspiré de Rothschild et Mancinelli, 2001) ainsi que quelques exemples d'autres bactéries dites « non extrêmophiles ».

| Paramètre | Type | Définition | Exemples | Activité métabolique | Références |
|---------------------|-------------------------------|--|---|-------------------------------|--|
| Température | Hyperthermophile ^a | croissance > 80 °C | <i>Methanopyrus kandleri</i> (122°C) | IRB | (Vargas <i>et al.</i> , 1998) |
| | | | <i>Ferroglobus placidus</i> (85 °C) | IOB | (Stetter, 1999) |
| | | | <i>Thermotoga maritima</i> (90°C) | IRB | (Vargas <i>et al.</i> , 1998) |
| | Thermophile | croissance 60 - 80 °C | <i>Thermotoga subterranea</i> (70 °C) | IRB | (Slobodkin <i>et al.</i> , 1999) |
| | | | <i>Desulfotomaculum</i> sp. (70°C) | SRB | (Rosnes <i>et al.</i> , 1991) |
| | | | <i>Caldithrix abyssi</i> (60°C) | NRB | (Miroshnichenko <i>et al.</i> , 2003) |
| Mésophile | croissance 15 - 60 °C | <i>Shewanella putrefaciens</i> (37 °C) | IRB | (Myers & Myers, 1997) | |
| Psychrophile | croissance < 15 °C | <i>Psychrobacter glacincola</i> (13 °C) | NRB | (Denner <i>et al.</i> , 2001) | |
| Radiation | | | <i>Deinococcus radiodurans</i> (50 kGy) | IRB | (Fredrickson <i>et al.</i> , 2000) |
| Pression | Piezophile | Haute pression (ne se développe pas à pression atmosphérique, max. connu 120 MPa) | <i>Methanopyrus kandleri</i> (40 MPa) | IRB | (Vargas <i>et al.</i> , 1998) |
| | | | <i>Thermotoga maritima</i> | IRB | (Vargas <i>et al.</i> , 1998) |
| | | | <i>Shewanella benthica</i> (41 MPa) | IRB | (Delong <i>et al.</i> , 1997) |
| Dessiccation | Xérophiles | Anhydrobiotique | <i>Deinococcus radiodurans</i> | IRB | (Venkateswaran <i>et al.</i> , 2000) |
| Salinité | Halophiles | 2 - 5 M NaCl | <i>Haloferax sulfurifontis</i> | S°RB ^b | (Elshahed <i>et al.</i> , 2004) |
| pH | Alcalophile | pH > 9 | <i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (pH=11) | IRB | (Ye <i>et al.</i> , 2004) |
| | Acidophile | pH < 5 | <i>Acidiphilium cryptum</i> (pH=2 - 5) | IRB | (Küsel <i>et al.</i> , 1999) |
| Oxygène | Anaérobie stricte | Intolérant à O ₂ | <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | SRB | (Bertrand <i>et al.</i> , 2011) |
| | Microaérophile | Utilisant O ₂ mais intolérant à une forte concentration en O ₂ | <i>Gallionella ferruginea</i> | IOB | (Bertrand <i>et al.</i> , 2011) |
| | Aéro-anaérobie facultative | Utilisant O ₂ et d'autres accepteurs d'électrons | <i>Klebsiella mobilis</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> | NRB IRB | (Bertrand <i>et al.</i> , 2011) (Myers & Nealson, 1990) |

Notes : ^a : Toutes les hyperthermophiles connues sont capables de réduire les espèces Fe^{III} (Vargas *et al.*, 1998) ; ^b : réduction du soufre ici seulement

Des analyses par génotypage ont permis d'identifier des espèces bactériennes dans l'argilite du Callovo-Oxfordien de Meuse/Haute-Marne dont des espèces sulfatoréductrices (Poulain, 2006). Leur présence dénote une quantité suffisante d'éléments nutritifs permettant de soutenir la croissance des communautés autochtones ou allochtones. La matière organique naturellement présente dans l'argilite du Callovo-Oxfordien, estimée à 1,4 % par gramme de matière sèche (Deniau *et al.*, 2008), y contribue probablement. En revanche, peu de microorganismes ont été isolés par culture sur des milieux conventionnels.

Nombre de ces bactéries sont non cultivées car les milieux autorisant leur croissance n'ont pas encore été développés. D'autres pourraient être viables mais non cultivables du fait d'une entrée en phase de survie (proche d'un état de dormance) encore mal expliqué (Barer & Harwood, 1999). Une restriction d'espace et d'eau au sein des argilites du Callovo-Oxfordien pourrait en être la cause (El Hajj, 2010). L'activité métabolique de ces microorganismes pourrait reprendre dès l'apparition de conditions favorables à leur développement. Les perturbations induites lors de l'excavation des galeries souterraines avec la formation d'une zone faillée – de 0,5 à 1 m autour des alvéoles – nommée EDZ (*Excavation Damaged Zone*) fournissant un espace adéquat, de l'eau et des nutriments nécessaires à la croissance bactérienne pourraient contribuer à la reprise d'activité et au développement des bactéries autochtones et allochtones.

Pour qu'une population bactérienne se développe, celle-ci a besoin d'eau, d'une source de carbone, de donneurs et d'accepteurs d'électrons et de tous les éléments essentiels à la formation de la biomasse (*e.g.* N, P, S, Mg²⁺, Fe²⁺) (**Figure 13**). Une formule élémentaire simplifiée de la biomasse bactérienne telle que C_{4,2}H₈O_{1,25}N_{1,16}P_{0,1}S_{0,03} (Pelmont, 1993) donne une idée de ses besoins relatifs en chaque élément. Le carbone étant donc l'élément le plus important quantitativement, les bactéries peuvent l'obtenir sous forme organique (*e.g.* glucose, lactate, formiate) ou inorganique (*e.g.* CO₂, CaCO₃), correspondant respectivement aux bactéries hétérotrophes et autotrophes. Le métabolisme a aussi besoin d'une source énergétique afin de fonctionner. Celle-ci est convertie en énergie cellulaire, principalement sous forme d'ATP (adénosine triphosphate). En absence de lumière, l'énergie est chimique et est obtenue par les réactions d'oxydoréductions entre un donneur et un accepteur d'électrons.

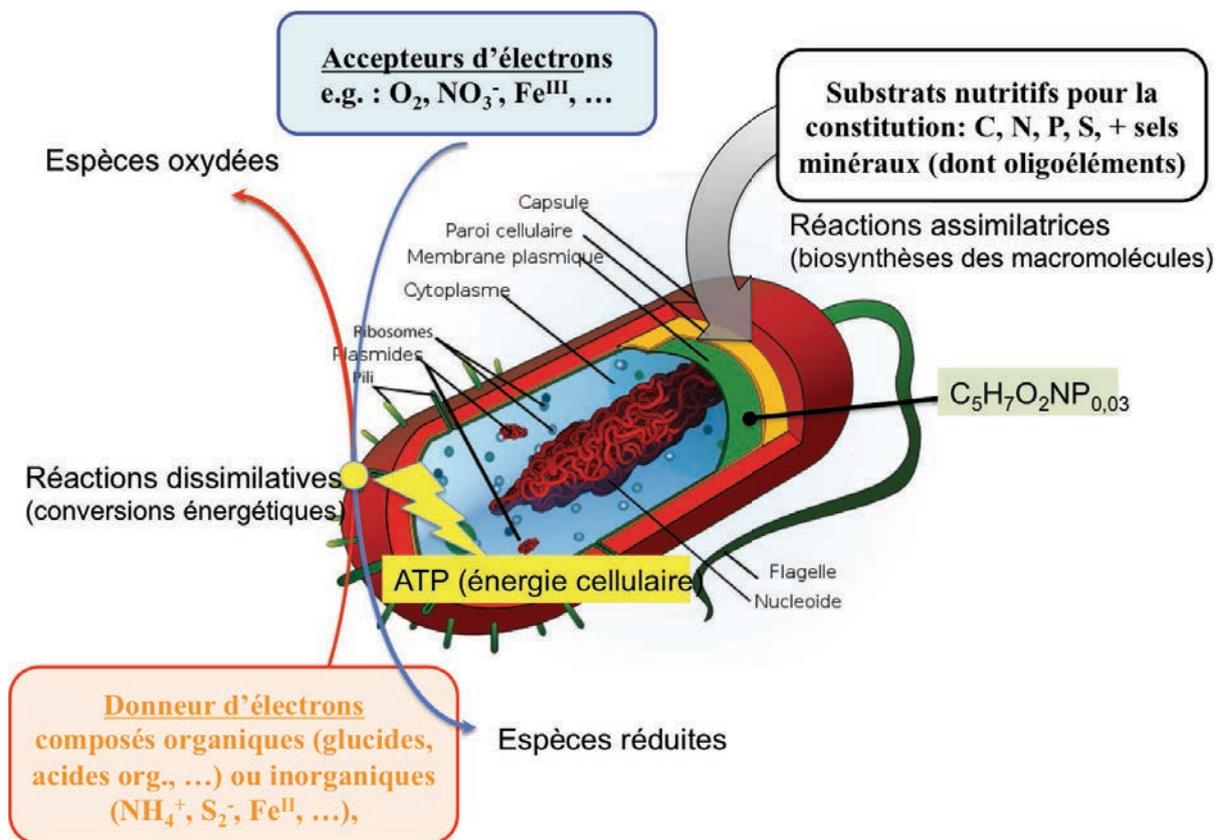


Figure 13. Utilisation des substrats nutritifs, des donneurs et accepteurs d'électrons essentiels à la production d'énergie cellulaire (ATP) et à la formation de biomasse selon la formule élémentaire simplifiée $C_5H_7O_2NP_{0,03}$.

Etant donné que le stockage des déchets radioactifs s'effectuera à 500 m de profondeur, la source d'électrons ne pourra être que chimique. Les microorganismes vivant dans cet environnement seront donc obligatoirement chimiotrophes (Tableaux 3 et 4).

Tableau 3. Classification trophique des microorganismes selon les sources d'énergie, de carbone, et de donneurs d'électrons.

| | | Type trophique |
|---------------------|-----------------------|----------------|
| Source d'énergie | lumineuse | Phototrophe |
| | chimique | Chimiotrophe |
| Source de carbone | CO ₂ | Autotrophe |
| | composés organiques | Hétérotrophe |
| Donneur d'électrons | composés inorganiques | Lithotrophe |
| | composés organiques | Organotrophe |

Tableau 4. Capacités respiratoires du genre *Shewanella* (d'après (DiChristina *et al.*, 2002), liste non exhaustive).

| Donneurs d'électrons | Accepteurs d'électrons |
|----------------------|--|
| Acides organiques | Oxygène (O ₂) |
| Acides aminés | Composés azotés (NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO) |
| Sucres | Oxydes de manganèse (Mn ⁴⁺ , Mn ³⁺) |
| Hydrogène | Oxydes de fer (Fe ³⁺) |
| | Composés soufrés (SO ₃ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ⁰ , DMSO) |
| | Uranium (U ⁶⁺) |
| | Technétium (Tc ⁷⁺ , Tc ⁴⁺) |
| | Sélénium (Se ⁴⁺) |

Une autre source d'électrons utilisable par les bactéries apparaît lors du stockage géologique des déchets radioactifs : le dihydrogène H₂. Ce gaz est produit notamment par corrosion aqueuse de l'acier ainsi que par la radiolyse de l'eau (en moindre mesure) et pourrait pénétrer la barrière argileuse du Callovo-Oxfordien. Le dihydrogène circule et diffuse librement au sein des fractures de la couche argileuse à proximité des alvéoles, dans la porosité de l'argilite du Callovo-Oxfordien ainsi que dans son eau porale (sous forme dissoute). Cette nouvelle source d'électrons est d'ailleurs plus intéressante à utiliser pour les bactéries qu'une source d'électrons organique (*e.g.* acétate, glucose) car elle engendre un faible coût énergétique pour les cellules en raison de sa diffusion passive dans les membranes et le cytoplasme, et laisse plus de carbone organique pour l'assimilation. Cela concerne les bactéries hydrogénotrophes.

En conditions réductrices et anoxiques, les bactéries peuvent utiliser une large diversité d'accepteurs d'électrons (**Tableau 4**) Le transfert d'électrons entre le donneur et l'accepteur d'électrons ne s'effectue que si la variation d'enthalpie libre à pression constante $\Delta_r G^0$ de la réaction d'oxydoréduction est exergonique (négative). Une partie de l'énergie issue de cette réaction est convertie en ATP. Les bactéries vont utiliser préférentiellement les accepteurs d'électrons permettant la production la plus élevée d'ATP, c'est-à-dire celui

présentant la plus grande différence de potentiel rédox (E^0) entre l'accepteur et le donneur d'électrons. On peut donc classer les accepteurs d'électrons par ordre de valorisation énergétique : $\text{NO}_3^- > \text{MnO}_2 > \text{Fe}^{\text{III}} > \text{SO}_4^{2-} > \dots$

III.2.2. Impacts de la radioactivité et de la température à proximité des alvéoles sur les microorganismes

Lors du stockage des déchets radioactifs au sein des alvéoles, ceux-ci vont induire un gradient de radioactivité et de température depuis le cœur du colis jusqu'à 5 m autour de l'alvéole. Radioactivité et température évoluent de manière concomitante : l'intensité est maximale au cœur de l'alvéole et décroît lorsque l'on s'éloigne du colis de stockage de manière centrifuge.

De très récentes études relatent la présence de bactéries au sein de sites radioactifs tels que d'anciens sites miniers ou d'armements nucléaires. Des microorganismes appartenant aux genres *Arthrobacter*, *Rhodococcus* et *Nocardia* ont été isolés en présence d'une forte concentration en éléments radioactifs ($10 - 20 \mu\text{Ci } ^{137}\text{Cs g}^{-1}$) (Fredrickson *et al.*, 2004). Ces derniers survivent à des doses radioactives quasi-identiques à celles de *Deinococcus radiodurans*. Ce microorganisme résiste à des doses radioactives s'élevant jusqu'à 20 kGy et à la dessiccation. *Deinococcus radiodurans* est capable de réduire des oxydes de Fe(III) tels que la goethite (Fredrickson *et al.*, 2000). Au sein de sites radioactifs (10 Gy maximum), la radiolyse de l'eau et la corrosion de l'acier entraîneront une libération de dihydrogène. Cette production favorise la sélection d'espèces hydrogénotrophes qui sont capables de se développer dans un milieu extrême (radioactivité).

La température au sein du site de stockage après 10 à 15 ans d'entreposage des colis est évaluée d'après le rapport Andra 2005 à un peu moins de 90 °C à l'interface fer/argile (ASN, 2010-2012). Après 1 000 ans de fonctionnement, la température sur cette même interface fer/argile est estimée à 30 – 50 °C. Celle-ci décroît en s'éloignant du colis pour atteindre la température moyenne de la couche argileuse du Callovo-Oxfordien soit 30 - 20 °C. Aux vues de la gamme de températures balayée pendant la période d'entreposage des colis radioactifs, les bactéries thermophiles seront favorisées à l'interface fer/argile durant les

premières années de fonctionnement puis laisseront ensuite place à des bactéries présentant une température optimale de croissance entre 30 °C et 40 °C (**Tableau 2**).

Radioactivité et température n'empêcheront donc pas l'activité bactérienne au sein du site de stockage de déchets radioactifs. Des espèces microbiennes adaptées à ces conditions extrêmes de vie – extrêmophiles – sont donc attendues. C'est probablement sous forme de biofilm que ces bactéries se développeront à la surface de ces matériaux.

III.2.3. Activités des microorganismes attendues à l'interface fer/argilite du Callovo-Oxfordien

Lorsqu'un métal est enfoui dans un milieu non stérile tel que les argilites du Callovo-Oxfordien, les microorganismes peuvent adhérer à sa surface et former un biofilm. Ce dernier est une structure complexe et organisée avec une épaisseur non uniforme constitué de cellules bactériennes vivantes ou mortes, de substances polymériques extracellulaires (EPS), et de divers produits organiques et inorganiques issus de l'activité biologique. L'activité des microorganismes du biofilm est connue pour favoriser la corrosion du métal (Videla & Herrera, 2005) mais aussi la dissolution des smectites de l'encaissant (transformation des smectites de l'argile de Tournemire en gel réticulé) (Esnault, 2010).

III.2.3.a. Interactions fer et communautés bactériennes des biofilms en milieu anoxique

Au sein du biofilm, les microorganismes issus de communautés microbiennes différentes sont liées les uns aux autres et enrobés par une matrice constituée de substances polymériques extracellulaires (EPS). Ces dernières comprennent des macromolécules telles que des protéines, des polysaccharides, des acides nucléiques et des lipides. Le biofilm présente une structure tridimensionnelle de grande hétérogénéité aussi bien au niveau physique, chimique que métabolique (De Beer & Stoodley, 1995). La composition du biofilm évolue selon les conditions environnementales (*e.g.* disponibilité de l'eau, des nutriments,

température, radioactivité). Constitué de canaux et de pores, l'eau chargée en nutriments circule à travers le biofilm (**Figure 14**) (Bachofen *et al.*, 1998).

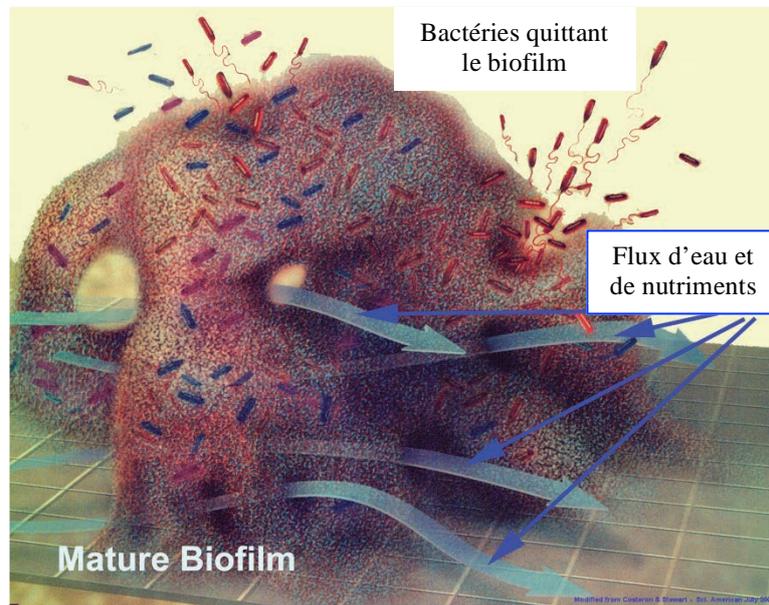


Figure 14. Circulation d'eau et de nutriments à travers les pores d'un biofilm mature.

Dans les environnements où l'apport en nutriments est limité et difficile d'accès, le biofilm apporte une réponse positive, un avantage sélectif pour les communautés bactériennes comparé à la vie d'une bactérie libre en suspension. En effet, le ratio surface/volume du biofilm est très élevé engendrant ainsi une plus grande rétention et adsorption des nutriments pour les microorganismes. Dans le cadre du stockage des déchets radioactifs au sein des argilites du Callovo-Oxfordien, la mobilité des bactéries et des nutriments et éléments essentiels à leur vie serait limitée par la très faible porosité du milieu argileux. La constitution d'un biofilm serait donc une réponse optimisant leur développement et leur survie.

Outre l'avantage qu'ont les microorganismes à vivre au sein d'un biofilm, le rôle de ce dernier est encore très discuté vis-à-vis de la biocorrosion. L'activité microbienne au sein du biofilm formé à la surface du métal peut affecter la cinétique des réactions anodiques (dissolution du métal) et/ou cathodiques (Jones & Amy, 2000). Certains auteurs montrent que sa formation à l'interface fer/argile accélère les phénomènes de corrosion de l'acier non allié (Geesey & Flemming, 1991 ; Beech & Sunner, 2004). Dans le système biofilm/fer, les

liaisons entre les EPS et les ions métalliques comme EPS-Fe³⁺ jouent le rôle de navettes à électrons (Beech & Sunner, 2004). Cependant, d'autres auteurs ont mis en évidence la capacité du biofilm à constituer une protection contre la biocorrosion (Dubiel *et al.*, 2002 ; Lee & Newman, 2003 ; Herrera & Videla, 2009).

Les principaux groupes métaboliques identifiés au sein de biofilms et susceptibles de jouer un rôle dans la biocorrosion sont les bactéries sulfatoréductrices (SRB), ferroxydantes (IOB) et ferriréductrices (IRB). L'implication des bactéries sécrétant des acides organiques a également été proposée dans les processus de biocorrosion (Beech & Sunner, 2004). Ces microorganismes coexistent naturellement au sein des biofilms sous la forme de consortia complexes à la surface du métal corrodé. Ceux-ci sont intimement liés au cycle biogéochimique du fer (Konhauser *et al.*, 2011).

En tant que nutriment essentiel et source d'énergie nécessaire à la croissance des microorganismes, le fer est réduit ou oxydé sous des formes chimiques variées à travers les réactions métaboliques des bactéries. Des microorganismes, capables de métaboliser le fer sous ses différents états de valence, peuvent se retrouver dans des biofilms et ainsi participer à la MIC si le support d'adhésion est constitué de fer (**Figure 15**).

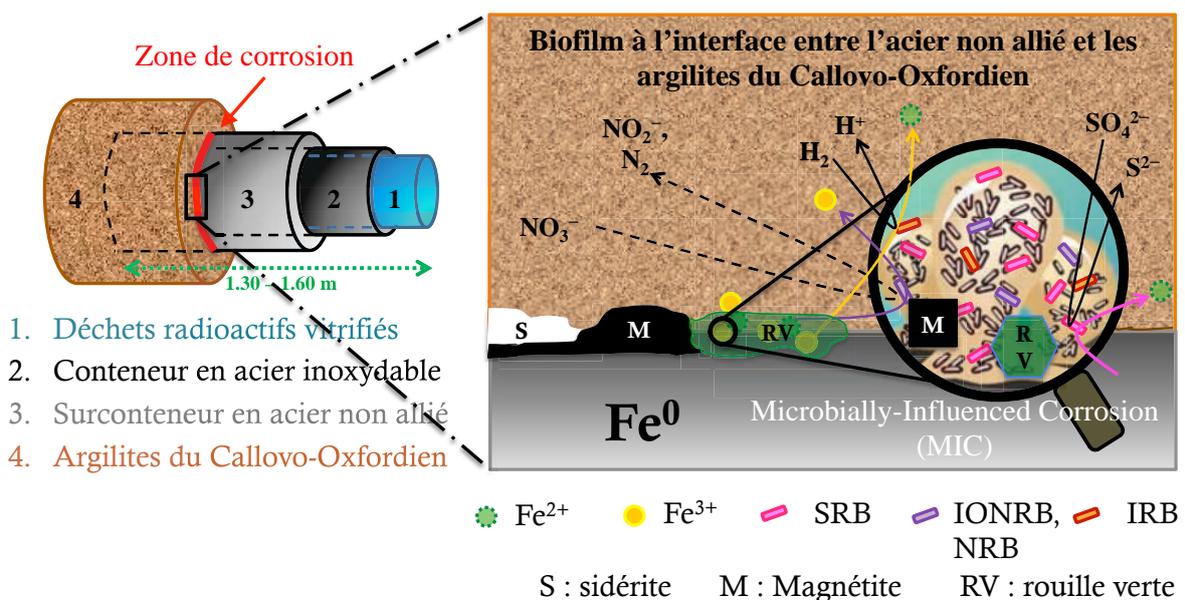
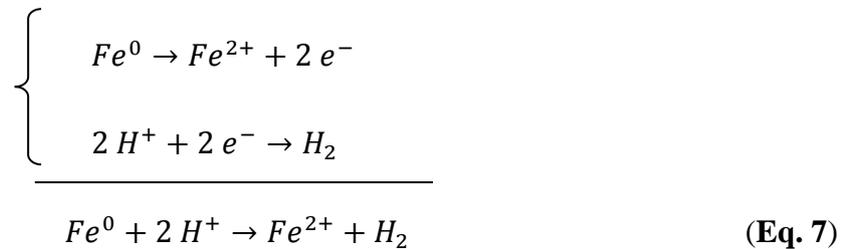
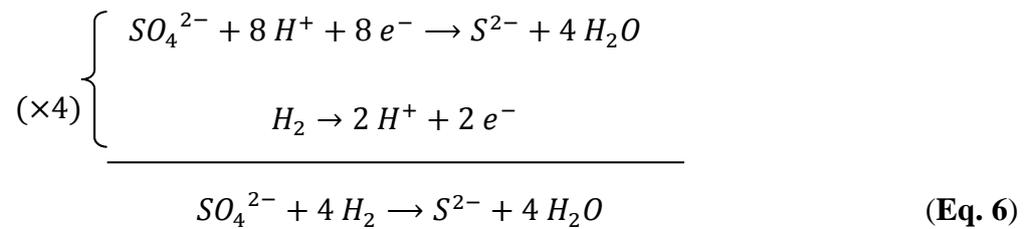
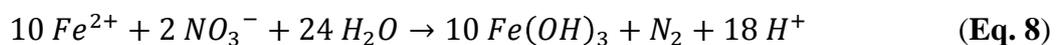


Figure 15. Interactions possibles fer/bactéries à l'interface fer non allié du surconteneur de déchets radioactifs et les argilites du Callovo-Oxfordien en milieu anoxique.

Les SRB sont pour la plupart capables de coupler l'oxydation des espèces H_2 à la réduction des sulfates SO_4^{2-} . Le dihydrogène est donc oxydé en protons H^+ via l'hydrogénase, une enzyme membranaire. Les protons vont capter des électrons du Fe^0 afin d'être à nouveau réduits en H_2 . Du fer ferreux apparaît dans le milieu selon le mécanisme résumé par les équations (6) et (7) :



Le fer ferreux ainsi formé (rappelons qu'outre la voie des SRB, il y a celle de la corrosion aqueuse) est ensuite oxydé en fer ferrique via la réduction de l'oxygène moléculaire à faible pression et pH neutre par des bactéries ferroxydantes (IOB) du genre *Leptothrix*, *Gallionella*, ... D'autres microorganismes tels que *Azospira oryzae* ou *Acidovorax BoFeNI* seraient capables d'oxyder par voie anaérobie les espèces Fe^{2+} en Fe^{3+} via la réduction des nitrates NO_3^- en azote N_2 (ou ammonium NH_4^+) (Straub *et al.*, 1996) (Eq. 8) :



Cependant, les mécanismes gouvernant cette réaction (Eq. 8) restent encore en suspens.

Enfin, les bactéries ferriréductrices (IRB) du genre *Geobacter* peuvent réduire à nouveau le fer ferrique en fer ferreux via l'oxydation d'une molécule organique ou du dihydrogène (Lovley *et al.*, 2004) selon la réaction globale (Eq. 9) :



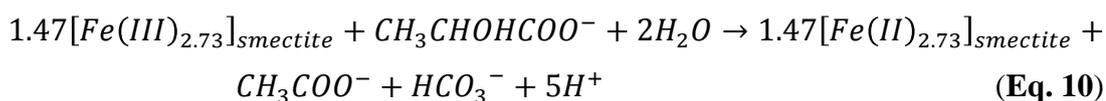
Pour la réduction anaérobie du Fe^{3+} , les IRB peuvent procéder de différentes manières pour transférer les électrons depuis le minéral ferrique jusqu'à leur membrane :

- Contact direct bactérie/minéral (Lower *et al.*, 2001) ;
- Contact via des pilis conducteurs (*nanowires*) (Reguera *et al.*, 2005 ; Malvankar & Lovley, 2014) ;
- Navettes à électrons endogènes (synthétisées par les bactéries) (Newman & Kolter, 2000) ou exogènes (*e.g.* substances humiques) (Lovley *et al.*, 1996 ; Roden *et al.*, 2010).

Ces bactéries ferriréductrices, au-delà d'être impliquées dans les processus de corrosion microbiens, ont été aussi identifiées comme acteur majeur de la dissolution des minéraux argileux tels que les smectites ou encore les kaolins (Esnault, 2010).

III.2.3.b. Bioréduction du fer ferrique des smectites

La présence de fer ferrique structural – en couche octaédrique – dans pratiquement tous les minéraux argileux entraîne une altération profonde de leurs propriétés physico-chimiques. Leur aptitude à pouvoir gonfler dans l'eau s'abaisse, leur capacité d'échange cationique augmente et leur surface spécifique décroît lorsque les espèces Fe^{3+} sont réduites chimiquement en Fe^{2+} via l'hydrazine (N_2H_4) ou le dithionite ($S_2O_4^{2-}$) (Stucki *et al.*, 1996 ; Stucki & Kostka, 2006). Or, ces réducteurs inorganiques sont minoritaires dans les sols tandis que les microorganismes, capables d'effectuer eux aussi cette réduction du fer ferrique, ont été recensés en grand nombre – plus de 10^5 cellules par gramme de matière sèche dans les sols agricoles (Achtlich *et al.*, 1995). De nombreux travaux ont exploré la réduction microbienne de la goethite, la magnétite, et des smectites (Kostka & Nealson, 1995 ; Roden & Zachara, 1996 ; Stucki & Kostka, 2006). Les bactéries ferriréductrices (IRB) couplent l'oxydation de la matière organique (*e.g.* lactate), ou du dihydrogène, à la respiration du Fe^{3+} (Canfield *et al.*, 1993 ; Roden & Wetzal, 1996 ; Kostka *et al.*, 1999 ; Lovley *et al.*, 2004) selon l'équation (10) :



Kostka *et al.* (1996) ont montré que l'espèce *Shewanella putrefaciens* pouvait réduire 29 % à 41 % du fer ferrique structural d'une smectite en moins de 24 h. De plus, cette bioréduction serait catalysée par la présence de ligands organiques dans le sol comme l'acide nitrilotriacétique (NTA). Celui-ci induirait une dissolution du minéral argileux entraînant ainsi une plus grande biodisponibilité des espèces Fe^{3+} pour les IRB (Kostka *et al.*, 1999). Cependant, une récente étude menée par Jaisi *et al.* (2007) a mis en évidence que l'augmentation de la concentration en Fe^{2+} dans le milieu inhiberait la bioréduction du Fe^{3+} en se sorbant à la fois sur les cellules et sur les particules d'argile. Au cours de la réduction du fer ferrique, les smectites riches en fer ferrique (nontronites) sont converties en illites (Kim *et al.*, 2004).

III.2.3.c. Biocorrosion ou corrosion influencée par les bactéries

La norme ISO 8044 : 1999 définit la corrosion microbienne ou corrosion bactérienne comme étant une interaction entre le vivant et le matériau où les microorganismes agissent directement ou par l'intermédiaire de substances issues de leur métabolisme. Les bactéries induisent ou accélèrent les processus de corrosion déjà en place, ou bien créent des conditions favorables à l'apparition d'un processus de corrosion. Il s'agit pour la plupart du temps d'une intervention indirecte des microorganismes. La MIC reste donc un phénomène électrochimique.

III.2.3.c.(i) Influence de la corrosion de l'acier non allié par les bactéries sulfato et thiosulfatoréductrices (SRB et TRB)

L'activité des SRB et TRB génère des sulfures dans le milieu par réduction des sulfates ou thiosulfates (Barton & Hamilton, 2007). Les sulfures S^{2-} peuvent tout d'abord catalyser les réactions anodiques par sulfuration de l'anode. Puis, le fer ferreux Fe^{2+} , produit de corrosion présent en solution est précipité sous forme de sulfures de fer provoquant alors

un transfert d'électrons du fer métallique vers le FeS en formant une pile galvanique (**Figure 16**). Ceci accélère les processus de corrosion. De plus, la production de protons par les SRB modifie le pH du milieu. Le métabolisme bactérien induit donc un couplage galvanique anode/cathode par acidification différentielle (Campaigolle, 1996). Les vitesses de corrosion peuvent atteindre jusqu'à 1 mm/an *via* une bioréduction des sulfates et 1 cm/an *via* une bioréduction des thiosulfates, comparées à la vitesse de corrosion moyenne de l'acier en condition anoxique se situant aux alentours de 10 µm/an.

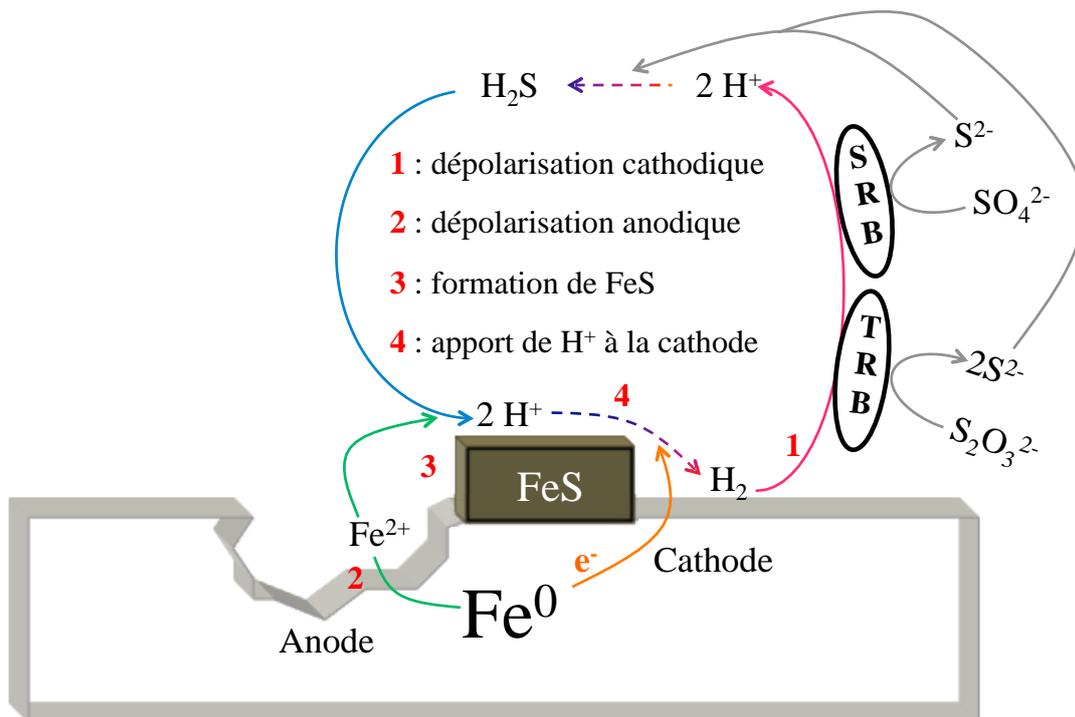


Figure 16. Modèle de biocorrosion par les SRB (adapté de Geesey *et al.*, 2000).

Les processus de biocorrosion par les bactéries ferroxydantes et ferriréductrices ont été moins étudiés que pour les SRB (Rainha & Fonseca, 1997 ; Castaneda & Benetton, 2008). Toutefois, la réduction bactérienne des composés d'ions ferriques insolubles en ions ferreux solubles a déjà été proposée pour faciliter la dissolution de la couche protectrice des produits de corrosion formés sur la surface métallique (Videla, 1996). Geesey and Flemming (1991) ont également signalé que les IRB sont impliquées dans la formation de biofilms favorisant la corrosion. Néanmoins, le rôle des IRB dans la MIC est encore sujet à débat. En effet, ces dernières pourraient former un biofilm protecteur inhibiteur des processus de corrosion selon certains auteurs (Dubiel *et al.*, 2002 ; Lee & Newman, 2003 ; Herrera & Videla, 2009).

Dernièrement, il a été mis en évidence que l'association IRB et SRB était impliquée dans les processus de biocorrosion au sein de pipelines (Elshawesh *et al.*, 2008).

III.2.3.c.(ii) Les bactéries ferriréductrices (IRB) et leur rôle dans la dégradation des produits de corrosion du fer constitutifs de la couche passivante

Les bactéries ferriréductrices (IRB) appartiennent à ce que l'on nomme les MRB : *Metal-Reducing Bacteria* (Beech & Gaylarde, 1999). Celles-ci sont capables de dissoudre les produits de corrosion constituant le film passivant à la surface de l'acier corrodé par réduction dissimilatrice des espèces Fe^{III} . Les produits biogénérés par cette réduction microbienne sont moins stables et entraînent une augmentation du processus de corrosion par déplacement d'équilibre chimique. Par exemple, la formation de rouille verte peut résulter de l'activité bactérienne. Obuekwe *et al.* (1981) démontrèrent l'accélération des processus de corrosion d'un acier non allié en présence d'IRB du genre *Pseudomonas* isolée dans les tuyaux corrodés acheminant le pétrole brut.

De nombreuses bactéries sont capables d'effectuer la réduction du fer (et/ou du manganèse) (Arnold *et al.*, 1988 ; Roden & Zachara, 1996). Il a été démontré que dans les cultures de *Shewanella putrefaciens*, le contact entre les oxydes fer et les cellules bactériennes est nécessaire pour qu'il y ait réduction des métaux. La vitesse de réaction dépend de la nature de l'oxyde de fer réduit (Little *et al.*, 1997 ; Nealson & Little, 1997). Par exemple, après 22 jours d'incubation avec des IRB, la vitesse de réduction de l'hématite est 50 fois plus lente que celles observées pour la goethite et la ferrihydrite. Les auteurs supposent que la vitesse de réduction du Fe^{3+} est reliée à la surface spécifique de l'oxyde de fer ainsi qu'à son accessibilité (Kostka & Nealson, 1995 ; Roden & Zachara, 1996 ; Neal *et al.*, 2003). Cependant, d'autres facteurs tels que la cristallinité et la solubilité du minéral affecteraient aussi la cinétique de conversion du fer ferrique en fer ferreux (Bonneville *et al.*, 2004 ; Cutting *et al.*, 2009 ; Bosch *et al.*, 2010).

La bioréduction de la magnétite par les bactéries ferriréductrices a été très peu étudiée puisqu'elle a été longtemps considérée comme un produit final de la réduction

microbienne des oxydes ferriques (ferrihydrite, lépidocrocite, goethite). Kostka and Nealson (1995) démontrent que la réduction par les IRB de l'oxyde de fer Fe_3O_4 couplée à l'oxydation du lactate ou du glucose est thermodynamiquement possible ($\Delta_r G^0$ négatif). Celle-ci serait optimale à une température de 37 °C et à des pH compris entre 5 et 6 (Kostka & Nealson, 1995). Cette conversion microbienne du Fe^{3+} en Fe^{2+} s'effectue soit par un contact entre la bactérie et le minéral (Kostka & Nealson, 1995), soit *via* une navette à électrons comme l'AQDS ou des substances humiques (Dong *et al.*, 2000). Ces vecteurs d'électrons induisent une accélération du processus de bioréduction de la magnétite. Ainsi ce minéral bien cristallisé peut être réduit en divers minéraux ferrifères : vivianite $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, sidérite FeCO_3 (Zhang *et al.*, 1997 ; Dong *et al.*, 2000). Ces derniers sont aussi rencontrés lorsque la magnétite est en présence de bactéries ferriréductrices thermophiles (Zhang *et al.*, 1997). Cependant, aucune étude n'a été menée sur l'influence de la surface spécifique de la magnétite sur sa vitesse de bioréduction. Pourtant, Bose *et al.* (2009) ont montré que le diamètre des particules d'hématite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), relié directement à la surface spécifique du minéral, était un paramètre prépondérant dans le pourcentage de fer ferrique réduit. De plus, il semblerait que celui-ci soit aussi dépendant de l'agrégation des particules dans le milieu (Bose *et al.*, 2009).

Par ailleurs, d'autres bactéries – *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio desulfuricans* – présentent aussi la capacité à réduire les espèces Fe^{III} malgré le fait que celles-ci soient classées parmi les SRB (Coleman *et al.*, 1993 ; Lovley, 1997). Par exemple, l'affinité de *Desulfovibrio desulfuricans* envers le fer ferrique en tant qu'accepteur d'électrons est plus élevée que pour les espèces SO_4^{2-} (Coleman *et al.*, 1993). La « respiration » des espèces Fe^{III} par des bactéries sulfatoréductrices reste encore très controversée. La majorité des travaux menés sur la réduction des espèces Fe^{III} en Fe^{II} via des SRB met en exergue un procédé indirect de formation du fer ferreux. Il s'agirait d'une réduction abiotique du fer ferrique par les sulfures biogénérés par les SRB – qui utilisent les sulfates pour produire des espèces S^{2-} (Li *et al.*, 2004).

Ainsi, plusieurs groupes métaboliques (IRB, SRB) coexistant au sein d'un biofilm à la surface d'un acier sont capables de réduire le fer ferrique en fer ferreux, déplaçant ainsi les équilibres chimiques impliqués dans les processus de corrosion.

Les interactions entre différentes espèces microbiennes sont complexes. Des consortia de bactéries ferroxydantes (IOB) et sulfatoréductrices (SRB) ont souvent été retrouvés dans les biofilms de surfaces métalliques corrodées (Videla & Characklis, 1992). De même, l'association d'IRB et IOB au sein de biofilms de l'environnement naturel a été mise en évidence (Blöthe & Roden, 2009 ; Jorand *et al.*, 2011 ; Roden *et al.*, 2012).

III.2.3.c.(iii) Implication des bactéries ferroxydantes (IOB) dans la continuité du processus de biocorrosion

Les bactéries du genre *Leptothrix*, *Gallionella* ou encore *Sphaerotilus* sont connues pour participer à la biogénération d'oxydes métalliques à partir du fer ou du manganèse (Gounot, 1994). Elles oxydent le Fe^{2+} – dissout dans le milieu ou précipité à la surface du métal – en Fe^{3+} . Ces microorganismes sont qualifiés de MDB : *Metal-Depositing Bacteria*. Ils compromettent la stabilité des films d'oxydes formés en surface d'un acier corrodé en milieu anaérobie. Leur implication dans la MIC a été proposée suite à leur détection par microscopie au sein de dépôts de corrosion naturels (Beech & Gaylarde, 1999). Ces bactéries sont typiquement associées à des nodules – dépôts macroscopiques contenant des microorganismes ainsi que de la matière organique et inorganique – et ces formations analogues au biofilm induisent une attaque par piqûration de l'acier (Tatnall, 1981). Parmi les IOB, certaines bactéries sont capables de coupler l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique à la réduction des nitrates en diverses espèces azotées : NO_2^- , N_2O , NO , N_2 , NH_4^+ . Celles-ci, plus connues sous le nom de *Iron Oxidizing Nitrate Reducing Bacteria* (IONRB) ont été mises en évidence par Straub *et al.* (1996).

III.2.3.c.(iv) Rôle des bactéries ferroxydantes nitrate-réductrices (IONRB) dans la corrosion microbienne

En conditions anoxiques et à pH neutre, les IONRB utilisent les espèces Fe^{II} en tant que donneur d'électrons et les anions NO_3^- comme accepteur d'électrons (Straub *et al.*, 1996 ; Weber *et al.*, 2006a ; Weber *et al.*, 2006b ; Matocha *et al.*, 2012). Les donneurs d'électrons ferreux tels que la sidérite (Kappler & Newman, 2004), la vivianite (Miot *et al.*, 2009a) et les rouilles vertes (Miot *et al.*, 2014b), sont alors oxydés via l'activité des IONRB en divers

minéraux secondaires en fonction des conditions géochimiques du milieu : ferrihydrite (Straub *et al.*, 1998 ; Senko *et al.*, 2005), goethite (Kappler *et al.*, 2005), lépidocrocite (Larese-Casanova *et al.*, 2010), magnétite (Chaudhuri *et al.*, 2001 ; Miot *et al.*, 2014b) ou rouilles vertes (Pantke *et al.*, 2012). Ces minéraux secondaires de fer ainsi biogénérés par l'activité des IONRB précipitent rapidement dans l'environnement immédiat des cellules conduisant à leur encroutement (**Figure 17**) et limitant dès lors la croissance bactérienne et l'oxydation du fer ferreux (Kappler *et al.*, 2005 ; Miot *et al.*, 2009a).

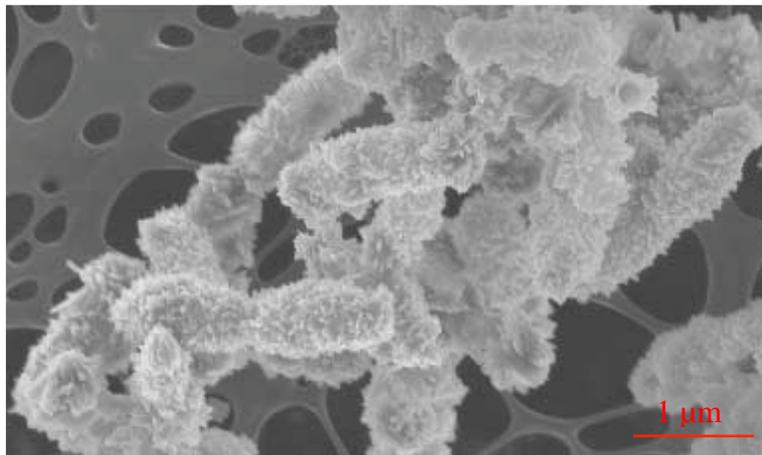


Figure 17. Encroutement par des aiguilles de goethite de cellules d'Acidovorax souche BoFeN1 mises en présence de nitrate, fer ferreux et lactate (Kappler *et al.*, 2005)

Cependant, l'activité des IONRB requiert la présence d'acétate en tant que co-substrat afin d'obtenir une oxydation significative des espèces Fe^{II} (Kappler *et al.*, 2005 ; Konhauser *et al.*, 2011 ; Picardal, 2012). Néanmoins, il n'est pas exclu que cet acétate joue le rôle de donneur d'électrons remettant ainsi en cause l'existence d'une oxydation enzymatique du fer ferreux (Carlson *et al.*, 2012 ; Picardal, 2012 ; Klueglein & Kappler, 2013). A l'heure actuelle, la présence d'une enzyme membranaire chez les IONRB couplant l'oxydation du fer à la réduction des nitrates n'a pas été mise en évidence, confortant ainsi l'hypothèse énoncée dès 2009 par Miot *et al.* où les nitrites, intermédiaires réactionnels probables de la dénitrification biogénérés par l'oxydation du co-substrat (acétate), oxyderaient les espèces Fe^{II} en Fe^{III} de manière purement abiotique (Miot *et al.*, 2009a ; Miot *et al.*, 2009b ; Miot *et al.*, 2011 ; Pantke *et al.*, 2012).

III.2.3.c.(v) Intervention des bactéries réductrices des nitrates (NRB) dans les processus de corrosion

Constituant un groupe important de la communauté bactérienne anaérobie, les NRB réduisent les nitrates en diverses espèces azotées de degré d'oxydation moindre (**Tableau 5**). Leur rôle dans les processus de corrosion a été identifié dès la fin des années 90 en démontrant que la consommation de H₂ (produit à la cathode) par les NRB telles que *Paracoccus denitrificans* supportait leur croissance et accélérât l'oxydation des espèces Fe⁰ en Fe^{II} et Fe^{III} (Till *et al.*, 1998 ; Kielemoes *et al.*, 2000 ; Sunger & Bose, 2009). L'espèce azotée majoritairement produite en fin de réaction dépend du ratio nitrite/fer ferreux : ainsi, plus ce ratio est bas et plus la formation d'ammonium est majoritaire ; en revanche, si ce ratio devient important, la formation de monoxyde d'azote va prédominer et engendrer un effet toxique sur les NRB, inhibant ainsi les processus de corrosion de l'acier (Kielemoes *et al.*, 2000).

Tableau 5. Spéciation de l'azote

| Nomenclature | Nitrates | Nitrites | Monoxyde d'azote | Protoxyde d'azote | Azote | Ammonium |
|--------------|------------------------------|------------------------------|------------------|-------------------|----------------|------------------------------|
| Formule | NO ₃ ⁻ | NO ₂ ⁻ | NO | N ₂ O | N ₂ | NH ₄ ⁺ |
| Degré | +V | +III | +II | +I | 0 | -III |

Cependant, l'impact des NRB dans les processus de biocorrosion reste très peu étudié du fait que la majorité de la communauté des corrosionnistes impute ces phénomènes à la seule activité des SRB. L'ajout de nitrates, nitrites ou biocides à base de nitrates entraîne une diminution significative de la biocorrosion causée par les SRB et TRB selon plusieurs mécanismes : i) une stimulation de la croissance des bactéries réductrices des nitrates ou nitrites en présence de donneurs d'électrons, au détriment des SRB/TRB (**Figure 18a**) ; ii) un détournement de la capacité de certaines SRB à réduire les sulfates en sulfures en favorisant une réduction dissimilatrice des nitrates en ammoniacque (**Figure 18b**) ; iii) une élimination des sulfures de dihydrogène (H₂S) à travers une oxydation bactérienne couplée à la réduction

des nitrates (**Figure 18c**) (Jenneman *et al.*, 1986 ; Gardner & Stewart, 2002 ; Zuo *et al.*, 2004 ; Hubert & Voordouw, 2007 ; Schwermer *et al.*, 2008 ; Pillay & Lin, 2014).

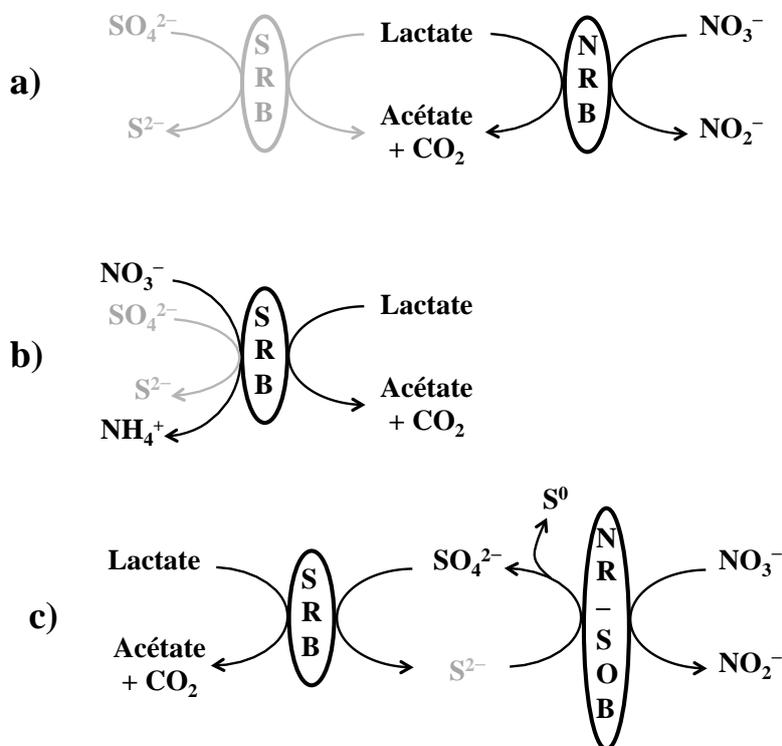
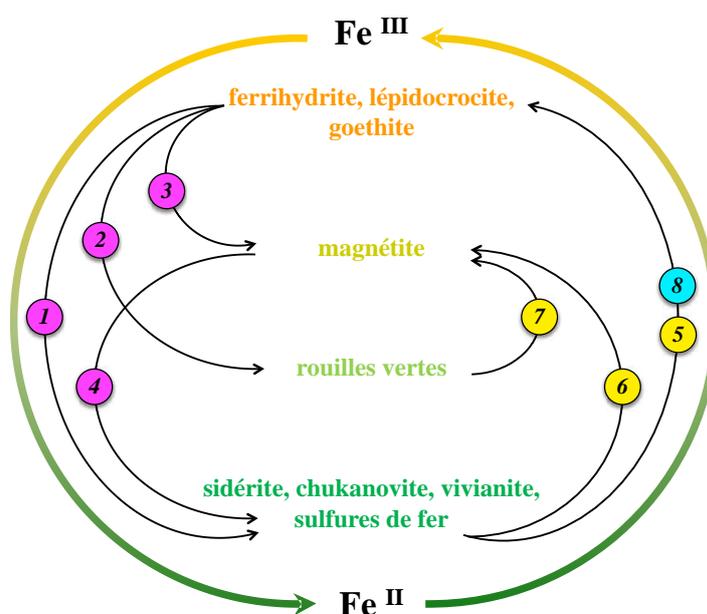


Figure 18. Impact des nitrates sur le cycle du soufre : (a) compétition SRB/NRB pour le donneur d'électrons organique entraînant une inhibition de la production de sulfures, (b) réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium aux dépens de la réduction des sulfates en sulfures, (c) conversion des sulfures en sulfates et soufre élémentaire par les bactéries réductrices des nitrates sulfo-oxydantes (NR-SOB).

Bien que l'emploi des inhibiteurs de corrosion à base de nitrates se soit avéré efficace, il entraîne une augmentation des NRB qui n'est pas non plus sans conséquence. Une étude récente menée sur un biofilm de *Bacillus licheniformis* à la surface de coupons d'acier (C1018) en présence de nitrate (15 mM) met en évidence la capacité des NRB à provoquer de profondes piquûres de l'ordre de 15 μm en une semaine, ainsi qu'une perte de masse en Fe^0 d'environ 1 mg/cm^2 (Xu *et al.*, 2013).

III.2.3.c.(vi) Récapitulatif de l'action des groupes métaboliques IRB, IOB et IONRB sur les transformations des produits de corrosion

L'activité des microorganismes anaérobies est donc susceptible de modifier les produits de corrosion et d'influencer de fait les mécanismes de la corrosion (**Figure 19**).



Activités des bactéries ferriréductrices (IRB) :

- 1 Bioréduction de la ferrhydrite ou lépidocrocite en sidérite, vivianite ou chukanovite (Fredrickson *et al.*, 1998; O'Loughlin *et al.*, 2010)
- 2 Bioréduction de la ferrhydrite ou lépidocrocite en rouille verte (Fredrickson *et al.*, 1998; Ona-Nguema *et al.*, 2002)
- 3 Bioréduction de la ferrhydrite ou lépidocrocite en magnétite (Fredrickson *et al.*, 1998; Ona-Nguema *et al.*, 2002)
- 4 Bioréduction de la magnétite en sidérite ou vivianite (Dong *et al.*, 2000)

Activités des bactéries ferroxydantes réductrices des nitrates (IONRB) :

- 5 Biooxydation de la sidérite ou de la vivianite en goethite (Kappler *et al.*, 2005; Miot *et al.*, 2009a)
- 6 Biooxydation de la sidérite en magnétite (Chaudhuri *et al.*, 2001)
- 7 Biooxydation des rouilles vertes en magnétite (Miot *et al.*, 2014)

Activités des bactéries ferroxydantes (IOB) :

- 8 Biooxydation de la pyrite, sidérite ou vivianite en goethite ou lépidocrocite (Kappler & Newman, 2004)

Figure 19. Implications des groupes métaboliques IRB, IONRB et IOB dans les transformations des produits de corrosion du fer en milieu anoxique

Chapitre II :

Objectifs de la thèse et démarche expérimentale

Hormis les silicates de fer, les principaux produits de corrosion attendus à la surface de l'acier non allié dans les conditions de stockage sont, comme nous l'avons vu, essentiellement de la magnétite et de la sidérite. Au contact de l'acier non allié, la magnétite formerait une couche nano-micrométrique surmontée par une couche de sidérite poreuse, présentant une épaisseur de l'ordre de 300 μm , en contact avec l'argilite du Callovo-Oxfordien (**Figure 20**).

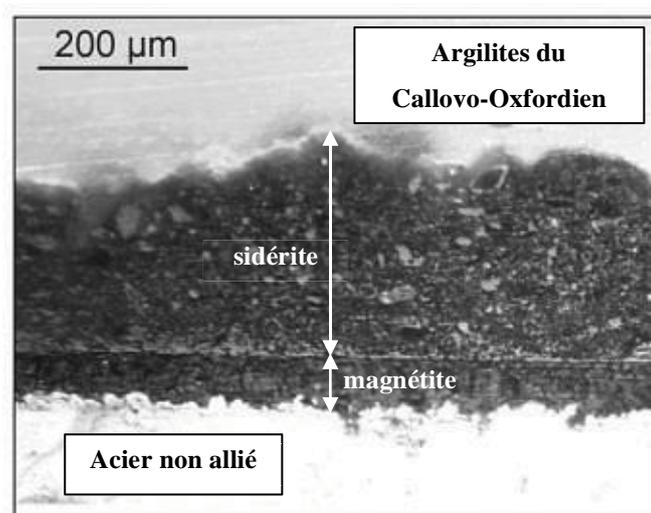


Figure 20. Observation en microscopie optique d'une coupe transversale d'une superposition de produits de corrosion formés à l'interface acier non allié et argilites du Callovo-Oxfordien par polarisation anodique à courant imposé ($500 \mu\text{A cm}^{-2}$) en 3 jours à $80 \text{ }^\circ\text{C}$ dans une solution de bicarbonate de sodium (0,1 M) et chlorure de sodium (0,05 M). La magnétite constitue la strate interne en contact avec l'acier non allié (28 – 100 μm d'épaisseur) et la sidérite forme la strate externe accompagnée d'une partie de la couche d'argilites du Callovo-Oxfordien qui la surplombe (Romaine, 2014).

L'influence des microorganismes sur les transformations de ces produits de corrosion reste, aujourd'hui encore, peu étudiée et les connaissances acquises et développées dans le domaine de la biocorrosion sont relativement peu exhaustives, exceptées pour les bactéries sulfatoréductrices (SRB) ou thiosulfatoréductrices (TRB), où, depuis le milieu du 20^{ème} siècle, une littérature abondante concerne les mécanismes de corrosion influencés par ces groupes métaboliques. Cependant, d'autres groupes métaboliques sont susceptibles d'intervenir dans les processus de corrosion, seuls ou associés avec les SRB et TRB. C'est

notamment le cas des microorganismes capables d'interagir directement avec le fer comme donneur ou accepteur d'électrons, telles les bactéries ferroxydantes ou les bactéries ferriréductrices (IRB). Enfin, en milieu anoxique, ce sont les couples rédox $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (et $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$, NO_3^-/N_2 , etc) qui présentent le potentiel rédox le plus élevé juste après celui de $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$. La capacité à respirer ces espèces oxydées de l'azote (bactéries réductrices des nitrates ou NRB) est largement répandue au sein des communautés bactériennes du sol. Parmi les intermédiaires réactionnels de la respiration des nitrates, les nitrites représentent l'espèce clé de l'azote de par sa forte réactivité envers le fer ferreux. Pour ces raisons, il semble pertinent de s'intéresser à ces groupes métaboliques IRB et NRB dans le contexte de la corrosion bactérienne anoxique.

L'enjeu principal de cette thèse vise donc à évaluer l'influence de l'activité des bactéries réductrices du fer ferrique (IRB) et des nitrates (NRB) sur les transformations des produits de corrosion, magnétite et sidérite, de l'acier non allié.

Pour répondre à cet objectif, trois verrous scientifiques ont été identifiés :

- ❖ Est-ce que l'activité des bactéries réductrices des nitrates ou NRB peut conduire à l'oxydation de la sidérite ? Dans quelle mesure l'activité « ferroxydante » des NRB peut-elle se rapprocher de l'activité des bactéries couplant l'oxydation du fer ferreux à la réduction des nitrates (IONRB) ?
- ❖ Est-ce que la magnétite peut être transformée sous l'activité des bactéries réductrices du fer ferrique ou IRB ? Dans quelles conditions cette transformation peut conduire à la formation de phases plus instables que la magnétite ?
- ❖ Retrouve-t-on ces transformations de la sidérite et de la magnétite lorsque ces produits de corrosion sont présents sous forme de films à la surface d'un coupon en acier non allié ?

Les deux espèces bactériennes qui ont été retenues comme modèle des groupes métaboliques NRB et IRB sont :

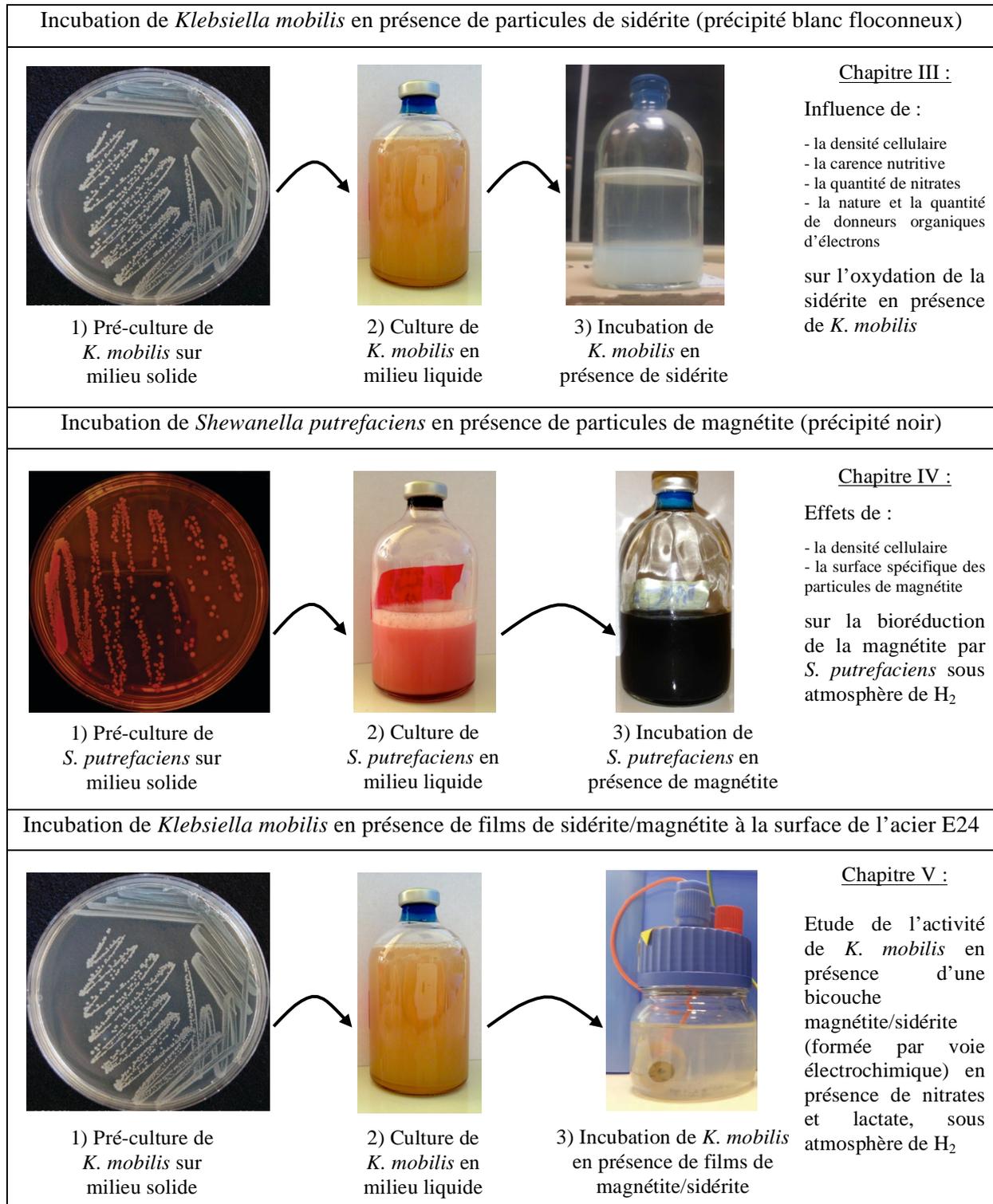
- NRB : *Klebsiella mobilis* (syn. *Enterobacter aerogenes*) est une bactérie mésophile, elle appartient à la classe des γ -protéobactéries et à la famille des *Enterobacteriaceae*, naturellement présente dans l'organisme humain. Elle est aérobie facultative, non dénitrifiante, et présente une capacité à respirer les nitrates en nitrites ;

- IRB : *Shewanella putrefaciens* est une bactérie mésophile ubiquiste, elle appartient à la classe des γ -protéobactéries et à la famille des *Shewanellaceae*, elles sont retrouvées notamment dans les biofilms à la surface d'aciers corrodés en milieu anoxique. Elle est aéro-anaérobie à respiration obligatoire.

Les NRB ou IRB ont dans un premier temps été mises en présence de sidérite ou de magnétite en suspension, respectivement, puis incubées en présence de films de sidérite/magnétite générés à la surface d'un disque d'acier E24 – représentatif de l'alliage du surconteneur métallique (**Figure 20**). Les travaux effectués sur les particules de sidérite et de magnétite en suspension visaient à accentuer les effets des bactéries sur le fer puisque la surface de contact est beaucoup plus élevée que sous forme de films.

Le **Tableau 6** récapitule et illustre les protocoles expérimentaux suivis lors des différentes expériences menées au cours de la thèse. Ces expériences seront décrites plus en détail dans la partie matériel et méthodes des chapitres III à V. Toutes les expériences réalisées au cours de cette thèse ont été faites *at minima* en duplicata, à un pH initial de 7 en conditions anoxiques, à l'abri de la lumière et sous une température de 30 °C.

Tableau 6. Organigramme avec illustration des expériences anoxiques portant sur l'influence des NRB et IRB sur les produits de corrosion, sidérite et magnétite, de l'acier non allié



Les méthodes de caractérisation des solides et d'analyses en solution utilisées au cours de cette thèse sont détaillées succinctement dans les **Tableaux 7 et 8** suivants :

Tableau 7. Techniques de caractérisation des solides

| Techniques de caractérisation | Informations retirées |
|--|--|
| Spectroscopie Raman | Nature des produits de corrosion |
| Diffraction des Rayons X | Identification des phases cristallines et détermination de la structure cristallographique |
| Spectroscopie Mössbauer | Nature et abondance relative des minéraux riches en fer |
| Microscopie Electronique en Transmission (TEM) / Analyse Dispersive en Energie (EDX) | Morphologie, structure cristallographique et analyse élémentaire des minéraux |
| Microscopie en épifluorescence | Localisation des cellules bactériennes vis-à-vis des phases solides, étant agrégées ou non |

Tableau 8. Analyses en solution

| | Techniques | Informations retirées |
|-----------------------|------------------------------------|---|
| Physico-chimie | Dosage à la ferrozine | [Fe ^{II}] et [Fe _{tot}] |
| | Dosage au salicylate/nitroprusside | [NH ₄ ⁺] |
| | Potentiométrie et pH-métrie | <i>E_h</i> et pH |
| | Chromatographie ionique | [NO ₃ ⁻] et [NO ₂ ⁻] |
| Biologie | Marquage au SYBR Green® | Dénombrement total des bactéries |
| | <i>BacLight</i> TM | Dénombrement total des bactéries et des bactéries dont l'intégrité membranaire est atteinte |
| | Culture en milieu | Dénombrement des Unités Formant Colonies (UFC) |
| | Galleries API® 20 E et 20 NE | Identification et contrôle des souches bactériennes |

Chapitre III :

Oxydation indirecte de la sidérite par l'activité des bactéries réductrices des nitrates (NRB)¹

¹ L'essentiel de ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

Marjorie Etique, Frédéric P. A. Jorand, Asfaw Zegeye, Brian Grégoire, Christelle Despas, Christian Ruby (2014) Abiotic process for Fe(II) oxidation and green rust mineralization driven by a heterotrophic nitrate reducing bacteria (*Klebsiella mobilis*). *Environmental Science & Technology*, 48 : 3742-3751.

I. Introduction

Suivant leur durée de vie et leur niveau de radioactivité, seuls les déchets radioactifs HAVL et MAVL seront enfouis à 500 m de profondeur dans une formation argileuse située sur le site Cigéo en Meuse/Haute-Marne (France). Bien qu'étant entreposés au sein de la même couche géologique du Callovo-Oxfordien, les colis HAVL et MAVL occuperont des zones de stockage distinctes où les concentrations attendues en nitrates présenteront une forte variabilité. L'origine des espèces nitrates sur le site d'enfouissement peut être multiple : (i) dissolution des matrices utilisées dans les infrastructures réceptionnant les colis de déchets nucléaires telles que les bétons ou les bitumes ; (ii) présence anthropique ou naturelle dans le milieu de stockage. Les gammes de concentrations en nitrates ont été estimées inférieures à 0,5 mM pour l'eau porale des argilites du Callovo-Oxfordien (Vinsot *et al.*, 2008), et de 0,1 mM à 10 mM pour la zone de stockage des colis MAVL (Truche *et al.*, 2013). En présence d'acier et au contact du dihydrogène, généré à la fois par la radiolyse de l'eau et la corrosion anoxique du fer métallique, les nitrates peuvent être réduits à haute température ($T \geq 90$ °C) par des processus abiotiques connus en diverses espèces azotées, notamment en ammonium, conduisant à une augmentation du pH dans le milieu (Truche *et al.*, 2013). Pour des températures plus faibles (25 °C $\leq T < 90$ °C), la réduction des nitrates est possible en présence de catalyseurs chimiques (*e.g.* Pd-Cu (Kim *et al.*, 2014)), de phases réactives à base de fer (*e.g.* rouille verte (Etique *et al.*, 2014b)) ou d'activité microbienne (Albrecht *et al.*, 2012). En effet, les IONRB présenteraient la capacité à coupler la réduction des nitrates à l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique (Klueglein & Kappler, 2013). Les nitrates sont des accepteurs d'électrons permettant le gain énergétique le plus élevé en conditions anoxiques. Une multitude de bactéries du sol sont capables de respirer les ions NO_3^- en conditions anoxiques à pH neutre et de générer des nitrites biogéniques comme produit azoté final ou intermédiaire réactionnel dans les processus de dénitrification (Prescott *et al.*, 2003). On parle de bactéries réductrices des nitrates ou NRB. Les nitrites présentant une forte réactivité vis-à-vis du fer ferreux, ils pourraient conduire à la transformation de la sidérite, produit de corrosion attendu à la surface de l'acier non allié dans le cadre du stockage des HAVL.

Afin d'évaluer la réactivité des nitrites biogéniques avec le fer ferreux de la sidérite pour former divers produits de corrosion dont la rouille verte carbonatée (métastable), *Klebsiella mobilis* a été utilisée comme modèle des NRB. Cette bactérie est non-dénitrifiante (Payne, 1973), *i.e.* elle ne peut réduire les nitrates en N_2O et/ou N_2 , et est incapable d'oxyder biologiquement le fer ferreux (Cruz-Garcia *et al.*, 2007), contrairement aux IONRB qui catalyseraient enzymatiquement la réduction des nitrates. *Klebsiella mobilis* est une entérobactérie qui peut utiliser des donneurs organiques d'électrons de nature variée tels que le glucose, le glycérol ou encore le lactate, aussi bien en aérobie qu'en anaérobie, pour réduire les nitrates en nitrites biogéniques, qui sont dès lors, expulsés activement hors du compartiment cytoplasmique (Stewart, 1988). Dans les environnements oligotrophes où la présence de donneurs organiques d'électrons est restreinte, voire absente, *Klebsiella mobilis* a la capacité d'utiliser ses propres réserves de sources de carbone et de donneurs organiques d'électrons stockées sous forme de glycogène. Le glycogène, accumulé au cours de périodes favorables à sa croissance (milieu nutritif riche), permet donc à la bactérie de survivre à des périodes de carences nutritives (Morita, 1997). Le glycogène constitue donc les réserves endogènes en carbone et en électrons de *Klebsiella mobilis*. Pour simuler l'activité bactérienne des NRB dans les milieux oligotrophes où les flux d'électrons sont très faibles, *Klebsiella mobilis* a donc été incubée en absence de source organique de carbone et de donneur organique d'électrons dans un milieu anoxique à pH neutre contenant des concentrations variées en fer ferreux et en nitrates. Ces conditions expérimentales limitant la vitesse d'oxydation de la sidérite liée à la production de nitrites biogéniques, nous avons été en mesure d'identifier la nature des phases de fer formées au cours des processus de biocorrosion.

II. Matériels et méthodes

II.1. Préparation de la suspension de *Klebsiella mobilis* et des milieux d'incubation

La bactérie nitrate-réductrice *Klebsiella mobilis* (syn. *Enterobacter aerogenes*), conservée à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a été revivifiée en conditions aérobies dans du TSA (gélose tryptocaséine soja) avant d'être cultivée dans du TSB (bouillon trypto-caséine soja) en aérobie à

30 °C sous agitation (180 rpm) (**Figure 21a**). La vitesse spécifique de croissance μ de *Klebsiella mobilis* est de $0,21 \text{ h}^{-1}$ (**Figure 21b**), ce qui correspond à un temps de doublement de la population bactérienne d'environ 3,30 h ($G = \ln(2) / \mu$) dans un milieu TSB à 30 °C en aérobie. A la fin de la phase de croissance exponentielle, soit au bout de 15 h de culture (**Figure 21a**), les bactéries ont été centrifugées (10 000 g à 22 °C pendant 10 min), lavées deux fois et resuspendues dans du NaCl 9 ‰ afin d'obtenir une densité cellulaire finale de $(2,2 \pm 0,5) \times 10^{10}$ bactéries mL^{-1} . La suspension bactérienne a ensuite été dégazée sous N_2 (99,99 %) durant 30 min. Cette suspension correspond ici à ce qui sera désignée par le terme de « cellules non carencées », *i.e.* les cellules bactériennes sortent juste de leur phase exponentielle de croissance où elles ont pu constituer un pool de réserves endogènes en carbone et en électrons.

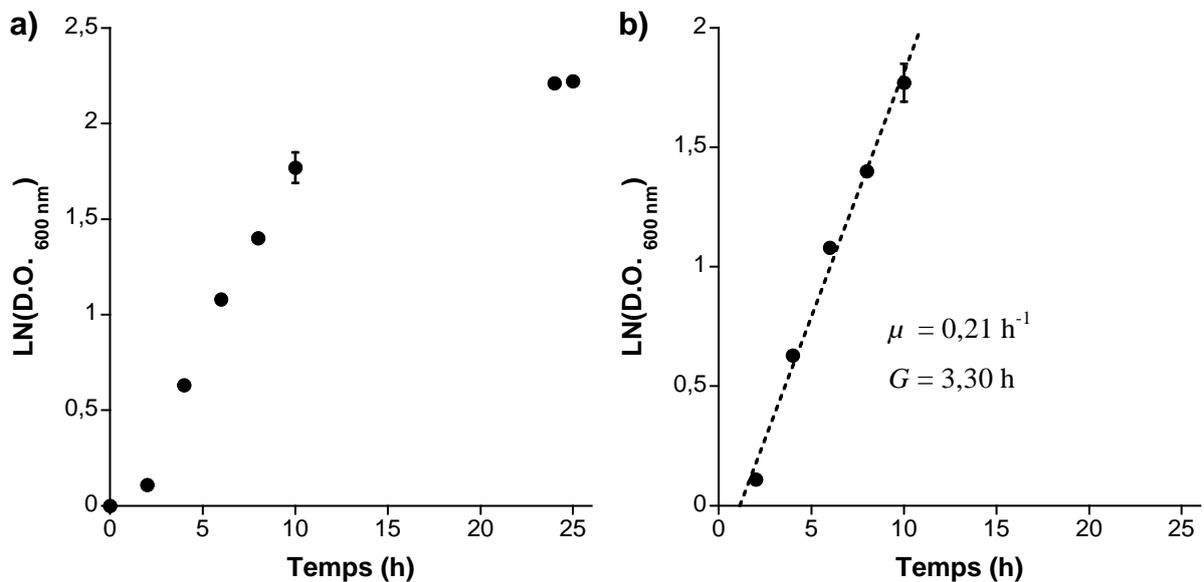


Figure 21. Suivi de la croissance aérobie de *Klebsiella mobilis* dans un bouillon de trypto-caséine soja à 30 °C sous une agitation de 180 rpm par mesure de la densité optique à 600 nm (a). Détermination de la vitesse de croissance spécifique μ de *Klebsiella mobilis* correspondant à la pente de la droite de croissance en phase exponentielle (b). Le temps de doublement de la population bactérienne G est calculé selon le rapport $\ln(2) / \mu$. Les barres d'erreurs ($n=2$) peuvent être masquées par la taille des symboles.

Le milieu minéral incubée par *Klebsiella mobilis* avait pour composition : 2 ‰ NaCl (w/v), 4 – 40 mM NaNO_3 et 30 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,7 mM NH_4Cl , 2,4 mM NaH_2PO_4 ,

7,3 mM NaHCO₃, 1 mL L⁻¹ solution vitaminée (*Vitamin solution*, DSMZ GmbH, 2010), 1 mL L⁻¹ solution d'éléments traces (SL-10, DSMZ GmbH, 2010), et le pH a été ajusté à 7,0 ± 0,2 avec une solution d'acide chlorhydrique ou de soude. Un précipité floconneux blanc a été formé immédiatement après l'addition du Fe(II) correspondant à une phase amorphe de sidérite (Pantke *et al.*, 2012). Quatre-vingt millilitres de ce milieu minéral ont été filtrés sur des membranes de 0,2 µm de porosité avant d'être dispensés dans des flacons en verre stérile de 100 mL fermés hermétiquement par des bouchons en butyle puis scellés. Pour chaque essai, deux duplicata ont été réalisés en balayant une densité bactérienne finale de (0,7 ± 0,1) × 10⁸ à (13,7 ± 0,3) × 10⁸ bactéries mL⁻¹, puis incubés à 30 °C en absence de lumière avec 5,2 – 29 mM de Fe(II), 4,2 – 38,1 mM de NO₃⁻ (**Tableaux 9 et 10**). Aucune source organique de carbone ou de donneur d'électrons n'a été ajoutée afin de maintenir les bactéries dans un état de carence nutritive. Les milieux ainsi inoculés contiennent 49 ± 1 mg L⁻¹ (n=3) de carbone organique dissous.

Des expériences ont été aussi conduites avec une suspension de « cellules carencées » obtenues par le même protocole que précédemment, excepté que la suspension bactérienne a été laissée durant 48 h dans une solution de NaCl 9 ‰ sous N₂ avant d'être introduite dans les bouteilles stériles.

II.2. Numération des bactéries, analyses chimiques et instrumentation

Les cellules bactériennes ont été marquées en utilisant un kit de viabilité Live/Dead[®] *BacLight*[™] (combinaison de fluorochromes SYTO 9 et iodure de propidium) afin d'être comptées par microscopie à épifluorescence et de distinguer les cellules présentant des altérations membranaires (fluorescence rouge) des cellules intègres (fluorescence verte). Un dénombrement des bactéries cultivables a aussi été réalisé par la méthode des Unités Formant Colonies (UFC).

Les concentrations en espèces Fe(II) et le Fe total (solide + solution) ont été analysées par la méthode de la ferrozine en chambre anaérobie après extraction dans HCl 2 M (Viollier *et al.*, 2000). Les nitrates et nitrites ont été suivis par chromatographie ionique après avoir été préalablement dilués dans de l'eau pure et filtrés à 0,2 µm (Etique *et al.*, 2014a).

Tableau 9. Données expérimentales obtenues lors de l'oxydation indirecte de la sidérite par l'activité réductrice des nitrates de *Klebsiella mobilis*. Deux densités cellulaires ont été testées $13,7 \pm 0,3 \times 10^8$ cellules mL⁻¹ et $8,6 \pm 0,3 \times 10^8$ cellules mL⁻¹. Les termes « non carencées » et « carencées » signifient respectivement que les bactéries ont été stoppées en fin de phase exponentielle de croissance et immédiatement injectées dans les flacons d'incubation ou qu'elles ont été injectées après un temps d'attente de 48 h dans une solution de NaCl 0,9 %. Les aspects cinétiques sont décrits par la vitesse initiale r_0 de consommation des espèces Fe(II) (nM s⁻¹) et par la constante cinétique de pseudo-premier ordre k_{obs} (10⁻⁷ s⁻¹). Les quantités de nitrates consommés ($\Delta_{NO_3^-}$), de fer ferreux oxydés ($\Delta_{Fe(II)}$) et d'ammonium produit ($\Delta_{NH_4^+}$) ont permis de calculer les ratios stœchiométriques R_{exp} et $R_{exp(I)}$ par la formule $\Delta_{Fe(II)}/\Delta_{NO_3^-}$. à, respectivement, 18 jours et 4 jours d'incubation. Les analyses du solide ont été effectuées en spectroscopie Raman et microscopie électronique à transmission au jour 6 et au jour 18 d'incubation. G = goethite, RV = rouille verte carbonatée, et S = sidérite.

| N° Exp. | | Paramètres cinétiques d'oxydation des espèces Fe(II) | | | Stœchiométrie de la réaction d'oxydation des espèces Fe(II) | | | | | Analyse du solide | |
|------------|----------------|--|--------------------------------|--|--|---------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|--------|
| | | cellules mL ⁻¹ $\times 10^8$ | r_0 (nM s ⁻¹) | k_{obs} (10 ⁻⁷ s ⁻¹) | $\Delta_{NO_3^-}$ (mM) | $\Delta_{Fe(II)}$ (mM) | $\Delta_{NH_4^+}$ (mM) | R_{exp} | $R_{exp(I)}$ | 6 j | 18 j |
| #1 | Non carencées | $13,7 \pm 0,3$ | 14 ± 2 | $5,0 \pm 0,2$ $r^2 = 0,98$ | - 0,5 | - 3,5 | + 0,49 | $7,0$ $\pm 0,4$ | $6,0$ $\pm 0,6$ | G | G |
| #2 | Carencées | $8,6 \pm 0,3$ | 24 ± 4 | $9,0 \pm 0,2$ $r^2 = 0,98$ | - 1,2 | - 8,2 | + 1,24 | $6,8$ $\pm 0,5$ | $6,3$ $\pm 0,2$ | G | G |
| #3 | Non carencées | $13,7 \pm 0,3$ | 12 ± 3 | $4,1 \pm 0,3$ $r^2 = 0,97$ | - 0,5 | - 3,8 | + 0,43 | $7,7$ $\pm 0,4$ | $5,8$ $\pm 0,5$ | RV + ~ G | G |
| #4 | Carencées | $8,6 \pm 0,3$ | 56 ± 7 | $19,4 \pm 0,4$ $r^2 = 0,97$ | - 1,4 | - 10,8 | + 1,29 | $7,6$ $\pm 0,3$ | $6,7$ $\pm 0,3$ | RV | G |
| #5 | Non carencées | $2,8 \pm 0,1$ | 5 ± 2 | $1,7 \pm 0,4$ $r^2 = 0,99$ | - 0,3 | - 1,8 | + 0,34 | $6,0$ $\pm 0,3$ | $6,0$ $\pm 0,4$ | S, RV | G |
| #6 | Non carencées | $0,7 \pm 0,1$ | 20 ± 4 | $33,5 \pm 0,2$ $r^2 = 0,92$ | - 0,3 | - 2,1 | + 0,40 | $7,0$ $\pm 0,5$ | $5,8$ $\pm 0,6$ | S, RV | RV |
| #7 | Non carencées | $2,8 \pm 0,1$ | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | RV | RV + G |
| Contrôle | Sans bactéries | / | n.a. | n.a. | + 0,3 | - 0,3 | 0,02 | n.a. | n.a. | ~ S | ~ S |

n.a.= non applicable; n.d. = non déterminé

Tableau 10. Concentrations initiales et finales en nitrate, fer ferreux et ammonium des expériences menées sur poudre de sidérite en présence ou absence de *Klebsiella mobilis*. Toutes les expériences ont été réalisées en duplicata. n.d. signifie « non déterminé ».

| N° Exp. | | Concentrations initiales (0 j) | | | | Concentrations finales (18 j) | |
|------------|-----------|--|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| | | cellules mL ⁻¹ × 10 ⁸ | NO ₃ ⁻ (mM) | Fe ^{II} (mM) | NH ₄ ⁺ (mM) | NO ₃ ⁻ (mM) | Fe ^{II} (mM) |
| #1 | Non | 13,7 | 38,1 | 27,6 | 1,70 | 37,6 | 24,1 |
| | carencées | ± 0,3 | ± 0,8 | ± 0,1 | ± 0,09 | ± 0,3 | ± 0,1 |
| #2 | Carencées | 8,6 | 40,4 | 26,9 | 1,68 | 39,2 | 18,7 |
| | | ± 0,3 | ± 0,1 | ± 0,9 | ± 0,02 | ± 0,2 | ± 0,4 |
| #3 | Non | 13,7 | 4,2 | 28,3 | 1,78 | 3,7 | 24,5 |
| | carencées | ± 0,3 | ± 0,9 | ± 0,3 | ± 0,02 | ± 0,1 | ± 0,3 |
| #4 | Carencées | 8,6 | 4,1 | 29,0 | 1,71 | 2,7 | 18,2 |
| | | ± 0,3 | ± 0,2 | ± 0,4 | ± 0,05 | ± 0,3 | ± 0,2 |
| #5 | Non | 2,8 | 38,0 | 27,7 | 1,75 | 37,7 | 25,9 |
| | carencées | ± 0,1 | ± 0,2 | ± 0,5 | ± 0,04 | ± 0,2 | ± 0,1 |
| #6 | Non | 0,7 | 9,4 | 5,7 | 1,68 | 9,1 | 3,6 |
| | carencées | ± 0,1 | ± 0,5 | ± 0,3 | ± 0,02 | ± 0,7 | ± 0,4 |
| #7 | Non | 2,8 | 24 | 30 | 1,70 | n.d. | n.d. |
| | carencées | | | | | | |
| Contrôle | Sans | / | 40,1 | 28,1 | 1,72 | 37,9 | 27,8 |
| | bactéries | | ± 0,2 | ± 0,2 | ± 0,05 | ± 0,5 | ± 0,3 |

Les analyses de chromatographie ionique ont révélé la présence de nitrites, cependant, ceux-ci n'étaient pas en quantité suffisante pour permettre une quantification fiable (limite de détection 0,1 μM , limite de quantification 0,3 μM). Ceci indique que l'oxydation du Fe(II) n'a pas été surestimée par une éventuelle réaction abiotique entre les nitrites et le Fe(II) en conditions de pH acide. L'ammonium a été mesuré par colorimétrie basée sur une solution de salicylate/nitroprussiate (Baethgen & Alley, 1989).

Des analyses du solide en microscopie électronique par transmission ont été menées via le microscope électronique par transmission CM20/STEM Philips avec une tension d'accélération de 200 kV. Une goutte de la suspension a été déposée sur une grille recouverte de carbone amorphe et introduite dans le porte-échantillon du microscope sous un vide de 10^{-8} Torr. Des caractérisations par spectroscopie Raman ont été aussi réalisées dans une cellule hermétique où l'échantillon est analysé sous N_2 , après avoir été préalablement séché en chambre anaérobie.

II.3. Calcul de la vitesse initiale r_0 d'oxydation des espèces Fe(II)

Nous supposons que l'oxydation du Fe(II) est régie par une cinétique de pseudo-premier ordre (**Eq. 11**). L'évolution de la concentration du Fe(II) en fonction du temps a donc été ajustée par l'équation (**11**) puis la vitesse initiale d'oxydation r_0 du Fe(II) a été déterminée par la méthode des tangentes avec l'équation (**12**) :

$$[Fe(II)]_t = ([Fe(II)]_0 - [Fe(II)]_f) \times e^{-k_{obs} \times t} + [Fe(II)]_f \quad (\text{Eq. 11})$$

$$r_0 \text{ (nM s}^{-1}\text{)} = k_{obs} \times [Fe(II)]_0 \quad (\text{Eq. 12})$$

Avec $[Fe(II)]_t$, $[Fe(II)]_f$ et $[Fe(II)]_0$ les concentrations en espèces Fe(II) totales au temps t, au jour 18 et au jour 0 (en mM) ; k_{obs} la constante cinétique de pseudo-premier ordre (s^{-1}), et r_0 la vitesse initiale d'oxydation du fer ferreux (en nM s^{-1}).

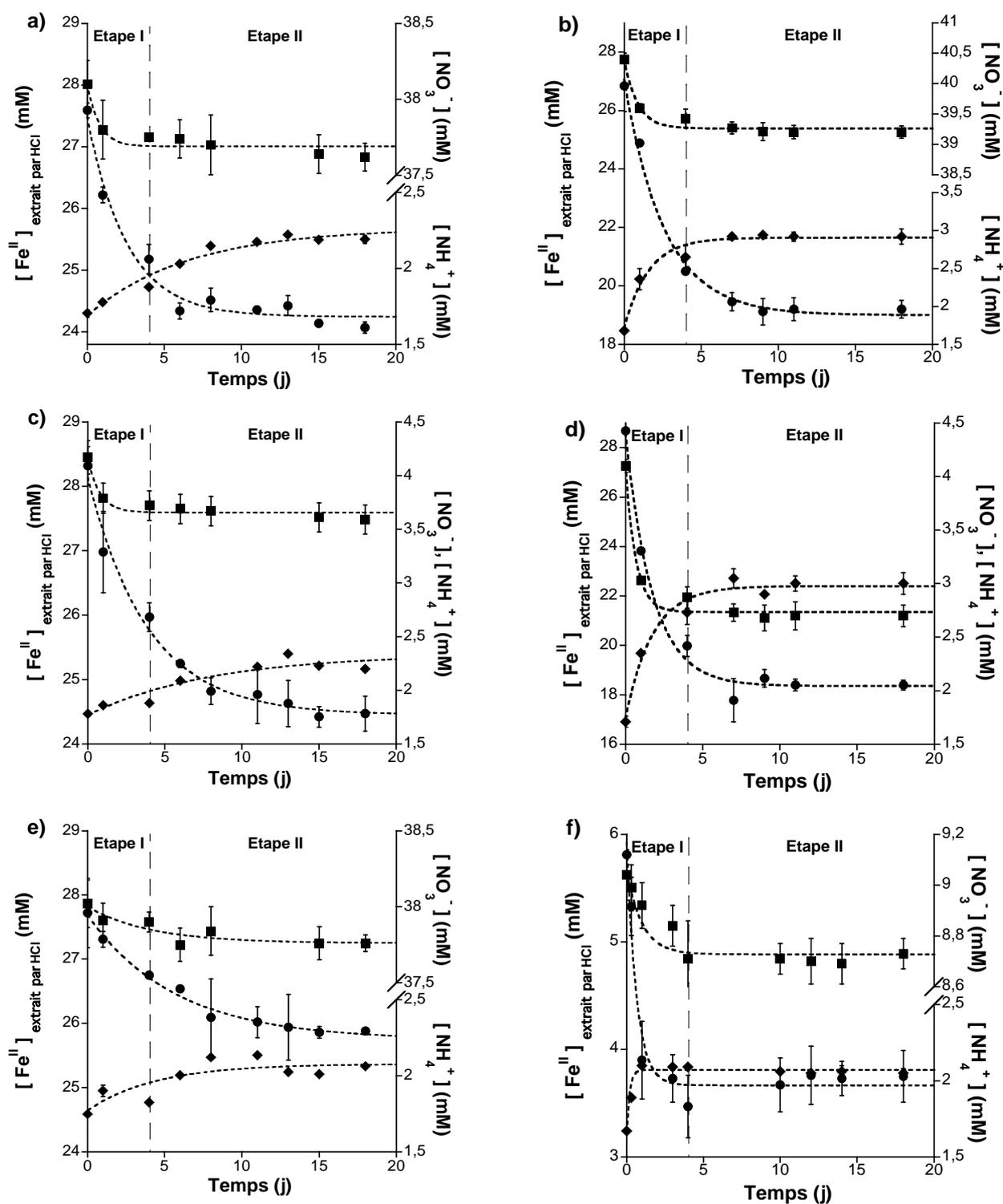


Figure 22. Évolution des concentrations en espèces $Fe(II)$ (rond noir), NO_3^- (carré noir) et NH_4^+ (losange noir) au cours de l'incubation de *Klebsiella mobilis* en présence de nitrates. Les graphes (a), (b), (c), (d), (e) et (f) correspondent respectivement aux expériences #1, #2, #3, #4, #5 et #6 des Tableaux 9 et 10. Le mécanisme d'oxydation de la sidérite étant basé sur deux étapes : (I) correspond à la réaction avec les nitrites biogénérés par *Klebsiella mobilis*, (II) correspond à la réaction de la rouille verte carbonatée avec les nitrates. Les barres d'erreurs (n=2) peuvent être masquées par la taille des symboles.

III. Résultats et discussion

III.1. Oxydation du fer ferreux et bioréduction des nitrates

Quelles que soient les expériences menées, les concentrations en espèces Fe(II) et NO_3^- décroissent de manière concomitante au cours de l'incubation bactérienne (**Figure 22**). Cependant, la quantité de nitrates consommée (0,3 – 0,5 mM) reste très faible par rapport aux concentrations initiales (4,2 – 38,1 mM), pour les cellules non carencées (**Figure 22a, c, e, f ; Tableaux 9 et 10, #1, #3, #5, #6**). *Klebsiella mobilis* ayant été incubée dans des conditions de non croissance (absence de carbone organique pouvant être utilisé comme donneur d'électrons exogène et source de carbone), la fraction de nitrates réduits est donc limitée. Ceci suggère que les cellules non carencées utiliseraient leur propre réserve endogène d'électrons pour réduire les nitrates. Cette hypothèse est cohérente avec la faible consommation de nitrates (0,3 – 0,5 mM) et la faible augmentation de la densité bactérienne au cours des vingt-quatre premières heures (de $2,5 \times 10^6$ à $4,5 \times 10^6$ UFC mL^{-1} et de 7×10^7 à $9,2 \times 10^7$ cellules mL^{-1}), avant de décroître significativement (**Figure 23**). En effet, la source endogène d'électrons stockée sous forme de glycogène ne peut entretenir durablement la réduction des nitrates et la croissance bactérienne. Cependant, nous ne pouvons exclure qu'une fraction du carbone organique dissous (49 ± 1 mg L^{-1}) présent dans le milieu d'incubation pourrait aussi servir de donneur d'électrons.

La réduction bactérienne des nitrates mobilisant une source d'électrons endogène peut être décrite par l'équation (13) :



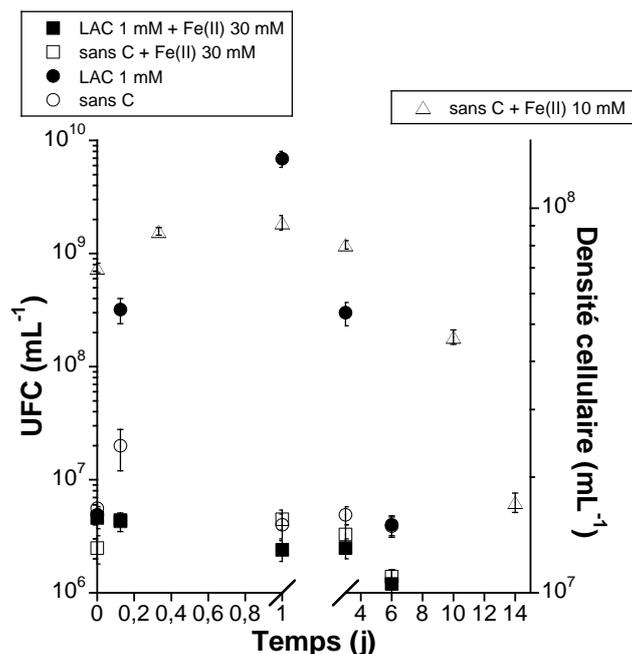


Figure 23. Évolution de la concentration bactérienne (en UFC et en nombre de bactéries/mL) au cours de l'incubation de *Klebsiella mobilis* en présence de nitrates : avec fer ferreux et donneur organique d'électrons (carré noir) ; avec fer ferreux et sans donneur organique d'électrons (carré blanc et triangle blanc) ; sans fer ferreux et avec donneur organique d'électron (rond noir) ; sans fer ferreux et sans donneur organique d'électron (rond blanc). Le donneur organique d'électrons est le lactate, symbolisé par « LAC », de concentration 1 mM. Les barres d'erreurs (n=3) peuvent être masquées par la taille des symboles.

Pour valider cette réduction des nitrates en nitrites par *Klebsiella mobilis*, la suspension cellulaire a été incubée en présence de nitrates sans fer ferreux (**Figure 24a**). Une faible fraction des nitrates (0,2 mM) a été effectivement réduite en nitrites (0,2 mM), confortant ainsi la stœchiométrie attendue avec l'équation (13) et indiquant bien que le fer ferreux n'est pas le réducteur des nitrates. Une consommation de 0,4 mM d'électrons équivalents est alors déduite de l'équation (13), ce qui est en accord avec le potentiel de stockage de carbone organique de *Klebsiella mobilis* sous forme de glycogène, rapporté par Potts (1969). La capacité de *Klebsiella mobilis* à respirer les nitrates en nitrites est documentée depuis plusieurs décennies, de même que son absence d'activité dénitrifiante (pas de formation significative de N₂ et/ou N₂O) (Payne, 1973). *Klebsiella mobilis* est aussi capable de réduire les nitrates et/ou nitrites en ammonium via une réduction assimilatrice lui permettant de satisfaire des besoins en éléments azotés pour sa production de biomasse et non pour sa production d'énergie (Payne, 1973 ; Balderston *et al.*, 1976 ; Cruz-Garcia *et al.*,

2007). Cette voie d'assimilation de la matière azotée à partir des nitrates ne mobilise en principe que peu d'azote, comparé à son utilisation au sein des réactions d'oxydoréduction de conversion énergétique. Mais en situation de carence nutritive, les flux de matière azotée impliqués dans la voie d'assimilation peuvent être de la même ampleur que ceux engagés dans la production d'énergie (ou voie dissimilatrice de la matière azotée). Cependant, la voie d'assimilation de la matière azotée à partir des nitrates est inhibée en présence d'ammonium dans le milieu d'incubation, ce qui est le cas dans nos conditions expérimentales où 1,7 mM de NH_4Cl sont ajoutés. En effet, dans le témoin sans fer ferreux, aucune production significative d'ammonium n'a été mesurée au cours de la respiration des nitrates en nitrites par *K. mobilis* confirmant que la réduction assimilatrice des nitrates n'a pas été activée (**Figure 24a**).

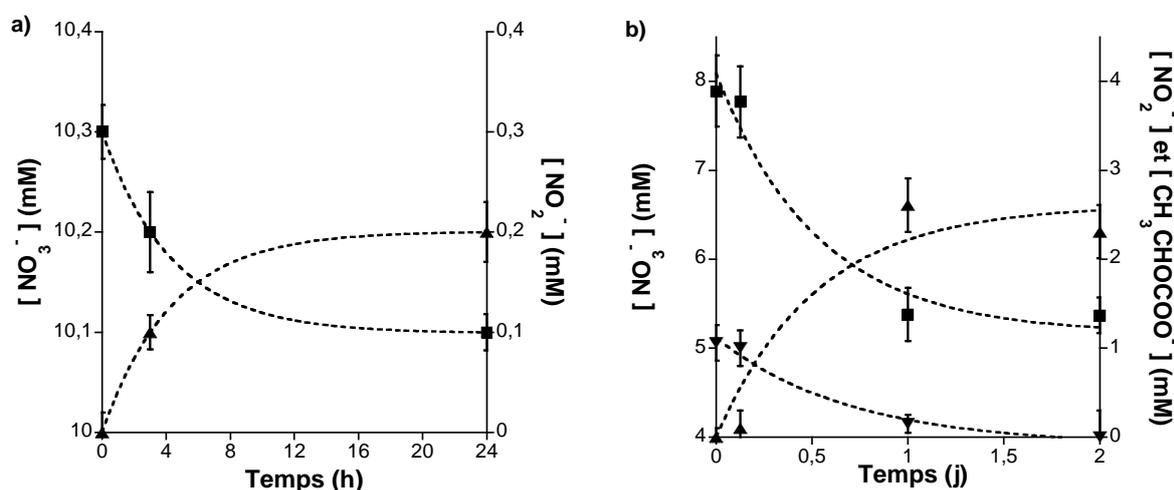


Figure 24. Production de nitrite (NO_2^- , triangle noir) liée à la respiration des nitrates (NO_3^- , carré noir) par *Klebsiella mobilis* en absence de fer ferreux : (a) sans source de carbone, (b) avec 1 mM de lactate ($\text{CH}_3\text{CHCOO}^-$, triangle inversé noir). Les traits pointillés représentent un ajustement par une cinétique de pseudo premier ordre. Les barres d'erreur (n=2) peuvent être masquées par la taille des symboles.

Après un jour d'incubation et quelles que soient les conditions testées, l'oxydation des espèces Fe(II) en présence de *Klebsiella mobilis* a déjà démarré sans présenter de phase apparente de latence (**Figure 22**). En absence de bactéries, aucune réduction des nitrates ou oxydation du fer ferreux n'a été observée (**Figure 25 ; Tableaux 9 et 10, contrôle**), démontrant que l'activité biologique est bien le moteur de ces réactions. En divisant la densité cellulaire par un facteur 5 (de $13,7 \times 10^8$ à $2,8 \times 10^8$ cellules mL^{-1}), la vitesse initiale

d'oxydation des espèces Fe(II), r_0 , diminue d'un facteur 3 (**Tableau 9, comparer #1 avec #5**). Contrairement à toute attente, en présence de bactéries carencées, r_0 et la quantité de Fe(II) oxydée $\Delta_{\text{Fe(II)}}$ sont sensiblement plus élevées qu'avec des bactéries non carencées (**Tableaux 9 et 10, comparer #1 et #3 avec #2 et #4**). Avec des bactéries carencées, la quantité de fer ferreux oxydée $\Delta_{\text{Fe(II)}}$ aurait dû être plus faible, la réserve endogène en électrons étant probablement plus faible que pour des bactéries non carencées juste issues d'une période de croissance en milieu riche. Il semblerait en fait que la période de privation nutritive sous N_2 ait conduit à une plus forte expression de la nitrate réductase, enzyme permettant la réduction des nitrates ; ce qui est confirmé par la littérature (Payne, 1973).

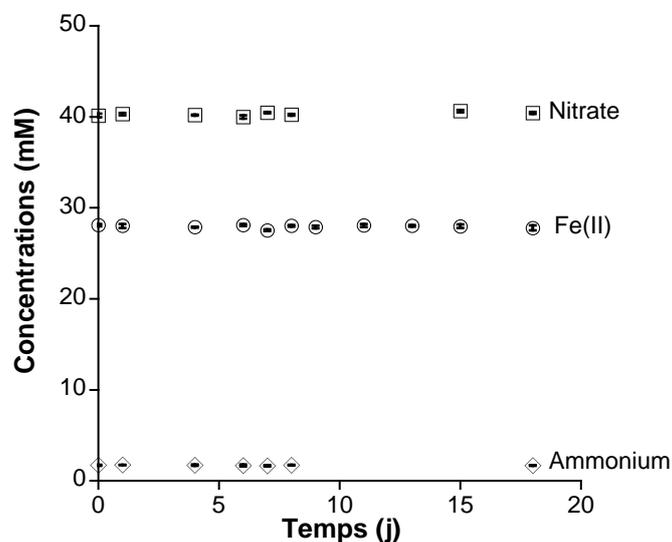
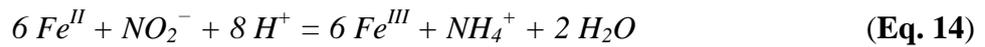


Figure 25. Suivi des concentrations en nitrate (carré), fer ferreux (rond), et ammonium (losange) dans le contrôle abiotique n'ayant pas été inoculée par *Klebsiella mobilis*. Les concentrations de ces trois espèces restent constantes au cours du temps démontrant que les nitrates ne peuvent être abiotiquement réduits par le fer ferreux de la sidérite en absence de bactéries. La faible concentration en ammonium était initialement présente dans le milieu minéral. Les barres d'erreurs sont comprises à l'intérieur des symboles.

III.2. Réduction des nitrates en ammonium par les espèces Fe(II)

D'après l'équation (13) décrite précédemment, la respiration bactérienne des nitrates par *Klebsiella mobilis* aurait dû conduire à une accumulation de nitrites dans le milieu d'incubation, les nitrites n'étant ni utilisés comme accepteur d'électrons par cette espèce

bactérienne, ni assimilés du fait de la présence d'ammonium. Or, seules des traces de NO_2^- ont été détectées suggérant leur consommation. De plus, une production d'ammonium a été mesurée au cours de la période d'incubation de *Klebsiella mobilis* en présence de fer ferreux et de nitrates. La quantité d'ammonium générée ($\Delta_{\text{NH}_4^+}$) est la même que celle des nitrates consommée ($\Delta_{\text{NO}_3^-}$) (**Tableau 9**), soit $\Delta_{\text{NH}_4^+} = \Delta_{\text{NO}_3^-}$. *Klebsiella mobilis* est un microorganisme organotrophe incapable de réaliser un gain énergétique en couplant l'oxydation des espèces Fe(II) à la réduction des nitrates, et comme nous l'avons vu, la réduction des nitrates peut s'effectuer en absence de fer ferreux (**Figure 24**). Par ailleurs, l'oxydation du fer ferreux ne peut se faire sans une activité bactérienne (**Figure 25**). La formation de l'ammonium au cours de la période d'incubation peut résulter d'un mécanisme abiotique (**Eq. 14**), où les nitrites biogénérés par la respiration bactérienne des nitrates réagiraient avec les espèces Fe(II) de la sidérite pour produire de l'ammonium (Matocha *et al.*, 2012).



Ainsi, l'oxydation du fer ferreux serait indirectement couplée à la réduction enzymatique des nitrates conduisant à la formation d'ammonium. L'oxydation du fer ferreux de la sidérite par les nitrates (**Eq. 15**) résulterait donc d'une combinaison de la réaction biotique (**Eq. 13**) et de la réaction abiotique (**Eq. 14**).



Dans toutes les expériences menées, le ratio R_{exp} correspondant à la fraction de fer ferreux oxydée $\Delta_{\text{Fe(II)}}$ divisée par la fraction de nitrates réduite $\Delta_{\text{NO}_3^-}$ est compris entre 6,0 et 7,7 (**Tableau 9**), avec une valeur moyenne de $7,0 \pm 0,6$. Ceci suggère qu'une fraction non-négligeable des espèces Fe(II) a été oxydée selon un processus différent de celui décrit par l'équation (14) (invoquant un transfert de 6 électrons par molécule de nitrite). Par ailleurs, une réduction directe des nitrates en ammonium par le fer ferreux pourrait se dérouler dans le milieu d'incubation d'après l'équation (15). Cependant, ce mécanisme réactionnel impliquerait un transfert de 8 électrons par molécule de nitrate, ce qui n'est pas non plus en accord avec la valeur moyenne observée de R_{exp} . Ainsi, il semblerait que la formation d'ammonium au cours de la période d'incubation soit basée à la fois sur les équations (14) et

(15). Néanmoins, d'après la littérature, la réaction (15) est très lente comparée à la réaction (14) lorsque le fer ferreux est sous forme de sidérite (Matocha *et al.*, 2012).

III.3. La rouille verte carbonatée : une phase transitoire de l'oxydation indirecte du fer ferreux

Au cours de l'oxydation des espèces Fe(II), le précipité blanc floconneux sidérite du milieu d'incubation a été transformé progressivement en un précipité vert puis orange. Ces précipités ont été caractérisés par spectroscopie Raman comme étant respectivement de la sidérite, de la rouille verte carbonatée, et de la goethite (**Figure 26**).

Le spectre Raman de la sidérite initiale présente de large bandes de fréquences mettant ainsi en évidence son caractère quasi amorphe comme montré par de précédents travaux au sein du même milieu de culture (**Figure 26a**) (Kappler & Newman, 2004). Après 6 jours d'incubation, la présence de bandes étroites à 282 cm^{-1} et 1086 cm^{-1} atteste d'une meilleure cristallinité de la sidérite (**Figure 26b ; Tableau 9, #5 et #6**) (Romaine *et al.*, 2013). Lors des essais menés à forte densité bactérienne et forte concentration en nitrates ($38 - 40\text{ mM}$ et $8,6 - 13,7 \times 10^8\text{ cellules mL}^{-1}$), les bandes étroites à 245 cm^{-1} , 300 cm^{-1} , 385 cm^{-1} , 560 cm^{-1} et 685 cm^{-1} démontrent la présence de goethite (de Faria *et al.*, 1997) que les bactéries aient été affamées ou non (**Fig. 26d; Tableau 9, #1 et #2**). Dans ces conditions, une forte quantité de nitrites est biogénérée, selon l'équation (13), conduisant exclusivement à la formation de goethite. En conservant la même densité bactérienne mais en diminuant la concentration en nitrates dans le milieu d'incubation (4 mM , $8,6$ à $13,7 \times 10^8\text{ cellules mL}^{-1}$), la rouille verte carbonatée a été identifiée à 6 jours par la présence de bandes à 157 cm^{-1} , 222 cm^{-1} , 260 cm^{-1} , 433 cm^{-1} et 511 cm^{-1} (Legrand *et al.*, 2001) en affamant ou non les bactéries (**Tableau 9, #3 et #4**).

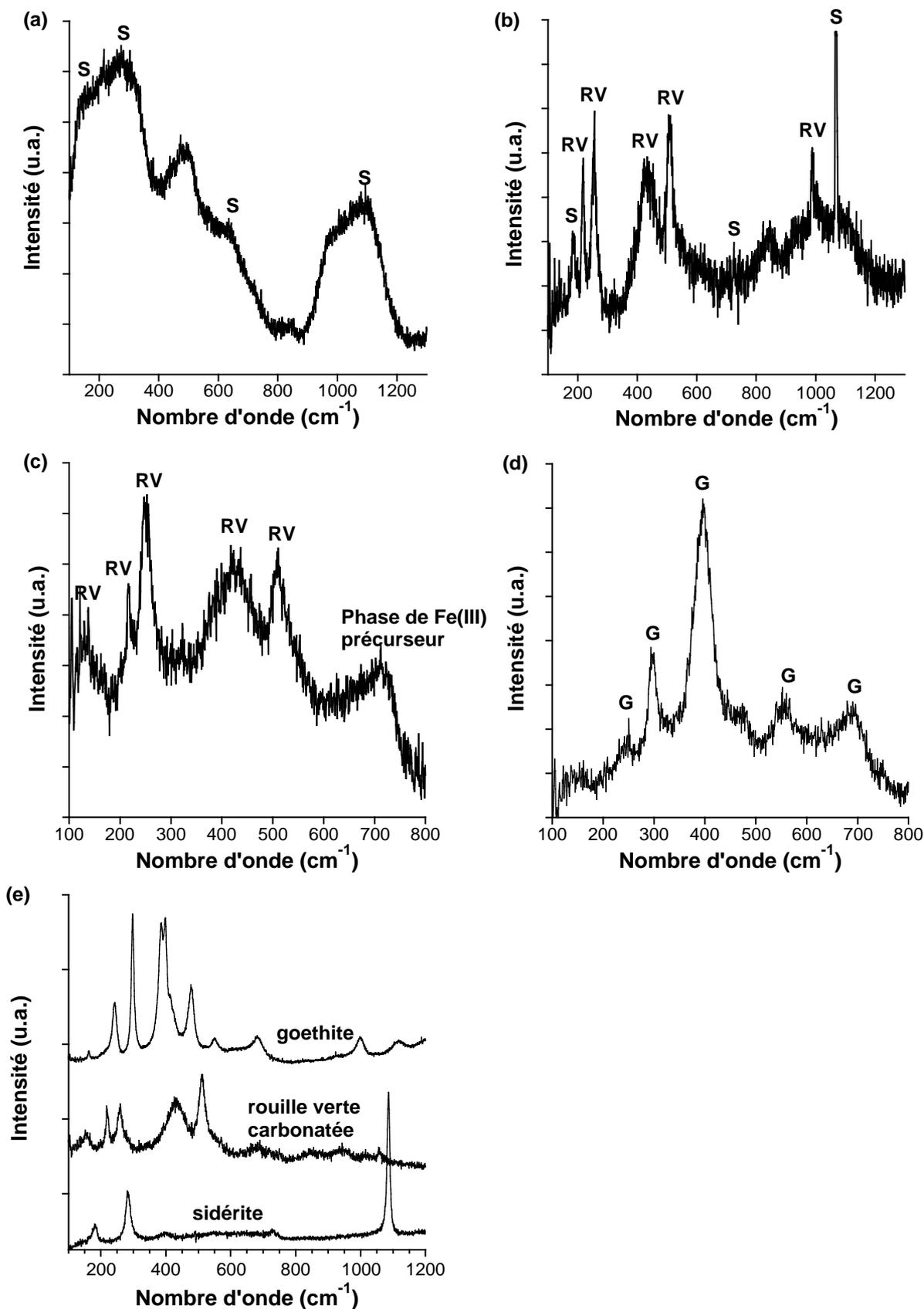


Figure 26. Caractérisation en spectroscopie Raman des minéraux secondaires issus de l'activité de *Klebsiella mobilis* : (a) sidérite amorphe, (b) rouille verte carbonatée et sidérite (Tableau 9, #5, 6 j), (c) rouille verte carbonatée et phase de Fe(III) précurseur (Tableau 9, #3, 6 j), (d) goethite (Tableau 9, #1, 6 j), (e) spectres de référence. S = sidérite, RV = rouille verte carbonatée, G = goethite.

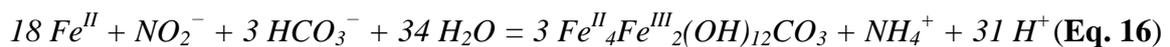
Pour l'expérience présentant la plus forte densité bactérienne, la présence d'une large bande à 710 cm^{-1} atteste de la formation d'une phase ferrique précurseur (**Figure 26c ; Tableau 9, #3**). Dans des conditions expérimentales inverses (faible densité bactérienne $2,8 \times 10^8$ cellules mL^{-1} et une forte concentration en nitrates $\sim 38\text{ mM}$), la sidérite et la rouille verte carbonatée ont été observées à 6 jours (**Figure 26b ; Tableau 9, #5**) avant de s'oxyder complètement en goethite après 18 jours d'incubation (**Tableau 9, #5**). Enfin, en diminuant à la fois la densité bactérienne et la concentration en nitrates ($0,7 \times 10^8$ cellules mL^{-1} et $\sim 9\text{ mM}$), la rouille verte carbonatée est toujours présente même après 18 jours d'incubation (**Tableau 9, #6**), celle-ci s'oxydant en goethite au-delà de 75 jours. Ces résultats suggèrent que la nature du produit de corrosion dépendrait des quantités de nitrites biogénérés et de fer ferreux oxydé et, dans une moindre mesure, semble être modulée par la densité bactérienne et la concentration en nitrates. En effet, plus les concentrations de ces deux paramètres sont élevées, plus la production de nitrites sera forte et conduira à une oxydation indirecte du Fe(II) en goethite. En revanche, en diminuant la densité bactérienne et/ou le taux de nitrate, la rouille verte carbonatée est obtenue de manière plus ou moins stable au cours du temps.

La génération indirecte de la rouille verte carbonatée au cours de la respiration des nitrates par une NRB organotrophe (source organique d'électrons) en présence des espèces Fe(II) n'a, à notre connaissance, jamais été documentée. Par contre, la rouille verte carbonatée a été produite, comme d'autres produits de corrosion, au cours de la dénitrification lithotrophique utilisant le fer ferreux comme donneur d'électrons. La rouille verte carbonatée est cependant rarement observée du fait qu'en présence d'une importante quantité de nitrates et de donneur d'électrons, les processus d'oxydation du Fe(II) se déroulent très rapidement et conduisent quasi immédiatement à son oxydation en ferrihydrite (Senko *et al.*, 2005), lépidocrocite (Larese-Casanova *et al.*, 2010), goethite (Kappler *et al.*, 2005) ou encore magnétite (Chaudhuri *et al.*, 2001 ; Miot *et al.*, 2014b). Au sein de toutes ces études, une production des anions nitrites et leur accumulation dans le milieu d'incubation ont été mises en exergue (Kappler *et al.*, 2005 ; Miot *et al.*, 2009b ; Pantke *et al.*, 2012). Cependant, la quantité de nitrites biogénérée ne coïncide pas avec la quantité de nitrates réduite, ce qui laisse sous entendre une production de N_2O et/ou N_2 (l'ammonium n'étant pas mesuré). Or, les rouilles vertes présentent une forte réactivité vis-à-vis des nitrates conduisant à la formation de la magnétite (Hansen *et al.*, 1996 ; Etique *et al.*, 2014b ; Zegeye *et al.*, 2014), et celle-ci est exacerbée avec les nitrites formant alors de la goethite. L'absence de

magnétite dans nos expériences indique que la rouille verte n'a pas réagi directement avec les ions nitrates. Seule la goethite a été détectée au cours de nos expérimentations (**Figure 26d ; Tableau 9**). La rouille verte carbonatée est plus ou moins stable au cours de l'incubation et la présence de polymères bactériens et de cellules jouerait un rôle majeur sur la stabilité du minéral (Jorand *et al.*, 2013 ; Zegeye *et al.*, 2014).

III.4. Réactivité de la rouille verte carbonatée avec les nitrites et/ou les nitrates

La formation de rouille verte carbonatée et d'ammonium au cours de la période d'incubation de *K. mobilis* en présence de nitrates et de fer ferreux semble être issue de la combinaison des équations (13) et (14) donnant l'équation (16) :



En conditions anoxiques, l'oxydation abiotique de la sidérite par les nitrites conduit bien à la formation de rouille verte carbonatée (**Figure 27**).

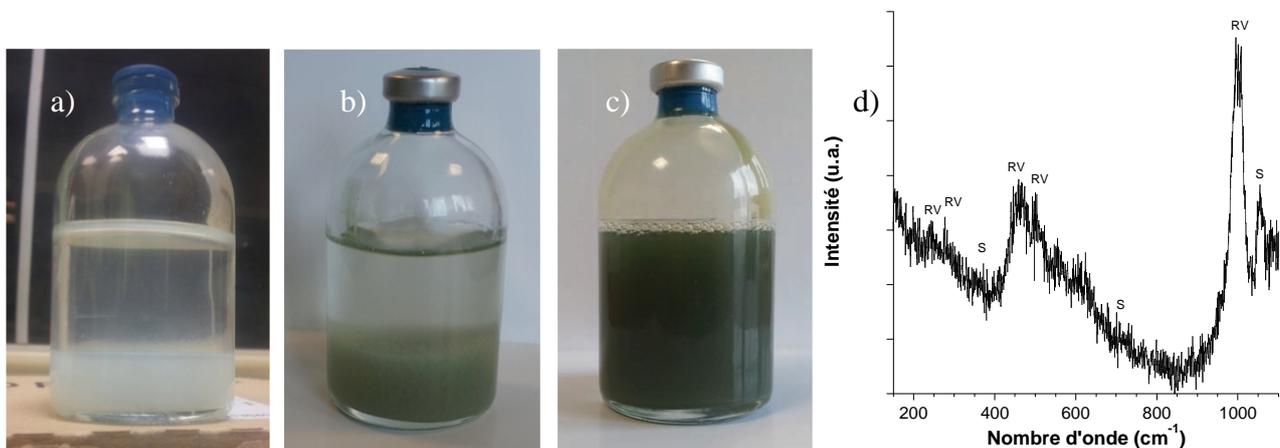


Figure 27. Formation abiotique de rouille verte carbonatée par réaction de la sidérite (40 mM) avec les nitrites (1 mM) : (a) sidérite à $t = 0$ min, (b) le précipité a verdi après seulement 10 min de réaction avec les nitrites, (c) le précipité vert intense est stable après 15 jours de réaction avec les nitrites, (d) spectre Raman du précipité observé en (c) confirmant la formation de rouille verte carbonatée. RV = rouille verte carbonatée et S = sidérite.

Comme indiqué précédemment, la source d'électrons permettant la respiration des nitrates par *K. mobilis* est endogène. Etant donné que ce réservoir interne d'électrons est faible, ceci suggère que la quantité de nitrites biogénérée sera limitée. Une fois cette ressource épuisée, le seul oxydant restant dans le milieu d'incubation est l'anion nitrate qui réagit lentement avec la rouille verte carbonatée – sans doute stabilisée par les polymères bactériens – pour former la goethite (Eq. 17). Ainsi, la rouille verte carbonatée est relativement stable durant une période de temps suffisante pour permettre sa caractérisation.



Cependant, si les nitrites biogénérés n'ont pas entièrement été consommés par le fer ferreux, ceux-ci peuvent aussi réagir avec la rouille verte carbonatée pour conduire à la formation de goethite selon l'équation (18) (Figure 28). De plus, la réactivité d'une rouille verte carbonatée est plus rapide avec les nitrites qu'avec les nitrates, mais cela a été observé à un pH alcalin (9,5 – 10) (Hansen *et al.*, 1994 ; Hansen *et al.*, 2000). Il est probable que cette différence de réactivité soit conservée à pH neutre (nos conditions expérimentales).

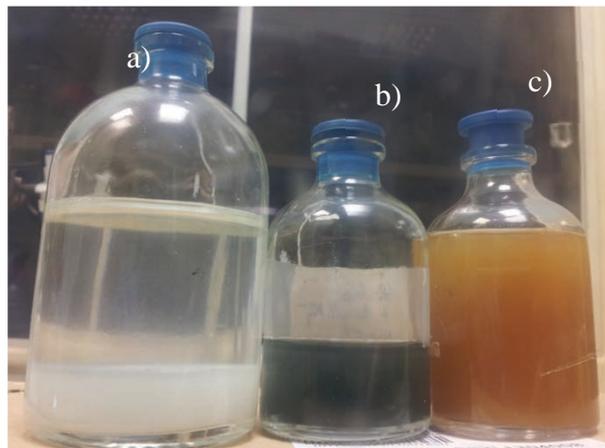
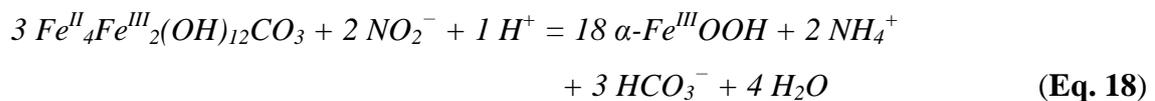


Figure 28. Oxydation abiotique de la sidérite (a) conduisant à la formation d'un précipité vert correspondant à la rouille verte carbonatée (b) pour une concentration en espèces NO_2^- de 1 mM, et à la formation d'un précipité orange correspondant à la goethite (c) pour une concentration en espèces NO_2^- de 10 mM.

En supposant que l'oxydation du fer ferreux soit basée sur un mécanisme en deux étapes distinctes, la première consisterait en une réaction avec les nitrites (**Etape I, Figure 22**) et la seconde en une réaction avec les nitrates (**Etape II, Figure 22**). Cette hypothèse peut être validée en étudiant la variation de concentrations en espèces Fe(II) et NO_3^- durant ces deux étapes de la période d'incubation. D'une manière générale, la plus forte variation a été observée au cours des quatre premiers jours, ce qui explique la délimitation apparente entre ces deux étapes (**Figure 22**).

Le ratio $R_{exp}(I)$ a donc été déterminé durant la première période d'incubation et la valeur moyenne obtenue est de $6,1 \pm 0,3$ (**Tableau 9**), ce qui est en accord avec un transfert de 6 électrons entre les espèces Fe(II) et NO_2^- des équations (14), (16) et (18). La variation de concentration en fer ferreux au cours de l'étape I représente 75 % à 100 % de la quantité totale des espèce Fe(II) oxydées (**Figure 22**). Cependant, la valeur moyenne de R_{exp} ($7,0 \pm 0,6$ prenant en compte les étapes I et II) est plus élevée que $R_{exp}(I)$, suggérant aussi un transfert de 8 électrons entre le fer ferreux et les nitrates dans un second temps comme décrit par les équations (15) et (17).

Finalement, l'oxydation indirecte des espèces Fe(II) par les nitrites biogénérés, et la production/oxydation de la rouille verte peuvent être résumées par la **Figure 29**. Dans une première étape, les nitrites issus de la respiration bactérienne (**réaction n°1, Figure 29**) oxydéraient selon un processus abiotique le fer ferreux de la sidérite en rouille verte carbonatée (**réaction n°2, Figure 29**) ou goethite (**réaction n°3, Figure 29**) en fonction de la vitesse et de la quantité de NO_2^- produits. Dans une seconde étape, la rouille verte formée pourrait être lentement oxydée en goethite par les nitrates (**réaction n°4, Figure 29**) encore présents dans le milieu d'incubation pour conduire à la génération d'un pool d'ammonium.

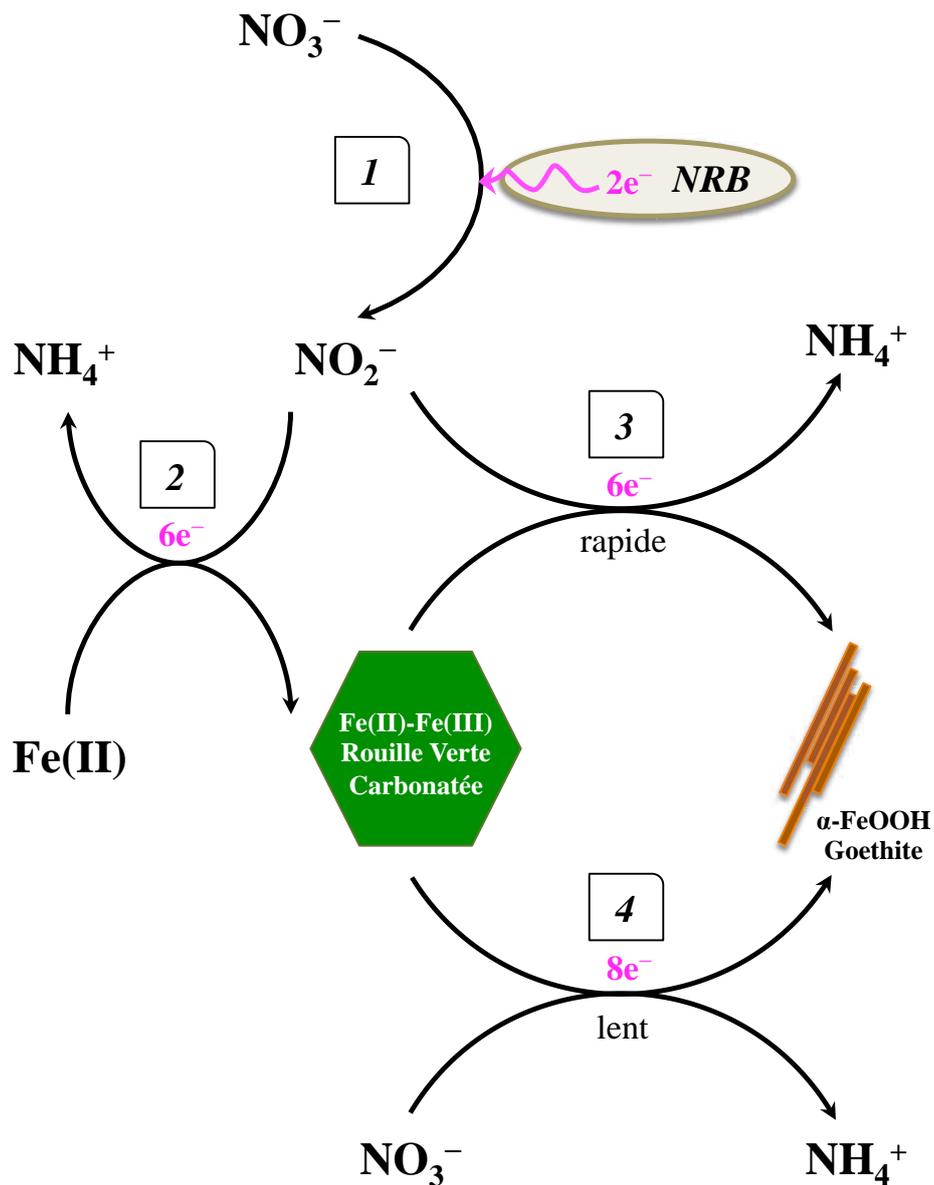


Figure 29. Schématisation du mécanisme d'oxydation du fer ferreux en présence de bactéries réductrices des nitrates : (1) réduction des nitrates en nitrites par les NRB utilisant leur propre réserve endogène d'électrons (supposée être du glycogène), (2) les nitrites biogéniques oxydent le fer ferreux de la sidérite en rouille verte carbonatée et produisent de l'ammonium, (3) les nitrites biogéniques restant réagissent rapidement avec la rouille verte carbonatée pour conduire à la formation de la goethite et accroître la quantité d'ammonium générée, (4) les nitrates encore présents dans le milieu réactionnel oxydent lentement la rouille verte carbonatée en goethite.

III.5. Nucléation des cristaux de rouilles vertes carbonatées à la surface des bactéries

Des analyses en microscopie électronique à transmission ont été réalisées à partir de la suspension de *Klebsiella mobilis* incubée en présence de nitrates et fer ferreux (**Figure 30**). Après 4 jours d'incubation, des cristaux hexagonaux nanométriques de rouille verte carbonatée (~ 100 nm) recouvrent complètement les surfaces des cellules bactériennes (**Figure 30a**). Au bout de 7 jours, les cristaux de rouilles vertes carbonatées sont devenus micrométriques (~ 5 – 10 µm) et les bactéries sont « racornies » et intimement associées à ces minéraux (**Figure 30b**). Ces micrographies montrent que les cristaux de rouille verte sont nucléés à la surface des bactéries puis croissent au cours du temps, probablement par un mûrissement d'Ostwald (Guilbaud *et al.*, 2013).

Cette formation des rouilles vertes carbonatées à la surface des bactéries peut s'expliquer par le fait que : i) la membrane bactérienne porte des sites de nucléation des biominéraux (Ferris *et al.*, 1986 ; Benzerara *et al.*, 2008 ; Miot *et al.*, 2014a), ii) les nitrites produits par respiration des nitrates se concentrent à la surface de *Klebsiella mobilis* car ils sont expulsés activement hors du cytoplasme (Carlson *et al.*, 2012), iii) les espèces Fe(II) peuvent être sorbées à la surface des cellules (Coby & Picardal, 2005). La présence localement élevée des espèces Fe(II) et Fe(III) ainsi que des ions bicarbonates à proximité des surfaces bactériennes, est favorable à leur précipitation en rouille verte carbonatée. Si les nitrates et la densité bactérienne sont suffisants pour induire une production significative de nitrites, alors les cristaux de rouilles vertes s'oxydent progressivement en goethite par les faces latérales (**Figure 30c**).

L'encroûtement des cellules par les cristaux de rouilles vertes (**Figure 28a**) pourrait potentiellement endommager l'intégrité membranaire de *Klebsiella mobilis*. L'atteinte de la viabilité cellulaire caractérisée par la perte de l'intégrité membranaire (**Figure 31**) et la chute de la cultivabilité (**Figure 23**) conforte cette hypothèse.

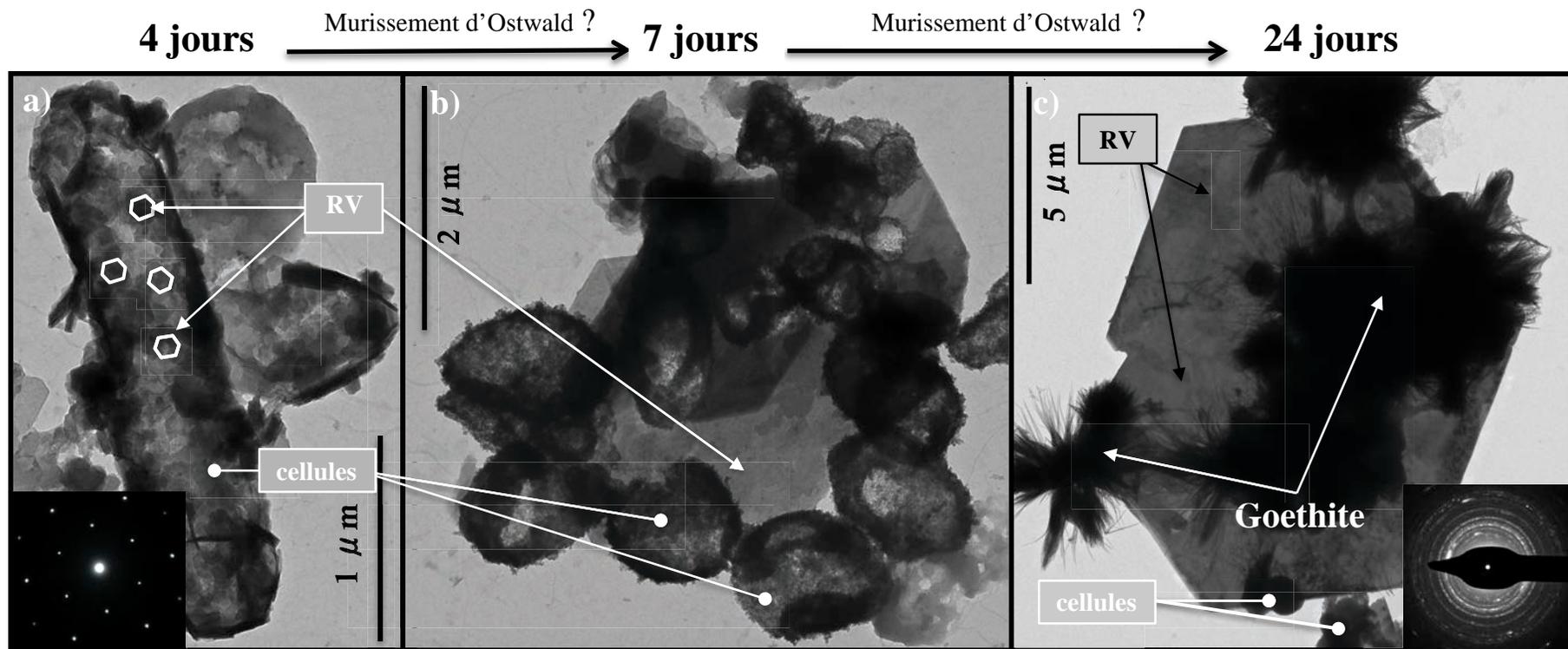


Figure 30. Micrographies des cristaux de rouilles vertes carbonatées nanométriques à 4 jours où la surface bactérienne de *Klebsiella mobilis* sert de point de nucléation (a) ; de cristaux de rouilles vertes carbonatées micrométriques, dû à un probable mûrissement d'Ostwald, à 7 jours, entourés de bactéries « racornies » (b) ; et d'aiguilles de goethite prenant naissance sur les bords des cristaux de rouilles vertes carbonatées à 24 jours (c). Les médaillons représentent les clichés de diffraction des électrons de la rouille verte carbonatée (a) et de la goethite (c).

Une légère croissance est observée au cours des vingt-quatre premières heures ($7,2 \times 10^8$ à $11,9 \times 10^8$ bactéries mL^{-1} avec un écart-type de $0,3 \times 10^8$) indiquant que la croissance bactérienne n'est pas supportée, ce qui était attendu étant donné l'absence de donneur d'électrons exogène et de phosphates. En outre, au-delà de 18 jours d'incubation en présence de Fe(II), une large proportion des bactéries présente un endommagement membranaire ($\sim 59 \pm 9 \%$; $n = 20$) suggérant alors une intolérance aux conditions d'incubation (*i.e.* toxicité des nitrites et absence d'une source d'énergie) et/ou à la précipitation des produits de corrosion à la surface des bactéries (**Figure 31**). L'encroutement des cellules par divers produits de corrosion affecterait probablement, de manière drastique et irréversible, la viabilité cellulaire, comme cela a déjà été suspecté pour des bactéries IONRB telles la souche *Acidovorax* BoFeN1 (Kappler *et al.*, 2005).

III.6. Formation de rouille verte carbonatée par *Klebsiella mobilis* en présence de donneurs organiques d'électrons

Les expériences menées précédemment ont permis de mettre en évidence la formation de rouille verte carbonatée par une oxydation microbienne indirecte du fer ferreux liée à la respiration des nitrates par *Klebsiella mobilis* en absence de donneurs organiques d'électrons. La bactérie utilisait ses réserves endogènes d'électrons (probablement du glycogène) pour réduire les nitrates en nitrites, mais en faible proportion au regard des quantités pouvant être stockées ($< 0,5 \text{ mM}$, cas des « bactéries non carencées »). Ces derniers, générés dans l'environnement proche de la cellule, oxydaient alors le fer ferreux de la sidérite qui précipitait en rouille verte carbonatée sur les structures membranaires. Ce minéral intermédiaire Fe(II)-Fe(III), relativement bien stabilisé par la présence de cellules et polymères bactériens dans le milieu d'incubation, s'oxydait progressivement en goethite, un composé ferrique. Cependant, lorsque les nitrites sont produits en plus grande quantité ($\geq 0,5 \text{ mM}$, cas des « bactéries carencées » – en fait affamées plus durablement que les précédentes – exprimant probablement plus fortement leur nitrate réductase), la rouille verte carbonatée n'a plus été observée et la goethite semblait être le seul minéral formé.

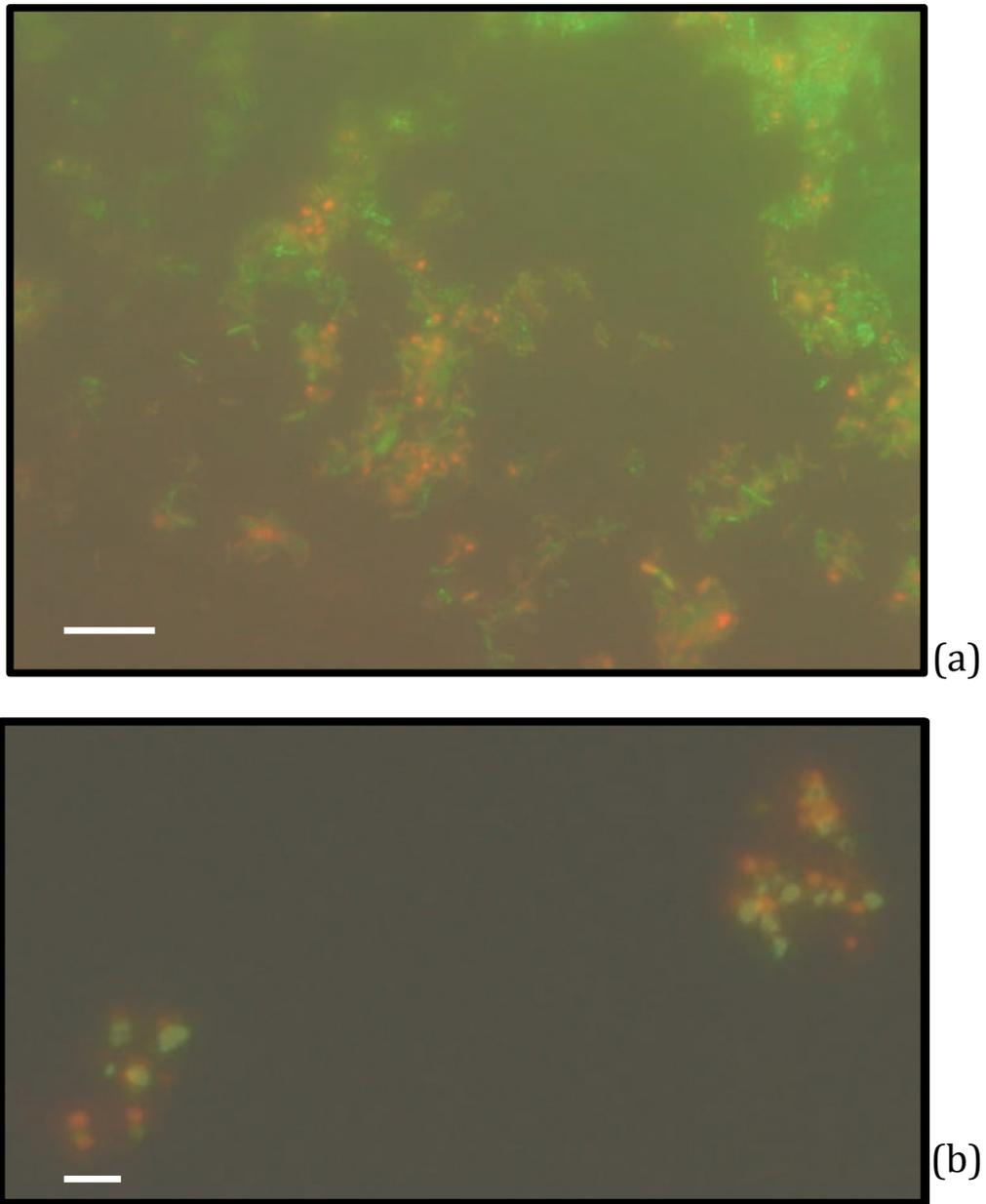
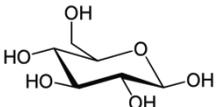
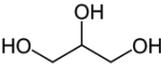
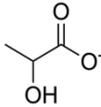
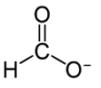


Figure 31. Observation en microscopie à épifluorescence de *Klebsiella mobilis* marquées au iodure de propidium (cellules en rouge présumant un endommagement des structures membranaires) et au SYTO 9 (cellules colorées en vert traduisant des cellules intactes n'ayant pas incorporé du PI). Lors de l'incubation en présence de fer ferreux et de nitrates, $10 \pm 2 \%$ ($n=20$) des cellules bactériennes présentaient une altération membranaire (a) contre $59 \pm 9 \%$ ($n=20$) au bout de 18 jours (b). La barre d'échelle correspond à $1 \mu\text{m}$.

Est-ce que ces minéraux secondaires, rouille verte carbonatée et goethite, issus de l'activité de *Klebsiella mobilis* en conditions de carence nutritive sont toujours produits lorsque le milieu est supplémenté en donneur organique d'électrons, dans des concentrations plus conventionnelles à ce qui est employé en culture microbienne ? La nature du donneur organique d'électrons et sa concentration influent-elles sur la nature des phases secondaires générées par l'oxydation indirecte de la sidérite ? La quantité de nitrites biogéniques issue de la respiration bactérienne des nitrates étant conditionnée par la quantité potentielle d'électrons que le donneur organique peut céder, plus ce dernier présentera une forte capacité réductrice et plus la fraction de nitrites produite sera élevée et devrait conduire à la formation de goethite. En revanche, en présence d'une source de carbone ne cédant qu'une faible quantité d'électrons, la quantité de nitrites produits devrait être faible et la rouille verte carbonatée devrait être observée. La validation de ces hypothèses est présentée dans le dernier volet du chapitre III.

Des donneurs organiques d'électrons de natures différentes et de concentrations variées ont été ajoutés séparément au milieu d'incubation (**Tableau 11**). Ce dernier est le même que décrit précédemment (Chapitre III, section II.1) et les concentrations en fer ferreux et nitrates ont été fixées à 30 mM et 7 mM. La concentration initiale en bactéries était de 5×10^6 UFC mL⁻¹ (**Figure 23**). Trois heures après l'inoculation par *Klebsiella mobilis* des milieux d'incubation supplémentés en donneurs organiques d'électrons – glucose, glycérol, lactate, méthanoate, TSB – des précipités de couleurs orange à vert sont observables (**Figure 32**).

Tableau 11. Nature et concentrations des donneurs organiques d'électrons mis en présence de *Klebsiella mobilis*, de fer ferreux et de nitrates. TSB signifie bouillon de trypto-caséine soja. Les minéraux formés sont G = goethite et RV = rouille verte carbonatée.

| | Glucose | Glycérol | | | Lactate | | | Méthanoate | | TSB | Contrôle (sans donneur organique d'électrons) |
|--|---|---|-----------|-----|--|-----------|-----|--|-----|--------------------|---|
| Formule chimique |  $C_6H_{12}O_6$ |  $C_3H_8O_3$ | | |  $C_3H_5O_3^-$ | | |  CHO_2^- | | - | - |
| Nombre d'électrons mol ⁻¹ ^a | 24 | 14 | | | 12 | | | 2 | | ~ 131 ^b | - |
| Concentrations ^a (mM) | 0,5 | 1,0 | 0,5 | 0,1 | 2,0 | 1,0 | 0,5 | 1,0 | 0,5 | ~ 0,3 | - |
| Concentrations ^a (milliéquivalents électrons) | 12 | 14 | 7 | 1,4 | 24 | 12 | 6 | 4 | 1 | ~ 39 | - |
| Minéraux formés (24 h) | G | G | G + RV | RV | G | G + RV | RV | RV | RV | G | RV |

^a dans l'hypothèse où tout le carbone organique est oxydable en CO₂ par *Klebsiella mobilis*

^b sur la base d'une composition moyenne à 90 % de caséine (C₃₁H₂₇NO₄, nombre d'électrons/mol = 143) et 10 % de glucose

Une caractérisation en spectroscopie Raman des précipités oranges et verts a permis d'identifier les phases générées au cours de l'activité bactérienne correspondant respectivement à de la goethite (**Figures 32a et 33a, b, c, e**) et de la rouille verte carbonatée (**Figures 32b et 33d, f**). En effet, le spectre Raman de la goethite présente des bandes caractéristiques à 243 cm^{-1} , 300 cm^{-1} , 386 cm^{-1} , 550 cm^{-1} et 685 cm^{-1} (**Figure 32a**), et celui de la rouille verte carbonatée à 222 cm^{-1} , 260 cm^{-1} , 433 cm^{-1} , 510 cm^{-1} et 1060 cm^{-1} (**Figure 32b**), en accord avec les observations de De Faria *et al.* (1997).

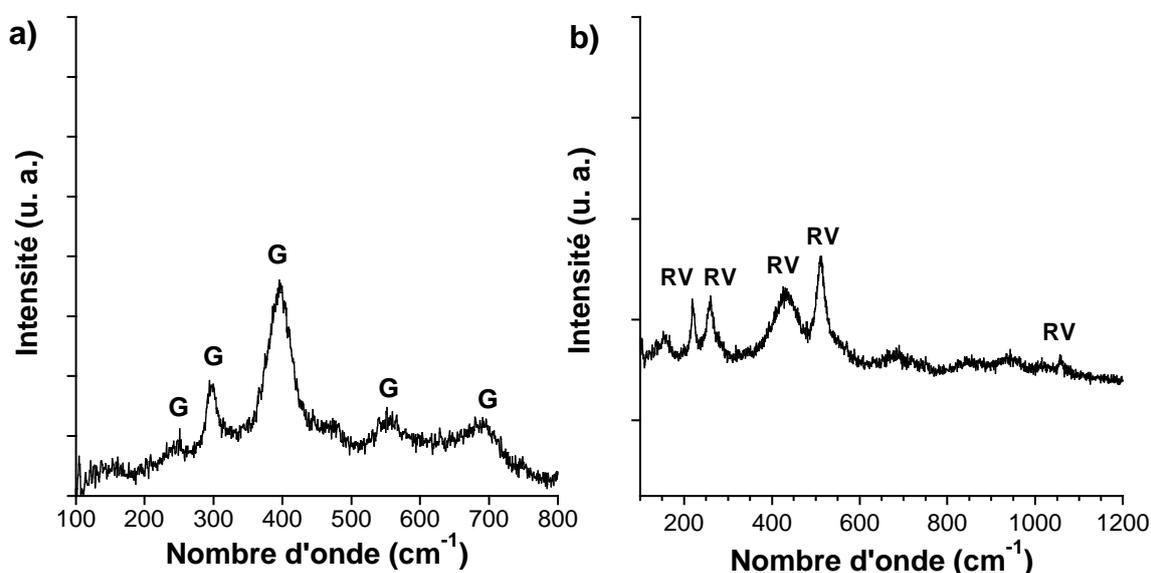


Figure 32. Spectres Raman des précipités oranges (a) et verts (b) de la Figure 33 correspondant respectivement à la goethite et la rouille verte carbonatée, issus de l'oxydation microbienne indirecte de la sidérite par *Klebsiella mobilis* en présence de donneurs organiques de carbone. G = goethite et RV = rouille verte carbonatée.

En incubant *Klebsiella mobilis* en présence d'un donneur organique riche en électrons tel que le bouillon trypto-caséine soja (TSB) ou le glucose, seule la goethite a été détectée (**Tableau 11 ; Figures 32a et 33a, e**). La minéralisation complète du glucose en CO_2 par *Klebsiella mobilis* génère un transfert de $24\text{ électrons mol}^{-1}$ vers l'accepteur final (les nitrates), soit 12 milliéquivalents électrons pour 0,5 mM de glucose (**Tableau 11**). De même, l'oxydation de la caséine et du glucose constituant le TSB, couplée à la réduction des nitrates par *Klebsiella mobilis*, permet un échange théorique d'environ $131\text{ électrons mol}^{-1}$, soit ~ 39 milliéquivalents électrons pour 0,3 mM de TSB (**Tableau 11**).



Figure 33. Variations des couleurs des précipités issus de l'oxydation microbienne indirecte de la sidérite par *Klebsiella mobilis* en présence de nitrates et de donneurs organiques d'électrons : (a) glucose 0,5 mM ; (b) glycérol 1 mM ; (c) lactate 2 mM ; (d) méthanoate 1 mM ; (e) TSB 0,3 mM ; (f) sans donneur organique d'électrons. Ces observations ont été réalisées après 3 heures d'incubation à 30 °C à l'abri de la lumière.

En présence de glycérol, lactate et méthanoate, le nombre d'électrons libérés par mole est respectivement de 14, 12 et 2 (**Tableau 11**). Bien que ces quantités d'électrons par mole soient moins élevés que celles libérées par l'oxydation complète du glucose ou du TSB, la formation de goethite est toujours observée pour le glycérol et le lactate introduits respectivement dans le milieu d'incubation en concentration de 1 mM et 2 mM (**Figure 33b-c**). En effet, la minéralisation complète de 1 mM de glycérol ou 2 mM de lactate entraîne la production de 14 milliéquivalents électrons ou 24 milliéquivalents électrons (**Tableau 11**) qui alimenteront la réduction bactérienne des nitrates en nitrites dans les mêmes proportions. La sidérite est alors oxydée en goethite (**Figure 32a**).

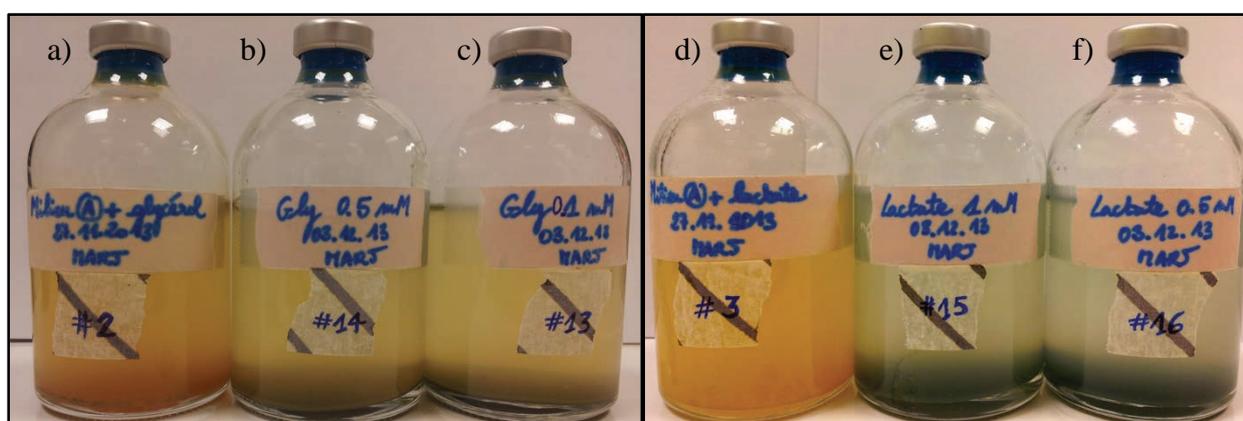


Figure 34. Gamme de couleurs, allant de l'orange au vert, des précipités issus indirectement de l'oxydation de la sidérite par l'activité de *Klebsiella mobilis* en présence de nitrates et de diverses concentrations en glycérol – (a) 1 mM, (b) 0,5 mM, (c) 0,1 mM – ou en lactate – (d) 2 mM, (e) 1 mM, (f) 0,5 mM.

En diminuant les concentrations en glycérol (0,5 mM et 0,1 mM) ou en lactate (1 mM et 0,5 mM) dans les milieux d'incubation, un précipité verdâtre apparaît trois heures après l'inoculation par *Klebsiella mobilis* (**Figure 34b, c, e, f**). Ce précipité verdâtre a été caractérisé au bout de dix jours en microscopie électronique à transmission (**Figure 35**). Les micrographies montrent la présence de bactéries encroûtées entourant des cristaux hexagonaux d'une taille d'environ 4 μm , pour les essais menés avec 0,1 mM de glycérol et 0,5 mM de lactate (**Figure 35a-b**). Certaines bactéries semblent même « endocytées » par les cristaux de rouilles vertes carbonatées et présentent des « zones d'adhérence » avec les bords des cristallites (**Figure 35a, zone en pointillé jaune**). La minéralisation complète de 0,1 mM de glycérol et de 0,5 mM de lactate par *Klebsiella mobilis* conduit respectivement à la

production de 1,4 et 6 milliéquivalents électrons, ce qui permet une oxydation limitée de la sidérite en rouille verte carbonatée. Les essais ayant été supplémentés par 0,5 mM de glycérol ou 1 mM de lactate présente des aiguilles de goethite amassées sur les bords des cristaux de rouille verte carbonatée (**Figure 35c**). L'oxydation totale de 0,5 mM de glycérol et de 1 mM de lactate génère respectivement 7 et 12 milliéquivalents électrons entraînant une oxydation modérée de la sidérite en rouille verte carbonatée et goethite.

Ainsi, l'oxydation bactérienne complète de la matière organique peut délivrer potentiellement des quantités élevées de milliéquivalents électrons et conduire, par couplage avec la respiration des nitrates, à la formation de nitrites biogéniques dans les mêmes proportions. Il semblerait que la sidérite, initialement présente dans le milieu d'incubation, soit oxydée en goethite lorsque le nombre de milliéquivalents électrons est supérieur à 12 (**Tableau 11**). En revanche, lorsque celui-ci est inférieur à 6, la sidérite est oxydée en rouille verte carbonatée (**Tableau 11**). Enfin, si le nombre de milliéquivalents électrons est compris entre 6 et 12, alors la sidérite est transformée en un mélange de rouille verte carbonatée et de goethite (**Tableau 11**). Cependant, cette analyse est basée sur l'hypothèse d'une minéralisation complète de la matière organique par *Klebsiella mobilis*. Afin de réfuter ou conforter cette hypothèse, des essais complémentaires ont été menés en absence de sidérite pour déterminer la quantité de nitrites biogéniques résultant de la respiration des nitrates par *Klebsiella mobilis* en présence de 2, 1 et 0,5 mM de lactate.

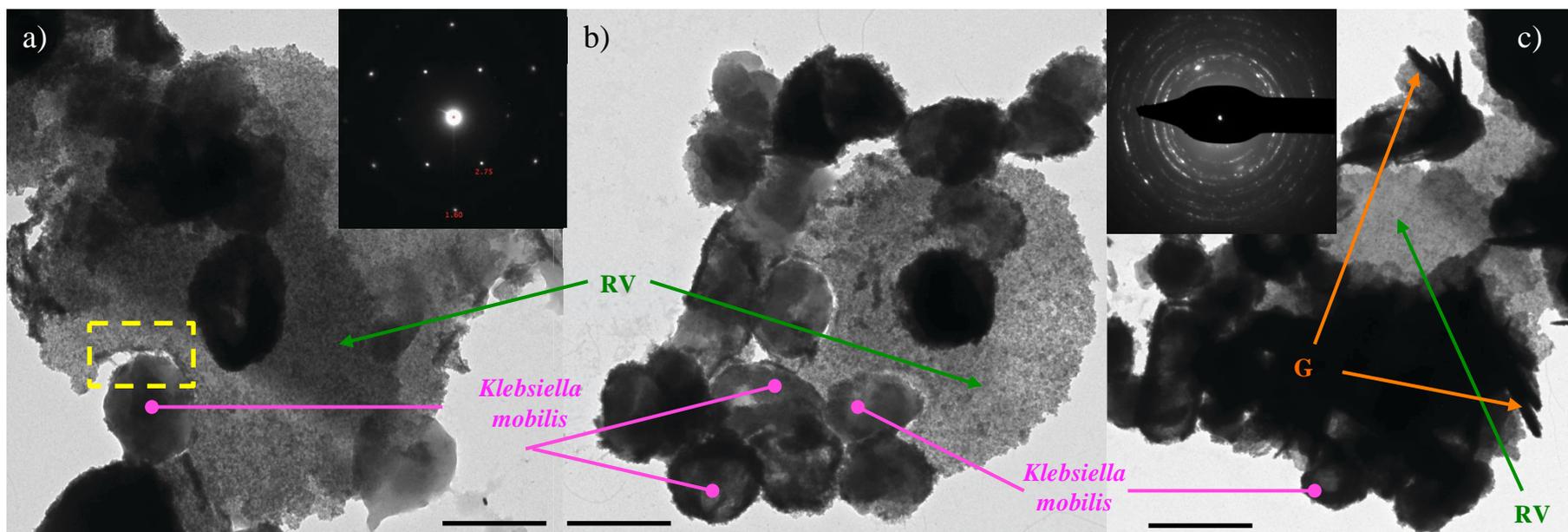


Figure 35. Micrographies des précipités verts observés au cours de l'incubation de *Klebsiella mobilis* en présence de nitrates et de glycérol 0,1 mM (a), lactate 0,5 mM (b), et 1 mM (c). Des cristaux hexagonaux de rouille verte carbonatée sont produits quelles que soient les concentrations introduites ici en donneurs organiques d'électrons. Le médaillon de la micrographie (a) représente le cliché de diffraction des électrons de la rouille verte carbonatée. Des aiguilles de goethite sont seulement observables dans la micrographie (c) avec son cliché de diffraction des électrons associé. Les médaillons sont les clichés de diffractions des électrons attestant de la formation de rouille verte carbonatée (a) et de goethite (c). La zone délimitée en pointillé jaune permet de visualiser les « zones d'adhérence » des bactéries au minéral de rouille verte carbonatée. RV = rouille verte carbonatée et G = goethite. Les barres d'échelle sur les micrographies ont pour valeur 1 μm .

L'incubation de *Klebsiella mobilis* en présence de 0,5 mM de lactate a conduit à la production de 0,6 mM de nitrites (**Figure 36**). Or, si la minéralisation de 0,5 mM de lactate était complète, la quantité de nitrites biogénérés aurait dû être de 3 mM selon l'équation (19), puisque 1 mole de lactate oxydée entraîne la formation de 6 moles de nitrites.

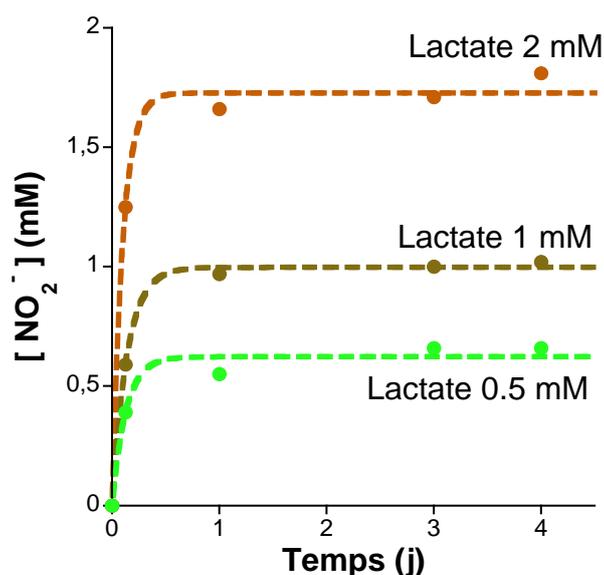
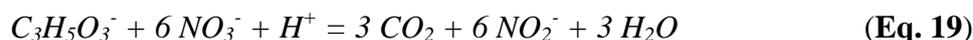
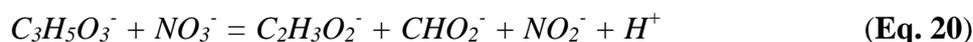


Figure 36. Production de nitrites biogéniques par *Klebsiella mobilis* au cours de la respiration des nitrates (7 mM) en présence de diverses concentrations en lactate : 0,5 mM, 1 mM et 2 mM. Les traits en pointillé représentent un ajustement de la cinétique de formation des nitrites selon une réaction de pseudo-premier ordre. Les coloris choisis pour les trois concentrations de lactate sont liés aux produits secondaires obtenus : vert clair = rouille verte carbonatée, vert foncé = mélange de rouille verte carbonatée et de goethite, orange = goethite.

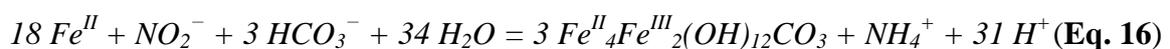
Ainsi, cette équation (19) suggérerait un faible rendement d'utilisation du lactate par *Klebsiella mobilis* de l'ordre de 20 %. Cependant, l'oxydation du lactate au cours de la croissance anaérobie de *Klebsiella mobilis* en présence de nitrates pourrait être décrite par une minéralisation partielle en acétate et méthanoate, comme cela est bien documenté pour une autre Entérobactérie, la souche *Escherichia coli* K-10 (Yamamoto & Ishimoto, 1981). D'après l'équation (20), l'oxydation partielle du lactate serait :



D'après cette équation (20), l'oxydation partielle de 1 mole de lactate par *Klebsiella mobilis* produirait 1 mole de nitrites biogéniques. En observant les quantités de nitrites générés par l'activité bactérienne, la consommation du lactate introduit dans des concentrations de 0,5 mM, 1 mM et 2 mM conduirait respectivement à la formation 0,6 mM, 1 mM et 1,8 mM de nitrites (Figure 36). Les rendements de l'équation (20), basés sur le ratio entre la quantité expérimentale de nitrites produits et la quantité théorique de lactate consommé, sont respectivement de 120 %, 100 % et 90 %, aboutissant à un rendement moyen de 103 %. L'équation (20) est donc en adéquation avec les résultats expérimentaux, signifiant que le lactate est partiellement minéralisé en acétate et méthanoate par *Klebsiella mobilis* en conditions anoxiques. Le lactate introduit dans le milieu d'incubation étant le réactif limitant aux concentrations de travail (0,5 mM, 1 mM et 2 mM), il est attendu que la concentration en nitrites issues de l'oxydation partielle du lactate selon l'équation (20) atteigne un plateau, signifiant que l'intégralité du lactate a été consommée par *Klebsiella mobilis* (Figure 36). En effet, la quantité de nitrites biogéniques atteint une concentration maximale en moins de 24 h (Figure 36).

L'hypothèse d'une oxydation complète de la matière organique par *Klebsiella mobilis* ayant donc été réfutée (Eq. 19 avec le lactate comme exemple) et la stœchiométrie de la réaction biologique couplant l'oxydation partielle du lactate à la production de nitrites biogéniques ayant été déterminée (Eq. 20), nous allons à présent analyser l'adéquation entre les quantités de nitrites biogéniques produites dans les milieux en absence de fer (Figure 36) et les quantités de fer ferreux oxydés dans les milieux d'incubation contenant de la sidérite (Figure 37).

L'incubation de *Klebsiella mobilis* en présence de sidérite, de nitrates et de lactate en concentrations 0,5 mM, 1 mM et 2 mM a conduit respectivement à l'oxydation de 3,8 mM, 6,8 mM, 11,5 mM (Figure 37). Ces résultats sont en accord avec l'équation (16) décrite précédemment dans les expériences en absence de donneurs organiques d'électrons.



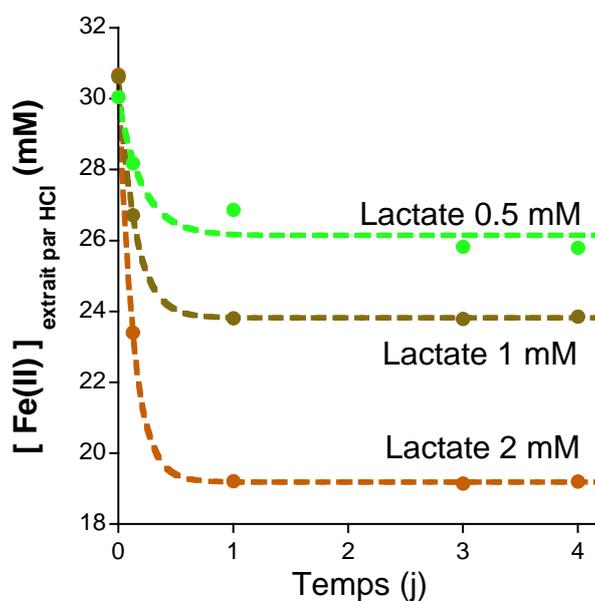


Figure 37. Variations des quantités de fer ferreux oxydées au cours de l'activité de *Klebsiella mobilis* incubée en présence de nitrates (7 mM) et de lactate aux concentrations 0,5 mM, 1 mM et 2 mM. Les traits en pointillé représentent un ajustement de la cinétique d'oxydation des espèces Fe(II) selon une réaction de pseudo-premier ordre. Les coloris choisis pour les trois concentrations de lactate sont liés aux produits secondaires obtenus : vert clair = rouille verte carbonatée, vert foncé = mélange de rouille verte carbonatée et de goethite, orange = goethite.

Ainsi, plus le lactate sera introduit en forte concentration dans les milieux d'incubation et plus la quantité de nitrites biogéniques – issus de l'oxydation partielle du lactate en acétate et méthanoate – sera importante et conduira à une oxydation de la sidérite en goethite, aux dépens de la phase rouille verte carbonatée. On a donc une transition étendue entre l'obtention de la rouille verte carbonatée et de la goethite liée à l'activité de *Klebsiella mobilis*. Cette limite floue entre ces deux minéraux secondaires peut être quantifiée sachant que l'oxydation du lactate est partielle et invoque un transfert de 2 électrons par mole de lactate oxydée en une mole d'acétate et une mole de méthanoate (**Eq. 20**). Si cette oxydation partielle de la matière organique par *Klebsiella mobilis* en présence de nitrates est valable quelle que soit la nature du donneur organique d'électrons, alors la rouille verte carbonatée serait obtenue lorsque le nombre de milliéquivalents électrons est inférieur à 2. En revanche, la sidérite serait oxydée en un mélange de rouille verte carbonatée et goethite lorsque le nombre de milliéquivalents électrons est compris entre 2 et 4, ou en goethite lorsque le nombre de milliéquivalents électrons apporté par la source de carbone est supérieur à 4.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre III, nous avons démontré que des bactéries réductrices des nitrates ou NRB, telles qu'une entérobactérie (*Klebsiella mobilis*), sont capables non seulement d'oxyder indirectement le fer ferreux par les nitrites qu'elles ont générés enzymatiquement, mais également de conduire à la formation de minéraux instables comme les rouilles vertes. Par conséquent, si les conditions sont réunies dans un environnement anoxique où la sidérite est présente à la surface d'un acier se corrodant, il est attendu que l'activité des NRB modifie les phénomènes de corrosion. La rouille verte carbonatée ainsi formée peut servir à la fois de donneur et d'accepteur d'électrons pour d'autres activités bactériennes, comme respectivement celles des bactéries ferroxydantes et ferriréductrices. Sa présence pourrait donc exacerber les processus de corrosion en déplaçant les équilibres déjà en place. Rappelons que ces observations ont été faites dans des conditions carencées en donneurs d'électrons, les bactéries utilisant leur propre réservoir d'électrons. Ces conditions sont probablement plus proches de celles rencontrées dans le milieu environnemental où la ressource en électrons est très souvent limitée. Cependant, un approvisionnement en donneur d'électrons sous forme de matière organique ou de dihydrogène permet d'entretenir la production de nitrites par la respiration bactérienne des nitrates. La rouille verte est alors oxydée en goethite, un oxyhydroxyde de fer ferrique. Sa formation serait tout aussi problématique car la goethite peut être à nouveau mobilisée par les bactéries ferriréductrices pouvant conduire à l'obtention de la rouille verte et de la sidérite.

L'ensemble du processus est résumé au travers de la **Figure 38** qui représente l'oxydation indirecte de la sidérite en rouille verte carbonatée ou goethite en anoxie sous l'action des NRB. *Klebsiella mobilis* utilise les électrons de la matière organique, par exemple du lactate, en l'oxydant partiellement en acétate, méthanoate et CO₂ (**réaction n°1, Figure 38**) pour réduire les nitrates en nitrites (**réaction n°2, Figure 38**), et répondre ainsi à ses besoins énergétiques. Les nitrites ainsi biogénérés réagissent avec le fer ferreux de la sidérite pour conduire à la formation de goethite lorsqu'ils sont produits en concentrations importantes ($\geq 1,5$ mM) (**réaction n°3, Figure 38**). En revanche, en présence d'une quantité limitée de nitrites biogéniques ($< 1,5$ mM), la sidérite est oxydée en rouille verte carbonatée (**réaction n°4, Figure 38**). Si les polymères bactériens ne sont pas en quantité suffisante pour

stabiliser la rouille verte carbonatée, celle-ci est alors oxydée progressivement en goethite en réagissant avec les nitrates (réaction n°5, Figure 38).

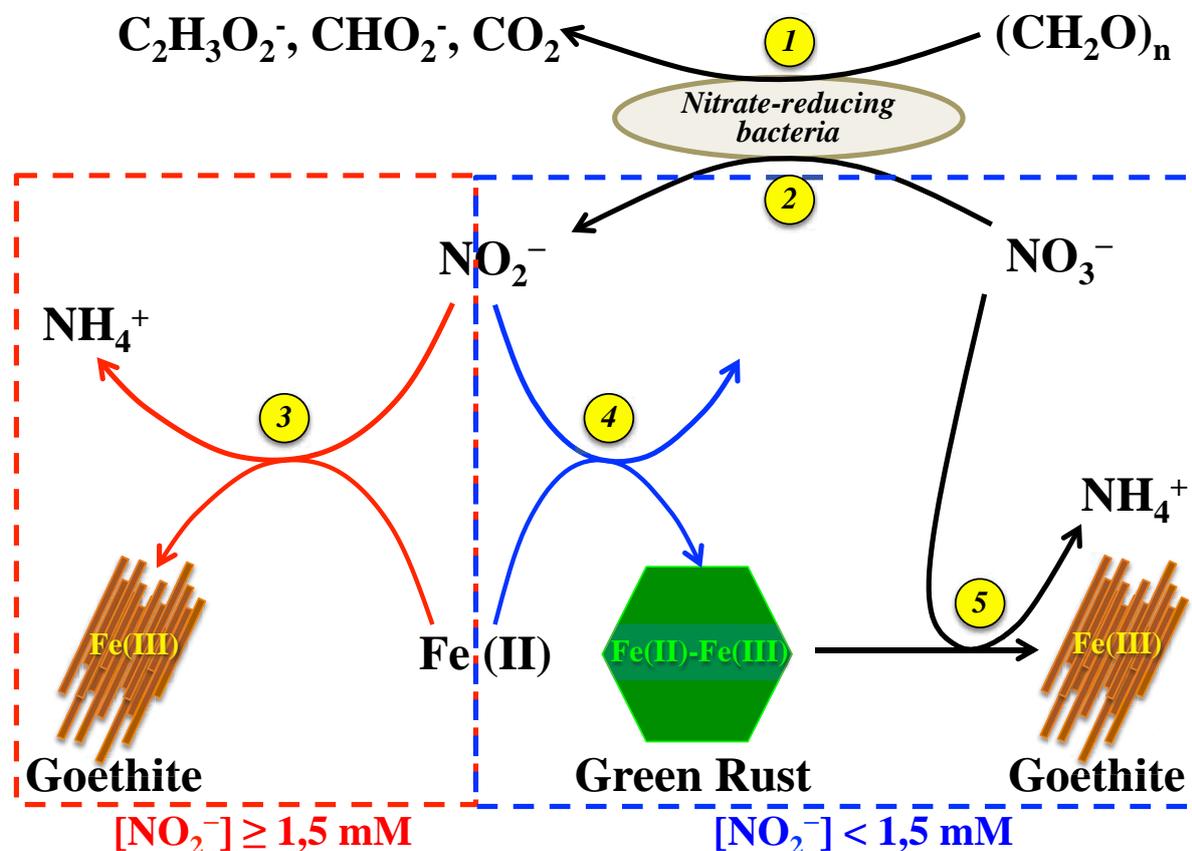


Figure 38. Oxydation indirecte du fer ferreux (de la sidérite) en rouille verte carbonatée ou goethite liée à l'activité des NRB. ① Oxydation partielle de la matière organique en acétate, méthanoate et CO_2 couplée à ② la réduction des nitrates en nitrites biogéniques. Pour des concentrations en nitrites biogéniques ③ supérieures à 1,5 mM, la sidérite est oxydée en goethite. En revanche, pour des concentrations en nitrites biogéniques ④ inférieures à 1,5 mM, la sidérite s'oxyde en rouille verte carbonatée qui continue ⑤ à s'oxyder lentement en goethite.

Rappelons que dans le milieu de stockage des colis HAVL, les concentrations attendues en nitrate sont faibles (inférieures à la limite de détection de l'ordre du millimolaire) comparées à celles utilisées au cours de cette étude de laboratoire (4 - 40 mM). Il est donc délicat d'extrapoler directement les résultats obtenus au niveau du site Cigéo où d'autres paramètres seront différents (température, pression, concentration en hydrogène dissous, etc).

D'un point de vue plus fondamental, nos travaux invitent à reconsidérer certains mécanismes de l'oxydation enzymatique du fer en conditions anoxiques, notamment ceux impliquant le groupe métabolique des IONRB. Les IONRB couplent la réduction des nitrates à l'oxydation « biologique » du fer ferreux en présence d'un co-substrat organique obligatoire, comme l'acétate. Le fait que l'oxydation indirecte de la sidérite par les NRB conduit aux mêmes résultats (en absence de donneur organique d'électrons, voire sous de faibles concentrations) qu'avec les IONRB laisse penser que l'oxydation du fer ferreux résulte des mêmes réactions abiotiques que pour les NRB, à savoir l'oxydation des espèces Fe(II) par les nitrites. En effet, l'acétate en tant que co-substrat obligatoire pourrait jouer le rôle de donneur d'électrons permettant d'alimenter la réduction des nitrates par les bactéries dénitrifiantes IONRB telles que la souche *Acidovorax* BoFeN1. Les nitrites pourraient donc être générés en tant qu'intermédiaire réactionnel au cours de la dénitrification et réagir avec le fer ferreux de la sidérite pour conduire à son oxydation indirecte en goethite ou rouille verte carbonatée. L'« illusion » d'une oxydation entièrement enzymatique du fer ferreux pourrait provenir d'une part, du fait que la réaction peut très bien se produire, ou tout du moins s'amorcer, à partir des sources endogènes d'électrons de la bactérie comme nous l'avons montré, donnant l'impression qu'un apport conséquent de donneur organique d'électrons n'est pas indispensable pour observer l'oxydation des espèces Fe(II). D'autre part, les quantités d'ammonium résultant de la réduction des nitrites par le fer ferreux peuvent être suffisamment faibles pour ne pas être détectées si les méthodes de dosage ne sont pas adéquates.

Notre hypothèse de réaction abiotique des nitrites avec le fer ferreux a depuis été confortée par l'équipe d'Andreas Kappler (Tübingen, Allemagne) – qui a travaillé avec les souches *Paracoccus denitrificans* (ATCC 19367 et Pd 1222) comme modèles des NRB, et les souches *Acidovorax* BoFeN1 et *Pseudogulbenkiania* 2002 comme modèles des IONRB, en présence de sidérite et de vivianite (Klueglein *et al.*, 2014) – et l'équipe de Karim Benzerara (Paris, France) – qui a incubé la souche *Acidovorax* BoFeN1 en présence de rouille verte chlorurée (Miot *et al.*, 2014b). D'autre part, l'absence de séquences génétiques proches de celles des gènes connus pour l'oxydation enzymatique aérobie des espèces Fe(II) dans ces souches IONRB (Klueglein & Kappler, 2013), même si elle ne le démontre pas, appuie l'hypothèse d'une réaction abiotique pour l'oxydation anoxique du fer ferreux.

Parmi les perspectives liées à ces travaux, les conséquences de la précipitation des oxydes ferriques à proximité des surfaces bactériennes sur la viabilité des cellules représentent alors un enjeu scientifique majeur dans le contexte de la biocorrosion mais aussi dans des environnements riches en fer. Des souches NRB peuvent-elles supporter durablement l'encroutement par les oxydes résultant de son activité, indiquant de fait qu'elles pourraient significativement contribuer à l'oxydation du fer ?

Chapitre IV :

Réduction directe de la magnétite par la respiration des bactéries ferriréductrices (IRB) en présence de dihydrogène

I. Introduction

Lors de la corrosion chimique en anoxie des colis de déchets radioactifs entreposés en milieu argileux profond, la formation d'une couche passivante à la surface de l'acier constituée de magnétite (Fe_3O_4) et de sidérite est attendue. La magnétite est un oxyde mixte Fe(II)-Fe(III) présentant une forte stabilité thermodynamique en conditions anoxiques et à pH neutre-basique (Cornell & Schwertmann, 2003). Il est cependant nécessaire de comprendre dans quelles circonstances la magnétite peut être déstabilisée afin de savoir si ces conditions pourront être rencontrées en situation de stockage. Au cours du stockage des colis HAVL, la corrosion aqueuse de l'acier non allié et, dans une moindre mesure la radiolyse de l'eau, conduiront à la production de 10^1 à 10^2 moles de dihydrogène par an et par alvéole (Talandier, 2005). Ce puissant réducteur pénètre la barrière argileuse, circule et diffuse librement au sein des fractures de l'argilite du Callovo-Oxfordien à proximité des alvéoles, dans la porosité de l'argilite ainsi que sous forme dissoute dans son eau porale (Boulin, 2008). La réduction abiotique de la magnétite par le dihydrogène est possible mais uniquement à des températures supérieures à 250 °C, conduisant à la formation de wüstite FeO et de Fe^0 (Pineau *et al.*, 2007). La magnétite peut aussi être réduite par voie biologique à des températures de l'ordre de 30 °C en présence de bactéries ferriréductrices (IRB). Ainsi, *Shewanella putrefaciens* est capable de dissoudre par réduction, ou « réduction dissolutive », les espèces Fe^{III} en Fe^{2+} en présence de donneur organique d'électrons tel que le lactate (Kostka & Nealson, 1995). Des produits secondaires, tels que la vivianite ou la sidérite (Dong *et al.*, 2000), se forment à l'issue de cette réduction microbienne et sont en général moins stables que la magnétite. Par déplacement des équilibres chimiques, ces réactions microbiennes contribueraient à modifier les processus de corrosion déjà en place. Pour que la transformation des oxydes de fer par l'activité bactérienne soit efficace, le milieu doit être anaérobie (absence d' O_2 et de NO_x), et un contact direct entre les oxydes fer et les cellules est nécessaire (Kostka *et al.*, 1996 ; Dong *et al.*, 2000 ; Lovley, 2008). La vitesse de réduction dépend de la nature de l'oxyde de fer (Lovley *et al.*, 2004) et de sa surface spécifique (Roden & Zachara, 1996 ; Neal *et al.*, 2003). Cependant, d'autres facteurs tels que la solubilité du minéral affecteraient aussi la cinétique de conversion du fer ferrique en fer ferreux (Bonneville *et al.*, 2004 ; Bose *et al.*, 2009 ; Cutting *et al.*, 2009).

La magnétite est considérée comme faisant partie des minéraux constitués de Fe(III) qui sont relativement « résistants » à la bioréduction par les IRB. Pourtant, peu de tentatives de réduction microbienne de la magnétite sont rapportées dans la littérature, sans doute du fait de sa relative stabilité face à la bioréduction, ce qui a certainement contribué à considérer ce minéral comme un produit final de la réduction microbienne des autres oxydes ferriques tels que la ferrihydrite (Lovley *et al.*, 1987), la lépidocrocite (Ona-Nguema *et al.*, 2002 ; Jorand *et al.*, 2013), ou encore l'hématite (Behrends & Van Cappellen, 2007). Dans le sous-sol profond, le dihydrogène représente un donneur d'électrons idéal pour les bactéries et leurs conversions énergétiques. En effet, non seulement il diffuse de manière passive au travers des membranes ; mais il est oxydable en protons par une très large variété de bactéries hydrogénotrophes (Thauer *et al.*, 1977). La présence de ce donneur inorganique d'électrons providentiel pourrait alors conduire par la réduction microbienne des espèces Fe(III) à la formation de divers produits de corrosion ferreux dont la vivianite $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, la sidérite FeCO_3 ou encore les rouilles vertes $\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2 (\text{OH})_{12}[\text{A}^{2-}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (carbonatées et sulfatées).

La magnétite est bioréductible par *Shewanella putrefaciens* en présence d'un donneur organique d'électrons comme le lactate pour des pH < 6.22 (Kostka & Nealson, 1995 ; Dong *et al.*, 2000). Seuls Dong *et al.* (2000) ont identifié des produits secondaires issus de cette réduction microbienne de la magnétite, à savoir la vivianite et la sidérite. La bioréduction de la magnétite en présence de dihydrogène n'ayant pas été documentée, le chapitre IV du présent manuscrit s'intéresse à la nature des produits de corrosion issus de l'activité des bactéries ferriréductrices hydrogénotrophes en conditions anaérobie et à pH neutre. Pour augmenter la part des espèces Fe(III) biodisponibles pour les IRB, nous avons synthétisé des particules de magnétite nanométriques présentant des surfaces spécifiques variables.

II. Matériels et méthodes

II.1. Préparation de la suspension de *Shewanella putrefaciens* et des milieux de bioréduction

Shewanella putrefaciens CIP 8040T (équivalent à ATCC 8071) a été revivifiée en conditions aérobies dans du TSA (gélose de trypto-caséine soja) avant d'être cultivée dans du TSB (bouillon de trypto-caséine soja) à 30 °C sous agitation orbitale (150 rpm) (**Figure 39**). Sa vitesse spécifique de croissance μ est de 0,25 h⁻¹ (**Figure 39b**), ce qui correspond à un temps de doublement de la population bactérienne d'environ 2,77 h ($G = \ln(2) / \mu$) dans un milieu TSB à 30 °C en aérobie. En fin de phase de croissance exponentielle, *i.e.* 15 h (**Figure 39a**), les bactéries ont été centrifugées (10000 g à 22 °C pendant 10 min), lavées deux fois et resuspendues dans une solution de NaCl 9 ‰ afin d'obtenir une densité finale de $(1,6 \pm 0,2) \times 10^{10}$ bactéries mL⁻¹.

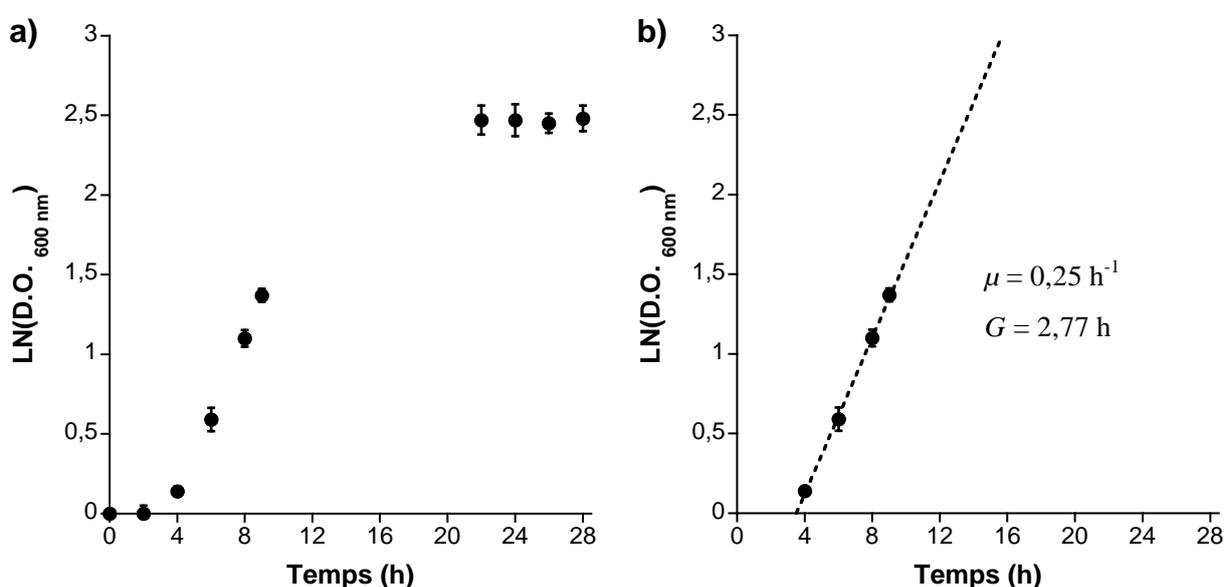


Figure 39. Suivi de la croissance aérobie de *Shewanella putrefaciens* dans un bouillon de trypto-caséine soja à 30 °C sous une agitation de 150 rpm par mesure de la densité optique à 600 nm (a). Détermination de la vitesse de croissance spécifique μ de *Shewanella putrefaciens* correspondant à la pente de la droite de croissance en phase exponentielle (b). Le temps de doublement de la population bactérienne G est calculé selon le rapport $\ln(2) / \mu$. Les barres d'erreurs (n=2) peuvent être masquées par la taille des symboles.

La suspension bactérienne a ensuite été dégazée sous N₂ (99,99 %) durant 30 min afin d'éliminer l'oxygène, puis introduite au travers d'un bouchon en butyle dans des bouteilles stériles, dégazées et scellées de 80 mL contenant : 5 mM MgSO₄·7H₂O, 7 mM CaCl₂·2H₂O, 1 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM Na₂SO₄, 10 mM NaHCO₃, 1 mL L⁻¹ solution vitaminée (*Vitamin solution*, DSMZ GmbH, 2010), 1 mL L⁻¹ solution d'éléments traces (SL-10, DSMZ GmbH, 2010) et 15 mM de Fe₃O₄, au pH de 7,0 ± 0,2 ajusté avec une solution HCl 2 M. Pour chaque essai, deux duplicata ont été réalisés en balayant une densité bactérienne finale de (4,0 ± 0,5) × 10⁸ à (1,2 ± 0,1) × 10⁹ bactéries mL⁻¹, puis incubés à 30 °C en absence de lumière. Du dihydrogène a barboté dans les milieux de bioréduction pendant 10 min avant d'imposer une pression initiale de un à deux bars de H₂ (99,9 %) dans l'espace de tête des flacons. Connaissant le coefficient de solubilité de H₂ dans l'eau à 25 °C, *i.e.* 1282 L atm mol⁻¹ (Lide & Frederickse, 1995 ; Sander, 1999), nous avons pu déterminer à partir de la loi de Van't Hoff (**Eq. 21**), le coefficient de solubilité de H₂ dans l'eau à 30 °C, soit 1318 L atm mol⁻¹. Ainsi, nous avons pu utiliser la loi de Henry (**Eq. 22**) pour calculer la concentration maximale en H₂ dissous dans les milieux d'incubation, soit de 0,8 à 1,6 mM.

$$k_{H_2,PC}(T) = k_{H_2,PC}(T_{réf}) \times e^{-A \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{réf}} \right)} \quad (\text{Eq. 21})$$

Où, $k_{H_2,PC}(T)$ est le coefficient de solubilité de H₂ en L atm mol⁻¹ à la température souhaitée T en Kelvin (ici, 303,15 K), $k_{H_2,PC}(T_{réf})$ le coefficient de solubilité de H₂ en L atm mol⁻¹ à la température de référence soit 298,15 K, et A une constante ayant ici la valeur de 500 K pour H₂.

$$C_{H_2,eau} = k_{H_2,PC}(T) \times P_{H_2} \quad (\text{Eq. 22})$$

Avec $C_{H_2,eau}$ la concentration en H₂ dissous dans l'eau à la température T soit 303,15 K, $k_{H_2,PC}(T)$ est le coefficient de solubilité de H₂ en L atm mol⁻¹ à la température T , et P_{H_2} est la pression partielle en H₂ en atm.

II.2. Synthèse des magnétites

Trois types de magnétites ont été synthétisés avec pour objectif de moduler leur surface spécifique. Toutes les suspensions de magnétites ont été lavées et centrifugées à 10000 g avec de l'eau pure stérile et anoxique, puis conservées sous atmosphère N₂ avant ensemencement par *Shewanella putrefaciens*.

II.2.1. Magnétite formée par coprécipitation de sels de fer ferreux et ferrique

Une solution mixte de FeSO₄•7H₂O ($n_{\text{Fe(II)}} = 0,17$ moles) est mélangée avec une solution de Fe₂(SO₄)₃•5H₂O ($n_{\text{Fe(III)}} = 0,33$ moles), puis alcalinisée par une solution de NaOH à 1,33 moles sous agitation magnétique vigoureuse sous atmosphère anoxique (Usman *et al.*, 2012). Un coprécipité noir des espèces Fe(II) et Fe(III) se forme immédiatement et correspond à la magnétite (M_1). L'échantillon est vieilli durant un jour sous agitation magnétique vigoureuse afin de s'assurer de la précipitation totale des espèces Fe(II)-Fe(III).

II.2.2. Magnétite issue de l'oxydation de la rouille verte carbonatée par les nitrates

La rouille verte carbonatée a été produite par coprécipitation en boîte à gants d'une solution mixte de FeSO₄•7H₂O ($n_{\text{Fe(II)}} = 3,33 \times 10^{-3}$ moles) et de Fe₂(SO₄)₃•5H₂O ($n_{\text{Fe(III)}} = 1,67 \times 10^{-3}$ moles) avec une solution basique carbonatée de NaOH ($n_{\text{OH}^-} = 1 \times 10^{-2}$ moles) et Na₂CO₃ ($n_{\text{CO}_3^{2-}} = 5,83 \times 10^{-3}$ moles) (Bocher *et al.*, 2004). Une fois obtenue, la rouille verte carbonatée a été oxydée avec une solution de NaNO₃ à 3 mM en magnétite (M_2) (Etique *et al.*, 2014b).

II.2.3. Bioréduction de la lépidocrocite et formation de biomagnétite

La synthèse de magnétite par bioréduction de la lépidocrocite a été effectuée selon le protocole décrit par (Zegeye *et al.*, 2011). Une suspension de *Shewanella putrefaciens* d'une

densité cellulaire inférieure à $1,2 \times 10^9$ cellules mL^{-1} (concentration finale) a été utilisée pour inoculer le milieu contenant 160 mM de méthanoate de sodium, 300 mM de lépidocrocite et 100 μM d'AQDS. Le milieu est incubé un mois à 30 °C, le précipité obtenu correspond à de la magnétite, dite biomagnétite (M_3).

II.3. Analyses chimiques et instrumentation

Les concentrations des espèces Fe(II) et le Fe total (solide + solution) ont été analysées par la méthode de la ferrozine en chambre anaérobie après extraction dans HCl 2 M (Viollier *et al.*, 2000). Le potentiel rédox et le pH de la solution ont également été mesurés.

Des analyses du solide en microscopie électronique par transmission (MET) ont été menées via le microscope électronique par transmission CM20/STEM Philips avec une tension d'accélération de 200 kV. Une goutte de la suspension a été déposée sur une grille recouverte de carbone amorphe et introduite dans le porte-échantillon du microscope sous un vide de 10^{-8} Torr. Des caractérisations par spectroscopie Raman à l'air ambiant ont été aussi réalisées après avoir préalablement séché l'échantillon en chambre anaérobie. Des analyses complémentaires ont été menées en DRX ($\lambda_{\text{K}\alpha}$: 1,79026 Å) en conditions anoxiques afin de caractériser avec une plus grande certitude les phases secondaires issues de la bioréduction de la magnétite suspectées par spectroscopie Raman. Pour réaliser ces analyses sous atmosphère inerte (95 % N_2 , 5 % H_2), les suspensions de magnétites bioréduites ont été centrifugées à 5000 g, concentrées et lavées trois fois avec de l'eau pure dégazée avant d'être déposées goutte à goutte sur un coupon de silicium afin de former un film homogène après un séchage de 24 h en boîte à gants (**Figure 40a**). Un dôme en plastique vient fermer hermétiquement le film sec et conserver des conditions anoxiques lors de l'analyse DRX (**Figure 40b**).

La surface spécifique des trois types de magnétites synthétisés a été déterminée par la méthode de Brunauer Emmett Teller (BET) en séchant préalablement les minéraux en boîte à gants.

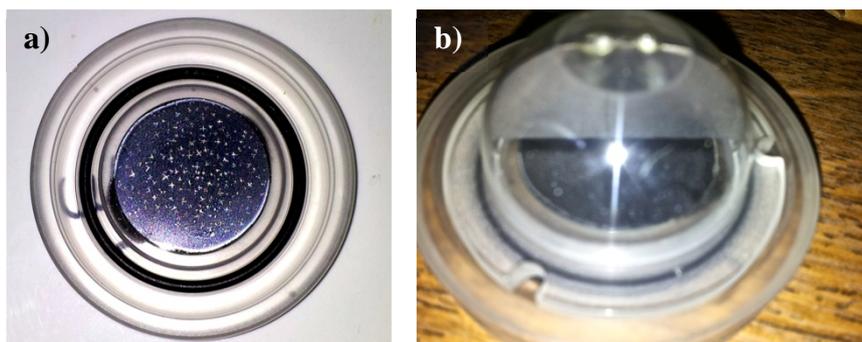


Figure 40. Photographies d'un film de magnétite bioréduite sur un coupon de silicium (a) recouvert d'un dôme en plastique avec couteau pour conserver une atmosphère inerte (b).

III. Résultats et discussion

III.1. Caractérisation des nanoparticules de magnétite synthétisées

La stœchiométrie ou la non-stœchiométrie de la magnétite $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ est définie par la valeur du paramètre δ ($0 \leq \delta \leq 0,33$) qui représente l'écart à la stœchiométrie Fe_3O_4 . La valeur de δ est directement reliée à la fraction molaire x selon la formule $x = [\text{Fe(III)}]/([\text{Fe(III)}] + [\text{Fe(II)}])$ où x est compris entre 0,67 et 1. Les valeurs de x pour les magnétites M_1 , M_2 et M_3 ont été mesurées par dosage des espèces Fe(II) et Fe(tot) dans la suspension (**Tableau 12**). Ces valeurs sont très proches d'une magnétite stœchiométrique où $x = 0,67$, quelle que soit la voie de synthèse (coprécipitation, oxydation de la rouille verte carbonatée, ou bioréduction de la lépidocrocite).

Tableau 12. Stœchiométrie x , surface spécifique, diamètre moyen et diamètre apparent des magnétites M_1 , M_2 et M_3 .

| | Stœchiométrie x | Surface spécifique ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) | d_{moy} (nm) | d_{app} (nm) |
|-------|-------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| M_1 | $0,67 \pm 0,03$ | 83 ± 2 | 14 | $14,0 \pm 0,1$ |
| M_2 | $0,68 \pm 0,02$ | 49 ± 3 | 24 | $23,6 \pm 0,2$ |
| M_3 | $0,66 \pm 0,03$ | 29 ± 5 | 40 | $40,0 \pm 0,6$ |

Les spectres Raman de M_1 , M_2 et M_3 ont permis de confirmer la formation de magnétite par la présence de bandes caractéristiques à $\sim 310\text{ cm}^{-1}$, $\sim 536\text{ cm}^{-1}$, et $\sim 666\text{ cm}^{-1}$ (**Figure 41**) (de Faria *et al.*, 1997). La présence d'une symétrie bilatérale sur la bande à $\sim 666\text{ cm}^{-1}$ ainsi que l'absence d'épaulement à $\sim 700\text{ cm}^{-1}$ conforte respectivement la stœchiométrie des magnétites synthétisées et l'absence d'une phase maghémite (présentant la même structure que la magnétite mais ne contenant que du fer ferrique) (de Faria *et al.*, 1997).

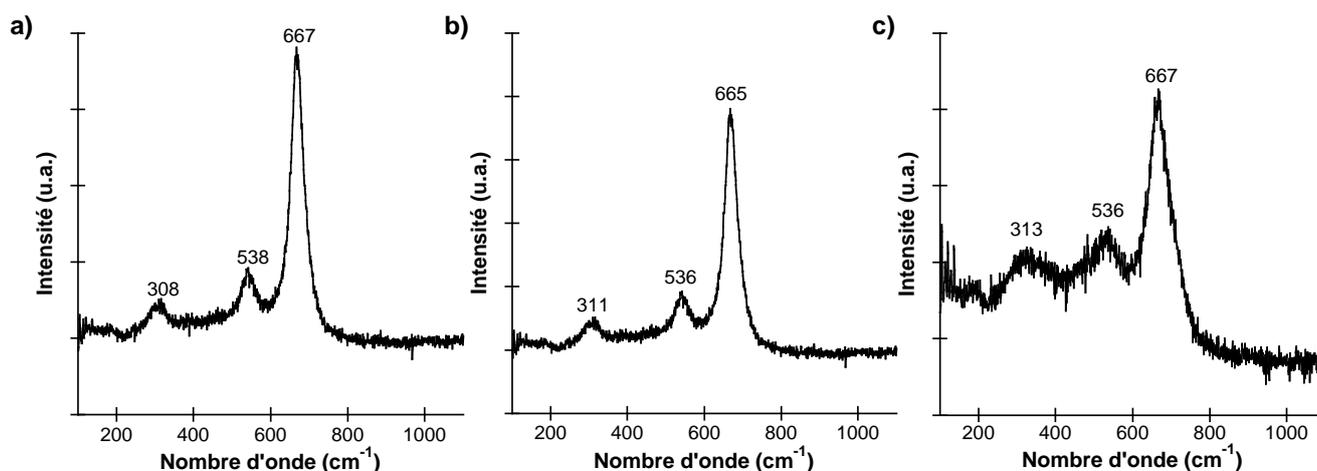


Figure 41. Spectres Raman des magnétites M_1 (a), M_2 (b), et M_3 (c) avec l'attribution des bandes principales d'absorption.

Les analyses DRX de M_1 , M_2 et M_3 confirment la présence de magnétite dans les milieux de synthèse (**Figure 42**).

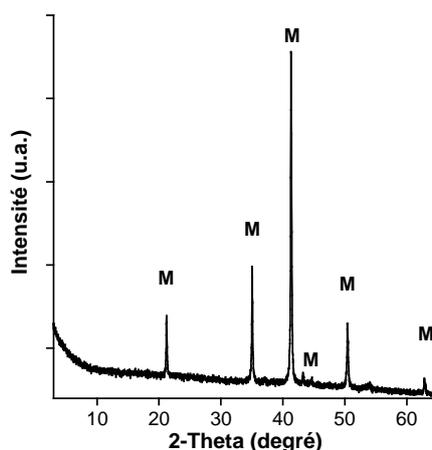


Figure 42. Diffractogramme de la magnétite M_1 (ceux de M_2 et M_3 sont identiques).

La morphologie et la taille des particules M_1 , M_2 et M_3 ont été déterminées par MET. Les particules de magnétites synthétisées sont monocristallines, monodisperses, de forme octaédrique et non agglomérées (**Figure 43**). Déterminé de façon statistique à partir de la mesure d'un échantillon de 200 particules à l'aide d'un programme informatique, le diamètre moyen d_{moy} des particules de magnétites diffère selon la voie de synthèse : $d_{moy, M1} = 14$ nm, $d_{moy, M2} = 24$ nm, et $d_{moy, M3} = 40$ nm (**Tableau 12, Figure 43**). Ces diamètres moyens sont en accord avec les diamètres apparents d_{app} calculés à partir de la surface spécifique des particules de magnétite déduites de l'isotherme d'adsorption à l'azote à l'aide de la BET (en considérant les particules comme sphériques) (**Eq. 23**).

$$d_{app} = 6000/(\rho \times S) \quad (\text{Eq. 23})$$

Avec d_{app} le diamètre apparent (nm), ρ la masse volumique (g cm^{-3}) ($5,18 \text{ g cm}^{-3}$ pour la magnétite) et S la surface spécifique ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$).

Les surfaces spécifiques déterminées par BET étant renseignées dans le **Tableau 12**, les diamètres apparents sont : $d_{app, M1} = 14,0 \pm 0,1$ nm, $d_{app, M2} = 23,6 \pm 0,2$ nm ; $d_{app, M3} = 40,0 \pm 0,6$ nm.

III.2. Suivi de la bioréduction du fer ferrique

III.2.1. Influence de la densité bactérienne sur la cinétique de bioréduction de la magnétite

Dès le premier jour d'incubation et quelles que soient les conditions testées, la réduction des espèces Fe(III) des magnétites en présence de *Shewanella putrefaciens* et de dihydrogène est amorcée et ne présente pas de phase apparente de latence (**Figure 44**). Au-delà de sept jours, la concentration en espèces Fe(III) se stabilise alors qu'il reste encore 70 % à 90 % de fer ferrique dans les essais avec $1,2 \times 10^9$ cellules mL^{-1} (**Figure 44a**) et 92 % à 96 % dans les essais avec $0,4 \times 10^9$ cellules mL^{-1} (**Figure 44b**). Cela peut signifier que : i) le donneur d'électrons H_2 est épuisé, ou ii) qu'il n'y a plus de fer ferrique biodisponible, ou encore iii) que l'intégrité membranaire des bactéries a été affectée.

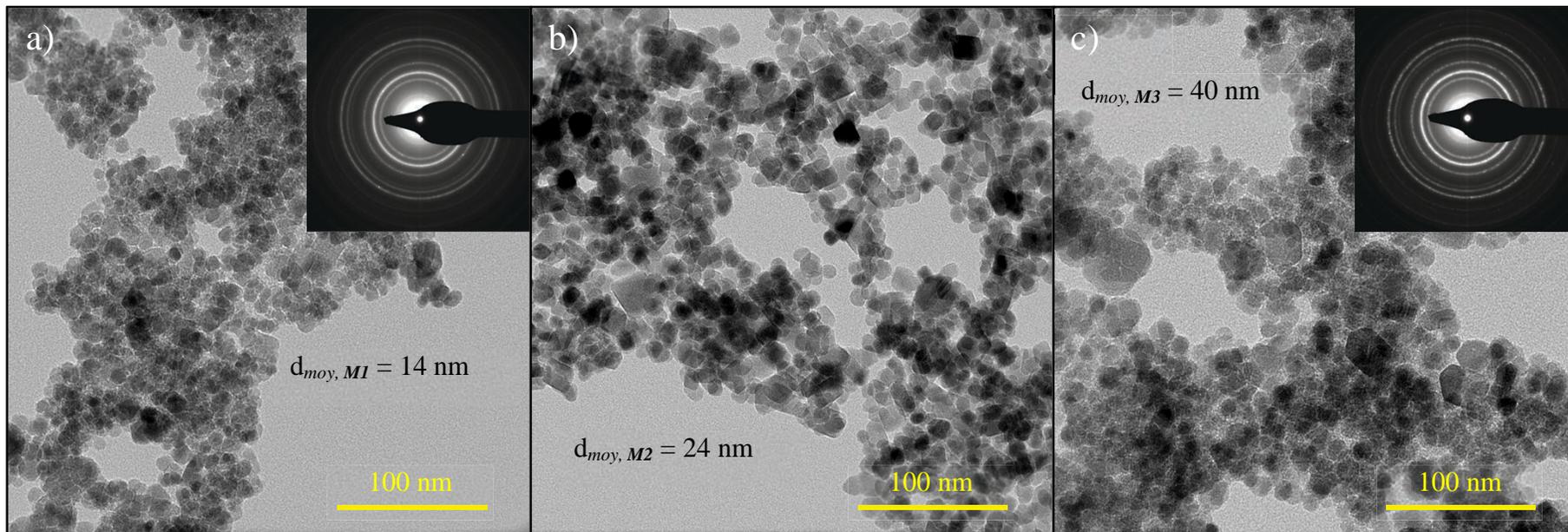


Figure 43. Micrographies des particules de magnétites M_1 (a), M_2 (b) et M_3 (c). Les médaillons en (a) et (b) représentent les clichés de diffraction des électrons pour les particules de magnétites M_1 et M_3 .

En absence de bactéries ou en présence de bactéries tuées (par la chaleur), aucune réduction du fer ferrique n'a été observée (**Tableau 13, Figure 44a**), confirmant que la réduction des espèces Fe(III) est bien le fait d'une activité biologique. De plus, la réduction microbienne du fer ferrique couplée à l'oxydation du dihydrogène apporte suffisamment d'énergie pour assurer la croissance des bactéries du genre *Shewanella* si l'ensemble des besoins nutritifs sont satisfaits (Roden & Zachara, 1996). Rappelons que dans notre cas, le milieu d'incubation ne supporte pas la croissance bactérienne par omission délibérée du phosphate, évitant ainsi la formation « parasite » de vivianite.

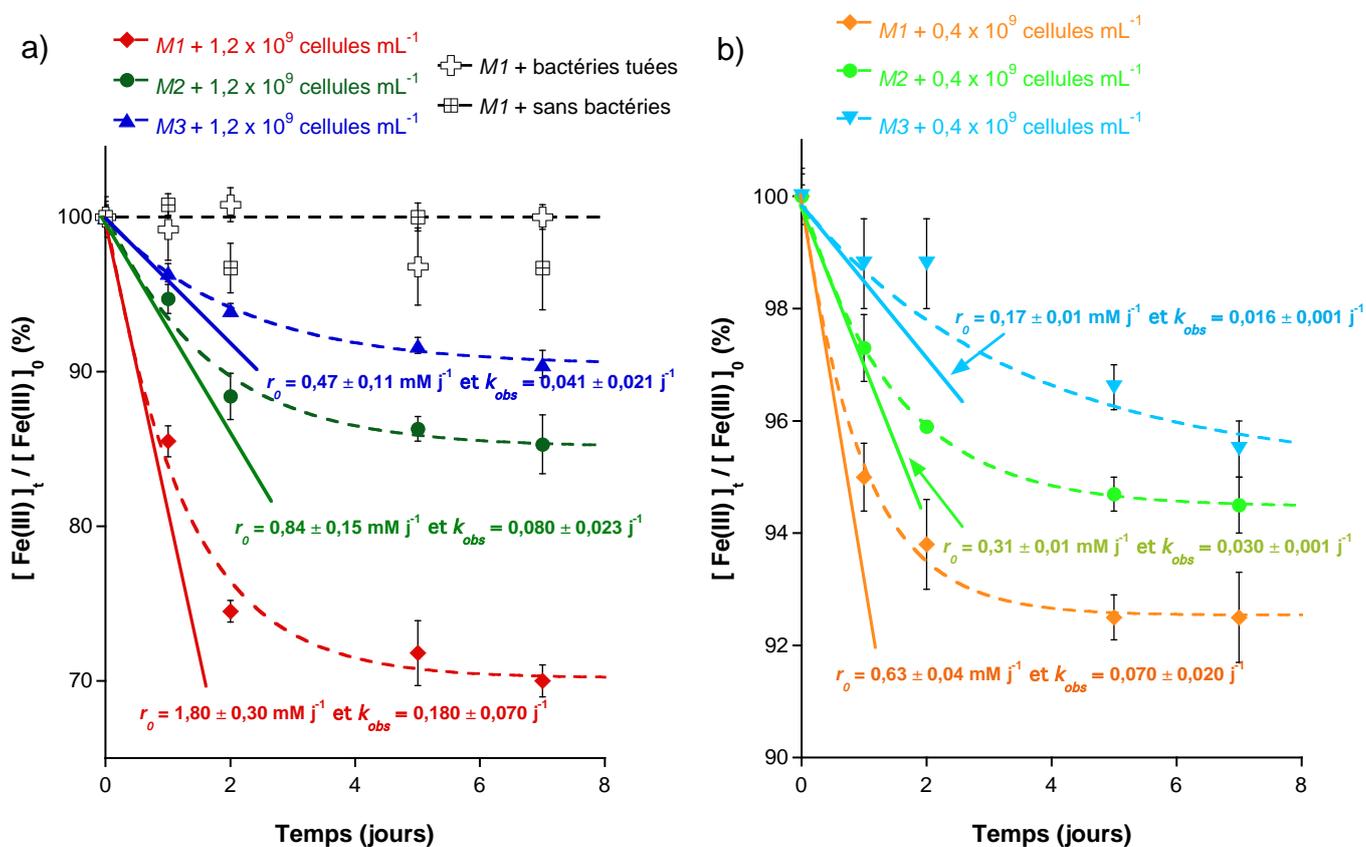
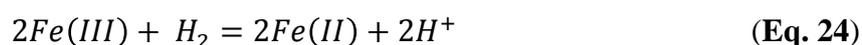


Tableau 13. Données de bioréduction des magnétites M_1 , M_2 et M_3 par *Shewanella putrefaciens* : concentration bactérienne initiale, vitesse initiale r_0 de réduction du fer ferrique de la magnétite, constante de cinétique k_{obs} , quantité de magnétite bioréduite, et nature des minéraux secondaires formés. RV = rouille verte carbonatée, S = sidérite, FS = sulfates de fer (en traces). « n.d. » et « l.d. » signifient respectivement « non détectable » et « limite de détection de 10^{-6} M »

| | Densité cellulaire ($\times 10^9$ cellules mL $^{-1}$) | r_0 (mM j $^{-1}$) | k_{obs} (j $^{-1}$) | Pourcentage de magnetite bioréduite (%) | | Minéraux secondaires générés |
|--|---|--------------------------|---------------------------|---|------|------------------------------------|
| | | | | 0 j | 21 j | 21 j |
| M_1 | 1,2 \pm 0,1 | 1,80 \pm 0,30 | 0,180 \pm 0,070 | 31 \pm 2 | | RV, S, FS |
| | 0,4 \pm 0,1 | 0,63 \pm 0,04 | 0,070 \pm 0,020 | 9 \pm 1 | | RV, S, FS |
| M_2 | 1,2 \pm 0,1 | 0,84 \pm 0,15 | 0,080 \pm 0,023 | 17 \pm 5 | | RV, S, FS |
| | 0,4 \pm 0,1 | 0,31 \pm 0,01 | 0,030 \pm 0,001 | 6 \pm 1 | | S, FS |
| M_3 | 1,2 \pm 0,1 | 0,47 \pm 0,11 | 0,041 \pm 0,021 | 12 \pm 1 | | RV, S, FS |
| | 0,4 \pm 0,1 | 0,17 \pm 0,01 | 0,016 \pm 0,001 | 4 \pm 2 | | FS |
| Contrôle M_1 avec bactéries tuées | 1,2 \pm 0,1 | – | – | < l.d. | | n.d. |
| Contrôle M_1 abiotique | n.d. | – | – | < l.d. | | n.d. |

En effet, une baisse uniforme de la concentration cellulaire d'un logarithme est observée en une semaine pour tous les essais, *i.e.* de $1,2 \times 10^9$ cellules mL^{-1} à $1,0 \times 10^8$ cellules mL^{-1} , et de $0,4 \times 10^9$ cellules mL^{-1} à $0,3 \times 10^8$ cellules mL^{-1} .

D'après la stœchiométrie de la réaction de réduction des espèces Fe(III) par le dihydrogène (**Eq. 24**), 1 mole de H_2 réagit avec 2 moles de fer ferrique.



Dans nos conditions expérimentales, le fer ferrique a été introduit à une concentration de ~ 10 mM pour un volume liquide de 80 mL (**Tableau 14**), soit une quantité de matière $n_{\text{Fe(III)}} = 0,8$ mmoles. La quantité de matière de dihydrogène total disponible dans le milieu d'incubation est, d'après la loi des gaz parfaits (**Eq. 25**), $n_{\text{H}_2} = 0,8$ mmoles à 1,6 mmoles. Ainsi, le réactif limitant est le fer ferrique d'après l'équation (**Eq. 24**). Il y a donc suffisamment de dihydrogène dans les flacons d'incubation pour réduire tout le fer ferrique de la magnétite par l'activité de *Shewanella putrefaciens*.

$$P \times V = n \times R \times T \quad (\text{Eq. 25})$$

Avec P la pression du gaz (Pa), V le volume occupé par le gaz (m^3), n la quantité de matière (moles), R la constante universelle des gaz parfaits ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), et T la température absolue (K).

Cependant, un plateau de bioréduction est présent pour l'ensemble des expérimentations après une semaine d'incubation (**Figure 44**). Cette baisse de cinétique de réduction microbienne du fer ferrique n'est donc pas due à l'épuisement de la ressource en dihydrogène dans les milieux d'incubation. De plus, l'éventualité d'une fuite en H_2 est exclue du fait de la conception même du réacteur (flacon en verre épais, bouchon hermétique en butyle de 1 cm d'épaisseur), et de la vérification constante d'absence de fuite à l'aide de surfactants. En revanche, la baisse de pression dans l'espace de tête engendrée par les prélèvements successifs (2,5 mL) suffirait à diminuer la disponibilité de H_2 dans la fraction liquide, d'après la loi de Henry, et donc à faire baisser rapidement la cinétique de réduction

des espèces Fe(III). Il n'est donc pas étonnant qu'un plateau de bioréduction soit atteint pour l'ensemble des essais, les prélèvements successifs ayant été homogènes, après une semaine de réaction (**Figure 44**). De plus, des points d'analyse complémentaires ont été effectués à 21 j, 1 an et 1,5 an et montrent que la concentration en fer ferrique en suspension n'a pas évoluée, confortant ainsi la stabilité du système sur au moins une échelle de temps à l'année.

Tableau 14. Concentrations initiales et finales en espèces Fe(III), variations du potentiel rédox E_h et du pH au cours de la bioréduction des magnétites M_1 , M_2 et M_3 par *Shewanella putrefaciens* en présence de H_2 . Les concentrations finales en espèces Fe(III), le potentiel rédox et le pH n'ont pas évolué à 21 j, 1 an et 1 an et demi. « n.d. » signifie « non déterminé ».

| | Densité cellulaire ($\times 10^9$ cellules mL^{-1}) | [Fe(III)] (mM) | | | E_h (mV) | | | pH | | |
|--------------------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 0 j | 7 j | 1½ an | 0 j | 7 j | 1½ an | 0 j | 7 j | 1½ an |
| M_1 | 1,2 \pm 0,1 | 10,0 \pm 0,9 | 6,9 \pm 0,8 | 6,8 \pm 0,2 | -255 \pm 3 | -513 \pm 1 | -510 \pm 5 | 7,02 \pm 0,01 | 7,55 \pm 0,03 | 7,56 \pm 0,02 |
| | 0,4 \pm 0,1 | 9,0 \pm 0,5 | 8,2 \pm 0,4 | 8,1 \pm 0,2 | -258 \pm 3 | -420 \pm 1 | -417 \pm 4 | 6,99 \pm 0,03 | 7,38 \pm 0,04 | 7,40 \pm 0,03 |
| M_2 | 1,2 \pm 0,1 | 10,5 \pm 0,4 | 8,2 \pm 0,2 | 8,2 \pm 0,2 | -269 \pm 1 | -454 \pm 15 | -456 \pm 7 | 7,07 \pm 0,02 | 7,50 \pm 0,07 | 7,52 \pm 0,03 |
| | 0,4 \pm 0,1 | 10,2 \pm 0,1 | 9,6 \pm 0,1 | 9,7 \pm 0,2 | -248 \pm 11 | -397 \pm 4 | -399 \pm 5 | 7,04 \pm 0,04 | 7,40 \pm 0,02 | 7,38 \pm 0,04 |
| M_3 | 1,2 \pm 0,1 | 11,4 \pm 0,1 | 10,0 \pm 0,1 | 9,9 \pm 0,1 | -268 \pm 6 | -335 \pm 8 | -330 \pm 4 | 7,07 \pm 0,02 | 7,25 \pm 0,03 | 7,27 \pm 0,02 |
| | 0,4 \pm 0,1 | 10,8 \pm 0,2 | 10,4 \pm 0,1 | 10,3 \pm 0,1 | -259 \pm 1 | -315 \pm 2 | -311 \pm 6 | 6,98 \pm 0,02 | 7,21 \pm 0,01 | 7,20 \pm 0,03 |
| Contrôle M_1 bactéries tuées | 1,2 \pm 0,1 | 10,5 \pm 0,3 | 10,4 \pm 0,5 | 9,9 \pm 0,8 | -265 \pm 4 | -261 \pm 3 | -262 \pm 6 | 6,93 \pm 0,04 | 7,02 \pm 0,02 | 7,05 \pm 0,02 |
| Contrôle M_1 abiotique | n.d. | 10,3 \pm 0,3 | 10,6 \pm 0,4 | 10,5 \pm 0,5 | -251 \pm 2 | -256 \pm 3 | -254 \pm 3 | 6,88 \pm 0,03 | 7,01 \pm 0,03 | 6,98 \pm 0,04 |

Lorsque la densité bactérienne est divisée par un facteur 3 ($1,2 \times 10^9$ à $0,4 \times 10^9$ cellules mL^{-1}), la quantité des espèces Fe(III) réduites diminue également d'un facteur 3 : la

fraction de M_1 réduite est abaissée de 31 % à 9 %, celle de M_2 de 17 % à 6 %, et celle de M_3 de 12 % à 4 % (**Tableau 13, Figure 44**). Il en est de même pour les vitesses initiales r_0 des magnétites M_1 , M_2 et M_3 qui diminuent respectivement de $1,80 \text{ mM j}^{-1}$ à $0,63 \text{ mM j}^{-1}$, de $0,84 \text{ mM j}^{-1}$ à $0,31 \text{ mM j}^{-1}$, et de $0,47 \text{ mM j}^{-1}$ à $0,17 \text{ mM j}^{-1}$. Les constantes cinétiques k_{obs} sont aussi impactées d'un facteur 3 par la diminution de la concentration initiale en bactéries, passant de $0,180 \text{ j}^{-1}$ à $0,070 \text{ j}^{-1}$ pour M_1 , de $0,080 \text{ j}^{-1}$ à $0,030 \text{ j}^{-1}$ pour M_2 , et de $0,041 \text{ j}^{-1}$ à $0,016 \text{ j}^{-1}$ pour M_3 . Ces résultats suggèrent donc que plus la concentration bactérienne est élevée, plus la vitesse initiale r_0 de réaction et donc le k_{obs} sont importants, et plus la quantité d'espèces Fe(III) réduites est conséquente. Ainsi, la réduction de la magnétite serait directement corrélée à l'activité bactérienne de *Shewanella putrefaciens*.

III.2.2. Impact de la cinétique de bioréduction de la magnétite par les variations de surfaces spécifiques

Pour une densité bactérienne donnée, *i.e.* $1,2 \times 10^9 \text{ cellules mL}^{-1}$, les trois types de magnétites M_1 , M_2 et M_3 – ayant une surface spécifique respective de $83 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, $49 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ et $29 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (**Tableau 12**) – présentent un taux de bioréduction de : 31 %, 17 % et 12 % (**Tableau 13, Figure 44a**). Le facteur de 1,7 entre chacune des surfaces spécifiques des magnétites étudiées se répercute donc sur la quantité de fer ferrique bioréduite en présence d'une forte densité cellulaire. Cette constatation est aussi valable à une plus faible concentration bactérienne ($0,4 \times 10^9 \text{ cellules mL}^{-1}$) où les fractions respectives de magnétites M_1 , M_2 et M_3 réduites sont : 9 %, 6 % et 4 % (**Tableau 13, Figure 44b**). De même, les vitesses initiales r_0 et les constantes cinétiques k_{obs} de la réduction de la magnétite diminuent d'un facteur 1,7 lorsque la surface spécifique des magnétites décroît aussi d'un facteur $\sim 1,7$ quelles que soient les densités cellulaires initiales. Par exemple à $1,2 \times 10^9 \text{ cellules mL}^{-1}$, $r_0(M_2) = 0,84 \pm 0,15 \text{ mM j}^{-1}$ et $r_0(M_3) = 0,47 \pm 0,11 \text{ mM j}^{-1}$ (**Tableau 13, Figure 44a**) présentent un facteur de $1,79 \pm 0,15$ entre les deux vitesses initiales pour une variation de la surface spécifique des particules M_2 et M_3 d'un facteur $1,69 \pm 0,09$ (**Tableau 12**).

Ainsi, plus la surface spécifique de la magnétite est importante, plus la cinétique de réduction (r_0 et k_{obs}) de la magnétite est élevée et plus la fraction des espèces Fe(III) réduites est importante. En effet, l'augmentation de la surface de contact des particules de magnétite

améliore son accessibilité pour la réduction dissimilatrice des espèces Fe(III) par *Shewanella putrefaciens*, comme démontré précédemment sur des particules de ferrihydrite, lépidocrocite, goethite ou encore hématite (Roden & Zachara, 1996 ; Dong *et al.*, 2000 ; Glasauer *et al.*, 2003 ; Bonneville *et al.*, 2004 ; Bose *et al.*, 2009). La réduction dissolutive microbienne de la magnétite s'effectueraient par : i) un contact direct entre les cellules et la surface de l'oxyde de fer (Arnold *et al.*, 1988 ; Kostka & Nealson, 1995 ; Lovley, 1997 ; Dong *et al.*, 2000), ii) la présence de navettes à électrons – telles que les substances humiques ou encore certains acides aminés comme la cystéine – qui, réduites par un système enzymatique bactérien, diffuseraient jusqu'à la magnétite pour céder leurs électrons de manière purement abiotique (Lovley, 2008 ; Kappler *et al.*, 2014), iii) des appendices conducteurs (*nanowires*) présents à la surface de *Shewanella putrefaciens* qui permettraient un transfert d'électrons depuis la cellule jusqu'à son point de contact à la surface de l'oxyde de fer (Gorby *et al.*, 2006 ; Pirbadian *et al.*, 2014). Cependant, cette dernière hypothèse soulevant l'implication des appendices conducteurs dans la réduction microbienne de la magnétite est peu probable dans nos conditions expérimentales car il n'y a pas eu carence de l'accepteur externe d'électrons (ici, le Fe(III) de la magnétite) qui est une condition nécessaire à l'expression de ces *nanowires* (Gorby *et al.*, 2006). Des observations en microscopie électronique à transmission ont révélé que *Shewanella putrefaciens* souche CN32 était entourée de cristaux de magnétite suggérant des interactions minéral/bactérie via des polymères bactériens extracellulaires, probablement des exopolysaccharides (EPS) (Dong *et al.*, 2000 ; Vu *et al.*, 2009). La présence de polymères extracellulaires générés par *Shewanella putrefaciens* au contact d'oxyhydroxydes de fer augmenterait dès lors la biodisponibilité du fer dans l'environnement immédiat des cellules (Beveridge *et al.*, 1997). Ainsi, le contact direct minéral/bactérie, et de ses polymères extracellulaires, pourraient favoriser le processus de réduction dissolutive de la magnétite.

La réduction bactérienne directe de la magnétite serait donc liée à un phénomène de biodisponibilité du fer ferrique couplé probablement à un mécanisme de dissolution/re-précipitation.

III.2.3. Effets de la concentration bactérienne et des surfaces spécifiques des magnétites sur le potentiel rédox et le pH

Le potentiel rédox E_h dans les milieux de culture contenant les trois types de magnétites M_1 , M_2 et M_3 lors de l'inoculation de *Shewanella putrefaciens* est identique et vaut $\sim -260 \pm 9$ mV (Tableau 14, Figure 45). Au cours de l'incubation, le potentiel rédox de la suspension E_h chute de -315 mV à -513 mV selon les conditions, alors que le pH augmente très légèrement (de $\sim 7,0$ à $\sim 7,5$) (Tableau 14, Figure 46). La réduction de la magnétite est pH-dépendante selon Kostka & Nealson (1995) : lorsque $5 \leq \text{pH} \leq 6,5$, la réaction est thermodynamiquement favorable pour une oxydation théorique complète du glucose ; à un $\text{pH} > 6,5$, la réaction n'est pas favorable thermodynamiquement. Cependant, le changement d'énergie libre de la réduction de la magnétite $\Delta_r G^0$ est influencé à la fois par le donneur d'électrons (*e.g.* glucose vs H_2) et par la précipitation des phases ferreuses telles que sidérite, vivianite ou encore rouille verte.

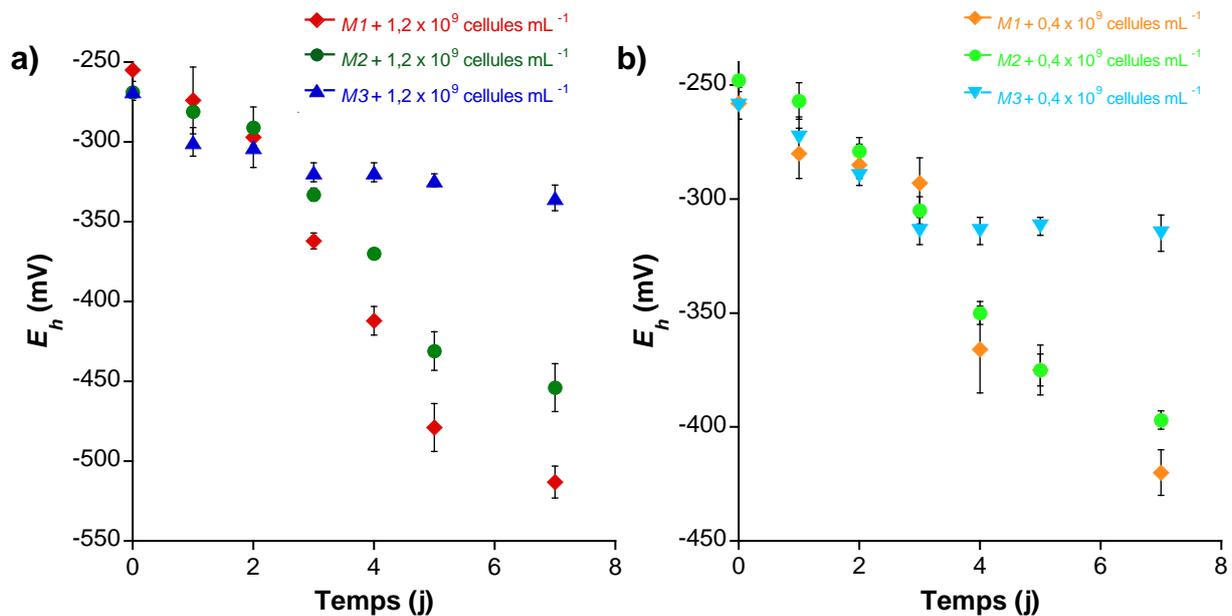


Figure 45. Evolution des potentiels rédox des trois types de magnétites M_1 , M_2 et M_3 au cours de la réduction des espèces Fe(III) en Fe(II) par *Shewanella putrefaciens* à forte densité cellulaire (a) ou plus faible densité cellulaire (b). Les barres d'erreurs ($n=2$) peuvent être masquées par la taille des symboles.

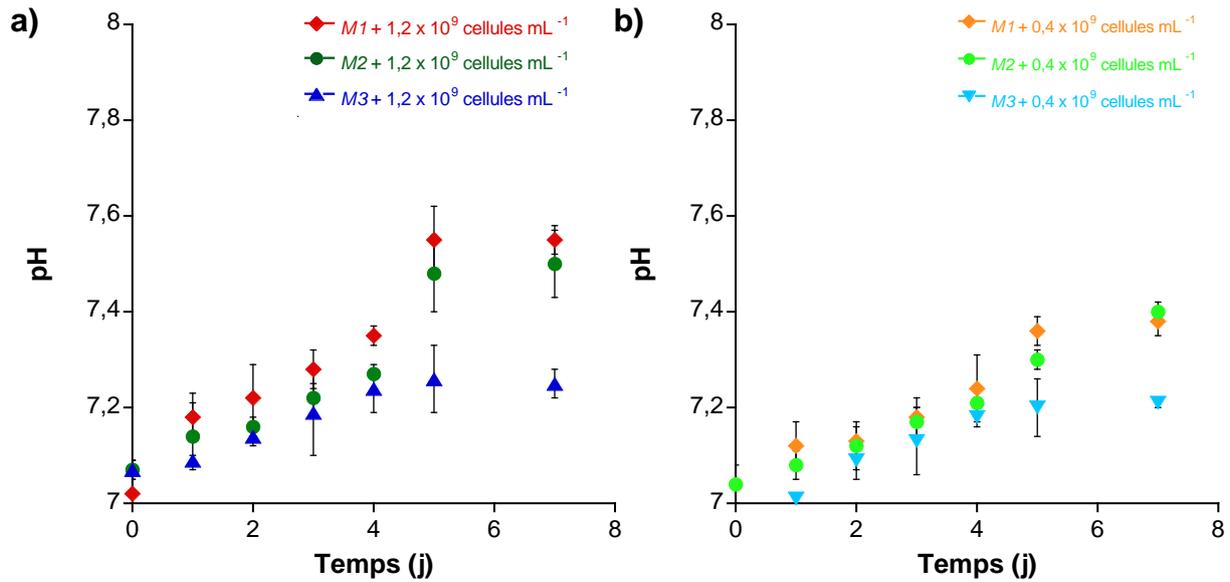
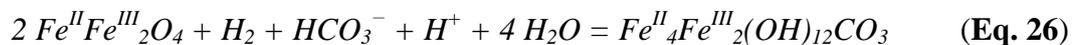


Figure 46. Variations des pH durant l'incubation de *Shewanella putrefaciens* à $1,2 \times 10^9$ cellules mL^{-1} (a) et $0,4 \times 10^9$ cellules mL^{-1} (b) en présence de H_2 et de magnétite. Les barres d'erreurs ($n=2$) peuvent être masquées par la taille des symboles.

La formation de minéraux secondaires est en générale négligée au cours des réactions, elle permet pourtant d'expliquer le déroulement de la réduction microbienne de la magnétite à des pH supérieurs à 7. Par exemple, si nous considérons que la rouille verte carbonatée est un produit secondaire susceptible d'être précipité au cours de la réduction dissolutive de la magnétite par *Shewanella putrefaciens* en présence de dihydrogène (Eq. 26), l'enthalpie libre standard de la réaction $\Delta_r G^0$ peut être calculée d'après la loi de Hess (Eq. 27).



$$\Delta_r G^0_{(T)} = \sum_j \nu_j \times \Delta_f G_j^0_{(T)} - \sum_i \nu_i \times \Delta_f G_i^0_{(T)} \quad (\text{Eq. 27})$$

Avec : - i, j correspondant respectivement aux réactifs et produits de la réaction
 - T , la température standard fixée à 298,15 K
 - ν , le coefficient stœchiométrique de l'espèce chimique considérée

- $\Delta_f G^0_{(T)}$ l'enthalpie libre de formation à la température T égale à $- 1172,67 \text{ kJ mol}^{-1}$ pour la magnétite (O'Neill, 1987), $- 586,29 \text{ kJ mol}^{-1}$ pour les ions bicarbonates (Lide & Frederickse, 1995), $- 237,18 \text{ kJ mol}^{-1}$ pour l'eau (Lide & Frederickse, 1995), et $- 4039,97 \text{ kJ mol}^{-1}$ pour la rouille verte carbonatée (Drissi *et al.*, 1995).

L'enthalpie libre de la formation de la magnétite à 298,15 K a été calculée d'après les données de O'Neill (1987) où $\Delta_f H^0_{(T)} = 1115,43 \text{ kJ mol}^{-1}$ et $S^0_{(T)} = 191,99 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ selon l'équation (27) (**Eq. 28**) :

$$\Delta_f G^0_{(T)} = \Delta_f H^0_{(T)} - T \times S^0_{(T)} \quad (\text{Eq. 28})$$

L'enthalpie libre standard de la réaction $\Delta_r G^0$ de réduction microbienne en présence de dihydrogène de la magnétite en rouille verte carbonatée (**Eq. 26**) vaut $- 159,62 \text{ kJ mol}^{-1}$. Etant inférieure à zéro, cette réaction est donc exergonique, *i.e.* que la réaction est thermodynamiquement favorable. En revanche, la réduction dissolutive en présence de H_2 de la magnétite en fer ferreux ($\Delta_f G^0_{(T)}(\text{Fe}^{2+}) = - 91,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Drissi *et al.*, 1995)) est de $+ 3788,85 \text{ kJ mol}^{-1}$. Cette réaction est donc endergonique et thermodynamiquement défavorable. Ainsi, la prise en compte de la nature des minéraux secondaires générés au cours de la réduction dissolutive de la magnétite par *Shewanella putrefaciens* en présence de dihydrogène est essentielle pour expliquer que cette réaction est thermodynamiquement favorable.

En présence de la plus forte densité cellulaire, dite « FD » ($1,2 \times 10^9 \text{ cellules mL}^{-1}$), la diminution de E_h est d'autant plus marquée, à 7 jours, lorsque la surface spécifique des particules de magnétites est élevée:

- $E_{h, M3, \text{FD}, 7j} = - 335 \text{ mV}$;
- $E_{h, M2, \text{FD}, 7j} = - 454 \text{ mV}$;
- $E_{h, M1, \text{FD}, 7j} = - 513 \text{ mV}$ (**Tableau 14, Figure 45a**).

Il en est de même avec la plus faible concentration bactérienne, dite « fd » ($0,4 \times 10^9 \text{ cellules mL}^{-1}$) :

- $E_{h, M3, fd, 7j} = - 315 \text{ mV}$;
- $E_{h, M2, fd, 7j} = - 397 \text{ mV}$;
- $E_{h, M1, fd, 7j} = - 420 \text{ mV}$ (**Tableau 14, Figure 45b**).

En absence de bactéries ou avec des bactéries tuées par la chaleur, le potentiel rédox et le pH n'évoluent pas au cours du temps.

III.3. La rouille verte carbonatée et la sidérite : des minéraux secondaires biogénérés lors de la réduction microbienne de la magnétite

Les solides présents dans les milieux d'incubation à l'issue de la bioréduction de la magnétite ont été caractérisés en spectroscopie Raman (**Figure 47**). Seules les solides des expériences menées à forte densité cellulaire ($1,2 \times 10^9 \text{ cellules mL}^{-1}$) présentant un taux de bioréduction de la magnétite supérieur à 10 % ont été analysées (**Tableau 13**). Les spectres Raman des solides présents dans les milieux de culture avec les trois types de magnétites M_1 , M_2 et M_3 semblent exhiber après la bioréduction un profil commun avec des raies larges peu intenses : $183\text{-}187 \text{ cm}^{-1}$, 223 cm^{-1} , 261 cm^{-1} , 286 cm^{-1} , $328\text{-}339 \text{ cm}^{-1}$, $375\text{-}380 \text{ cm}^{-1}$, 403 cm^{-1} , 447 cm^{-1} , 491 cm^{-1} , $505\text{-}508 \text{ cm}^{-1}$, $668\text{-}672 \text{ cm}^{-1}$ et $700\text{-}719 \text{ cm}^{-1}$, rendant difficile l'attribution de ces fréquences à des composés à base de fer défini (**Figure 47**).

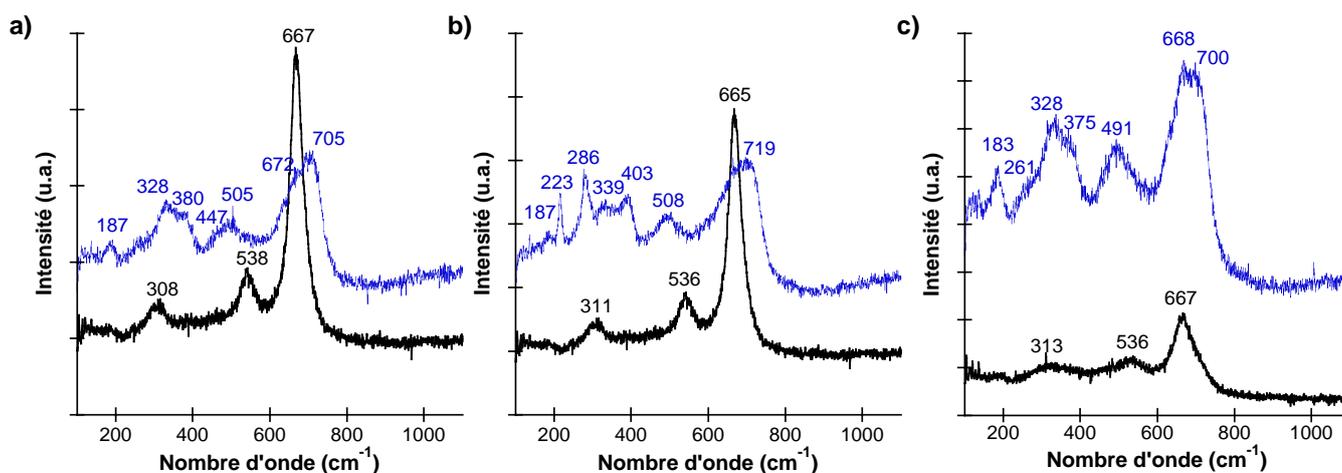
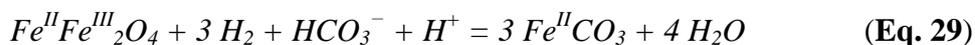


Figure 47. Spectres Raman des particules de magnétites M_1 (a), M_2 (b) et M_3 (c) avant bioréduction (noir) et post-bioréduction (bleu).

Cependant, la présence de sidérite ($183\text{-}187\text{ cm}^{-1}$, 286 cm^{-1} , 491 cm^{-1}), rouille verte carbonatée (223 cm^{-1} , 447 cm^{-1} , $505\text{-}508\text{ cm}^{-1}$, $668\text{-}672\text{ cm}^{-1}$), magnétite ($668\text{-}672\text{ cm}^{-1}$), et maghémite ($700\text{-}719\text{ cm}^{-1}$) peut-être suspectée (de Faria *et al.*, 1997 ; Romaine, 2014). La formation de maghémite suggère que nos échantillons ont subi une oxydation à l'air lors de l'accumulation de signal malgré une faible puissance de sortie du laser (200 mW) et une densité optique importante (1,9) permettant de limiter l'échauffement des phases analysées. Des analyses en conditions anoxiques, à l'aide d'une cellule hermétiquement fermée sous atmosphère inerte, auraient sans doute permis une meilleure identification des phases secondaires générées post-bioréduction de la magnétite.

Les diffractogrammes obtenus sur l'intégralité des échantillons post-bioréduction confirment bien la présence de rouille verte carbonatée, sidérite et magnétite suspectée lors des analyses en spectroscopie Raman (**Figure 48**). De plus, une nouvelle phase secondaire est détectée en traces : les sulfates de fer suggérant une légère précipitation entre les espèces du fer biogénérée et les sulfates présents en quantité importante dans le milieu de culture (**Figure 48**). La présence de magnétite sur tous les diffractogrammes post-bioréduction signifie que ce minéral n'a pu être réduit en totalité par l'activité bactérienne (**Figure 48**), ce qui est en accord avec les fractions de fer ferrique réduit s'élevant de 4 % (pour la magnétite biogénique M_3 inoculée avec $0,4 \times 10^9$ cellules mL^{-1}) à 31 % (pour la magnétite coprécipitée M_I inoculée avec $1,2 \times 10^9$ cellules mL^{-1}) (**Tableau 13, Figure 44**). Lorsque les quantités des espèces Fe(III) réduites sont supérieures à 4 ± 2 %, la sidérite apparaît dans le milieu de culture suite à une coprécipitation des espèces Fe(II) biogénérées avec les ions bicarbonates (**Eq. 29**) (**Tableau 13, Figures 44 et 48a-e**).



Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Dong *et al.* (2000) où la formation de sidérite, liée à la bioréduction (*Shewanella putrefaciens* CN32) de la magnétite « biogénique » par 2 à 3×10^8 cellules mL^{-1} , s'effectue dans un milieu carbonaté non tamponné (Dong *et al.*, 2000).

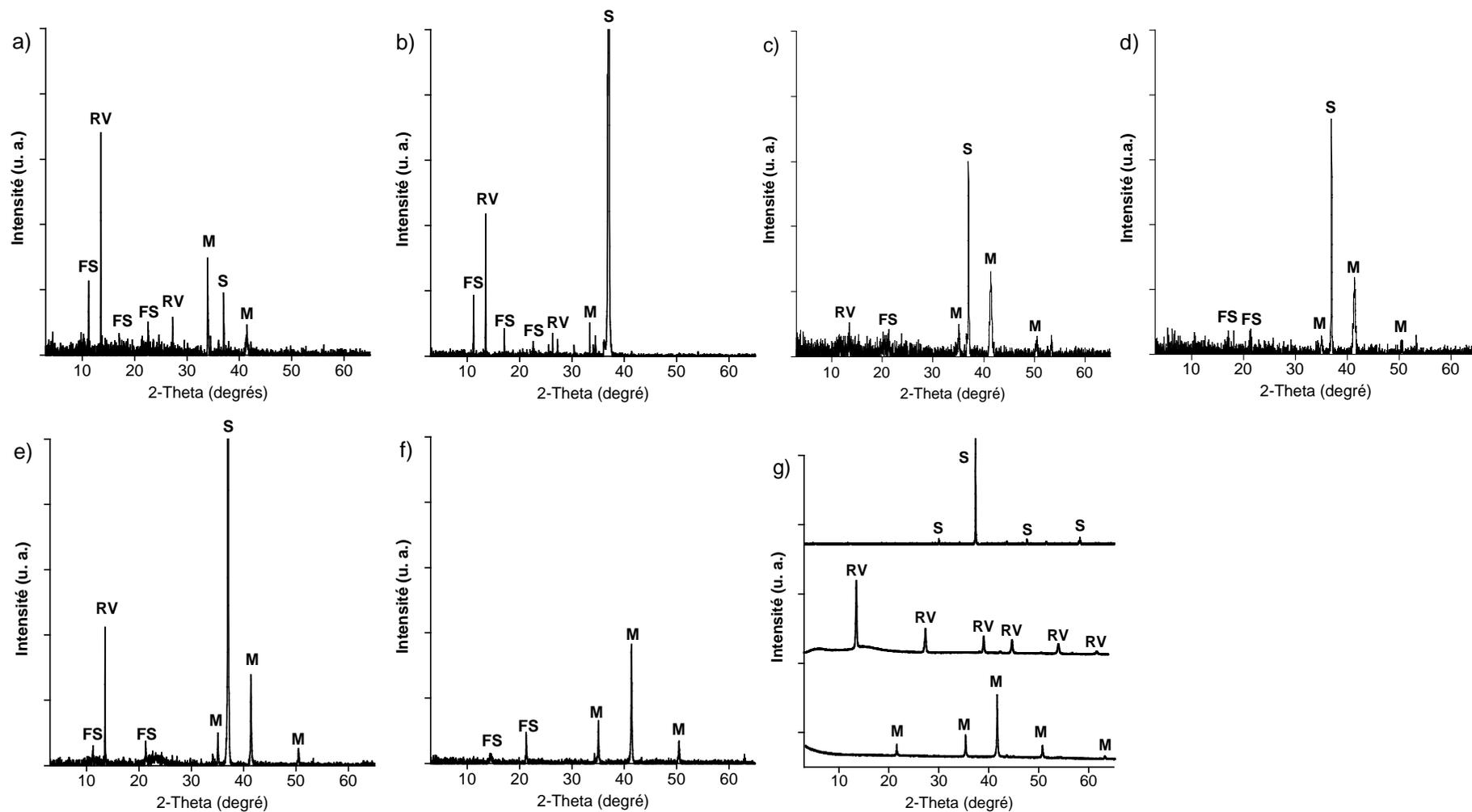


Figure 48. Diffractogrammes des magnétites partiellement bioréduites par *Shewanella putrefaciens* en présence de H_2 : (a) $M_1 + 1,2 \times 10^9$ cellules mL^{-1} ; (b) $M_1 + 0,4 \times 10^9$ cellules mL^{-1} ; (c) $M_2 + 1,2 \times 10^9$ cellules mL^{-1} ; (d) $M_2 + 0,4 \times 10^9$ cellules mL^{-1} ; (e) $M_3 + 1,2 \times 10^9$ cellules mL^{-1} ; (f) $M_3 + 0,4 \times 10^9$ cellules mL^{-1} ; (g) diffractogrammes de référence. M = magnétite; RV = rouille verte carbonatée, S = sidérite et FS = sulfate de fer en traces.

Les solides présents dans les expériences menées avec des bactéries tuées ou sans bactérie ont été aussi caractérisés en spectroscopie Raman et diffraction des rayons X après des périodes d'incubation de 21 jours et un an, et la magnétite est bien la seule phase observée.

La formation de rouille verte au cours de la réduction microbienne de la magnétite n'avait, à notre connaissance, jamais été démontrée jusqu'à présent. C'est une rouille verte carbonatée qui est obtenue dans nos conditions expérimentales, lorsque la fraction de magnétite bioréduite est supérieure à 9 ± 1 % dans nos conditions expérimentales, la rouille verte carbonatée est mise en évidence (**Tableau 13, Figure 48a, b, c, e**). Les espèces Fe(II) biogénérées précipiteraient avec les espèces Fe(III) et les ions bicarbonates pour conduire à la formation de rouille verte carbonatée selon l'équation (26) présentée précédemment (**Eq. 26**).

La microscopie électronique à transmission effectuée sur les magnétites M_1 , M_2 et M_3 bioréduites en présence de $1,2 \times 10^9$ cellules mL^{-1} de *Shewanella putrefaciens* montre une morphologie hexagonale des cristaux de rouille verte avec un diamètre moyen de 550 ± 10 nm (**Figure 49**). La diffraction des électrons sur ces particules correspond bien aux distances interréticulaires d_{hkl} d'une rouille verte carbonatée et nous permet de remonter au paramètre de maille moyen $a = b = 3,17 \pm 0,03$ Å (**Tableau 15, Figure 49b - médaillon**). Cette valeur du paramètre a est très proche de celle déterminée antérieurement par diffraction des rayons X (Drissi *et al.*, 1995).

Tableau 15. Détermination des distances interréticulaires des particules de rouilles vertes carbonatées et du paramètre de maille a sachant que la rouille verte carbonatée cristallise dans un réseau rhomboédrique qui peut être décrit dans une maille hexagonale triple de base (a, b).

| d_{hkl} (notre étude) | h k l | Paramètres de maille (Å) |
|----------------------------|-------|--------------------------------|
| 2,75 | 1 0 0 | $a = 3,14$ |
| 1,60 | 1 1 0 | $a = 3,20$ |

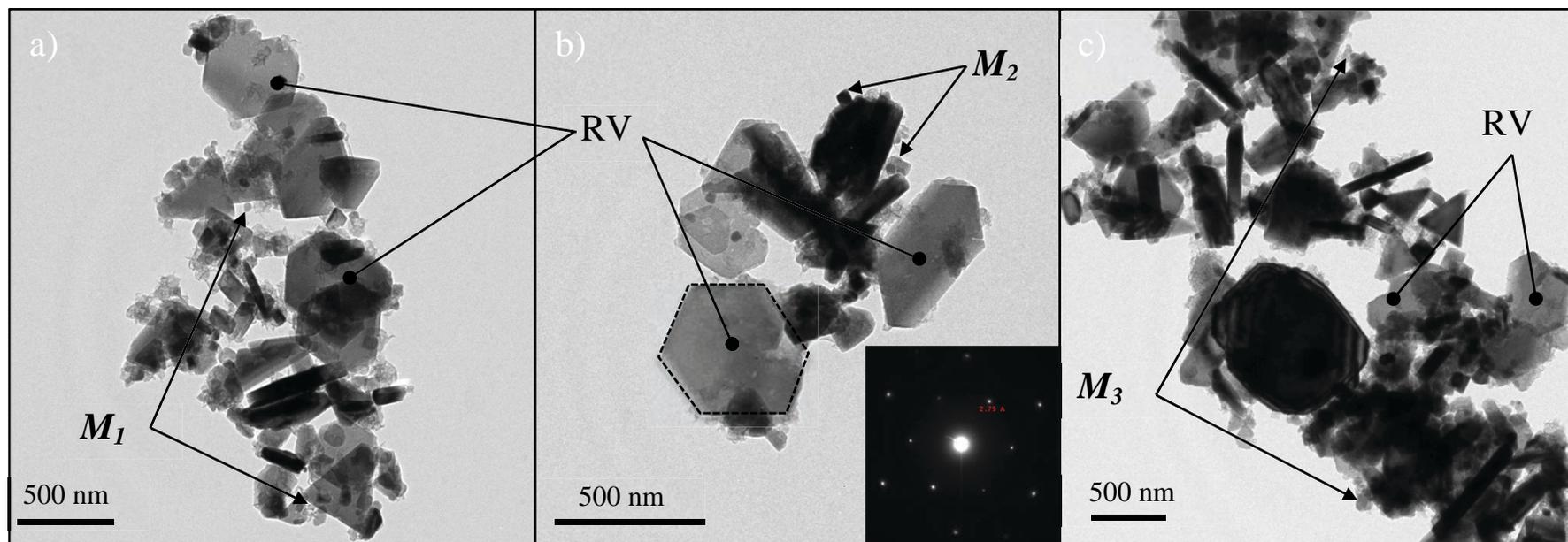


Figure 49. Micrographies des particules de rouille verte carbonatée obtenues par bioréduction partielle des magnétites M_1 (a), M_2 (b) et M_3 (c). Le médaillon dans le cadre (b) représente le cliché de diffraction des électrons d'une particule de rouille verte carbonatée permettant de remonter aux paramètres de maille $a = b = 3,20 \text{ \AA}$ et $c = 22,23 \text{ \AA}$ (Aissa *et al.*, 2006). Les particules de magnétites (M) restantes sont associées aux cristaux de rouilles vertes carbonatées (RV).

La rouille verte carbonatée formée par bioréduction de la magnétite en présence de dihydrogène est stable au cours du temps. Un an et demi après les premières caractérisations, les particules sont toujours identifiables en DRX ou en MET (données non montrées). Les EPS de *Shewanella putrefaciens* (ou issues d'autres systèmes comme ceux des boues d'épuration) stabilisent les minéraux secondaires, tels que la rouille verte carbonatée, générés à partir de la bioréduction des oxydes de fer (Jorand *et al.*, 2013 ; Zegeye *et al.*, 2014). Il s'agirait probablement de polysaccharides comme cela a été rapporté pour la souche *Shewanella alga* BrY par marquage à la ferritine (Urrutia & Fredrickson, données non publiées) (Dong *et al.*, 2000).

III.4. Diagramme de Pourbaix : validation du processus de dissolution/reprécipitation au cours de la réduction microbienne de la magnétite

Les minéraux secondaires, rouille verte carbonatée et sidérite, ayant été caractérisés et validés par plusieurs techniques d'analyses du solide (spectroscopie Raman, DRX et MET), nous pouvons tracer les diagrammes de Pourbaix du fer en solution aqueuse carbonatée à 25 °C, pour une activité des espèces carbonate de 0,01 et une activité des espèces fer de 0,015 (**Figure 50a**). Bien que les essais de bioréduction aient été conduits à 30 °C, cette légère variation de température par rapport à la température standard de référence 298,15K utilisée pour construire les diagrammes de Pourbaix, n'impacte les données d'enthalpie libre de formation $\Delta_f G^0(T)$ que très faiblement. Nous considérerons donc les enthalpies libres de formation des espèces à 25 °C listées dans le **Tableau 16**. Les équations d'équilibres des diagrammes de Pourbaix de la **Figure 50a** sont reportées dans le **Tableau 17**. Les valeurs thermodynamiques utilisées pour construire ces diagrammes de Pourbaix ont été tirées des travaux de Refait *et al.* (2006). Un premier diagramme E_h -pH a été tracé en considérant l'existence de la phase rouille verte carbonatée $GR(CO_3^{2-})$ et en omettant la possible existence de la phase sidérite $FeCO_3$ (**Figure 50a, trait plein noir**).

Tableau 16. Enthalpies libres de formation utilisées pour les calculs dans les conditions standard de température et de pression (Refait *et al.*, 2006).

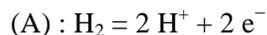
| Espèces | Degré d'oxydation | $\Delta_f G^0_{(T)}$ (kJ mol ⁻¹) |
|---|-------------------|--|
| Espèces solides | | |
| Fe ⁰ | 0 | 0 |
| FeCO _{3(s)} | +2 | -681 |
| GR(CO ₃ ²⁻) | | |
| Fe ^{II} ₄ Fe ^{III} ₂ (OH) ₁₂ CO ₃ •2H ₂ O _(s) | +7/3 | -4076 |
| α -FeOOH _(s) | +3 | -485,3 |
| Espèces liquides et dissoutes | | |
| H ₂ O | | -237,18 |
| Fe ²⁺ _(aq) | +2 | -91,5 |
| H ₂ CO ₃ | | -623,2 |
| HCO ₃ ⁻ | | -586,8 |
| CO ₃ ²⁻ | | -527,9 |

Le second diagramme de Pourbaix a été établi en considérant l'existence des deux phases. Les équations d'équilibre impliquant la sidérite ont été représentées par une ligne bleu clair (**Figure 50a**). Le domaine de stabilité de la rouille verte carbonatée GR(CO₃²⁻) est entièrement compris dans le domaine de stabilité de la sidérite, qui est délimité par les lignes (6), (7), (8) et (9), démontrant que la rouille verte carbonatée est métastable au regard de la sidérite.

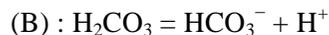
L'ensemble des couples (E_h , pH) mesurés pour les trois types de magnétites M_1 , M_2 et M_3 , indépendamment de la densité bactérienne, sont alignés sur une droite de pente - 428

mV (unité de pH)⁻¹ (**Figure 50a, médaillon**). Cette régression linéaire se superpose à $\pm 10\%$ sur la droite d'équilibre (c) du Fe(II) en solution et de la rouille verte carbonatée présentant une pente de -384 mV unité de pH⁻¹ (**Tableau 17, Figure 50a**). Cet alignement des couples (E_h , pH) expérimentaux à proximité immédiate de la droite d'équilibre (c) suggère que le potentiel rédox mesuré serait gouverné par l'équilibre entre les espèces Fe(II) solubles et la rouille verte carbonatée, plutôt que l'équilibre entre les espèces Fe(II) solubles et la magnétite caractérisé par une pente de -236 mV unité de pH⁻¹ (**Figure 50b**). Ces espèces proviendraient donc d'un mécanisme de réduction dissolutive de la magnétite par *Shewanella putrefaciens* suivi d'une recristallisation en minéraux secondaires enrichis en fer ferreux. Ainsi, la bioréduction de la magnétite devrait conduire à la formation des phases rouille verte carbonatée et sidérite, comme prédit par le diagramme de Pourbaix (**Figure 50a**). En effet, ces deux phases secondaires sont obtenues après 7 jours de réduction microbienne de la magnétite en présence de H₂ (**Figures 48 et 49**). Evoqué depuis 1995 par Kostka & Nealson, le mécanisme de dissolution/re-précipitation de la magnétite est cohérent au vu du changement de structure fondamental qui s'opère en passant de la magnétite à la rouille verte carbonatée et/ou sidérite. Cette modification drastique de la structure cristallographique suggère qu'il ne peut y avoir de conversion topotactique d'un solide vers une autre phase solide.

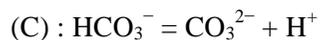
Tableau 17. Réactions d'équilibre des différents couples rédox utilisées pour construire les diagrammes de Pourbaix (Figure 50a).



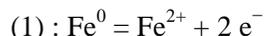
$E_h = 0,00 - 0,0591 \text{ pH}$



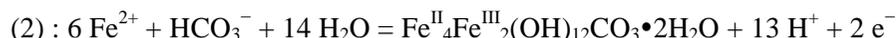
$6,37 = \text{pH} + \log([\text{H}_2\text{CO}_3]) - \log([\text{HCO}_3^-])$



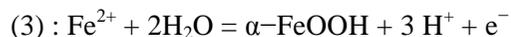
$10,34 = \text{pH} + \log([\text{HCO}_3^-]) - \log([\text{CO}_3^{2-}])$



$E_h = -0,44 + 0,02955 \log([\text{Fe}^{2+}])$



$E_h = 1,94 - 0,02955 \log([\text{HCO}_3^-]) - 0,3842 \text{ pH} - 0,1773 \log([\text{Fe}^{2+}])$



$E_h = 0,82 - 0,1773 \text{ pH} - 0,0591 \log([\text{Fe}^{2+}])$



$E_h = -0,10 - 0,00422 \log([\text{HCO}_3^-]) - 0,0549 \text{ pH}$



$E_h = 0,26 + 0,0148 \log([\text{HCO}_3^-]) - 0,0739 \text{ pH}$



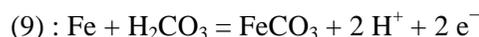
$5,90 = \log([\text{Fe}^{2+}]) + \log([\text{H}_2\text{CO}_3]) + 2 \text{ pH}$



$E_h = 0,863 + 0,0591 \log([\text{HCO}_3^-]) - 0,1182 \text{ pH}$



$E_h = 1,473 + 0,0591 \log([\text{CO}_3^{2-}]) - 0,1773 \text{ pH}$



$E_h = -0,300 - 0,0296 \log([\text{H}_2\text{CO}_3]) - 0,0591 \text{ pH}$

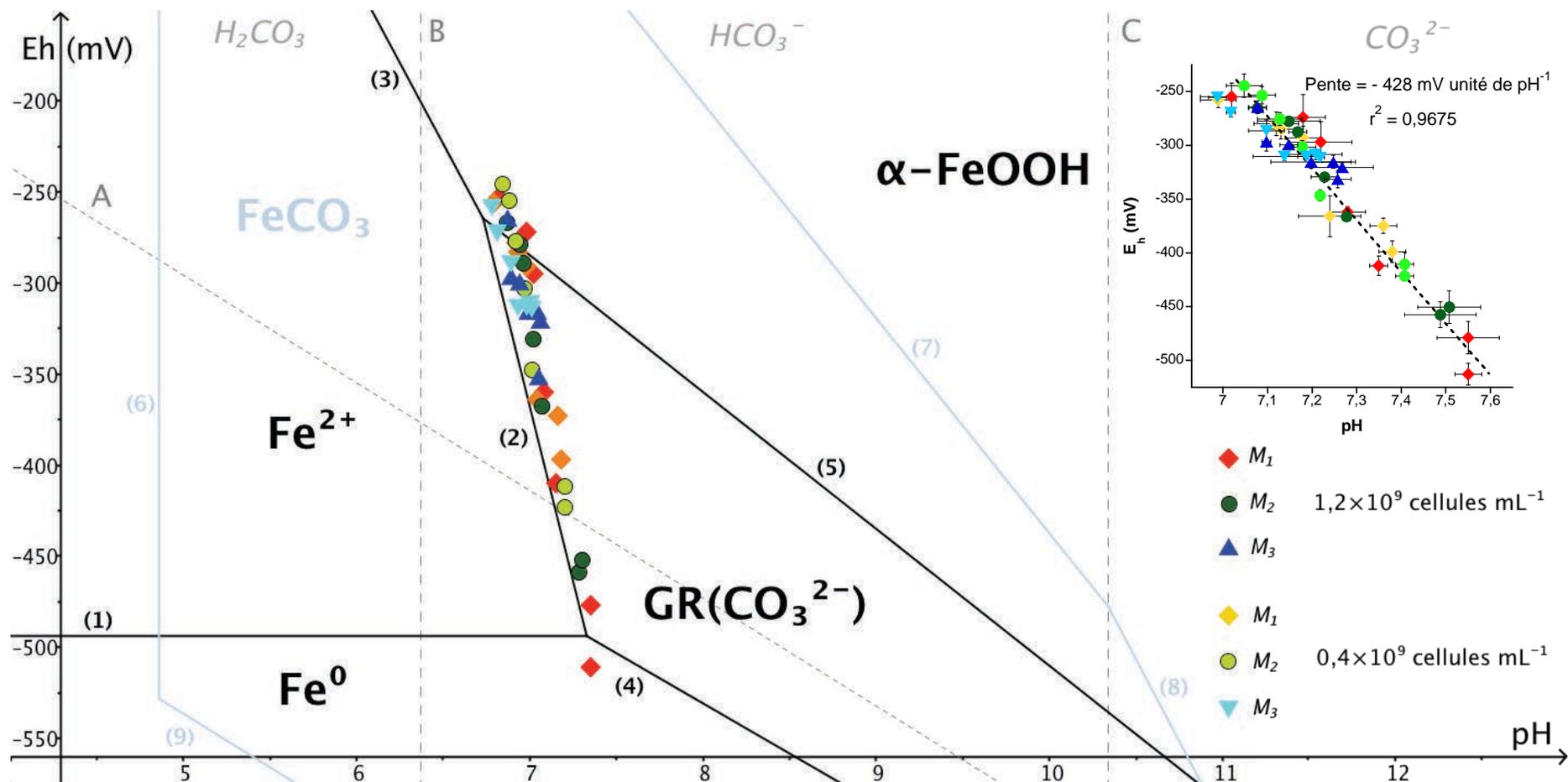


Figure 50a. Superposition des diagrammes de Pourbaix du fer en solution aqueuse carbonatée à 25 °C, pour une activité des espèces carbonates de 0,01 et des espèces fer de 0,015. Le diagramme en ligne pleine noire est tracé en omettant $FeCO_3$. Les données (E_h , pH) au cours de la réduction microbienne de la magnétite par *Shewanella putrefaciens* en présence de dihydrogène ont été ajoutées. Le médaillon permet de visualiser la pente de la droite $E_h = f(\text{pH})$ d'une valeur de $-428 \text{ mV (unité de pH)}^{-1}$. Les barres d'erreurs ont été établies pour (n=2) et elles peuvent être masquées par la taille des symboles.

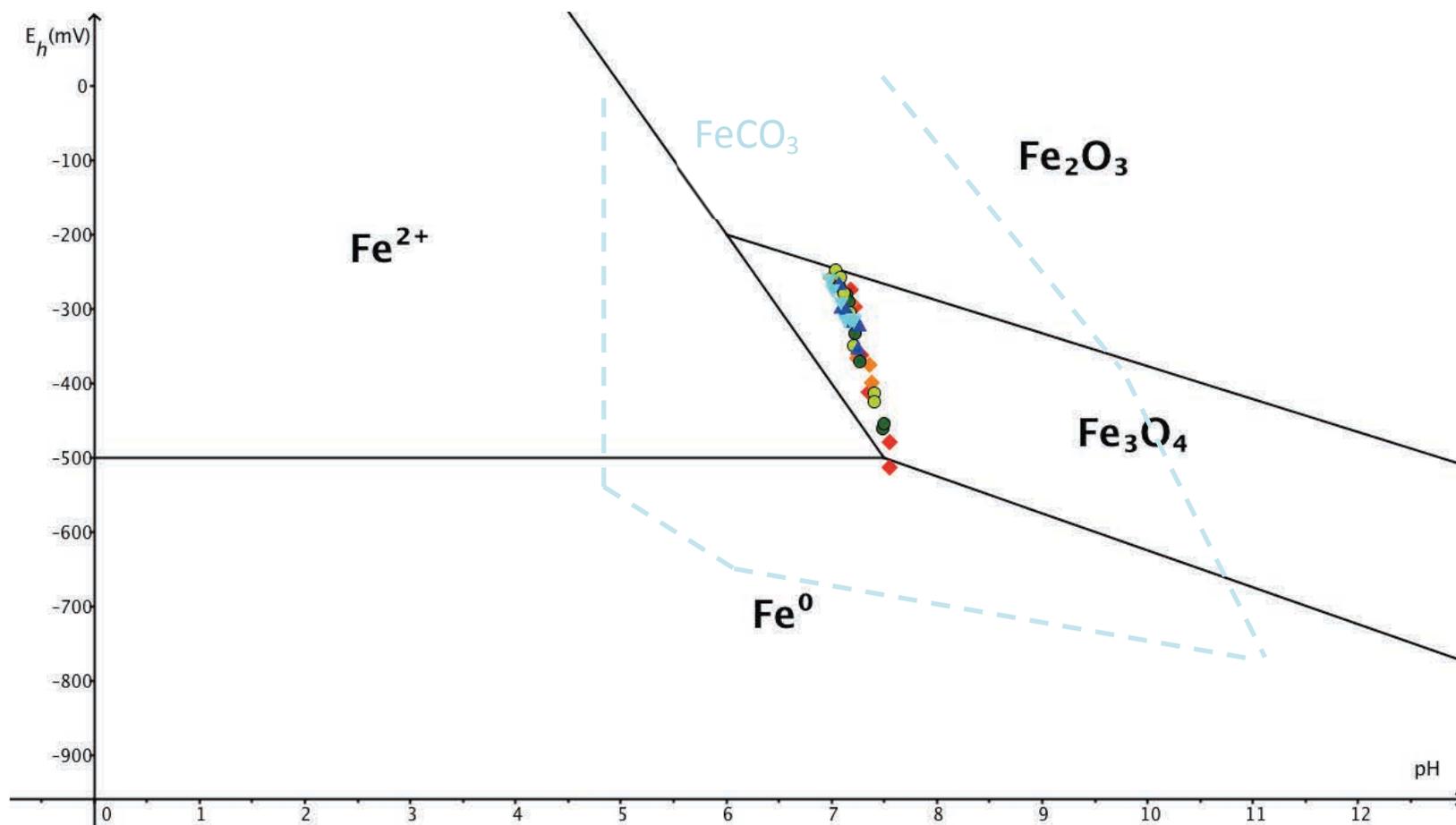
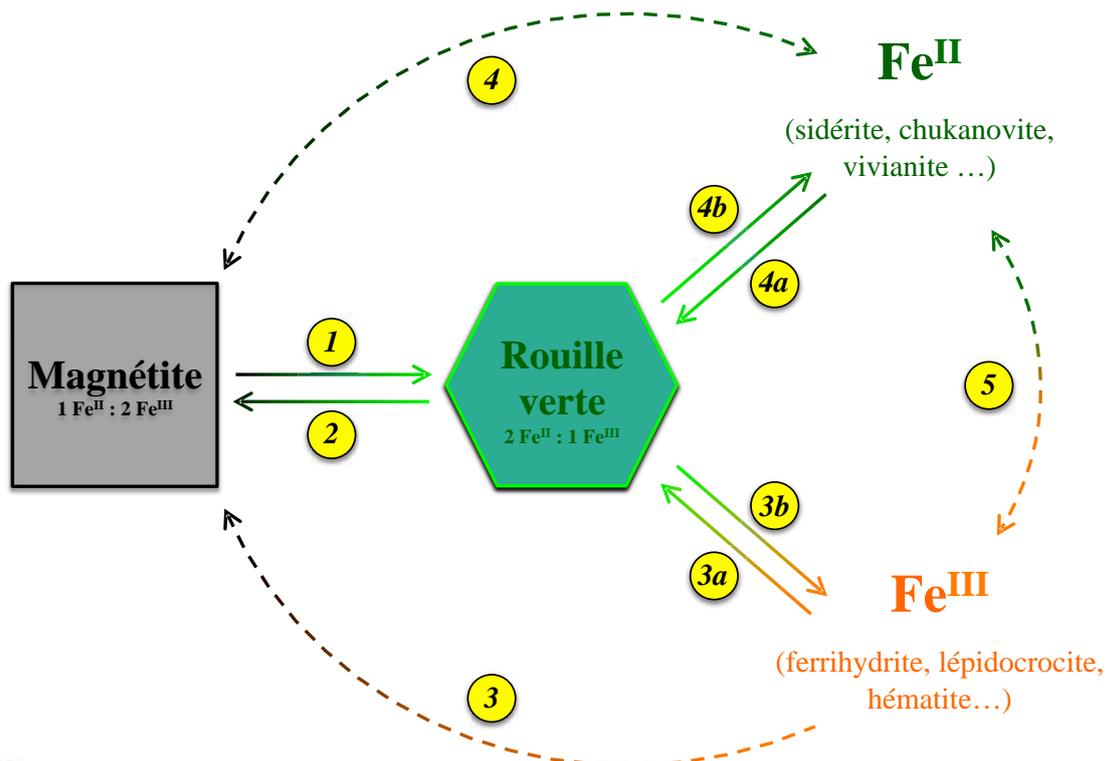


Figure 50b. Superposition des diagrammes de Pourbaix du fer en solution aqueuse à 25 °C pour une activité des espèces carbonates de 0,01 et des espèces fer de 0,015. Le diagramme en ligne pleine noire est tracé en omettant $FeCO_3$, selon Vannerberg (1988). Les données (E_h , pH) au cours de la réduction microbienne de la magnétite par *Shewanella putrefaciens* en présence de dihydrogène ont été ajoutées. Tous les points expérimentaux se situent dans le domaine de stabilité de la magnétite en phase aqueuse.

IV. Conclusion

Au cours de ce chapitre IV, nous avons démontré expérimentalement et par le biais de considérations thermodynamiques que la réduction microbienne directe de la magnétite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$) par une bactérie ferriréductrice, *Shewanella putrefaciens*, est possible à des pH supérieurs à 6,5 en présence de dihydrogène comme unique source de donneur d'électrons. Les minéraux secondaires issus de cette réduction dissolutive du fer ferrique de la magnétite sont la rouille verte carbonatée ($\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) et/ou la sidérite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}_3$). Leur formation permet d'expliquer le caractère exergonique ($\Delta_r G^0 < 0 \text{ kJ mol}^{-1}$) de cette réaction, considérée jusqu'à présent comme thermodynamiquement défavorable à des pH > 6,5 où ni la nature des produits secondaires de corrosion (' Fe^{2+} ' vs 'rouille verte carbonatée et/ou sidérite'), ni la source de donneur d'électrons ('lactate' vs 'dihydrogène') n'avaient été prises en compte. Au cours de la bioréduction de la magnétite, le report des variations du potentiel rédox E_h et du pH de la suspension au sein des diagrammes de Pourbaix – prenant en considération la nature des minéraux secondaires produits – nous a permis de constater que E_h est voisin de celui du couple d'oxydoréduction $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, en accord avec un phénomène de réduction dissolutive de la magnétite suivie par une recristallisation de la rouille verte. Cette réaction est d'ailleurs accélérée lorsque les particules de magnétite présentent une surface spécifique élevée ou lorsque la concentration bactérienne est importante.

A notre connaissance, nous montrons pour la première fois que la rouille verte peut être formée par bioréduction de la magnétite (**réaction n° 1, Figure 51**). Par conséquent, cela indique la réversibilité de la transformation par voie biotique de la rouille verte en magnétite (**réaction n° 2, Figure 51**). Cette dernière était jusque là considérée comme un produit final de la bioréduction des oxydes ferriques (**réaction n° 3, Figure 51**) ou d'oxydation biologique des composés ferreux (**réaction n°4, Figure 51**) avec la rouille verte comme minéral transitoire. La rouille verte jouerait donc bien le rôle de pivot lors des transformations biotiques des produits de corrosion ferrique (Fe^{III}) et ferreux (Fe^{II}), comme l'avait proposé (Herbillon, 2006).



- 1 Bioréduction de la magnétite en rouille verte (Etique *et al.*, in preparation) : **IRB**
- 2 Biooxydation des rouilles vertes en magnétite (Miot *et al.*, 2014) : **IONRB**
- 3 Bioréduction de la ferrihydrite ou lépidocrocite en magnétite (Fredrickson *et al.*, 1998; Ona-Nguema *et al.*, 2002) : **IRB**
- 3a Bioréduction de la ferrihydrite ou lépidocrocite en rouille verte (Fredrickson *et al.*, 1998; Ona-Nguema *et al.*, 2002) : **IRB**
- 3b Oxydation indirecte de la rouille verte en goethite (Etique *et al.*, 2014) : **NRB**
- 4 Bioréduction de la magnétite en sidérite ou vivianite (Dong *et al.*, 2000) : **IRB**, et biooxydation de la sidérite en magnétite (Chaudhuri *et al.*, 2001) : **IONRB**
- 4a Oxydation indirecte de la sidérite en rouille verte (Etique *et al.*, 2014) : **NRB**
- 4b Bioréduction de la rouille verte en chukanovite (Ona-Nguema *et al.*, 2009) : **IRB**
- 5 Bioréduction de la ferrihydrite ou lépidocrocite en sidérite, vivianite ou chukanovite (Fredrickson *et al.*, 1998; O'Loughlin *et al.*, 2010) : **IRB**, et oxydation indirecte de la sidérite en goethite (Etique *et al.*, 2014) : **NRB** ou biooxydation de la sidérite ou vivianite en goethite ou lépidocrocite (Kappler & Newman, 2004) : **IOB**

Figure 51. La rouille verte, un minéral pivot dans les processus de transformations microbiens du fer en anoxie ?

La magnétite, composé stable thermodynamiquement, forme un film passivant à la surface de l'acier non allié des colis de déchets radioactifs entreposés dans les argilites du Callovo-Oxfordien. Cependant, il est attendu qu'au cours du stockage, une proportion significative de dihydrogène sera produite, et si un biofilm bactérien se développe à l'interface fer / argilites il pourrait tout à fait profiter de cet apport de donneur d'électrons inorganiques, qui lui permettrait d'une part de répondre à ses besoins énergétiques, et d'autre part, d'économiser la ressource de carbone organique, sans doute limitante, pour l'engager uniquement dans la production de biomasse et non d'énergie. Le dihydrogène est un donneur majeur d'électrons pour les bactéries ferriréductrices constituant une partie de la population microbienne en place. Celles-ci sont capables de catalyser – *via* un transfert d'électrons depuis H₂ vers l'oxyde de fer mixte – la réduction de la magnétite en divers produits de corrosion finaux tels que les rouilles vertes et la sidérite. Les rouilles vertes, produits de corrosion métastables sont donc susceptibles d'être biominéralisées au cours de la réduction de la magnétite, et pourraient dès lors influencer sur les processus de corrosion par déplacement des équilibres déjà en place. Les IRB pourraient aussi être à l'origine de la formation d'hétérogénéités au sein de la couche de corrosion et pourraient induire des phénomènes de couplage galvanique (Romaine, 2014).

Les résultats de ce travail s'inscrivent également dans le thème de la genèse des minéraux des gisements de fer rubanés. Ces structures géologiques constituées d'une alternance de couches riches en oxydes ferriques comme la magnétite et l'hématite, et de couches riches en carbonates ferreux comme la sidérite, auraient été formées par une activité bactérienne primitive où le dihydrogène serait le donneur d'électrons le plus probable (Konhauser, 2007). Le rapport isotopique du fer, signature de l'intervention des bactéries, déterminé dans des grains de magnétite de 2,9 milliards d'années est très proche de celui observé dans les magnétites actuelles issues de la réduction dissimilatrice des espèces Fe(III) (Yamaguchi *et al.*, 2005). A savoir si la rouille verte n'aurait pas joué un rôle durant les activités bactériennes primitives de réduction et d'oxydation du fer reste une question ouverte. Son identification dans les gisements de fer rubanés renforcerait l'hypothèse de l'implication des bactéries dans les transformations magnétite/sidérite.

Chapitre V :

Activités des NRB sur les films de magnétite/sidérite à la surface de l'acier non allié

I. Introduction

Durant la période de stockage des déchets radioactifs en formation géologique profonde, la formation d'un film de magnétite surmonté d'une couche de sidérite à l'interface acier non allié/argilites du Callovo-Oxfordien est attendue (**Figure 20**). Les chapitres III et IV de ce manuscrit visent à accentuer les effets des bactéries sur le fer en travaillant respectivement avec des particules de sidérite et de magnétite en suspension présentant une surface de contact plus élevée que sous forme de films. Jusqu'à présent, aucune étude ne s'était intéressée à extrapoler l'influence des bactéries sur des particules de fer en suspension (telles que des particules de sidérite, **Figure 52a**) à des films de produits de corrosion (**Figure 52b**).

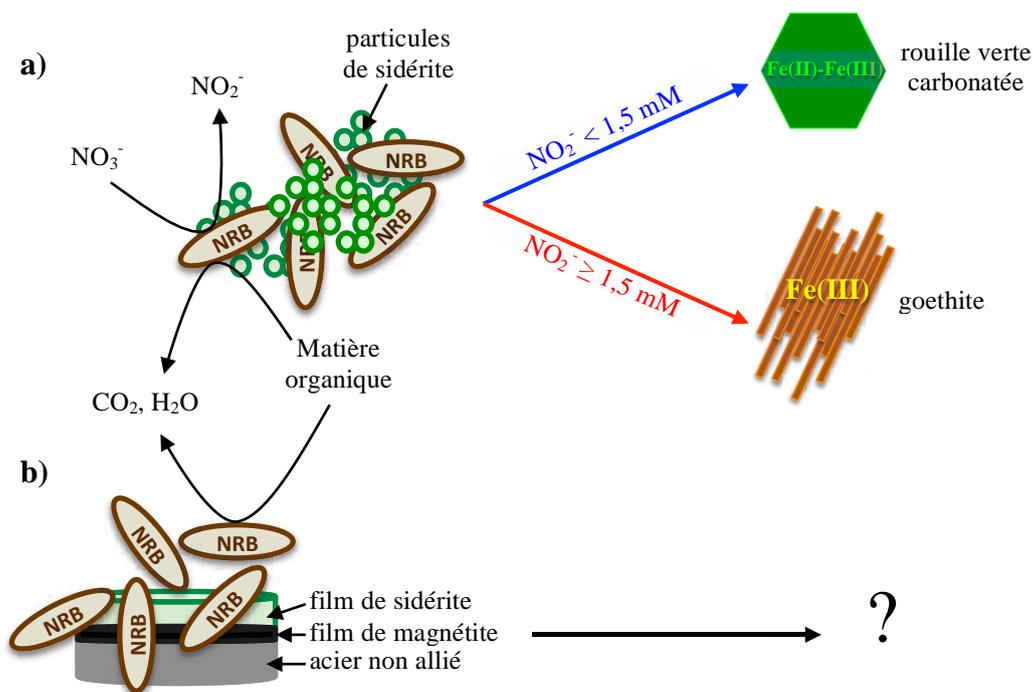


Figure 52. Représentation schématique des bactéries réductrices des nitrates (NRB) avec des particules de sidérite en suspension et les minéraux secondaires obtenus (a), et sur des films de magnétite/sidérite à la surface d'un acier non allié (b). Les nitrates et du carbone organique servent respectivement d'accepteur et de donneur d'électrons.

L'objectif de cette dernière partie de thèse était de synthétiser, par voie électrochimique, des films de magnétite/sidérite à la surface de l'acier non allié, puis de les

mettre en présence de NRB telles que *Klebsiella mobilis* (**Figure 52b**). Nous avons montré précédemment que l'activité de cette souche NRB entraînait l'oxydation de la sidérite particulière en rouille verte carbonatée et goethite, l'obtention de ces deux minéraux étant conditionnée par la quantité de nitrites biogénérés par *Klebsiella mobilis* (**Figure 52a**). Ces transformations de la sidérite sont-elles observées lorsque celle-ci est présente dans le milieu d'incubation sous forme de film surmontant une couche de magnétite à la surface d'un acier non allié ?

II. Matériels et méthodes

II.1. Génération par polarisation anodique à courant imposé d'un film de magnétite/sidérite à la surface d'un coupon en acier non allié

Les compétences en électrochimie permettant de générer une bicouche de magnétite/sidérite à l'interface acier non allié/argilites du Callovo-Oxfordien ont été acquises au Laboratoire des Sciences de l'Ingénieur pour l'Environnement (LaSIE UMR 7356) sous la direction du Professeur Philippe REFAIT et du Docteur Alexandre ROMAINE au cours de trois séjours d'une semaine. Ces techniques de synthèse électrochimique ont ensuite été transférées et appliquées au LCPME avec l'aide de l'équipe ELAN (chimie et électrochimie analytique).

Le matériau utilisé pour synthétiser un film de magnétite/sidérite est l'acier E24 (anciennement S235) – acier non allié mimant celui employé dans les surconteneurs des colis de déchets radioactifs – dont la composition est donnée dans le **Tableau 18**.

Tableau 18. Composition chimique de l'acier E24 déterminée par spectrométrie à émission optique (% massique).

| Fe | C | Si | Mn | P | S | Cr | Mo | Ni | Cu |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| 98,2 | 0,122 | 0,206 | 0,641 | 0,016 | 0,013 | 0,118 | 0,02 | 0,011 | 0,451 |

Des cylindres d'acier E24 de 2 cm² de surface et 1,5 cm de hauteur ont été enrobés à froid dans une résine époxy MA2 (Mécaprex), en ayant auparavant réalisé le soudage d'un fil de cuivre gainé sur la face arrière du cylindre pour assurer le contact électrique (60 % Sn, 40 % Pb) (**Figure 53**).



Figure 53. Soudure à l'étain et au plomb d'un fil de cuivre gainé sur la face arrière du cylindre d'acier E24.

L'enrobage permet d'isoler complètement les surfaces latérale et arrière des cylindres d'acier E24 afin que seule la face avant (2 cm²) soit en contact avec l'électrolyte (**Figure 54**). Celle-ci est ensuite polie au papier abrasif de carbure de silicium depuis un grade 80 jusqu'à un grade 600 – la granulométrie de la surface est alors comprise entre 46 µm et 25 µm – puis rincée à l'eau ultrapure et séchée.

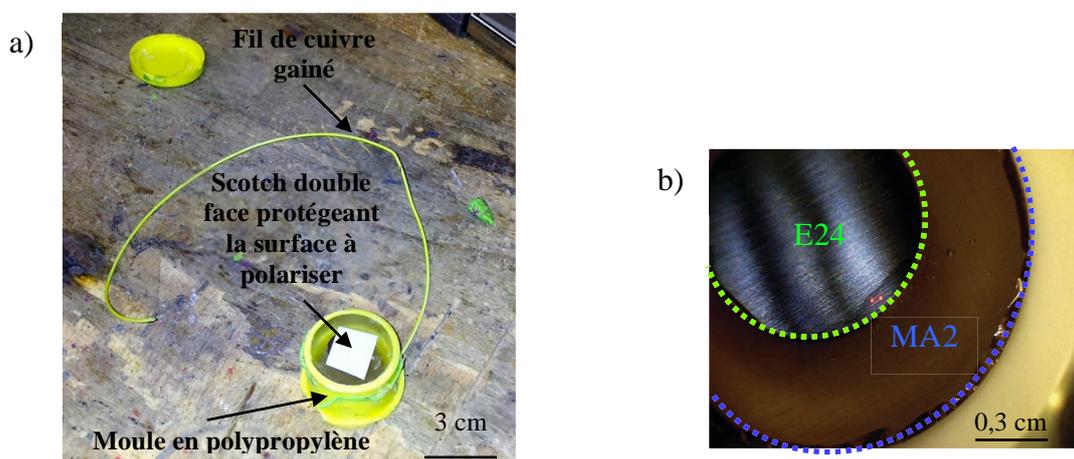


Figure 54. Photographies de l'électrode de travail constituée d'un disque d'acier E24 dont la surface à polariser est protégée par un scotch double face (a), après un temps de pose de 24 h dans une résine époxy à froid MA2 au sein d'un moule en polypropylène, et (b) coupon d'acier E24 enrobé dans la résine époxy MA2 et poli avec au grade 600 par l'utilisation successive de disques de carbure de silicium.

L'électrode de travail en acier E24 ainsi produite est recouverte par une fine couche d'argilites du Callovo-Oxfordien broyée finement et compactée avant d'être plongée dans une solution électrolytique contenant 0,05 M NaCl et 0,5 M NaHCO₃ à pH 7,0 ± 0,2. Cette dernière est soumise à une polarisation anodique (200 μA cm⁻²) pendant 72 h à température ambiante (25 °C) et à l'abri de la lumière, en utilisant un potentiostat VSP BioLogic en présence d'une contre-électrode de platine et d'une électrode de référence au calomel saturée (Figure 55).

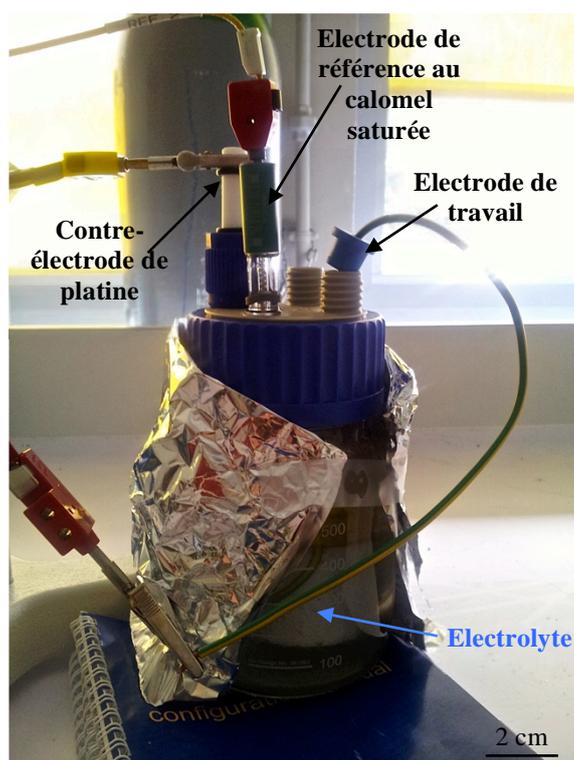


Figure 55. Montage permettant d'effectuer une polarisation anodique avec une densité de courant de 200 μA cm⁻² de l'électrode de travail en acier E24 surmontée d'une couche d'argilites du Callovo-Oxfordien dans une solution électrolytique à base de carbonates et de chlorures à 25 °C et à l'abri de la lumière durant 72 h.

La contre-électrode de platine a été fabriquée et optimisée au laboratoire, avec l'aide du doctorant Lukasz POLTORAK et du Chargé de Recherche Grégoire HERZOG (équipe ELAN, LCPME, UMR 7564), afin de minimiser les bruits de fond lors de la polarisation anodique (Figure 56).

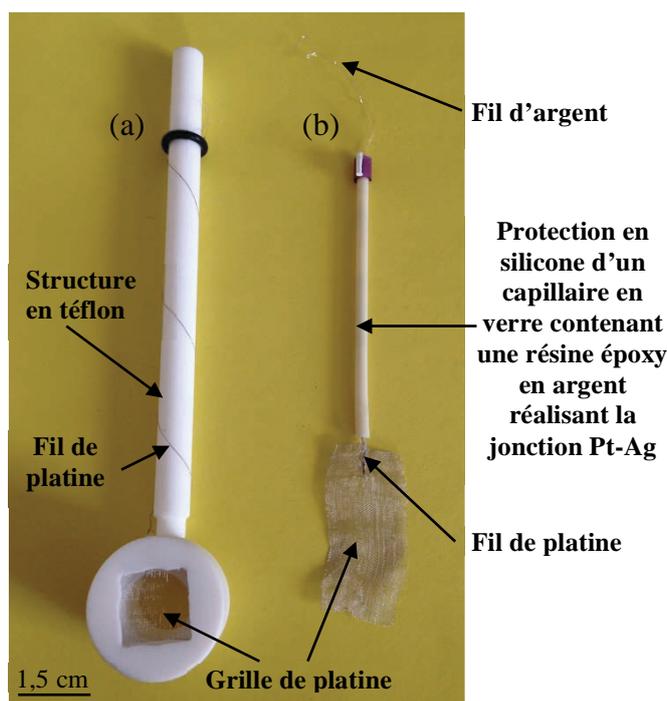


Figure 56. Photographies des contre-électrodes de platine (Pt) utilisées lors de la polarisation anodique à courant imposé : (a) grille de Pt maintenue par une structure en téflon, (b) grille de Pt soudée à l'arc électrique sur un fil de Pt de même pureté avec une jonction à un fil d'argent de pureté 99,99 % réalisée par une résine époxy en argent au sein d'un capillaire en verre recouvert d'une protection en silicone.

Une grille de platine (pureté 99,99 %) d'une longueur de 5 cm sur une largeur de 2,5 cm a été soudée à l'arc électrique sur un fil de platine de même pureté (longueur 1 cm et de diamètre 1 mm). Un capillaire (longueur 10 cm et diamètre 1,5 mm) a été fondu au bec Bunsen en exerçant des torsions rotatives autour du fil de platine sur une distance de 0,5 cm. L'étanchéité de ce système a été vérifiée en plongeant le capillaire recevant le fil de platine relié à la grille de platine dans de l'eau pendant 15 min. Ensuite, le capillaire a été rempli à son embasement (intérieur du capillaire en verre où dépasse le fil de platine) par une résine époxy à base d'argent (EPO-TEK H20S) à l'aide d'une seringue et d'une aiguille glissée dans le capillaire. Un fil d'argent de diamètre 0,5 mm et de longueur 5 cm a été inséré dans la résine époxy d'argent au fond du capillaire. La contre-électrode ainsi fabriquée a été séchée au four durant une nuit à 50 °C, puis refroidie à température ambiante et protégée des chocs dans une gaine en silicone (**Figure 56b**).

II.2. Culture de *Klebsiella mobilis* et préparation des milieux d'incubation en présence des films de magnétite/sidérite sous atmosphère H₂

La bactérie réductrice des nitrates, *Klebsiella mobilis*, a été cultivée selon le mode opératoire décrit précédemment (Chapitre III, section II.1). Brièvement, *Klebsiella mobilis*, conservée à – 80 °C, a été revivifiée sur une gélose de trypto-caséine soja (TSA), puis cultivée dans un bouillon de trypto-caséine soja durant 15 h à 30 °C sous une agitation orbitale de 180 rpm. Les bactéries ont été centrifugées (10000 g à 22 °C pendant 10 min), lavées deux fois et resuspendues dans du NaCl 9 ‰ afin d'obtenir une densité cellulaire finale de $(2,0 \pm 0,4) \times 10^{10}$ bactéries mL⁻¹. La suspension bactérienne a ensuite été barbotée sous N₂ (99,99 %) durant 30 min afin d'éliminer l'oxygène, puis introduite au travers d'un bouchon en butyle dans des flacons stériles de 500 mL, dégazés et scellés contenant : 5 mM MgSO₄·7H₂O, 7 mM CaCl₂·2H₂O, 1 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM Na₂SO₄, 10 mM NaHCO₃, 2 mM NaNO₃, 2 mM NH₄Cl, 2 mM KH₂PO₄, 10 mM CH₃CHOHCOONa, 1 mL L⁻¹ solution vitaminée (*Vitamin solution*, DSMZ GmbH, 2010), 1 mL L⁻¹ solution d'éléments traces (SL-10, DSMZ GmbH, 2010) au pH de $7,0 \pm 0,2$ ajusté avec une solution HCl 2 M. La concentration bactérienne initiale dans les flacons d'incubation était de $(8,3 \pm 0,4) \times 10^7$ UFC mL⁻¹. Chaque flacon d'incubation contenait un coupon d'acier non allié surmonté d'une bicouche de magnétite/sidérite fraîchement synthétisée, nettoyé en boîte à gants (95 % N₂, 5 % H₂) par une solution dégazée d'éthanol à 70 %, la stérilisation par la chaleur à 121 °C conduisant à l'oxydation de la bicouche. Du dihydrogène a été barboté dans les milieux d'incubation pendant 10 min avant d'imposer une pression de un bar de H₂ (99,9 %) dans l'espace de tête des flacons, correspondant à 0,8 mM de dihydrogène dissous (chapitre IV, section II.1). L'espace de tête a été rechargé quotidiennement en dihydrogène en conditions d'asepsie. Le montage expérimental est présenté **Figure 57**. L'étanchéité des flacons a été vérifiée quotidiennement par l'ajout de surfactant (savon). Les flacons ont été incubés à 30 °C pendant un mois à l'abri de la lumière.

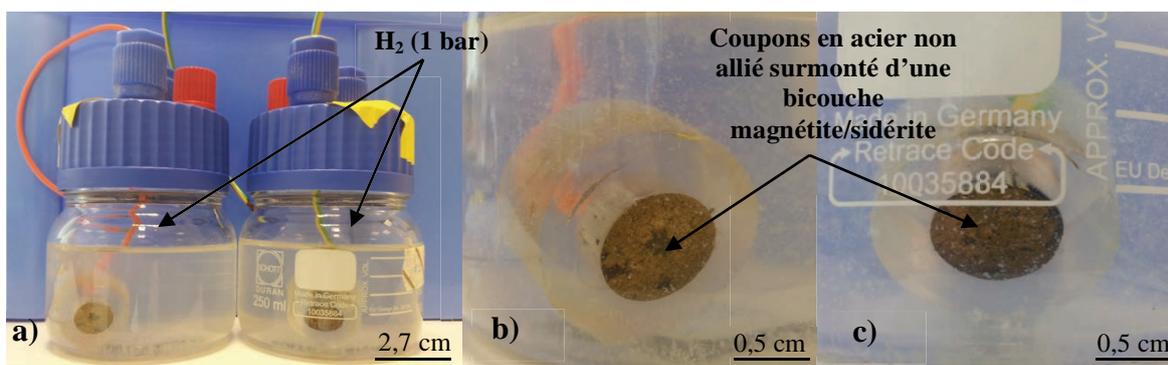


Figure 57. Flacons d'incubation contenant un coupon d'acier E24 surmonté d'une bicouche de magnétite/sidérite en présence de bactéries réductrices de nitrates (*Klebsiella mobilis*) sous atmosphère H_2 (1 bar) à 30 °C et à l'abri de la lumière (a). Les images (b) et (c) sont des grossissements des coupons incubés.

II.3. Analyses chimiques et instrumentation

Les concentrations des espèces Fe(II) et du Fe total (solide + solution) ont été analysées par la méthode de la ferrozine en chambre anaérobie après extraction dans HCl 2 M (Viollier *et al.*, 2000). Le potentiel rédox et le pH de la solution ont également été mesurés.

Des analyses du solide en spectroscopie Raman à l'air ambiant ont été réalisées après avoir préalablement séché l'échantillon en chambre anaérobie. Les produits de corrosion présents sur l'intégralité de la surface du coupon étant répartis de manière inhomogène, des analyses en diffraction des rayons X ($\lambda_{K\alpha}$: 1,54060 Å) ont été développées avec l'aide du Docteur Isabelle BIHANNIC (LIEC, UMR 7360, CNRS – Université de Lorraine). Un programme informatique a été créé afin de balayer la surface du coupon par un faisceau de rayons X selon une ligne définie et d'observer la variabilité de répartition et de nature des produits de corrosion présents à la surface du coupon en acier non allié. Les espèces solides du fer ont ensuite été caractérisées par spectroscopie Mössbauer en transmission à partir des poudres de produits de corrosion récupérées par grattage de la surface du coupon.

III. Résultats et discussion

III.1. Caractérisation de la bicouche magnétite/sidérite à la surface de l'acier non allié

Durant la polarisation anodique à courant imposé de l'électrode de travail en acier E24 recouverte d'argilites du Callovo-Oxfordien, les variations du potentiel d'électrode E_h ont été suivies en fonction du temps (**Figure 58**). Au cours des six premières heures, E_h augmente rapidement de $-0,67$ V à $-0,60$ V, puis plus lentement de $-0,60$ V à $-0,58$ V jusqu'à 72 h. L'augmentation de E_h signifierait probablement que les couches de produits de corrosion générées à l'interface entre l'acier non allié E24 sont en train de croître en épaisseur. La couche d'argilites du Callovo-Oxfordien semble ne pas empêcher le passage du courant (faible augmentation de E_h durant 72 h : $\Delta E_h = +0,09$ V) suggérant que les produits de corrosion formés à la surface de l'acier non allié seraient vraisemblablement poreux et peu adhérents (Romaine, 2014). La couche d'argilites du Callovo-Oxfordien permet un confinement des espèces de Fe(II) produites à la surface de l'acier non allié.

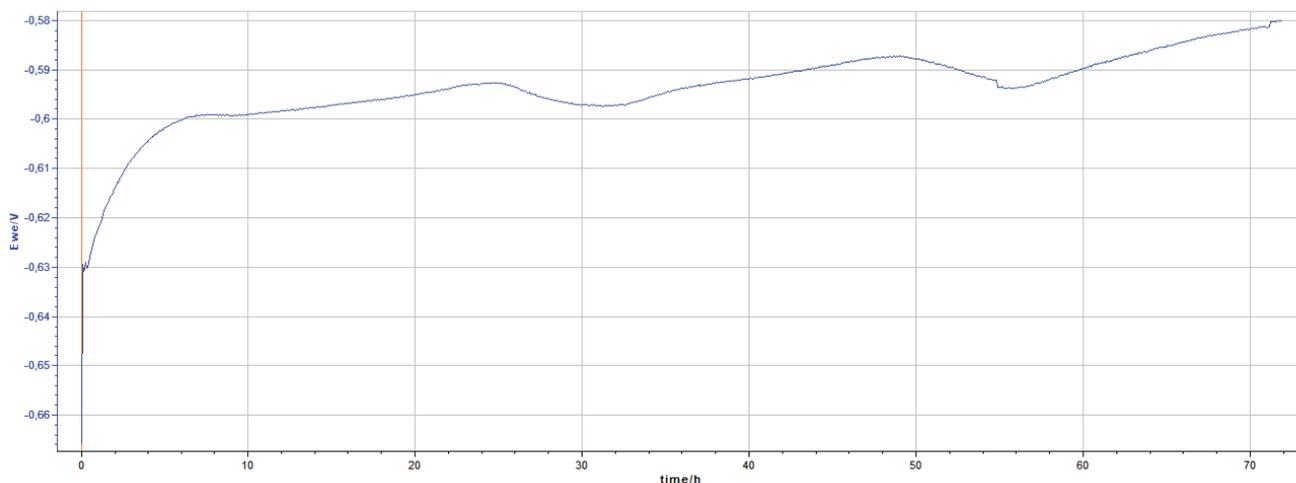


Figure 58. Courbe chronopotentiométrique observée lors de la polarisation anodique à courant imposé ($200 \mu A cm^{-2}$) pendant 72 h à température ambiante ($25 \text{ }^\circ C$) d'un coupon d'acier non allié E24 recouvert d'argilites du Callovo-Oxfordien et plongé dans une solution électrolytique de bicarbonate de sodium (0,5 M) et de chlorure de sodium (0,05 M).

Une fois la polarisation anodique à courant imposé terminée, le coupon d'acier E24 recouvert d'argilites du Callovo-Oxfordien est rincé en chambre à atmosphère contrôlée (95 % N₂, 5 % H₂) à l'eau pure dégazée, puis à l'éthanol 70 % dégazé. Les produits de corrosion générés par voie électrochimique apparaissent : une phase claire, poreuse et peu adhérente recouvrant majoritairement la face externe du coupon, et une phase sombre lisse sous-jacente en contact avec l'acier E24 (**Figure 59**). L'apparition de la phase sombre est due à un détachement de la phase claire lors du rinçage de la couche d'argilites du Callovo-Oxfordien.



Figure 59. Observation des produits de corrosion formés à la surface de l'acier E24 non allié recouvert d'argilites du Callovo-Oxfordien après une polarisation anodique à courant imposé ($200 \mu\text{A cm}^{-2}$) de 72 h à température ambiante (25 °C) dans une solution électrolytique de bicarbonate de sodium (0,5 M) et de chlorure de sodium (0,05 M). Les produits de corrosion clairs sont peu adhérents (ils sont évacués lors du protocole de rinçage de la couche d'argilites du Callovo-Oxfordien) et sont visuellement poreux. Les produits de corrosion sombres présentent un aspect lisse et sont visibles lorsque les produits de corrosion clairs ont été emportés par le rinçage.

Les spectres Raman réalisés sur les phases claires et sombres observées précédemment (**Figure 59**) ont permis de déterminer la nature de ces phases. Le spectre Raman du produit de corrosion clair, d'aspect poreux et peu adhérent, présente des bandes de fréquences à 185 cm^{-1} , 283 cm^{-1} , 730 cm^{-1} et 1086 cm^{-1} (**Figure 60a**), caractéristiques de la sidérite (Saheb *et al.*, 2008). L'analyse en spectroscopie Raman de la phase sombre, sous-jacente à la phase claire, met en évidence la présence de bandes caractéristiques à 308 cm^{-1} , 527 cm^{-1} et 667 cm^{-1} (**Figure 60b**), correspondant à celles de la magnétite (de Faria *et al.*, 1997). La sidérite et la magnétite sont donc les deux produits de corrosion majeurs.

identifiés à la surface de l'acier non allié E24 recouvert d'argilites de Callovo-Oxfordien après une polarisation anodique de 72 h à 25 °C dans une solution électrolytique de NaHCO₃ (0,5 M) et NaCl (0,05 M) à pH 7,0 ± 0,2.

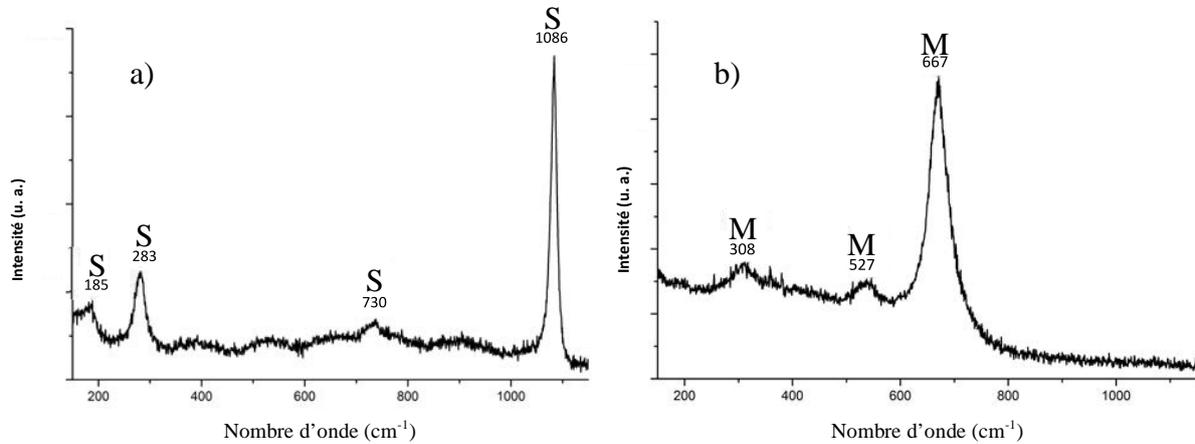


Figure 60. Spectres Raman des phases claire (a) et sombre (b) générées à la surface de l'acier E24 non allié recouvert d'argilites du Callovo-Oxfordien après une polarisation anodique à courant imposé (200 $\mu\text{A cm}^{-2}$) de 72 h à température ambiante (25 °C) dans une solution électrolytique de bicarbonate de sodium (0,5 M) et de chlorure de sodium (0,05 M). Les produits de corrosion clair et sombre correspondent respectivement à la sidérite (S) et à la magnétite (M).

Des caractérisations supplémentaires ont été effectuées par diffraction des rayons X avec un balayage de la surface d'analyse par le faisceau de rayons X. Quel que soit le point analysé, les principaux minéraux identifiés à la surface du coupon en acier non allié sont la sidérite ($d = 3,58 \text{ \AA}, 2,78 \text{ \AA}, 2,34 \text{ \AA}, 1,96 \text{ \AA}, 1,79 \text{ \AA}, 1,73 \text{ \AA}, 1,72 \text{ \AA}, 1,51 \text{ \AA}, 1,36 \text{ \AA}$) (Graf, 1961), le quartz ($d = 4,26 \text{ \AA}, 3,34 \text{ \AA}, 2,12 \text{ \AA}$) (Levien *et al.*, 1980) et la calcite ($d = 3,03 \text{ \AA}$) (Markgraf & Reeder, 1985) (**Figure 61**). Aucune différence n'est constatée entre les phases sombres et claires qui auparavant, correspondaient respectivement à la magnétite et la sidérite d'après les analyses en spectroscopie Raman. Ici, seule la sidérite est observée suggérant probablement qu'elle est en quantité plus importante que la magnétite et/ou mieux cristallisée. La présence de quartz et de calcite peut être attribuée à un résiduel d'argilites du Callovo-Oxfordien à la surface de la sidérite, le rinçage n'étant probablement pas suffisamment efficace pour se débarrasser de ces résidus. Aux extrémités de l'échantillon analysé (+6 et -10) (**Figure 61**), la large bande de diffraction s'étendant de 7 \AA à 3,7 \AA correspond à la diffraction de la résine époxy entourant le coupon en acier non allié.

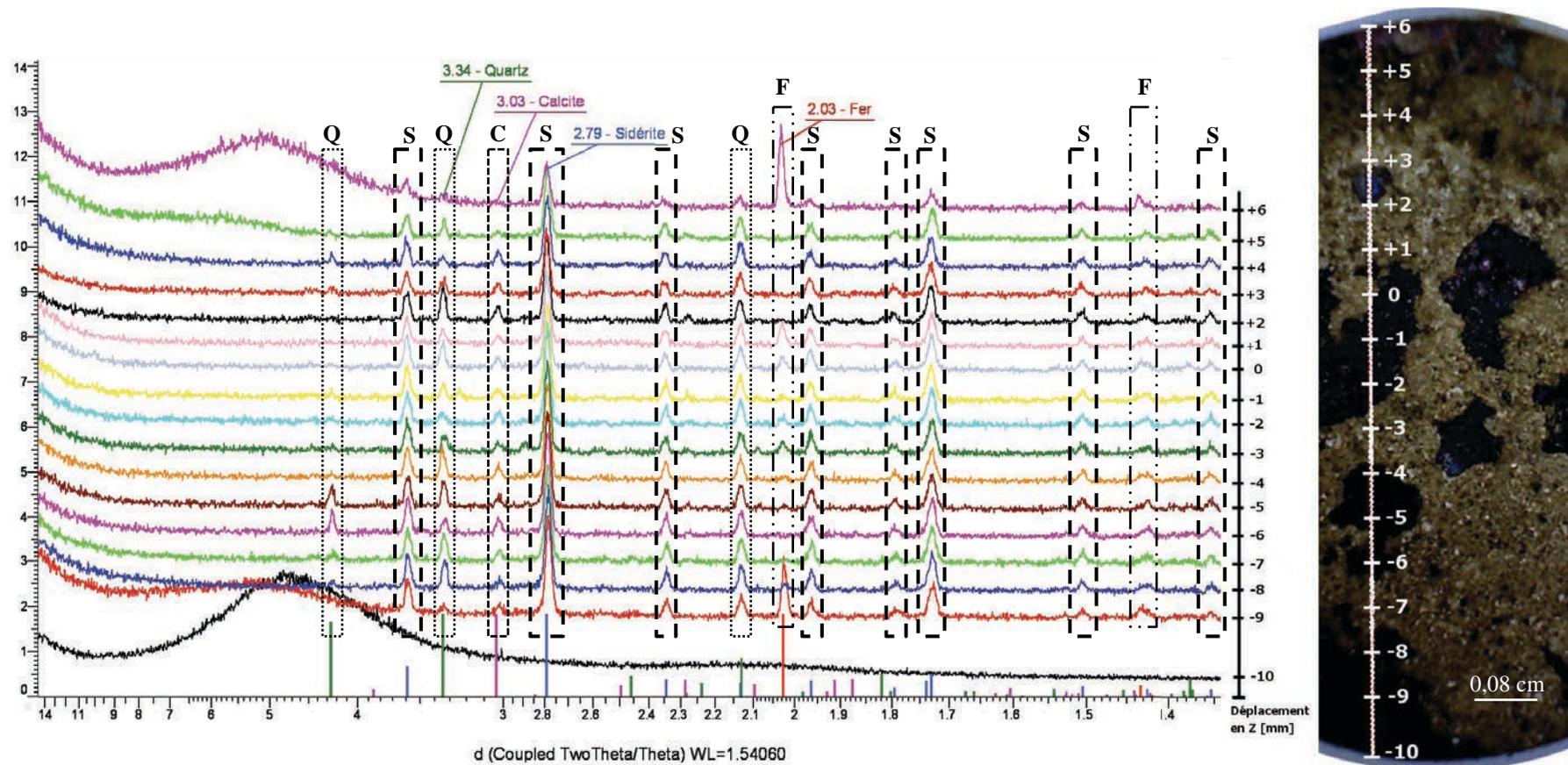


Figure 61. Diffractogrammes des phases sidérite (S), quartz (Q) et calcite (C) réparties selon la ligne d'analyse à la surface de l'acier non allié (F) après une polarisation anodique à courant imposé ($200 \mu\text{A cm}^{-2}$) de 72 h à température ambiante ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) dans une solution électrolytique de bicarbonate de sodium (0,5 M) et de chlorure de sodium (0,05 M).

Les raies de diffraction du fer métallique sont parfois observées sur certains points d'analyse (+6, +1, 0, -2, -3, -8 et -9) (**Figure 61**) signifiant probablement que l'épaisseur de la couche sus-jacente de produits de corrosion est faible. L'absence de magnétite sur les diffractogrammes réalisés sur le même échantillon que celui analysé précédemment par spectroscopie Raman paraissant très surprenante, nous nous sommes orientés vers des analyses en spectroscopie Mössbauer afin d'identifier la nature des produits de corrosion issus de la polarisation anodique à courant imposé du coupon en acier non allié sous une couche d'argilites du Callovo-Oxfordien, et de quantifier la proportion des phases sidérite et magnétite.

Les analyses Mössbauer des produits de corrosion récupérés à la surface de l'acier E24 après polarisation anodique ont été effectuées à 295 K, 77 K et 7 K. Les spectres Mössbauer obtenus sont présentés par la **Figure 62** et les paramètres hyperfins dans le **Tableau 19**.

Tableau 19. Paramètres hyperfins des produits de corrosion formés à la surface de l'acier non allié par polarisation anodique à courant imposé. CS est le *center shift* par rapport à la référence α -Fe (mm s^{-1}), Δ est l'éclatement quadrupolaire (mm s^{-1}), H est le champ magnétique hyperfin (kOe), A. R. est l'abondance relative de chacun des sites (%). Les lettres « D, O et S » signifient respectivement « doublet, octuplet et sextuplet ».

| Température d'analyse | Nature des sites | CS (mm s^{-1}) | Δ ou 2ϵ (mm s^{-1}) | H (kOe) | A. R. (%) |
|-----------------------|-------------------------------------|---------------------------|--|-----------|-----------|
| 295 K | D ₁ (Fe ^{II}) | 1,21 | 1,95 | – | 83 |
| | D ₂ (Fe ^{III}) | 0,24 | 0,61 | – | 17 |
| 77 K | D ₁ (Fe ^{II}) | 1,22 | 2,29 | – | 43 |
| | D ₂ (Fe ^{II}) | 1,26 | 2,75 | – | 19 |
| | D ₃ (Fe ^{II}) | 1,22 | 1,81 | – | 22 |
| | D ₄ (Fe ^{III}) | 0,24 | 1,14 | – | 16 |
| 7 K | O ₁ (Fe ^{II}) | 1,41 | 2,15 | 154 | 53 |
| | O ₂ (Fe ^{II}) | 1,58 | - 2,38 | 99 | 32 |
| | S ₃ (Fe ^{III}) | 0,53 | - 0,21 | 514 | |
| | S ₄ (Fe ^{III}) | 0,35 | 0,00 | 443 | |
| | S ₅ (Fe ^{II}) | 2,21 | 0,20 | 366 | 15 |
| | S ₆ (Fe ^{III}) | 0,72 | 0,24 | 517 | |

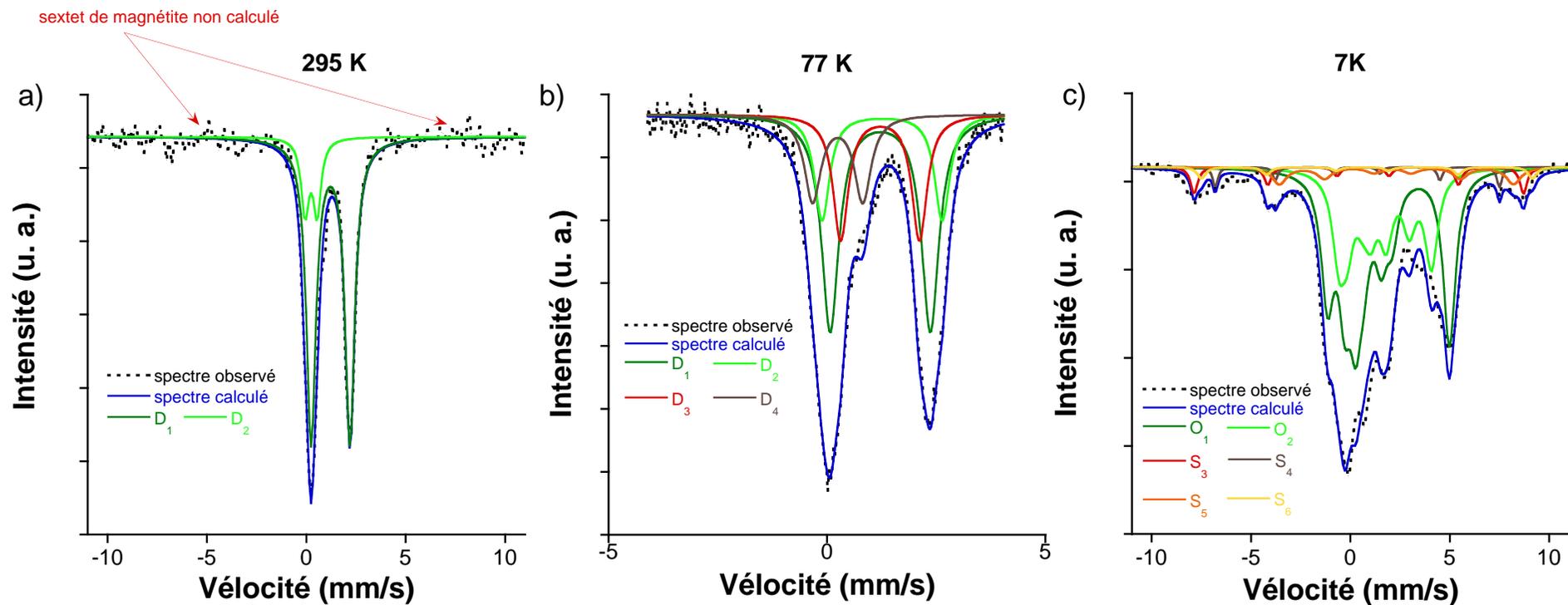


Figure 62. Spectres Mössbauer à 295 K (a), 77 K (b) et 7 K (c) des produits de corrosion formés par polarisation anodique à courant imposé ($200 \mu\text{A cm}^{-2}$) durant 72 h à température ambiante ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) dans une solution électrolytique de bicarbonate de sodium (0,5 M) et de chlorure de sodium (0,05 M). Le spectre (a) présente deux doublets : D_1 est attribué aux espèces Fe(II)-carbonates (83 %), D_2 correspond aux espèces Fe(II-III) de la magnétite (17 %). Le spectre (b) comporte quatre doublets : D_1 , D_2 et D_3 représentent les porteurs des espèces Fe(II)-carbonates (43 %, 19 %, 22 %), D_4 est attribué à la magnétite (16 %). Le spectre (c) met en évidence deux octuplets, attribués vraisemblablement aux porteurs des espèces Fe(II) de la sidérite (O_1 , 53 %) et de la chukanovite (O_2 , 32 %), et quatre sextuplets (S_3 , S_4 , S_5 , S_6) correspondant aux espèces Fe(II-III) de la magnétite (15 %).

Le spectre Mössbauer à 295 K présente deux doublets D₁ et D₂ (**Figure 62a**) avec, respectivement, un déplacement *CS* de 1,21 mm s⁻¹ et 0,24 mm s⁻¹, et un éclatement quadrupolaire Δ de 1,95 mm s⁻¹ et 0,61 mm s⁻¹ (**Tableau 19**). D'après la littérature, les paramètres hyperfins du doublet D₁ sont typiques de ceux de la sidérite à 295 K avec $CS = 1,22 \pm 0,03$ mm s⁻¹ et $\Delta = 1,79 \pm 0,04$ mm s⁻¹ (Sawicki *et al.*, 1995 ; Ahmed *et al.*, 2007). Les paramètres hyperfins à 295 K du doublet D₂ correspondraient probablement à ceux de la magnétite superparamagnétique avec $CS = 0,26 \pm 0,02$ mm s⁻¹ et $\Delta = 0,02 \pm 0,02$ mm s⁻¹ (Cornell & Schwertmann, 2003) ou à ceux de la pyrite (Fe(II) bas spin) avec $CS = 0,31 \pm 0,02$ mm s⁻¹ et $\Delta = 0,61 \pm 0,02$ mm s⁻¹ (Manning & Ash, 1979). A cette température ambiante de 295 K, la distinction entre la pyrite et la magnétite est difficile. Afin de déterminer au mieux la nature des produits de corrosion de l'acier non allié, les spectres Mössbauer ont été réalisés en abaissant la température d'analyse à 77 K et 7 K. Le spectre Mössbauer mesuré à 77 K est décomposé en 4 doublets (**Figure 62b**) dont les trois premiers correspondent aux sites des espèces Fe(II)-carbonates (D₁, D₂, D₃), et le dernier doublet (D₄) aux sites des espèces Fe(II-III) de la magnétite. A 7 K, le spectre Mössbauer présente deux octuplets (O₁, O₂) et quatre sextuplets (S₃, S₄, S₅, S₆) (**Figure 62c**). Les octuplets correspondent à l'éclatement des doublets porteurs des espèces Fe(II)-carbonates car la diminution de température provoque un ordonnancement magnétique des noyaux de fer, et les sextuplets sont attribués ici sans ambiguïté aux sites des espèces Fe(II-III) de la magnétite, et non aux sites des espèces Fe(II) bas spin de la pyrite qui devraient rester paramagnétiques (donc sous la forme de doublet) à la température de 7 K (Gallagher *et al.*, 1969). L'octuplet O₁ présente un éclatement quadrupolaire $\Delta = 2,15$ mm s⁻¹ et un champ magnétique hyperfin $H = 154$ kOe (**Tableau 19**) qui ont des valeurs proches de celles de la sidérite où $\Delta = 1,91$ mm s⁻¹ et $H = 166$ kOe (Sawicki *et al.*, 1995). L'octuplet O₂ possède un *center shift* $CS = 1,58$ mm s⁻¹ et un champ magnétique hyperfin $H = 99$ kOe (**Tableau 19**), ces valeurs sont proches de celles obtenus pour la chukanovite (communication personnelle de M. Abdelmoula).

Ainsi, les produits de corrosion présents à la surface du coupon seraient : la sidérite (53 %), un autre carbonate ferreux probablement la chukanovite (32 %) et la magnétite (15 %) (**Tableau 19**). Le couplage des techniques d'analyse du solide (DRX, spectroscopies Raman et Mössbauer) permettant de caractériser la bicouche magnétite/ « sidérite » prend ici

toute son importance et nous a permis d'identifier au mieux la bicouche générée par voie électrochimique que nous appellerons « magnétite/(sidérite-chukanovite) » dans la suite de ce chapitre.

III.2. Incubation de *Klebsiella mobilis* en présence de films magnétite/(sidérite-chukanovite) sous atmosphère en dihydrogène

III.2.1. Absence de variations du potentiel d'électrode E_h et du pH au cours de la période d'incubation bactérienne

Le potentiel d'électrode et le pH mesurés au cours des 21 jours d'incubation de *Klebsiella mobilis* en présence des coupons d'acier non allié surmontés d'une bicouche de magnétite/(sidérite-chukanovite) sont restés constants : $E_h = -480 \text{ mV} \pm 10 \text{ mV}$ et $\text{pH} = 7,02 \pm 0,5$. Sous l'apparente inertie de ces paramètres physico-chimiques, les coupons ont pris une coloration noire (**Figure 63**), ainsi que la suspension dans laquelle étaient incubés les coupons. La concentration en fer ferreux de la suspension (solide + liquide) de $10 \pm 2 \text{ mM}$ correspond à la concentration en fer total. Une partie des produits de corrosion est présente en suspension dans le milieu d'incubation.



Figure 63. Aspect noirâtre avec des zones plus claires de la surface du coupon d'acier non allié surmonté d'une bicouche de magnétite/(sidérite-chukanovite) après trois semaines d'incubation avec la souche réductrice des nitrates *Klebsiella mobilis* en présence de lactate (10 mM), nitrate (2 mM) et dihydrogène (1 bar).

III.2.2. Transformation de la bicouche magnétite/(sidérite-chukanovite) en mackinawite et greigite par *Klebsiella mobilis*

Afin d'analyser la nature des produits de corrosion secondaires après un contact avec les NRB de 21 jours, un coupon a été prélevé sous une hotte à balayage d'azote et une forte odeur soufrée s'est dégagée lors de l'extraction, indiquant la présence de sulfures de dihydrogène. Le coupon a été séché sous flux d'azote puis analysé en spectroscopie Raman. A température ambiante, le spectre Raman des produits de corrosion secondaires présente les bandes caractéristiques de la mackinawite (FeS) à 213 cm⁻¹, 255 cm⁻¹, 306 cm⁻¹ (Bourdoiseau *et al.*, 2008), ainsi que les bandes typiques de la greigite (Fe₃S₄) à 185 cm⁻¹ et 364 cm⁻¹ (Bourdoiseau *et al.*, 2011) (**Figure 64**).

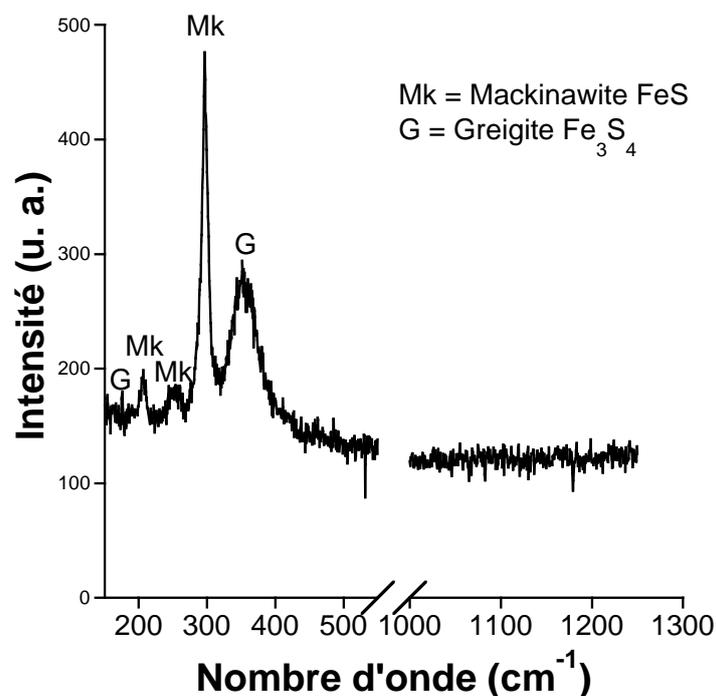


Figure 64. Spectre Raman des produits de corrosion observés à la surface de l'acier non allié surmonté d'une bicouche magnétite/(sidérite-chukanovite) après 21 jours d'incubation avec *Klebsiella mobilis* à 30 °C sous atmosphère H₂.

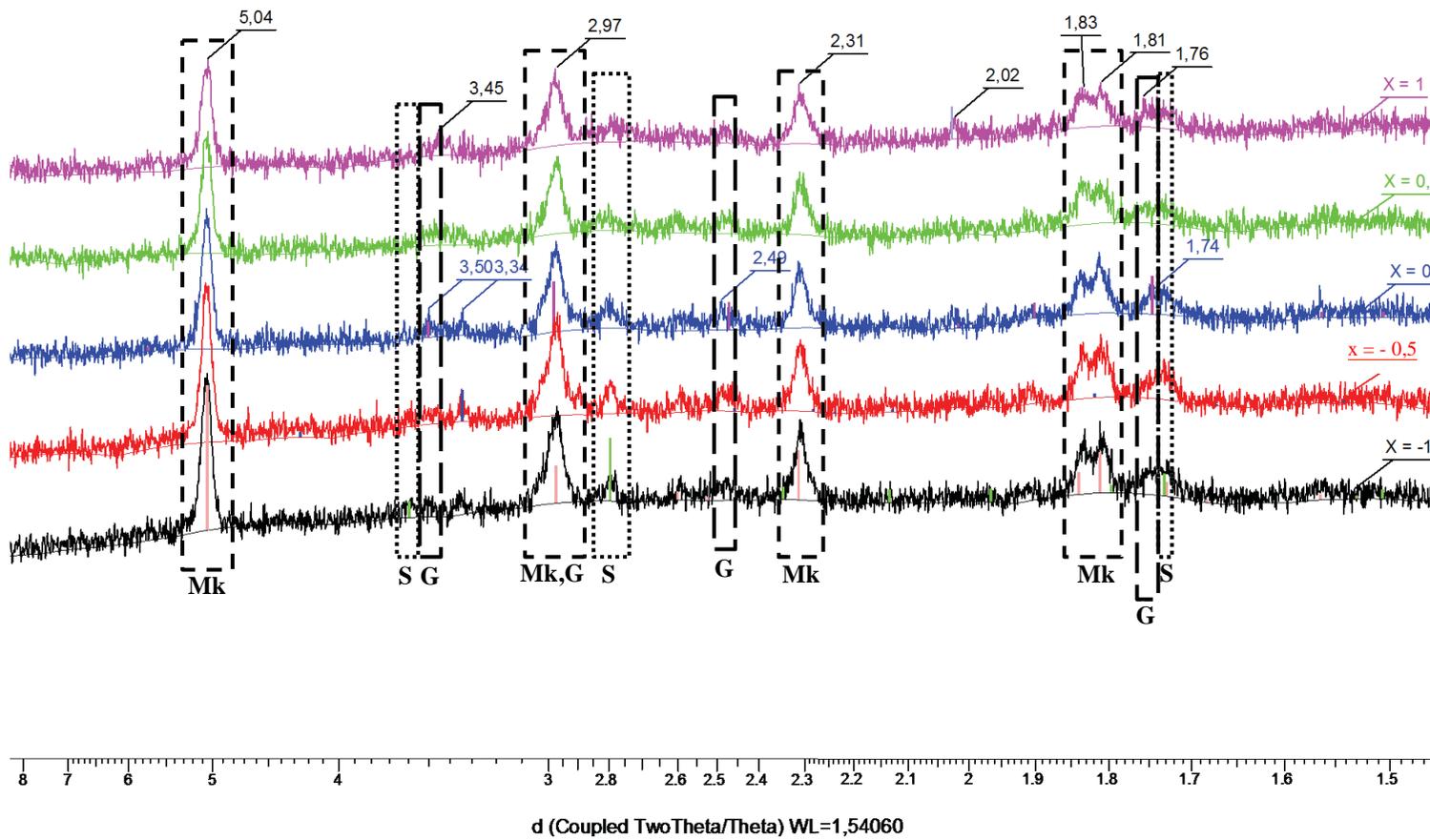


Figure 65. Diffractogrammes pris en différents points de la surface de l'acier non allié recouvert de produits de corrosion mackinawite (Mk), greigite (G), sidérite (S).

La présence de greigite – $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{S}_4$, composé thermodynamiquement métastable et souvent présent comme produit de corrosion intermédiaire à la mackinawite et à la pyrite (Ning *et al.*, 2014) – pourrait être liée à l’oxydation de la mackinawite à l’air ambiant lors des analyses du solide (Bourdoiseau *et al.*, 2011). Cependant, cette mackinawite semble relativement stable aussi bien au cours des analyses en spectroscopie Raman que au cours des analyses en diffraction des rayons X. Aucun signe d’une oxydation brutale de la mackinawite en greigite puis en lépidocrocite n’a été observé durant les 12 h de balayage par le faisceau de rayons X de la surface du coupon (**Figure 65**). La mackinawite est identifiée grâce aux raies de diffraction à 5,04 Å, 2,97 Å, 2,31 Å, 1,83 Å, et 1,81 Å (**Figure 65**) (Lennie *et al.*, 1995). La greigite présente des raies de diffraction caractéristiques à 3,50 Å, 2,97 Å, 2,49 Å, et 1,74 Å (**Figure 65**) (Skinner *et al.*, 1964). Les diffractogrammes obtenus apportent cependant des informations supplémentaires, notamment sur la présence de sidérite résiduelle caractérisée par les raies de diffraction à 3,58 Å, 2,79 Å et 1,73 Å (Graf, 1961) (**Figure 65**).

Les phases mackinawite, greigite et sidérite présentes à la surface du coupon après mise en contact avec les bactéries réductrices des nitrates pendant 21 jours ont été quantifiées par spectrométrie Mössbauer en réflexion à la température de 295 K sous atmosphère ambiante (**Figure 66**). Le résiduel de sidérite détecté par DRX a été estimé à 17 % par la présence du doublet D_2 présentant un déplacement CS de $1,02 \text{ mm s}^{-1}$ et un éclatement quadrupolaire Δ de $2,37 \text{ mm s}^{-1}$. Les phases mackinawite et greigite ont été respectivement estimées à 13 % et 39 % avec les paramètres hyperfins: $CS = 0,41 \text{ mm s}^{-1}$ pour le singulet (Si_1) de la mackinawite (**Figure 66**) ; et $CS = 0,45 \text{ mm s}^{-1}$ et $0,10 \text{ mm s}^{-1}$, $\Delta = -0,09 \text{ mm s}^{-1}$ et $0,03 \text{ mm s}^{-1}$, $H = 365 \text{ kOe}$ et 331 kOe pour les deux sextuplets S_1 et S_3 de la greigite (**Figure 66**) (Vaughan & Ridout, 1971). Ici, la forte proportion de greigite par rapport à la fraction de mackinawite est probablement due à une oxydation à l’air de la mackinawite. En effet, le temps d’accumulation a été relativement important (une semaine) afin d’améliorer la quantification des différentes phases carbonatées et sulfurées par rapport à la présence majoritaire du signal du fer zéro-valent présent sous la forme d’un sextuplet (S_2) sur le spectre Mössbauer (**Figure 66**). Les proportions de sidérite, mackinawite et greigite ont été estimées sans tenir compte de la contribution du fer métallique de l’acier non allié du coupon.

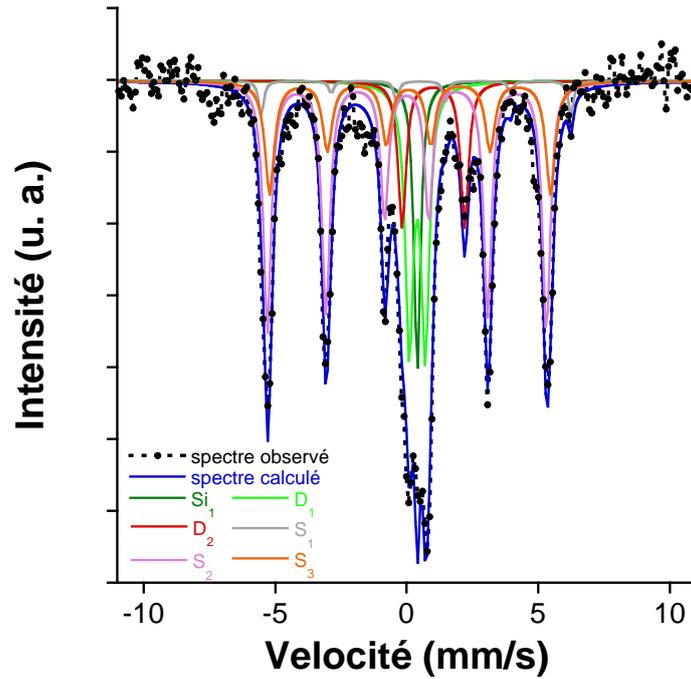


Figure 66. Spectre Mössbauer des minéraux secondaires présents à la surface du coupon en acier non allié surmonté des couches de magnétite/(sidérite-chukanovite) mis en contact 21 jours avec *Klebsiella mobilis*. La mackinawite est représentée par un singulet (Si_1) et quantifiée à hauteur de 13 %. La sidérite résiduelle est identifiable par un doublet (D_2) et évaluée à 17 %. La greigite est caractérisée par la présence de deux sextuplets (S_1 et S_3) et estimée à 39 %. Le sextuplet majoritaire (S_2) correspond au fer métallique du coupon en acier non allié. Le doublet D_1 correspondrait probablement aux sites Fe^{II} ou Fe^{III} mais n'ont pour le moment pas été attribués.

La présence de mackinawite et de greigite à la surface du coupon en acier non allié implique la présence de sulfures de dihydrogène dans le milieu, ce qui est assez inattendu étant donné que la souche bactérienne n'est pas sulfatoréductrice et que le soufre était présent en principe seulement sous forme de sulfate (15 mM initialement). Néanmoins, on ne peut exclure une « fuite » de sulfure qui résulterait de la réduction du sulfate par les voies assimilatrices (réduction anabolique) pour satisfaire les besoins en acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et en thiols de la bactérie en croissance (Peck, 1961) (Eq. 30 et 31) :



Le soufre comptant pour environ 1 % de la masse cellulaire sèche, cette voie assimilatrice du soufre à partir de sulfate peut conduire à la libération d'une quantité significative de sulfures lors de la dégradation du matériel cellulaire à l'issue de la mort cellulaire suivie d'une autolyse de la cellule par exemple (Postgate, 1959 ; Peck, 1961). Pendant la période d'incubation, le nombre de bactéries cultivables a chuté de $(8,3 \pm 0,4) \times 10^7$ UFC mL⁻¹ à $(5,5 \pm 0,7) \times 10^4$ UFC mL⁻¹ en trois semaines. Soit, en se basant sur une masse cellulaire sèche de 0,2 pg par cellule et en retenant une lyse de $\sim 10^8$ cellules mL⁻¹, environ 0,1 mM de soufre réduit est susceptible d'avoir été ainsi libéré. Pour valider cette hypothèse, le dosage des ions sulfates ($[\text{SO}_4^{2-}]_{\text{initiale}} = 15$ mM) par chromatographie ionique permettrait de confirmer leur réduction en ions sulfures, qui peuvent aussi être quantifiés par spectrophotométrie au bleu de méthylène.

Un témoin abiotique (absence de *Klebsiella mobilis*) a été réalisé. Durant l'incubation abiotique du coupon magnétite/(sidérite-chukanovite) aucun phénomène de transformation de ces produits de corrosion n'a été constaté ; le pH et le potentiel rédox sont restés constants : pH = 7,02 et $E_h = -460$ mV ce qui montre que les transformations observées sont bien liées à la présence des bactéries. De plus, un milieu spécifique de croissance des bactéries sulfatoréductrices (DSMZ 63) a été inoculé par 1 mL du milieu d'incubation ayant mis en évidence la formation de sulfures de fer en présence de *Klebsiella mobilis*. Dans ce milieu DSMZ 63, la présence de bactéries sulfatoréductrices entraînerait la précipitation de sulfures de fer liée à la réduction dissimilatrice des sulfates par les SRB. Ainsi, s'il y a une contamination de nos expériences par des SRB, le milieu DSMZ 63 deviendra trouble et noir dû aux précipités de FeS. Aucun trouble ni apparition de précipités n'ont été constatés après 15 jours d'incubation à 30 °C signifiant qu'aucune SRB n'a pu se développer. L'hypothèse d'une contamination par une ou des bactéries sulfatoréductrices présentes dans les argilites du Callovo-Oxfordien (ayant servi à la synthèse de la bicouche magnétite/(sidérite-chukanovite)) ou le milieu d'incubation peut alors être écartée. Cela renforce l'idée d'une réduction assimilatrice des sulfates en sulfures par *Klebsiella mobilis* qui serait à l'origine de la transformation de la bicouche magnétite/(sidérite-chukanovite) en mackinawite et greigite.

Les sulfures sont fortement réactifs vis-à-vis du fer ferrique (Rickard, 1974 ; Pyzik & Sommer, 1981 ; Dos Santos Afonso & Stumm, 1992 ; Peiffer *et al.*, 1992 ; Yao & Millero,

1996 ; Poulton *et al.*, 2004) qui est ici présent sous forme de magnétite à la surface des coupons en acier non allié. Au contact des sulfures dissous, les (oxyhydr)oxydes de fer sont réduits en fer ferreux selon la séquence réactionnelle suivante (Dos Santos Afonso & Stumm, 1992) :

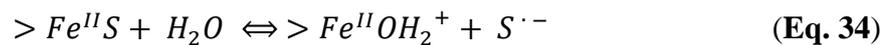
(i) Formation d'un complexe de surface :



(ii) Transfert d'électrons :



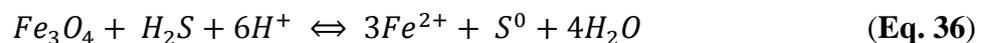
(iii) Libération du produit oxydé :



(iv) Détachement des espèces Fe(II) :



La réaction de formation d'un complexe de surface (**Eq. 32**) se déroule généralement rapidement à la surface des (oxyhydr)oxydes de fer et est immédiatement suivie d'un transfert d'électrons (**Eq. 33**) (Dos Santos Afonso & Stumm, 1992 ; Poulton *et al.*, 2004). Les radicaux $S^{\cdot -}$ libérés (**Eq. 34**) réagissent instantanément avec des espèces additionnelles de Fe(III) pour conduire à un composé soufré de degré d'oxydation supérieur. Les espèces Fe(II) ainsi produites à la surface des (oxyhydr)oxydes de fer vont en solution (**Eq. 35**). Dans le cas de la magnétite, le composé final soufré majoritaire est le soufre élémentaire S^0 (**Eq. 36**) (Poulton *et al.*, 2004), et le fer ferreux en solution peut réagir avec des ions sulfures dissous encore présents pour conduire à la précipitation de FeS (**Eq. 37**).



Ainsi, la formation de mackinawite (FeS) pourrait s'expliquer par la combinaison d'une réaction biologique – libération des ions sulfures lors de la réduction anabolique des ions sulfates par *Klebsiella mobilis* – et d'une réaction abiotique – réduction du fer ferrique par les ions sulfures biogénérés et précipitation de mackinawite.

IV. Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif d'étudier l'influence de *Klebsiella mobilis* (NRB) sur les films de magnétite/sidérite formés à la surface de l'acier non allié. Dans un premier temps, la synthèse d'une bicouche magnétite/(sidérite-chukanovite) a été réalisée par polarisation anodique à courant imposé d'un coupon d'acier non allié recouvert d'argilites du Callovo-Oxfordien (couche de confinement) plongé dans une solution électrolytique contenant 0,5 M de NaHCO₃ et 0,05 M de NaCl (pH 7, température ambiante de 25 °C, à l'abri de la lumière, 72 h). Les produits de corrosion générés à la surface de l'acier non allié ont été caractérisés par spectroscopie Raman, spectroscopie Mössbauer et diffraction des rayons X. Ces techniques d'analyse du solide ont été complémentaires et ont permis de mettre en évidence la présence d'une phase poreuse grisâtre constituée de sidérite (53 %) et de chukanovite (32 %), surmontant une couche noire de magnétite (15 %).

La synthèse de la bicouche magnétite/(sidérite-chukanovite) ayant été bien contrôlée, les coupons ont, dans un second temps, été incubés trois semaines en présence de *Klebsiella mobilis* sous atmosphère de dihydrogène. Les produits de corrosion secondaires générés à la surface de l'acier non allié au cours de cette période d'incubation ont été identifiés comme des sulfures de fer. Bien que ce phénomène soit complètement inattendu, la mackinawite (FeS) et la greigite (Fe₃S₄) ont pu être produites au cours de la réduction anabolique des sulfates en sulfures par *Klebsiella mobilis*. L'hypothèse selon laquelle ces sulfures proviendraient d'une SRB ayant contaminé le milieu a été écartée.

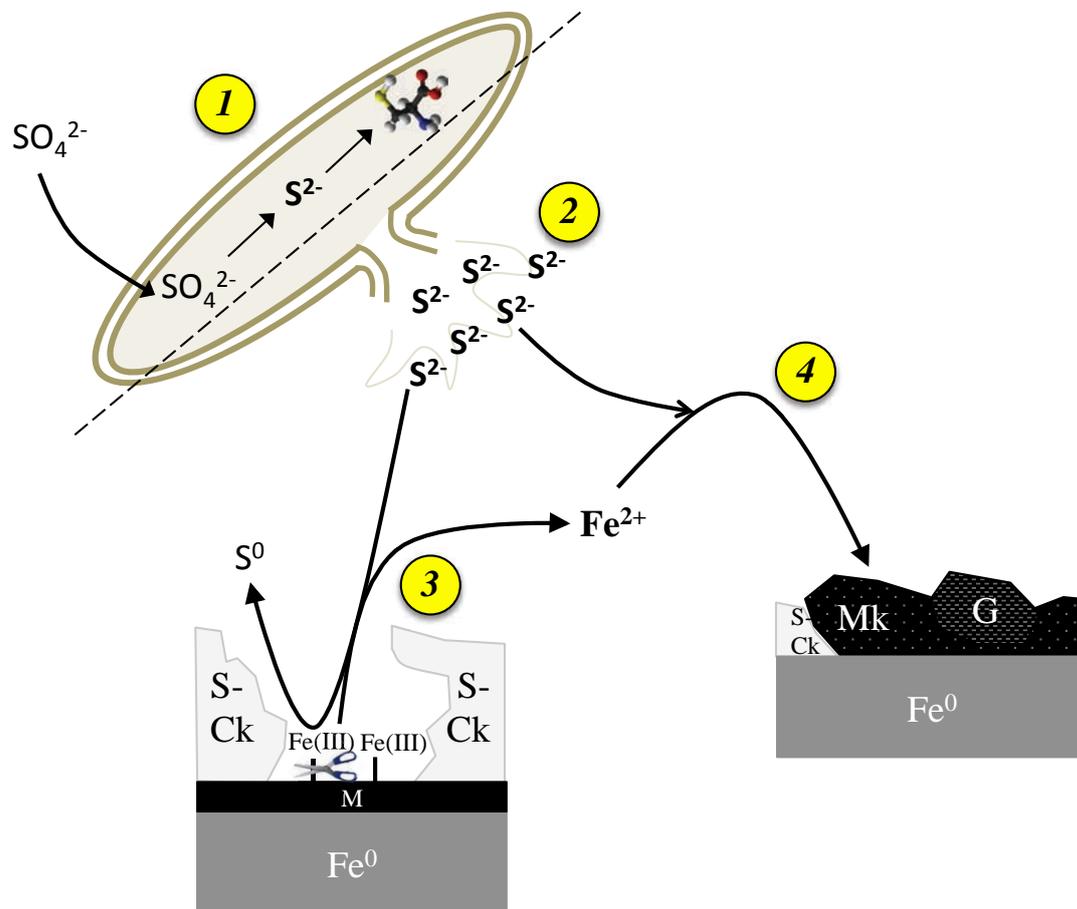


Figure 67. Réduction indirecte de la magnétite en mackinawite lors de l'assimilation des sulfates par *Klebsiella mobilis*. **1** En conditions de croissance, la réduction anabolique des sulfates en sulfures biogéniques permet de répondre aux besoins en soufre (e.g. cystéine). **2** Lors de l'autolyse bactérienne, la paroi se rompt et libère une quantité importante de sulfures biogéniques dans le milieu d'incubation. **3** Ces derniers réagissent spontanément avec les espèces Fe(III) en surface de la magnétite (M), qui est accessible grâce à la porosité de la couche sidérite-chukanovite (S-Ck) sus-jacente, et entraînent la production de soufre élémentaire et d'ions Fe^{2+} . **4** Ceux-ci précipitent alors en mackinawite (Mk) au contact des sulfures encore présents dans le milieu d'incubation. La mackinawite serait probablement oxydée en greigite (G) au contact de l'air ambiant.

En conditions de croissance, *Klebsiella mobilis* réduit les sulfates en sulfures pour assimiler le soufre et répondre à ses besoins en acides aminés (cystéine, méthionine) et en coenzymes soufrés (e.g. biotine) (**réaction n°1, Figure 67**). Lors de la mort cellulaire associée à une autolyse, la dégradation de ces molécules soufrées apporterait suffisamment de sulfures (**réaction n°2, Figure 67**) pour réagir avec la magnétite. Bien qu'étant surmontée d'une couche de sidérite-chukanovite, la porosité de cette dernière permettrait aux ions

sulfures de réagir avec le fer ferrique présent en surface de la magnétite. Au contact des sulfures biogéniques, les espèces Fe(III) seraient alors rapidement réduites en ions Fe^{2+} avec une production conjointe de soufre élémentaire (**réaction n°3, Figure 67**). Les ions Fe^{2+} ainsi libérés en solution précipiteraient avec les sulfures biogéniques encore présents pour conduire à la formation de mackinawite et de greigite (**réaction n°4, Figure 67**). Ces sulfures de fer, issus indirectement de la réduction anabolique des sulfates par *Klebsiella mobilis*, semblent stables en condition aérobie. Les cellules et les polymères bactériens pourraient stabiliser les produits formés comme cela a déjà été observé pour la rouille verte.

Contrairement à ce qui était attendu (cf. Chapitre III), la sidérite n'a pas été oxydée indirectement en rouille verte carbonatée et/ou goethite par *Klebsiella mobilis*. Cette expérience sur films de magnétite/(sidérite-chukanovite) présente cependant des divergences avec celle menée sur les poudres de sidérite : (i) un milieu d'incubation favorable à la croissance de *Klebsiella mobilis* plutôt que des conditions de carence nutritive ; (ii) une atmosphère de H_2 plutôt que N_2 ; (iii) la sidérite en film poreux surmontant une couche de magnétite à la surface d'un acier non allié plutôt que des particules de sidérite en suspension.

CONCLUSIONS – DISCUSSION

L'objectif général de cette thèse visait à étudier l'influence des bactéries réductrices des nitrates (NRB) et du fer ferrique (IRB) sur les produits de corrosion magnétite et sidérite, ces derniers étant attendus à la surface d'un acier non allié se corrodant en milieu anoxique. Pour mener à bien cette étude, la stratégie retenue a consisté à utiliser des bactéries comme modèles des activités des NRB et des IRB, soient respectivement *Klebsiella mobilis* (syn. *Enterobacter aerogenes*) et *Shewanella putrefaciens*, et à les incuber, dans un premier temps en présence de poudres de sidérite et de magnétite – afin d'exacerber les processus de transformation du fer du fait d'une surface spécifique élevée – et dans un deuxième temps en présence de films électrogénérés de ces produits pour se rapprocher des conditions d'un acier non allié corrodé en anoxie.

Le premier volet a consisté à incuber une suspension de sidérite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}_3$) en présence de *Klebsiella mobilis*, préalablement cultivées en milieu complet. Le milieu d'incubation, en conditions anoxiques, ne contenait aucun donneur d'électrons et seuls les nitrates (de 4 mM à 40 mM) représentaient un pool d'accepteurs d'électrons disponible pour supporter l'activité bactérienne. Dans ces conditions, il était attendu que l'état physiologique de la cellule soit relativement proche de celui rencontré dans le milieu environnemental. Durant la période d'incubation de trois semaines, la sidérite a été oxydée en rouille verte carbonatée ($\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) et/ou en goethite ($\alpha\text{-Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$). Nous avons pu mettre en évidence un mécanisme hybride de réactions biotique et abiotique aboutissant à une oxydation des espèces Fe(II) ; il s'agit donc d'une réaction microbienne indirecte d'oxydation de la sidérite. La première étape de ce mécanisme est biotique et repose sur la réduction des nitrates en nitrites selon un métabolisme respiratoire par *Klebsiella mobilis*. Privé de donneur organique d'électrons externe, *Klebsiella mobilis* mobilise ses réserves endogènes d'électrons pour réduire les nitrates en nitrites dans des quantités restreintes (< 1,5 mM). Au contact de la sidérite, les nitrites biogénérés sont réduits en ammonium et le fer ferreux est oxydé en fer ferrique conduisant à la précipitation de rouille verte carbonatée sur la surface bactérienne. Cet oxyhydroxyde de fer mixte, stabilisé par la présence de cellules et de polymères bactériens, est progressivement oxydé en goethite par les nitrates en excès dans le milieu

d'incubation. Ces réactions d'oxydation des espèces Fe^{II} en $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{III}}$ puis Fe^{III} constituent l'étape abiotique de ce mécanisme hybride de transformation de la sidérite.

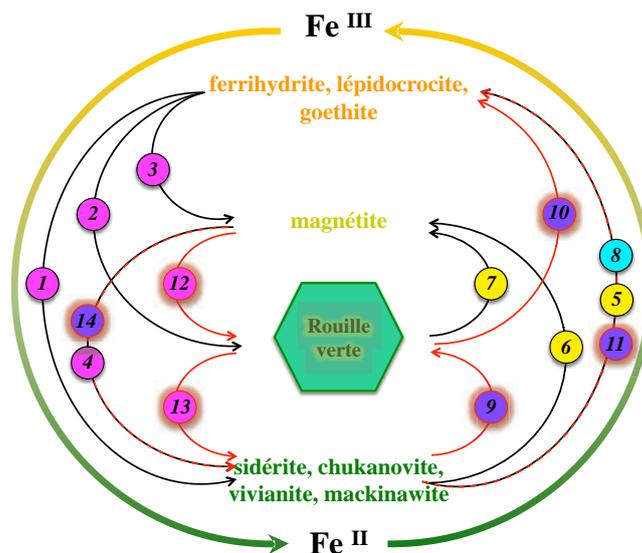
L'étape biotique du processus étant limitée par la disponibilité des réserves endogènes d'électrons de *Klebsiella mobilis*, il a été possible de l'amplifier en supplémentant le milieu d'incubation en donneur organique d'électrons (*e.g.* lactate). La nature du minéral secondaire est alors contrôlée par la teneur en donneur organique d'électrons, qui module donc bien la production de nitrites. Ainsi, pour une concentration inférieure à 1,5 mM de nitrites, la rouille verte carbonatée était observée dans le milieu d'incubation. En revanche, à de plus fortes concentrations, seule la goethite était identifiée, les cinétiques d'oxydation abiotique du fer ferreux étant dès lors très rapides. Le **chapitre III** de ce manuscrit de thèse a donc permis de démontrer que la rouille verte carbonatée est un intermédiaire réactionnel au cours de l'oxydation microbienne indirecte de la sidérite en goethite.

Dans un second volet, une suspension de magnétite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$) a été incubée en présence de *Shewanella putrefaciens* sous atmosphère de dihydrogène dans un milieu carencé en donneur organique d'électrons. Durant la période d'incubation de trois semaines, la magnétite a été réduite en rouille verte carbonatée et/ou en sidérite. Nous avons pu démontrer, par l'expérience et la théorie, que la réduction microbienne directe de la magnétite est possible à pH 7. Pour ce faire, il convenait de prendre en compte la nature des phases secondaires générées dans les calculs thermodynamiques de l'énergie libre de la réaction $\Delta_r G^0$. Nous avons aussi confirmé la réduction dissolutive du fer ferrique en fer ferreux par *Shewanella putrefaciens* à l'aide de diagrammes E_h -pH de Pourbaix. La magnétite, considérée jusqu'à présent comme un minéral très peu bioréductible, a été réduite jusqu'à 30 % dans nos conditions expérimentales où la surface spécifique des particules de magnétite et la concentration bactérienne ont été modifiées. En effet, plus ces deux paramètres, déterminants dans la biodisponibilité du fer ferrique pour la respiration anaérobie de *Shewanella putrefaciens*, étaient importants, plus la magnétite était bioréduite et conduisait à une production importante de fer ferreux qui précipitait en rouille verte carbonatée et/ou sidérite. Ce **chapitre IV** a permis aussi de mettre en évidence la formation de la rouille verte carbonatée en tant qu'intermédiaire réactionnel au cours de la réduction microbienne directe de la magnétite en sidérite.

Le dernier volet concernait les transformations microbiennes des films de magnétite/sidérite. La synthèse de ces films a été réalisée par polarisation anodique d'un coupon d'acier recouvert d'une couche d'argilites du Callovo-Oxfordien dans une solution électrolytique de carbonates de sodium et de chlorures de sodium. La bicouche ainsi formée était constituée d'un film de magnétite (15 %) en contact direct avec l'acier non allié, surmontée d'une couche poreuse et peu adhérente de sidérite (53 %) et d'un autre carbonate ferreux, vraisemblablement de la chukanovite (32 %), qui est l'homologue hydroxylé de la sidérite de formule $\text{Fe}^{\text{II}}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$. La conception de cette bicouche par voie électrochimique étant bien maîtrisée, nous avons étudié sa transformation au contact de *Klebsiella mobilis* dans un milieu d'incubation à pH 7 sous atmosphère saturée en dihydrogène. Durant la période d'incubation de trois semaines, la bicouche de magnétite/(sidérite-chukanovite) a été réduite en mackinawite et/ou transformée en greigite, des sulfures de fer de formules chimiques respectives $\text{Fe}^{\text{II}}\text{S}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{S}_4$, contrairement à ce qui était attendu d'après les expériences sur poudre de sidérite. Nous avons élaboré l'hypothèse d'un nouveau mécanisme encore basé sur la combinaison d'un processus biologique (biotique) et d'un processus chimique (abiotique). La première étape, biotique, consisterait en une réduction anabolique des sulfates par *Klebsiella mobilis*, les sulfures issus de cette assimilation réductrice seraient libérés en quantité significative lors de l'autolyse bactérienne (mort cellulaire). Dans la seconde étape, abiotique, ces sulfures réagiraient spontanément avec le fer ferrique de la magnétite pour conduire à la formation de mackinawite et/ou de greigite d'après des mécanismes d'adsorption/transfert d'électrons bien documentés. En perspective de ce **chapitre V**, il conviendrait, pour valider l'existence d'un mécanisme de réduction microbienne des sulfates, de suivre notamment leur disparition et leur transformation en sulfures.

Nous avons donc vu au cours de ce travail de thèse que l'oxydation indirecte de la sidérite et que la réduction directe/indirecte de la magnétite peuvent être gouvernées par l'activité microbienne anaérobie et conduire potentiellement à la formation de rouille verte. La capacité à réduire les nitrates en nitrites (NRB) et la respiration anaérobie du fer (IRB) sont des propriétés répandues parmi les communautés bactériennes du sol. Reste donc à se poser la question de savoir si ces réactions pourraient se produire dans les conditions de stockage des déchets de haute activité à vie longue (HAVL) telles que décrites pour le site Cigéo (Meuse/Haute-Marne, France). La période oxydante étant très brève sur l'échelle des

temps géologiques (< 10 ans), la phase anoxique et réductrice (-500 mV, pH 7) débutera pendant la phase thermique du stockage estimée à 90 °C maximum. A cette température, des microorganismes hyperthermophiles partageant tous la capacité à respirer le fer ferrique pourront éventuellement subsister, voire se multiplier si l'apport en carbone organique, évalué à 1,4 % par gramme de matière sèche dans le milieu de stockage, est suffisant. La probabilité que des bactéries hyperthermophiles, présentes en général dans les fonds marins à haute pression, se retrouvent dans ce milieu n'est pas à négliger puisqu'à l'ère du Callovo-Oxfordien, l'océan Téthys recouvrait la France, notamment la région de Meuse/Haute-Marne. On ne peut cependant exclure que des bactéries thermophiles, moins inattendues sous des pressions atmosphériques, puissent résister au-delà de 80 °C. Ainsi, la magnétite attendue à la surface de l'acier non allié pourrait en toute vraisemblance servir d'accepteur d'électrons dans la respiration anaérobie du fer par des bactéries (hyper)thermophiles et amener à la formation de rouille verte et/ou de sidérite, comme nous l'avons montré avec une bactérie anaérobie *Shewanella putrefaciens*, mais qui est mésophile. Peut-on alors s'attendre à des réactions similaires à des températures supérieures à 80 °C ? Rien n'est moins sûr pour la rouille verte qui n'est plus stable au-delà de 80 °C tandis que la sidérite l'est. Il n'est pas non plus à exclure que des bactéries ferroxydantes hyperthermophiles telle que la souche *Ferroglobus placidus* puissent se développer et conduire à l'oxydation de la sidérite, phase ferreuse carbonatée majoritaire attendue à la surface de l'acier non allié, en rouille verte ou goethite par couplage avec la réduction d'un accepteur d'électrons tel que les nitrates ou encore les thiosulfates en présence de dihydrogène. Bien que présentant le potentiel rédox le plus élevé en anoxie pour les communautés bactériennes du sol, les nitrates sont mesurés dans des concentrations inférieures à l'ordre du millimolaire dans l'eau porale du Callovo-Oxfordien, ce qui peut représenter un facteur limitant. Au fur et à mesure du stockage, la température diminuera progressivement pour atteindre celle de la couche argileuse du Callovo-Oxfordien à 20 °C – 30 °C. Dans ces conditions thermiques, les bactéries anaérobies mésophiles pourront éventuellement se développer mais leur croissance sera sans doute considérablement limitée par les ressources nutritives. Néanmoins, la présence de dihydrogène estimée à $10^1 - 10^2$ moles an^{-1} par alvéole dans le milieu de stockage HAVL pourrait apporter les électrons nécessaires à la fixation de carbone inorganique (e.g. CO_2 , aragonite, calcite) par chimiosynthèse pour les microorganismes autotrophes par rapport au carbone.



Activités des bactéries ferriréductrices (IRB) :

- 1 Bioréduction de la ferrihydrite ou lépidocrocite en sidérite, vivianite ou chukanovite (Fredrickson *et al.*, 1998; O'Loughlin *et al.*, 2010)
- 2 Bioréduction de la ferrihydrite ou lépidocrocite en rouille verte (Fredrickson *et al.*, 1998; Ona-Nguema *et al.*, 2002)
- 3 Bioréduction de la ferrihydrite ou lépidocrocite en magnétite (Fredrickson *et al.*, 1998; Ona-Nguema *et al.*, 2002)
- 4 Bioréduction de la magnétite en sidérite ou vivianite (Dong *et al.*, 2000)
- 12 Bioréduction de la magnétite en rouille verte (Etique *et al.*, in preparation)
- 13 Bioréduction de la rouille verte en sidérite (Etique *et al.*, in preparation)

Activités des bactéries ferroxydantes réductrices des nitrates (IONRB) :

- 5 Biooxydation de la sidérite ou de la vivianite en goethite (Kappler *et al.*, 2005; Miot *et al.*, 2009a)
- 6 Biooxydation de la sidérite en magnétite (Chaudhuri *et al.*, 2001)
- 7 Biooxydation des rouilles vertes en magnétite (Miot *et al.*, 2014)

Activités des bactéries ferroxydantes (IOB) :

- 8 Biooxydation de la pyrite, sidérite ou vivianite en goethite ou lépidocrocite (Kappler & Newman, 2004)

Activités des bactéries réductrices des nitrates (NRB):

- 9 Oxydation indirecte de la sidérite en rouille verte (Etique *et al.*, 2014)
- 10 Oxydation indirecte de la rouille verte en goethite (Etique *et al.*, 2014)
- 11 Oxydation indirecte de la sidérite en goethite (Etique *et al.*, 2014)
- 14 Réduction indirecte de la magnétite en mackinawite (Etique *et al.*, in preparation)

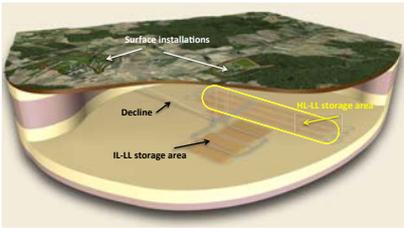
Figure 68. Implications des groupes métaboliques IRB, IOB, IONRB et NRB dans le cycle biogéochimique du fer en anoxie. La rouille verte se trouverait au cœur des processus de transformations des oxydes et oxyhydroxydes de fer. Le caractère purement enzymatique de l'oxydation des espèces Fe(II) en anaérobie (réactions n° 5-7) est en discussion. Pour les réactions n° 1, 5, 8 et 11 il n'est pas exclu que la transformation implique un passage transitoire par la rouille verte.

De plus, le dihydrogène est un donneur d'électrons intéressant à utiliser pour les bactéries hydrogénotrophes (*e.g.* genres *Shewanella*, *Geobacter*) en raison de sa diffusion passive dans les membranes et le cytoplasme, mais surtout parce qu'il permet d'économiser la ressource de carbone organique. Dans nos conditions expérimentales, nous avons volontairement travaillé dans des conditions nutritives restreintes (pas d'ajout de carbone organique ni de phosphore) qui, en stressant les bactéries, les rapprochent des conditions physiologiques dans lesquelles elles se trouvent probablement dans les environnements oligotrophes tels que la zone de stockage des HAVL.

L'originalité de ce travail de thèse réside donc dans la prise en considération de métabolismes bactériens tels que l'activité réductrice des nitrates (NRB) ou l'activité ferriréductrice (IRB), souvent délaissés, voire ignorés dans les processus de biocorrosion, contrairement aux métabolismes sulfato-réducteurs par exemple qui sont examinés depuis des décennies. Les NRB et IRB sont capables de transformer des produits de corrosion comme la sidérite ou la magnétite en rouille verte. Ce composé occupe ici une place centrale dans le cycle biogéochimique du fer en anoxie (**Figure 68**), décrivant la circulation de cet élément dans les différents compartiments de l'environnement en absence d'oxygène. La rouille verte apparaît comme une phase transitoire commune à plusieurs réactions microbiennes directes (**réactions n° 1 à 8 et 12-13, Figure 68**) ou indirectes (**réactions n° 9 à 11 et 14, Figure 68**) mobilisant le fer sous deux états d'oxydation différents Fe^{II} et Fe^{III} . La plupart des oxyhydroxydes et oxydes de fer sont les précurseurs de la rouille verte ou simplement des produits de sa transformation.

A l'échelle du laboratoire, nous avons mis en évidence par ce travail de thèse que les produits de corrosion sidérite et magnétite peuvent être transformés par l'activité bactérienne des NRB et IRB en minéraux secondaires variés tels que la rouille verte carbonatée, la goethite, la mackinawite ou encore la greigite. Cette diversité de minéraux secondaires pourrait impacter et accélérer les processus de corrosion se déroulant à la surface d'un acier non allié en augmentant notamment les potentiels couplages galvaniques entre les différentes phases de fer. Cette étude ayant été menée en fixant certains paramètres comme le pH, la pression en hydrogène, la densité cellulaire (**Tableau 20**), il serait donc délicat d'extrapoler ces résultats à une échelle plus importante, celle du milieu de stockage des déchets radioactifs HAVL.

Tableau 20. Variations des paramètres expérimentaux à l'échelle du laboratoire et à l'échelle du stockage souterrain des déchets radioactifs HAVL

| | Echelle du laboratoire (cette étude) | Echelle du stockage des déchets radioactifs HAVL |
|--|---|---|
| |  |  |
| pH | 7 | 7 – 9 |
| Concentration en nitrates (mM) | 4 – 40 | < 1 |
| Température (°C) | 30 | 30 – 90 |
| Densité cellulaire (cellules mL⁻¹) | 10 ⁷ – 10 ⁹ | ? |
| Diversité bactérienne | NRB et IRB | ? |
| Conditions nutritives | H ₂ : 1 – 2 bars C _{org} (lactate) : 10 mM | H ₂ : 80 bars C _{org} : < 1,4 % g ⁻¹ de matière sèche |
| Viabilité cellulaire | 1 mois | ? |

Les perspectives liées à ce travail sont multiples et pourraient, dans un premier temps, consister à la réalisation d'études similaires à des températures et pressions représentatives de celles attendues dans le milieu de stockage HAVL (90 °C et 8 MPa) en choisissant des souches de NRB et IRB hyperthermophiles piezophiles. De plus, il serait intéressant d'évaluer les effets de consortia bactériens entre groupes métaboliques (*e.g.* IRB + NRB, IRB + NRB + SRB) ou entre souches d'un même groupe métabolique (*e.g.* *Shewanella putrefaciens* et *Geobacter metallireducens* appartenant aux IRB) sur les transformations des

produits de corrosion sidérite et magnétite afin de se rapprocher au mieux des conditions environnementales. En effet, la littérature reporte des réactions se déroulant uniquement sous consortia bactériens, et non pas en souches pures, comme par exemple la méthanotrophie anaérobie qui est active au travers d'une syntrophie entre des SRB et des *Archaea* (Boetius *et al.*, 2000). Enfin, il conviendrait de vérifier que l'oxydation des espèces Fe(II) par des souches telles que *Acidovorax* BoFeN1 ou encore *Azospira oryzae* est bien le résultat d'une réaction « enzymatique » couplée à la réduction des nitrates. La recherche d'enzymes fer-oxydases au sein de leurs structures membranaires peut être un moyen. Si cette oxydation enzymatique est infirmée, alors les IONRB seront considérées comme de simples NRB. Ce qui reviendrait à dire que toutes les bactéries réductrices des nitrates sont des bactéries « ferroxydantes ». Cette idée est déjà en discussion depuis peu par certains des auteurs à l'origine de la découverte des IONRB (Klueglein & Kappler, 2013 ; Klueglein *et al.*, 2014).

RÉFÉRENCES

- Abdelmoula M, Refait P, Drissi SH, Mihe JP, Génin J-MR (1996) Conversion electron Mössbauer spectroscopy and X-ray diffraction studies of the formation of carbonate-containing green rust one by corrosion metallic iron in NaHCO₃ and (NaHCO₃+NaCl) solutions. *Corrosion Science*, **38**, 623-633.
- Achtnich C, Schuhmann A, Wind T, Conrad R (1995) Role of interspecies H₂ transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **16**, 61-69.
- Ahmed MA, Blesa MJ, Moliner R (2007) Chemical decomposition of iron in spanish coal pyrolysis identified by Mössbauer spectroscopy at different temperatures. *Energy Sources part A*, **29**, 1443-1456.
- Aissa R (2004) Coprécipitation d'ions Fe^{II} et Fe^{III} par Na₂CO₃ en milieu sulfaté et synthèse de la rouille verte substituée aluminium. Université de Nancy, Nancy, France.
- Aissa R, Francois M, Ruby C, Fauth F, Medjahdi G, Abdelmoula M, Génin J-MR (2006) Formation and crystallographical structure of hydroxysulphate and hydroxycarbonate green rusts synthesised by coprecipitation. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **67**, 1016-1019.
- Albrecht A, Bertron A, Libert M (2012) Microbial catalysis of redox reactions in concrete cells of nuclear waste repositories: a review and introduction. In: *Cement-based materials for nuclear waste storage* (eds Bert F, Cau-Dit-Coumes C, Frizon F, Lorette S). Springer, Berlin, Allemagne, pp. 147-159.
- Allman R (1970) Double layer structures with brucite-like ions [M(II)_(1-x)M(III)_x(OH)₂]^{x+}. *Chimia*, **24**, 99-108.
- Andra (2005) Argile.
- Appenzeller B (2002) Effet du phosphate sur les interactions bactéries-produits de corrosion en réseau de distribution d'eau potable. Université Henri Poincaré - Nancy 1, Nancy, France.

- Arnold RG, Dichristina TJ, Hoffmann MR (1988) Reductive dissolution of Fe(III) oxides by *Pseudomonas* sp. 200. *Biotechnology and Bioengineering*, **32**, 1081-1096.
- Asn (2010-2012) Plan national de gestion des matières et des déchets radioactifs.
- Azoulay I, Conforto E, Refait P, Rémazeilles C (2013) Study of ferrous corrosion products on iron archaeological objects by electron backscattered diffraction (EBSD). *Applied Physics A*, **110**, 379-388.
- Azoulay I, Rémazeilles C, Refait P (2012) Determination of standard Gibbs free energy of formation of chukanovite and Pourbaix diagrams of iron in carbonated media. *Corrosion Science*, **58**, 229-236.
- Bachofen R, Ferloni P, Flynn I (1998) Microorganisms in the subsurface. *Microbiological Research*, **153**, 1-22.
- Baethgen WE, Alley MM (1989) A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **20**, 961-969.
- Balderston WL, Sherr B, Payne WJ (1976) Blockage by acetylene of nitrous-oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **31**, 504-508.
- Barer MR, Harwood CR (1999) Bacterial viability and culturability. *Advances in Microbial Physiology*, **41**, 93-137.
- Baroux B (2014) *La corrosion des métaux: passivité et corrosion localisée*, DUNOD, Paris, France.
- Barton LL, Hamilton AW (2007) *Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems*, Cambridge University Press, New York, USA.
- Beech IB, Gaylarde CC (1999) Recent advances in the study of biocorrosion - An overview. *Revista De Microbiologia*, **30**, 177-190.
- Beech IB, Sunner JA (2004) Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**, 181-186.

- Beech IB, Sunner JA (2007) Sulphate-reducing bacteria and their role in corrosion of ferrous materials. In: *Sulphate-reducing bacteria: environmental and engineered systems* (eds Barton LL, Hamilton AW). Cambridge University Press, New York, USA, pp. 459-482.
- Behrends T, Van Cappellen P (2007) Transformation of hematite into magnetite during dissimilatory iron reduction - conditions and mechanisms. *Geomicrobiology Journal*, **24**, 403-416.
- Benzerara K, Menguy N, Guyot F, Skouri F, De Luca G, Barakat M, Heulin T (2004) Biologically controlled precipitation of calcium phosphate by *Ramlibacter tataouinensis*. *Earth and Planetary Science Letters*, **228**, 439-449.
- Benzerara K, Morin G, Yoon TH, Miot J, Tyliczszak T, Casiot C, Bruneel O, Farges F, Brown GE (2008) Nanoscale study of As biomineralization in an acid mine drainage system. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**, 3949-3963.
- Bernal JO, Dasgupta DR, Mackay AL (1959) The oxides and hydroxides of iron and their structural inter-relationships. *Clay Mineral Bulletin*, **4**, 15-30.
- Bertrand J-C, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P (2011) *Ecologie microbienne. Microbiologie des milieux naturels et anthropisés*, Presse Universitaire de Pau et des Pays de l'Adour (PUPPA), Pau, France.
- Beveridge TJ, Makin SA, Kadurugamuwa JL, Li Z (1997) Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, **20**, 291-303.
- Bildstein O, Trotignon L, Perronnet M, Jullien M (2006) Modelling iron-clay interactions in deep geological disposal conditions. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, **31**, 618-625.
- Blöthe M, Roden EE (2009) Microbial iron redox cycling in a circumneutral-pH groundwater seep. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 468-473.
- Bocher F, Gehin A, Ruby C, Ghanbaja J, Abdelmoula M, Genin JMR (2004) Coprecipitation of Fe(II-III) hydroxycarbonate green rust stabilised by phosphate adsorption. *Solid State Sciences*, **6**, 117-124.

- Boetius A, Ravenschlag K, Schubert CJ, Rickert D, Widdel F, Gieseke A, Amann R, Jørgensen BB, Witte U, Pfannkuche O (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, **407**, 623-626.
- Bonneville S, Van Cappellen P, Behrends T (2004) Microbial reduction of iron(III) oxyhydroxides: effects of mineral solubility and availability. *Chemical Geology*, **212**, 255-268.
- Bosch J, Heister K, Hofmann T, Meckenstock RU (2010) Nanosized iron oxide colloids strongly enhance microbial iron reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 184-189.
- Bose S, Hochella MF, Gorby YA, Kennedy DW, Mccready DE, Madden AS, Lower BH (2009) Bioreduction of hematite nanoparticles by the dissimilatory iron reducing bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **73**, 962-976.
- Boulin P (2008) Expérimentation et modélisation du transfert d'hydrogène à travers des argiles de centre de stockage de déchets radioactifs. Institut Polytechnique de Grenoble, Grenoble, France.
- Bourdoiseau J-A, Jeannin M, Rémazeilles C, Sabot R, Refait P (2011) The transformation of mackinawite into greigite studied by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, **42**, 496-504.
- Bourdoiseau J-A, Jeannin M, Sabot R, Rémazeilles C, Refait P (2008) Characterization of mackinawite by Raman spectroscopy: effects of crystallisation, drying and oxidation. *Corrosion Science*, **50**, 3247-3255.
- Bourrié G, Trolard F, Génin J-MR, Jaffrezic A, Maitre V, Abdelmoula M (1999) Iron control by equilibria between hydroxy-green rusts and solutions in hydromorphic soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **63**, 3417-3427.
- Bragg WH (1915) The structure of magnetite and the spinels. *Nature*, **95**, 561.
- Bragg WH, Bragg WL (1918) *X-rays and crystal structure*, G. Bell and Sons, London, Grande Bretagne.

- Campaignolle X (1996) Etude des facteurs de risque de la corrosion bactérienne des aciers au carbone induite par les bactéries anaérobies sulfurogènes Université de Bordeaux, Bordeaux, France.
- Canfield DE, Thamdrup B, Hansen JW (1993) The anaerobic degradation of organic matter in Danish coastal sediments: iron reduction, manganese reduction, and sulfate reduction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **57**, 3867-3883.
- Carlson HK, Clark IC, Melnyk RA, Coates JD (2012) Toward a mechanistic understanding of anaerobic nitrate-dependent iron oxidation: balancing electron uptake and detoxification. *Frontiers in Microbiology*, **3**, 1-6.
- Castaneda H, Benetton XD (2008) SRB-biofilm influence in active corrosion sites formed at the steel-electrolyte interface when exposed to artificial seawater conditions. *Corrosion Science*, **50**, 1169-1183.
- Chaudhuri SK, Lack JG, Coates JD (2001) Biogenic magnetite formation through anaerobic biooxidation of Fe(II). *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2844-2848.
- Coby AJ, Picardal FW (2005) Inhibition of NO_3^- and NO_2^- reduction by microbial Fe(III) reduction: evidence of a reaction between NO_2^- and cell surface-bound Fe^{2+} . *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5267-5274.
- Coleman ML, Hedrick DB, Lovley DR, White DC, Pye K (1993) Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature*, **361**, 436-438.
- Cornell RM, Schwertmann U (2003) *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*, WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA.
- Crolet JL (1995) La corrosion bactérienne dans l'industrie pétrolière. In: *Biodétérioration des matériaux*.
- Cruz-Garcia C, Murray AE, Klappenbach JA, Stewart V, Tiedje JM (2007) Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Bacteriology*, **189**, 656-662.

- Cutting RS, Coker VS, Fellowes JW, Lloyd JR, Vaughan DJ (2009) Mineralogical and morphological constraints on the reduction of Fe(III) minerals by *Geobacter sulfurreducens*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **73**, 4004-4022.
- De Beer D, Stoodley P (1995) Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena. *Water Science and Technology*, **32**, 11-18.
- De Faria DLA, Silva VS, De Oliveira MT (1997) Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides. *Journal of Raman Spectroscopy*, **28**, 873-878.
- Delong EF, Francks DG, Yayanos AA (1997) Evolutionary relationship of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 2105-2108.
- Deniau I, Devol-Brown I, Derenne S, Behar F, Largeau C (2008) Comparison of the bulk geochemical features and thermal reactivity of kerogens from Mol (Boom Clay), Bure (Callovo-Oxfordian argillite) and Tournemire (Toarcian shales) underground research laboratories. *Science of the Total Environment*, **389**, 475-485.
- Denner EBM, Mark B, Busse H-J, Turkiewicz M, Lubitz W (2001) *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill *Euphasia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease. *Systematic and Applied Microbiology*, **24**, 44-53.
- Dichristina TJ, Moore CM, Haller CA (2002) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction by *Shewanella putrefaciens* requires ferE, a homolog of the pulE (gspE) type II protein secretion gene. *Journal of Bacteriology*, **184**, 142-151.
- Dong HL, Fredrickson JK, Kennedy DW, Zachara JM, Kukkadapu RK, Onstott TC (2000) Mineral transformation associated with the microbial reduction of magnetite. *Chemical Geology*, **169**, 299-318.
- Dos Santos Afonso M, Stumm W (1992) Reductive dissolution of iron(III) (hydr)oxides by hydrogen sulfide. *Langmuir*, **8**, 1671-1675.

- Drissi SH, Refait P, Abdelmoula M, Génin J-MR (1995) The preparation and thermodynamic properties of Fe(II)-Fe(III) hydroxide-carbonate (green rust 1) - Pourbaix diagram of iron in carbonate-containing aqueous-media. *Corrosion Science*, **37**, 2025-2041.
- Dubiel M, Hsu CH, Chien CC, Mansfeld F, Newman DK (2002) Microbial iron respiration can protect steel from corrosion. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1440-1445.
- El Hajj H (2010) Influence des microorganismes sur la corrosion d'un acier non allié dans le contexte du stockage géologique profond des déchets radioactifs. Université de Nantes, Nantes, France.
- Elshahed MS, Savage KN, Oren A, Guttierrez MC, Ventosa A, Krumholz LR (2004) *Haloferax sulfurifontis* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a sulfide- and sulfur-rich spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 2275-2279.
- Elshawesh F, Abusowa K, Mahfud H, Abderraheem A, Eljweli F, Zyada K (2008) Microbial-influenced corrosion (MIC) on an 18 in. API 5L X52 Trunkline. *Journal of Failure Analysis and Prevention*, **8**, 60-68.
- 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. Nancy Université, Nancy, France.
- Etique M, Jorand FPA, Zegeye A, Grégoire B, Despas C, Ruby C (2014a) Abiotic process for Fe(II) oxidation and green rust mineralization driven by a heterotrophic nitrate reducing bacteria (*Klebsiella mobilis*). *Environmental Science & Technology*, **48**, 3742-3751.
- Etique M, Ruby C, Jorand FPA (in preparation) Magnetite as a precursor for green rust: the activity of hydrogenotrophic iron-reducing bacteria (*Shewanella putrefaciens*).
- Etique M, Zegeye A, Grégoire B, Carteret C, Ruby C (2014b) Nitrate reduction by mixed iron(II-III) hydroxycarbonate green rust in the presence of phosphate anions: the key parameters influencing the ammonium selectivity. *Water Research*, **62**, 29-39.

- Ewing FG (1935) The crystal structure of lepidocrocite. *Journal of Chemical Physics*, **3**, 420-424.
- Fassbinder JWE, Stanjek H, Vali H (1990) Occurrence of magnetic bacteria in soil. *Nature*, **343**, 161-163.
- Ferris FG, Beveridge TJ, Fyfe WS (1986) Iron-silica crystallite nucleation by bacteria in a geothermal sediment. *Nature*, **320**, 609-611.
- Fredrickson JK, Kostandarithes HM, Li SW, Plymale AE, Daly MJ (2000) Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2006-2011.
- Fredrickson JK, Zachara JM, Balkwill DL, Kennedy D, Li S-MW, Kostandarithes HM, Daly MJ, Romine MF, Brockman FJ (2004) Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 4230-4241.
- Fredrickson JK, Zachara JM, Kennedy DW, Dong H, Onstott TC, Hinman NW, Li S-M (1998) Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **62**, 3239-3257.
- Fripiat JJ, Jelli A, Poncelet G, André J (1965) Thermodynamic properties of adsorbed water molecules and electrical conduction in Montmorillonites and Silicas. In: *Thermodynamic Properties of Adsorbed Water Molecules*, pp. 2185-2196.
- Gallagher PK, Macchesney JB, Sherwood RC (1969) Mössbauer effect in the system $\text{Co}_{1-x}\text{Fe}_x\text{S}_2$. *The Journal of Chemical Physics*, **50**, 4417-4419.
- Gardner LR, Stewart PS (2002) Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **29**, 345-360.
- Geesey GG, Beech I, Bremer PJ, Webster BJ, Wells BD (2000) Biocorrosion. In: *Biofilms II: process analysis and applications* (ed Bryers JD). WILEY-LISS, New York, USA.

- Geesey GG, Flemming HC (1991) What is biocorrosion ? In: *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Springer-Verlag, Berlin, Allemagne, pp. 155-164.
- Génin JMR, Olowe AA, Benbouzid-Rollet ND, Prieur D, Confente M, Reziak B (1992) The simultaneous presence of green rust 2 and sulphate reducing bacteria in the corrosion of steel sheet piles in a Harbour. *Hyperfine Interactions*, **69**, 875-878.
- Glasauer S, Weidler PG, Langley S, Beveridge TJ (2003) Controls on Fe reduction and mineral formation by a subsurface bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **67**, 1277-1288.
- Goldsztaub S (1932) Structure cristalline de la goethite. *Comptes rendus l'Académie Sciences*, **195**, 964.
- Gorby YA, Yanina S, Mclean JS, M. RK, Moyles D, Dohnalkova A, Beveridge TJ, Chang IS, Kim BH, Kim KS, Culley DE, Reed SB, Romine MF, Saffarini DA, Hill EA, Shi L, Elias DA, Kennedy DW, Pinchuk G, Watanabe K, Ishii S, Logan B, Nealson KH, Fredrickson JK (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 11358-11363.
- Gounot A-M (1994) Microbial oxidation and reduction of manganese: consequences in groundwater and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, **14**, 339-349.
- Graf DL (1961) Crystallographic tables for the rhombohedral carbonates. *American Mineralogist*, **46**, 1283-1316.
- Grassini S, Angelini E, Parvis M, Bouchar M, Dillmann P, Neff D (2013) An in situ corrosion study of Middle Ages wrought iron bar chains in the Amiens Cathedral. *Applied Physics A*, **113**, 971-979.
- Guilbaud R, White ML, Poulton SW (2013) Surface charge and growth of sulphate and carbonate green rust in aqueous media. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **108**, 141-153.
- Guilminot E, Neff D, Rémazeilles C, Reguer S, Kergoulay F, Pelé C, Dillmann P, Refait P, Nicot F, Mielcarek F, Huet N, Rebière J (2012) Influence of crucial parameters on the

- dechlorination treatments of ferrous objects from seawater. *Studies in Conservation*, **57**, 227-236.
- Hansen HCB, Bender Koch C, Erbs M, Guldborg S, Dickow J (2000) Redox reactions of iron(II)iron(III) hydroxides (green rusts). In: *Chemical-biological interactions in contaminant fate*, Washington, DC, USA, pp. 321-323.
- Hansen HCB, Borggaard OK, Sørensen J (1994) Evaluation of the free energy of formation of Fe(II)-Fe(III) hydroxide-sulphate (green rust) and its reduction of nitrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **58**, 2599-2608.
- Hansen HCB, Koch CB, Nancke-Krogh H, Boorgaard OK, Sorensen J (1996) Abiotic nitrate reduction to ammonium: key role of green rust. *Environmental Science & Technology*, **30**, 2053-2056.
- Herbillon AJ (2006) Ferrosic hydroxides, green rust and fougérite in the biogeochemical cycle of iron. *Comptes Rendus Geoscience*, **338**, 393-401.
- Herrera LK, Videla HA (2009) Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **63**, 891-895.
- Heulin T, Barakat M, Christen R, Lesourd M, Sutra L, De Luca G, Achouak W (2003) *Ramlibacter tataouinensis* gen. nov., sp. nov., and *Ramlibacter henchirensis* sp. nov., cyst-producing bacteria isolated from subdesert soil in Tunisia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 589-594.
- Hubert C, Voordouw G (2007) Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 2644-2652.
- Jaisi DP, Dong H, Liu C (2007) Influence of biogenic Fe(II) on the extent of microbial reduction of Fe(III) in clay minerals nontronite, illite, and chlorite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **71**, 1145-1158.
- Javaherdashti R (2008) Microbiologically influenced corrosion. In: *Microbiologically influenced corrosion: An engineering insight*.

- Jenneman G, Mcinerney MJ, Knapp RM (1986) Effect of nitrate on biogenic sulphide production. *Applied and Environmental Microbiology*, **51**, 1205-1211.
- Jones DA, Amy PS (2000) Related electrochemical characteristics of microbial metabolism and iron corrosion. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **39**, 575-582.
- Jorand FPA, Sergent A-S, Remy P-P, Bihannic I, Ghanbaja J, Lartiges B, Hanna K, Zegeye A (2013) Contribution of anionic vs neutral polymers to the formation of green rust 1 from γ -FeOOH bioreduction. *Geomicrobiology Journal*, **30**, 1-16.
- Jorand FPA, Zegeye A, Ghanbaja J, Abdelmoula M (2011) The formation of green rust induced by tropical river biofilm components. *Science of the Total Environment*, **409**, 2586-2596.
- Kappler A, Newman DK (2004) Formation of Fe(III)-minerals by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **68**, 1217-1226.
- Kappler A, Schink B, Newman DK (2005) Fe(III) mineral formation and cell encrustation by the nitrate-dependent Fe(II)-oxidizer strain BoFeN1. *Geobiology*, **3**, 235-245.
- Kappler A, Wuestner ML, Ruecker A, Harter J, Halama M, Behrens S (2014) Biochar as an electron shuttle between bacteria and Fe(III) minerals. *Environmental Science & Technology Letters*, **1**, 339-344.
- Kielemoes J, De Boever P, Verstraete W (2000) Influence of denitrification on the corrosion of iron and stainless steel powder. *Environmental Science & Technology*, **34**, 663-671.
- Kim J, Dong HL, Seabaugh J, Newell SW, Eberl DD (2004) Role of microbes in the smectite to illite reaction. *Science*, **303**, 830-832.
- Kim M-S, Lee D-W, Chung S-H, Kim JT, Cho I-H, Lee K-Y (2014) Pd-Cu bimetallic catalysts supported on TiO₂-CeO₂ mixed oxides for aqueous nitrate reduction by hydrogen. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **392**, 308-314.
- Klueglein N, Kappler A (2013) Abiotic oxidation of Fe(II) by reactive nitrogen species in cultures of the nitrate-reducing Fe(II) oxidizer *Acidovorax* sp. BoFeN1 – questioning the existence of enzymatic Fe(II) oxidation. *Geobiology*, **11**, 180-190.

- Klueglein N, Zeitvogel F, Stierhof Y-D, Floetenmeyer M, Konhauser KO, Kappler A, Obst M (2014) Potential role of nitrite for abiotic Fe(II) oxidation and cell encrustation during nitrate reduction by denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**, 1051-1061.
- Kohler E (2005) La réactivité des matériaux argileux sous gradient thermique. Université d'Evry Val d'Essonne, Evry Val d'Essonne, France.
- Konhauser KO (2007) *Introduction to Geomicrobiology*, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Konhauser KO, Kappler A, Roden EE (2011) Iron in microbial metabolisms. *Elements*, **7**, 89-93.
- Kostka JE, Haefele E, Viehweger R, Stucki JW (1999) Respiration and dissolution of iron(III)-containing clay minerals by bacteria. *Environmental Science & Technology*, **33**, 3127-3133.
- Kostka JE, Nealson KH (1995) Dissolution and reduction of magnetite by bacteria. *Environmental Science & Technology*, **29**, 2535-2540.
- Kostka JE, Stucki JW, Nealson KH, Wu Y (1996) Reduction of structural Fe(III) in smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* strain MR-1. *Clays and Clay Minerals*, **44**, 522-529.
- Kukkadapu RK, Zachara JM, Smith SC, Fredrickson JK, Liu C (2001) Dissimilatory bacterial reduction of Al-substituted goethite in subsurface sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **65**, 2913-2924.
- Kulakov LA, Mcalister MB, Ogden KL, Larkin MJ, O'hanlon JF (2002) Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1548-1555.
- Küsel K, Dorsch T, Acker G, Stackebrandt E (1999) Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilium cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3633-3640.

- Lantenois S (2003) Réactivité fer métal/smectites en milieu hydraté à 80 °C. Université d'Orléans, Orléans, France.
- Larese-Casanova P, Haderlein SB, Kappler A (2010) Biomineralization of lepidocrocite and goethite by nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacteria: effect of pH, bicarbonate, phosphate and humic acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **74**, 3721-3734.
- Lee AK, Newman DK (2003) Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **62**, 134-139.
- Legrand L, Abdelmoula M, Gehin A, Chausse A, Génin J-MR (2001) Electrochemical formation of a new Fe(II)-Fe(III) hydroxy-carbonate green rust: Characterization and morphology. *Electrochimica Acta*, **46**, 1815-1822.
- Lennie AR, Redfern SaT, Schofield PF, Vaughan DJ (1995) Synthesis and Rietveld crystal structure refinement of mackinawite, tetragonal FeS. *Mineralogical Magazine*, **59**, 677-683.
- Levien L, Prewitt CT, Weidner DJ (1980) Structure and elastic properties of quartz at pressure. *American Mineralogist*, **65**, 920-930.
- Li YL, Vali H, Sears SK, Yang J, Deng BL, Zhang CL (2004) Iron reduction and alteration of nontronite NAu-2 by a sulfate-reducing bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **68**, 3251-3260.
- Lide DR, Frederickse HPR (1995) *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 76th Edition*, CRC Press, Boca Raton, Floride, USA.
- Little BJ, Wagner PA, Lewandowski Z (1997) Spatial relationships between bacteria and mineral surfaces. *Reviews in Mineralogy*, **35**, 154-159.
- Lovley DR (1997) Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiology Reviews*, **20**, 305-313.
- Lovley DR (2008) Extracellular electron transfer: wires, capacitors, iron lungs, and more. *Geobiology*, **6**, 225-231.

- Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP, Woodw AJC (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, **382**, 445-448.
- Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. In: *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 219-286.
- Lovley DR, Stolz JF, Nord GL, Phillips J, Phillips EJP (1987) Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature*, **330**, 252-254.
- Lower SK, Hochella MF, Beveridge TJ (2001) Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between *Shewanella* and α -FeOOH. *Science*, **292**, 1360-1363.
- Maher BA, Taylor RM (1988) Formation of ultrafine-grained magnetite in soils. *Nature*, **336**, 368-370.
- Malvankar NS, Lovley DR (2014) Microbial nanowires for bioenergy applications. *Current Opinion in Biotechnology*, **27**, 88-95.
- Manning PA, Ash LA (1979) Mössbauer spectral studies of pyrite, ferric and high-spin ferrous distributions in sulfide-rich sediments from Moira Lake, Ontario. *Canadian Mineralogist*, **17**, 111-115.
- Marchal R (1999) Rôle des bactéries sulfurogènes dans la corrosion du fer. *Oil & Gas Science and Technology*, **54**, 649-659.
- Marcus P (2012) *Corrosion mechanisms in theory and practice*, CRC Press, USA.
- Markgraf SA, Reeder RJ (1985) High-temperature structure refinements of calcite and magnesite. *American Mineralogist*, **70**, 590-600.
- Marty NCM, Fritz B, Clément A, Michau N (2010) Modelling the long term alteration of the engineered bentonite barrier in an underground radioactive waste repository. *Applied Clay Science*, **47**, 82-90.
- Matocha CJ, Dhakal P, Pyzola SM (2012) The role of abiotic and coupled biotic/abiotic mineral controlled redox processes in nitrate reduction. In: *Advances in Agronomy* (ed Sparks DL). Elsevier, Burlington, pp. 181-214.

- Miot J, Benzerara K, Kappler A (2014a) Investigating microbe-mineral interactions: recent advances in X-ray and electron microscopy and redox-sensitive methods. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **42**, 271-289.
- Miot J, Benzerara K, Morin G, Bernard S, Beyssac O, Larquet E, Kappler A, Guyot F (2009a) Transformation of vivianite by anaerobic nitrate-reducing iron-oxidizing bacteria. *Geobiology*, **7**, 373-384.
- Miot J, Benzerara K, Morin G, Kappler A, Bernard S, Obst M, Ferard C, Skouri-Panet F, Guigner JM, Posth N, Galvez M, Brown GE, Guyot F (2009b) Iron biomineralization by anaerobic neutrophilic iron-oxidizing bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **73**, 696-711.
- Miot J, Li J, Benzerara K, Sougrati MT, Ona-Nguema G, Bernard S, Jumas J-C, Guyot F (2014b) Formation of single domain magnetite by green rust oxidation promoted by microbial anaerobic nitrate-dependent iron oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **139**, 327-343.
- Miot J, Maclellan K, Benzerara K, Boisset N (2011) Preservation of protein globules and peptidoglycan in the mineralized cell wall of nitrate-reducing, iron(II)-oxidizing bacteria: a cryo-electron microscopy study. *Geobiology*, **9**, 459-470.
- Miroshnichenko M, Kostrikina NA, Chernyh NA, Pimenov NV, Tourova TP, Antipov AN, Spring S, Stackebrandt E, Bonch-Osmolovskaya E (2003) *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 323-329.
- Morita RY (1997) *Bacteria in Oligotrophic Environments: Starvation-survival Lifestyle*, Chapman & Hall Microbiology Series, New York.
- Mullet M, Khare V, Ruby C (2008) XPS study of Fe(II)-Fe(III) (oxy)hydroxycarbonate green rust compounds. *Surface and Interface Analysis*, **40**, 323-328.
- Myers CR, Myers JM (1997) Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome *c* required for reduction of iron(III), fumarate, and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology*, **179**, 1143-1152.

- Myers CR, Nealson KH (1990) Respiration-linked proton translocation coupled to anaerobic reduction of manganese(IV) and iron(III) in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology*, **172**, 6232-6238.
- Neal AL, Rosso KM, Geesey GG, Gorby YA, Little BJ (2003) Surface structure effects on direct reduction of iron oxides by *Shewanella oneidensis*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **67**, 4489-4503.
- Nealson KH, Little B (1997) Breathing manganese and iron: solid-state respiration. *Advances in Applied Microbiology*, **45**, 213-239.
- Necib Ammour S (2013) Note technique Expérimentation MCO, Essai "Etat de corrosion/gravimétrie" installation et premiers résultats.
- Neff D (2003) Apport des analogues archéologiques à l'estimation des vitesses moyennes et à l'étude des mécanismes de corrosion à très long terme des aciers non alliés dans les sols. Univeristé de Technologie de Compiègne, Compiègne, France.
- Neff D, Saheb M, Monnier J, Perrin S, Descotes M, L'hostis V, Crusset D, Millard A, Dillmann P (2010) A review of the archeological analogue approaches to predict the long-term corrosion behaviour of carbon steel overpack and reinforced concrete structures in the French disposal systems. *Journal of Nuclear Materials*, **402**, 196-205.
- Newman DK, Kolter R (2000) A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature*, **405**, 94-97.
- Ning J, Zheng Y, Young D, Brown B, Nešić S (2014) Thermodynamic study of hydrogen sulfide corrosion of mild steel. *Corrosion*, **70**, 375-389.
- O'Neill HSC (1987) Quartz-fayalite-iron and quartz-fayalite-magnetite equilibria and the free energy of formation of fayalite (Fe_2SiO_4) and magnetite (Fe_3O_4). *American Mineralogist*, **72**, 67-75.
- Obuekwe CO, Westlake DWS, Cook FD, William Costerton J (1981) Surface changes in mild steel coupons from the action of corrosion-causing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**, 766-774.

- Olowe AA, Génin J-MR (1990) Kinetics of formation of green rust 2 in the steady acidic sulfated medium. *Hyperfine Interactions*, **57**, 2029-2035.
- Ona-Nguema G, Abdelmoula M, Jorand FPA, Benali O, Gehin A, Block JC, Génin J-MR (2002) Iron(II,III) hydroxycarbonate green rust formation and stabilization from lepidocrocite bioreduction. *Environmental Science & Technology*, **36**, 16-20.
- Ona-Nguema G, Morin G, Wang Y, Menguy N, Juillot F, Olivi L, Aquilanti G, Abdelmoula M, Ruby C, Bargar JR, Guyot F, Calas G, Brown GE (2009) Arsenite sequestration at the surface of nano-Fe(OH)₂, ferrous-carbonate hydroxide, and green-rust after bioreduction of arsenic-sorbed lepidocrocite by *Shewanella putrefaciens*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **73**, 1359-1381.
- Pantke C, Obst M, Benzerara K, Morin G, Ona-Nguema G, Dippon U, Kappler A (2012) Green rust formation during Fe(II) oxidation by the nitrate-reducing *Acidovorax* sp. strain BoFeN1. *Environmental Science & Technology*, **46**, 1436-1446.
- Parmar N, Gorby YA, Beveridge TJ, Ferris FG (2001) Formation of green rust and immobilization of nickel in response to bacterial reduction of hydrous ferric oxide. *Geomicrobiology Journal*, **18**, 375-385.
- Payne WJ (1973) Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriological reviews*, **37**, 409-452.
- Peck HD (1961) Enzymatic basis for assimilatory and dissimilatory sulfate reduction. *Journal of Bacteriology*, **82**, 933-939.
- Peiffer S, Dos Santos Afonso M, Wehrli B, Gächter R (1992) Kinetics and mechanism of the reaction of H₂S with lepidocrocite. *Environmental Science & Technology*, **26**, 2408-2413.
- Pekov IV, Perchiazzi N, Merlino S, Kalachev VN, Merlini M, Zadov AE (2007) Chukanovite, Fe₂CO₃(OH)₂, a new mineral from the weathered iron meteorite Dronino. *European Journal of Mineralogy*, **19**, 891-898.
- Pelmont J (1993) *Bactéries et environnement, Adaptations physiologiques*, EDP Sciences.

- Picardal F (2012) Abiotic and microbial interactions during anaerobic transformations of Fe(II) and NO_x⁻. *Frontiers in Microbiology*, **3**, 1-7.
- Pillay C, Lin J (2014) The impact of additional nitrates in mild steel corrosion in a seawater/sediment system. *Corrosion Science*, **80**, 416-426.
- Pineau A, Kanari N, Gaballah I (2007) Kinetics reduction of iron oxides by H₂: part II. Low temperature reduction of magnetite. *Thermochimica Acta*, **456**, 75-88.
- Pineau S, Sabot R, Quillet L, Jeannin M, Caplat C, Dupont-Morrall I, Refait P (2008) Formation of the Fe(II-III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel associated to molecular detection of dissimilatory sulphite-reductase. *Corrosion Science*, **50**, 1099-1111.
- Pirbadian S, Barchinger SE, Leung KM, Byun HS, Jangir Y, Bouhenni RA, Reed SB, Romine MF, Saffarini DA, Shi L, Gorby YA, Golbeck JH, El-Naggar MY (2014) *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 12883-12888.
- Postgate J (1959) Sulphate reduction by bacteria. *Annual Reviews of Microbiology*, **13**, 505-520.
- Potts JM (1969) Survival of microorganisms under conditions of total starvation. University of British Columbia, Canada.
- Poulain S (2006) Caractérisation microbiologique de l'argile à Opalinus du Mont Terri et de l'argilite du Callovo-Oxfordien de Meuse/Haute-Marne. Université de Bordeaux, Bordeaux, France.
- Poulton SW, Krom MD, Raiswell R (2004) A revised scheme for the reactivity of iron (hydr)oxide minerals towards dissolved sulfide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **68**, 3703-3715.
- Prescott L, Harley J, Klein D (2003) *Microbiologie*, De Boeck & Larcier S.A., Bruxelles.
- Pyzik AJ, Sommer SE (1981) Sedimentary iron monosulfides: kinetics and mechanism of formation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **45**, 687-698.

- Rainha VL, Fonseca ITE (1997) Kinetic studies on the SRB influenced corrosion of steel: a first approach. *Corrosion Science*, **39**, 807-813.
- Refait P, Abdelmoula M, Génin J-MR (1998) Mechanisms of formation and structure of green rust one in aqueous corrosion of iron in the presence of chloride ions. *Corrosion Science*, **40**, 1547-1560.
- Refait P, Abdelmoula M, Génin J-MR, Sabot R (2006) Green rusts in electrochemical and microbially influenced corrosion of steel. *Comptes Rendus Geoscience*, **338**, 476-487.
- Refait P, Memet JB, Bon C, Sabot R, Genin JMR (2003) Formation of the Fe(II)-Fe(III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel. *Corrosion Science*, **45**, 833-845.
- Refait P, Nguyen DD, Jeannin M, Sable S, Langumier M, Sabot R (2011) Electrochemical formation of green rusts in deaerated seawater-like solutions. *Electrochimica Acta*, **56**, 6481-6488.
- Regazzoni AE, Urrutia GA, Blesa MA, Maroto AJG (1981) Some observations on the composition and morphology of synthetic magnetites obtained by different routes. *Journal of Inorganic & Nuclear Chemistry*, **43**, 1489-1493.
- Reguera G, Mccarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, Lovley DR (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, **435**, 1098-1101.
- Rémazeilles C, Neff D, Kergoulay F, Foy E, Conforto E, Guilminot E, Reguer S, Refait P, Dillmann P (2009) Mechanisms of long-term anaerobic corrosion of iron archaeological artefacts in seawater. *Corrosion Science*, **51**, 2932-2941.
- Remazeilles C, Refait P (2009) Fe(II) hydroxycarbonate $\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ (chukanovite) as iron corrosion product: Synthesis and study by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Polyhedron*, **28**, 749-756.
- Rickard DT (1974) Kinetics and mechanism of the sulfidation of goethite. *American Journal of Science*, **274**, 941-952.

- Rivard C (2011) Contribution à l'étude de la stabilité des minéraux constitutifs des argilites du Callovo-Oxfordien en présence de fer à 90 °C. Université de Lorraine, Vandœuvre-Lès-Nancy, France.
- Roden EE, Kappler A, Bauer I, Jiang J, Paul A, Stoesser R, Konishi H, Xu H (2010) Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances. *Nature Geosciences*, **3**, 417-421.
- Roden EE, Mcbeth JM, Blöthe M, Percak-Dennett EM, Fleming EJ, Holyoke RR, Luther GW, Emerson D (2012) The microbial ferrous wheel in a neutral pH groundwater seep. *Frontiers in Microbiology*, **3**, 172.
- Roden EE, Wetzel RG (1996) Organic carbon oxidation and suppression of methane production by microbial Fe(III) oxide reduction in vegetated and unvegetated freshwater wetland sediments. *Limnology and Oceanography*, **41**, 1733-1748.
- Roden EE, Zachara JM (1996) Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environmental Science & Technology*, **30**, 1618-1628.
- Roh Y, Zhang C-L, Vali H, Lauf RJ, Zhou J, Phelps TJ (2003) Biogeochemical and environmental factors in Fe biomineralization: magnetite and siderite formation. *Clays and Clay Minerals*, **51**, 83-95.
- Romaine A (2014) Rôle des espèces sulfures dans la corrosion des aciers non alliés : Hétérogénéités de la couche de produits de corrosion et couplages galvaniques. Université de La Rochelle, La Rochelle, France.
- Romaine A, Sabot R, Jeannin M, Necib S, Refait P (2013) Electrochemical synthesis and characterization of corrosion products on carbon steel under argillite layers in carbonated media at 80°C. *Electrochimica Acta*, **114**, 152-158.
- Rosnes JT, Torsvik T, Lien T (1991) Spore-forming thermophilic sulfate-reducing bacteria isolated from North Sea oil field waters. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 2302-2307.
- Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. *Nature*, **409**, 1092-1010.

- Ruby C, Upadhyay C, Gehin A, Ona-Nguema G, Génin J-MR (2006) In situ redox flexibility of Fe^{II-III} oxyhydroxycarbonate green rust and fougérite. *Environmental Science & Technology*, **40**, 4696-4702.
- Saheb M, Descostes M, Neff D, Matthiesen H, Michelin A, Dillmann P (2010) Iron corrosion in an anoxic soil: Comparison between thermodynamic modelling and ferrous archaeological artefacts characterised along with the local in situ geochemical conditions. *Applied Geochemistry*, **25**, 1937-1948.
- Saheb M, Neff D, Bellot-Guriel L, Dillmann P (2011) Raman study of deuterated iron hydroxycarbonate to assess long-term corrosion mechanisms in anoxic soils. *Journal of Raman Spectroscopy*, **42**, 1100-1108.
- Saheb M, Neff D, Dillmann P, Matthiesen H, Foy E (2008) Long-term corrosion behaviour of low-carbon steel in anoxic environment: characterization of archaeological artefacts. *Journal of Nuclear Materials*, **379**, 118-123.
- Sampson PF (1969) The lattice parameters of natural single crystal and synthetically produced goethite (α -FeOOH). *Acta Crystallographica Section B*, **25**, 1683-1685.
- Sander R (1999) Compilation of Henry's law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry. Max-Planck Institute of Chemistry, Mainz, Germany.
- Savoie S, Legrand L, Sagon G, Lecomte S, Chausse A, Messina R, Toulhoat P (2001) Experimental investigations on iron corrosion products formed in bicarbonate/carbonate-containing solutions at 90°C. *Corrosion Science*, **43**, 2049-2064.
- Sawicki JA, Brown AD, Beveridge TJ (1995) Microbial precipitation of siderite and protoferrihydrite in a biofilm. *Journal of the Mineralogical Association of Canada*, **33**, 1-6.
- Schwermer CU, Lavik G, Abed RMM, Dunsmore B, Ferdelman TG, Stoodley P, Gieseke A, De Beer D (2008) Impact of nitrate on the structure and function of bacterial biofilm communities in pipelines used for injection of seawater into oil fields. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 2841-2851.

- Schwertmann U, Thalmann H (1976) The influence of Fe(II), Si and pH on the formation of lepidocrocite and ferrihydrite during oxydation of aqueous FeCl₂ solutions. *Clay Minerals*, **11**, 189-200.
- Senko JM, Dewers TA, Krumholz LR (2005) Effect of oxidation rate and Fe(II) state on microbial nitrate-dependent Fe(III) mineral formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 7172-7177.
- Simon L, François M, Refait P, Renaudin G, Lelaurain M, Génin J-MR (2003) Structure of the Fe(II-III) layered double hydroxysulphate green rust two from Rietveld analysis. *Solid State Sciences*, **5**, 327-334.
- Skinner BJ, Erd RC, Grimaldi FS (1964) Greigite, the thio-spinel of iron; a new mineral. *American Mineralogist*, **49**, 543-555.
- Slobodkin AI, Jeanthon C, L'haridon S, Nazina T, Miroshnichenko M, Bonch-Osmolovskaya E (1999) Dissimilatory reduction of Fe(III) by thermophilic bacteria and archea in deep subsurface petroleum reservoirs of Western Siberia. *Current Microbiology*, **39**, 99-102.
- Stampfl PP (1969) Basic Fe(II)(III)-carbonate in rust. *Corrosion Science*, **9**, 185-187.
- Stetter KO (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **452**, 22-25.
- Stewart V (1988) Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Microbiological Reviews*, **52**, 190-232.
- Straub KL, Benz M, Schink B, Widdel F (1996) Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 1458-1460.
- Straub KL, Hanzlik M, Buchholz-Cleven BEE (1998) The use of biologically produced ferrihydrite for the isolation of a novel iron-reducing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, **21**, 442-449.
- Stucki JW, Bailey GW, Gan H (1996) Oxidation-reduction mechanisms in iron-bearing phyllosilicates. *Applied Clay Science*, **10**, 417-430.

- Stucki JW, Kostka JE (2006) Microbial reduction of iron in smectite. *Comptes Rendus Geoscience*, **338**, 468-475.
- Sunger N, Bose P (2009) Autotrophic denitrification using hydrogen generated from metallic iron corrosion. *Bioresource Technology*, **100**, 4077-4082.
- Świetlik J, Raczyk-Stanislawiak U, Piszora P, Nawrocki J (2012) Corrosion in drinking water pipes: the importance of green rusts. *Water Research*, **46**, 1-10.
- Talandier J (2005) La production et le transfert de gaz dans le stockage et dans la couche du Callovo-Oxfordien, lien avec le transitoire hydraulique. Site de Meuse/Haute-Marne. ASCM 03.0042. ANDRA.
- Tatnall RE (1981) Fundamentals of bacteria induced corrosion. *Materials Performance*, **20**, 32-38.
- Taylor HFW (1973) Crystal structures of some double hydroxide minerals. *Mineralogical Magazine*, **39**, 377-389.
- Templeton AS (2011) Geomicrobiology of iron in extreme environments. *Elements*, **7**, 95-100.
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews*, **41**, 100-180.
- Till BA, Weathers LJ, Alvarez PJJ (1998) Fe(0)-Supported Autotrophic Denitrification. *Environmental Science & Technology*, **32**, 634-639.
- Tóth EM, Vengring A, Homonnay ZG, Kéki Z, Spröer C, Borsodi AK, Márialigeti K, Schumann P (2014) *Phreatobacter oligotrophus* gen. nov., sp. nov., an α -proteobacterium isolated from ultrapure water of the water purification system of a power plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**, 839-845.
- Truche L, Berger G, Albrecht A, Domergue L (2013) Abiotic nitrate reduction induced by carbon steel and hydrogen: implications for environmental processes in waste repositories. *Applied Geochemistry*, **28**, 155-163.

- Usman M, Faure P, Ruby C, Hanna K (2012) Remediation of PAH-contaminated soils by magnetite catalyzed Fenton-like oxidation. *Applied Catalysis B: Environmental*, **117-118**, 10-17.
- Vannerberg N-G (1988) Solution chemistry and corrosion. *Pure & Applied Chemistry*, **60**, 1831-1840.
- Vargas M, Kashefi K, Blunt-Harris EL, Lovley DR (1998) Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature*, **395**, 65-67.
- Vaughan DJ, Ridout MS (1971) Mössbauer studies of some sulphide minerals. *Journal of Inorganic & Nuclear Chemistry*, **33**, 741-746.
- Velde B, Meunier A (2008) *The origin of clay minerals in soils and weathered rocks*, Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Venkateswaran AA, Mcfarlan SC, Ghosal D, Minton KW, Vasilenko A, Makarova K, Wackett LP, Daly MJ (2000) Physiologic determinants of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2620-2626.
- Videla HA (1996) *Manual of biocorrosion*, CRC Lewis Publishers.
- Videla HA, Characklis WG (1992) Biofouling and microbially influenced corrosion. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **29**, 195-212.
- Videla HA, Herrera LK (2005) Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International Microbiology*, **8**, 169-180.
- Vinsot A, Mettler S, Wechner S (2008) *In situ* characterization of the Callovo-Oxfordian pore water composition. *Physics and Chemistry of the Earth*, **33**, S75-S86.
- Viollier E, Inglett PW, Hunter K, Roychoudhury AN, Cappellen PV (2000) The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry*, **15**, 785-790.
- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP (2009) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, **14**, 2535-2554.

- Weber KA, Achenbach LA, Coates JD (2006a) Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews: Microbiology*, **4**, 752-764.
- Weber KA, Pollock J, Cole KA, O'connor SM, Achenbach LA, Coates JD (2006b) Anaerobic nitrate-dependent iron(II) bio-oxidation by a novel lithoautotrophic betaproteobacterium, strain 2002. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 686-694.
- Xu D, Li Y, Song F, Gu T (2013) Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing bacterium *Bacillus licheniformis*. *Corrosion Science*, **77**, 385-390.
- Yamaguchi KE, Johnson CM, Beard BL, Ohmoto H (2005) Biogeochemical cycling of iron in the Archean-Paleoproterozoic Earth: constraints from iron isotope variations in sedimentary rocks from the Kaapvaal and Pilbara Cratons. *Chemical Geology*, **218**, 135-169.
- Yamamoto I, Ishimoto M (1981) Oxidation of lactate in comparison with that of glucose in nitrate respiration of *Escherichia coli*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **27**, 11-20.
- Yao W, Millero FJ (1996) Oxidation of hydrogen sulfide by hydrous Fe(III) oxides in seawater. *Marine Chemistry*, **52**, 1-16.
- Ye Q, Roh Y, Carroll SL, Blair B, Zhou J, Zhang C-L, Fields MW (2004) Alkaline anaerobic respiration: isolation and characterization of a novel alkaliphilic and metal-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 5595-5602.
- Yven B, Sammartino S, Geraud Y, Homand F, Villieras F (2007) Mineralogy, texture and porosity of Callovo-Oxfordian argillites of the Meuse/Haute-Marne region (eastern Paris Basin). *Mémoires de la Société Géologique de France*, **178**, 73-90.
- Zegeye A, Abdelmoula M, Usman M, Hanna K, Ruby C (2011) In situ monitoring of lepidocrocite bioreduction and magnetite formation by reflection Mössbauer spectroscopy. *American Mineralogist*, **96**, 1410-1413.

- Zegeye A, Etique M, Carteret C, Ruby C, Schaaf P, Francius G (2014) Origin of the differential nanoscale reactivity of biologically and chemically formed green rust crystals investigated by chemical force spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, **118**, 5978-5987.
- Zegeye A, Mustin C, Jorand FPA (2010) Bacterial and iron oxide aggregates mediate secondary iron mineral formation: green rust versus magnetite. *Geobiology*, **8**, 209-222.
- Zegeye A, Ona-Nguema G, Carteret C, Huguet L, Abdelmoula M, Jorand FPA (2005) Formation of hydroxysulphate green rust 2 as a single iron(II-III) mineral in microbial culture. *Geomicrobiology Journal*, **22**, 389-399.
- Zegeye A, Ruby C, Jorand FPA (2007) Kinetic and thermodynamic analysis during dissimilatory γ -FeOOH reduction: Formation of green rust 1 and magnetite. *Geomicrobiology Journal*, **24**, 51-64.
- Zhang CL, Liu S, Phelps TJ, Cole DR, Horita J, Fortier SM, Elless M, Valley JW (1997) Physiochemical, mineralogical, and isotopic characterization of magnetite-rich iron oxides formed by thermophilic iron-reducing bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61**, 4621-4632.
- Zuo R, Ornek D, Syrett BC, Green RM, Hsu C-H, Mansfeld FB, Wood TK (2004) Inhibiting mild steel sorrosion from sulfate-reducing bacteria using antimicrobial-producing biofilms in Three-Mile-Island process water. *Applied Microbiology Biotechnology*, **64**, 275-283.

Effets de l'activité bactérienne réductrice du fer ferrique et des nitrates sur les transformations des produits de corrosion magnétite et sidérite de l'acier non allié

En France, il est envisagé de stocker en formation géologique profonde les déchets radioactifs vitrifiés à haute activité et vie longue dans un conteneur en acier inoxydable chemisé par un surconteneur en acier non allié. Les principaux produits de corrosion attendus à la surface de ce dernier, *i.e.* la sidérite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}_3$) et la magnétite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$), jouent un rôle protecteur contre la corrosion en tant que couche passivante. Ce travail de thèse visait à étudier l'influence des groupes métaboliques bactériens réducteurs du fer ferrique (IRB) et des nitrates (NRB) sur les transformations de ces produits de corrosion en anoxie. Des souches modèles de NRB (*Klebsiella mobilis*) et IRB (*Shewanella putrefaciens*) ont, dans un premier temps, été incubées en présence de suspension de sidérite ou de magnétite, afin d'exacerber les processus de transformation du fer du fait d'une surface spécifique élevée, puis dans un second temps, en présence de films électrogénérés de ces produits pour se rapprocher des conditions d'un acier non allié corrodé en anoxie. Ces souches bactériennes sont capables de transformer la sidérite et la magnétite par des processus microbiens directs ou indirects et de conduire à la formation de rouille verte carbonatée ($\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{CO}_3$). Ce composé occupe une place centrale dans le cycle biogéochimique du fer en anoxie en tant que transitoire commun à plusieurs réactions microbiennes mobilisant le fer sous deux états d'oxydation différents Fe^{II} et Fe^{III} . L'originalité de ce travail de thèse est donc de montrer que des métabolismes bactériens inaccoutumés tels que les NRB ou les IRB sont susceptibles de jouer un rôle dans les processus de biocorrosion.

Effects of iron-reducing bacteria and nitrate-reducing bacteria on the transformations of iron corrosion products, magnetite and siderite, formed at the surface of non-alloy steel

Radioactive waste is one of the major problems facing the nuclear industry. To circumvent this issue France plans to store vitrified high-level nuclear waste in a stainless steel container, placed into a non-alloy steel overpack, at a depth of 500m in an argillaceous formation. The main iron corrosion products formed at the surface of the non-alloy steel are siderite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}_3$) and magnetite ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$). These compounds are formed in the anoxic conditions present in the nuclear waste repository and play a protective role against corrosion as a passive layer. This work aims to investigate the activity of nitrate-reducing bacteria (NRB, *Klebsiella mobilis*) and iron-reducing bacteria (IRB, *Shewanella putrefaciens*) during the transformation of siderite and magnetite, especially those involved in anoxic iron biogeochemical cycle. *Klebsiella mobilis* and *Shewanella putrefaciens* were first incubated with siderite or magnetite suspensions (high surface specific area) in order to exacerbate the microbial iron transformation, subsequently incubated with a magnetite/siderite film synthesized by anodic polarization at applied current density. The transformation of siderite and magnetite by direct or indirect microbial processes led to the formation of carbonated green rust ($\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{CO}_3$). As a transient phase shared by several bacterial reactions involving Fe^{II} and Fe^{III} , this compound is the cornerstone of the anoxic iron biogeochemical cycle. The novelty of this thesis is the consideration of bacterial metabolisms of NRB and IRB often overlooked in biocorrosion processes.