



**HAL**  
open science

# Réactivité géomicrobiologique des matériaux et minéraux ferrifères : impact sur la sureté d'un stockage de déchets radioactifs en milieux argileux

Loïc Esnault

► **To cite this version:**

Loïc Esnault. Réactivité géomicrobiologique des matériaux et minéraux ferrifères : impact sur la sureté d'un stockage de déchets radioactifs en milieux argileux. Sciences de la Terre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10139 . tel-01746181

**HAL Id: tel-01746181**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746181>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



# THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Nancy-Henri Poincaré  
en Géoscience

par **Loïc Esnault**

Ecole doctorale : **Ressources Procédés Produits Environnement**

**Réactivité géomicrobiologique des matériaux et minéraux  
ferrières : conséquences sur l'évolution à long terme des  
matériaux d'un stockage de déchets radioactifs en milieu  
argileux**

**Soutenue publiquement le 09 Décembre 2010**

Composition du jury :

<b>Oleg POKROVSKY</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>François GUYOT</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Jean-Claude BLOCK</b>	<b>Président</b>
<b>Frédéric VILLIERAS</b>	<b>Examineur</b>
<b>Guillaume MORIN</b>	<b>Examineur</b>
<b>Delphine PELLEGRINI</b>	<b>Examineur</b>
<b>Michel JULLIEN</b>	<b>Encadrant CEA</b>
<b>Marie LIBERT</b>	<b>Directrice de thèse</b>
<b>Christian MUSTIN</b>	<b>Co-directeur de thèse</b>



# THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Nancy-Henri Poincaré  
en Géoscience

par **Loïc Esnault**

Ecole doctorale : **Ressources Procédés Produits Environnement**

**Réactivité géomicrobiologique des matériaux et minéraux  
ferrières : conséquences sur l'évolution à long terme des  
matériaux d'un stockage de déchets radioactifs en milieu  
argileux**

**Soutenue publiquement le 09 Décembre 2010**

Composition du jury :

<b>Oleg POKROVSKY</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>François GUYOT</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Jean-Claude BLOCK</b>	<b>Président</b>
<b>Frédéric VILLIERAS</b>	<b>Examineur</b>
<b>Guillaume MORIN</b>	<b>Examineur</b>
<b>Delphine PELLEGRINI</b>	<b>Examineur</b>
<b>Michel JULLIEN</b>	<b>Encadrant CEA</b>
<b>Marie LIBERT</b>	<b>Directrice de thèse</b>
<b>Christian MUSTIN</b>	<b>Co-directeur de thèse</b>

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier comme il se doit mes deux directeurs de thèse Marie Libert (CEA) et Christian Mustin (UHP Nancy), pour avoir accepté de diriger ce travail. Je vous remercie aussi de m'avoir ouvert les portes de la géomicrobiologie et fait partager vos expériences. Merci Marie, pour ta confiance lors de ma participation à des programmes de recherche tels que « GDR FORPRO » ou « GNR PARIS », ainsi que ton soutien dans la réalisation de cette thèse. Merci à toi Christian, pour tes idées, ta motivation, ainsi que ta grande curiosité et culture scientifique qui m'ont été très bénéfiques. Je n'oublierai pas non plus nos discussions philosophiques sur les mécanismes à l'origine de la vie sur Terre, qui je l'espère, seront un jour démontrées....

Je tiens aussi à remercier Michel Jullien, qui a été pour moi bien plus qu'un encadrant de thèse CEA, mais un ami de confiance. Merci d'avoir été l'instigateur de ce projet et de m'avoir fait découvrir ta passion pour la géologie et plus particulièrement sur le monde « vivant » des argiles. J'ai apprécié les discussions très riches sur ces sujets « border line » ainsi que ta patience afin de répondre à toutes mes sollicitations, même dans les moments les plus « Caipirinharisé ».

Je remercie aussi l'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire) pour avoir financé mes travaux de recherche. Je tiens à remercier tout particulièrement Delphine Pelligrini et François Marsal de m'avoir accueilli dans ce programme de recherche exploratoire ainsi que de leurs visions sur la sûreté des stockages.

Je remercie également toutes les personnalités qui ont bien voulu participer à mon jury. J'exprime ma reconnaissance envers Messieurs Oleg Pokrovsky et François Guyot, respectivement professeurs à l'Université Paul Sabatier de Toulouse et à l'Université de Paris VII. Ils m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Messieurs Jean-Claude Block, professeur et directeur du LCPME à Nancy, Frédéric Villieras directeur de recherche au LEM à Nancy et Guillaume Morin, directeur de recherche à l'IMPMC à Paris, pour avoir été mes examinateurs.

Je rends hommage aussi à toutes les personnes que j'ai pu encadrer dans leurs stages et qui m'ont aidées, dans la mise en œuvre de mes expériences : Laurence, Olivier, Aurélien, Jiajia et Floriane, ce travail est aussi le vôtre.

De plus, je remercie Daniel Borschneck (CEREGE), Mustapha Abdelmoula (LCPME), Hervé Marmier et Géraldine Kitzinger (LIMOS) et Laurent Cournac (IBEB) pour leur aide dans la caractérisation des échantillons.

Je voudrais maintenant remercier mon laboratoire, le LMTE qui m'a accueilli pendant mes trois années de thèse au CEA Cadarache. Avec, tout d'abord, un merci chaleureux à ma collègue et amie de bureau: Laureline qui m'a supportée (le contraire aussi...) pendant ces trois années. Pleins d'anecdotes qui resteront, je l'espère, dans ce mythique bureau !!!

Un grand merci à tous mes collègues de travail rencontrés dans ce laboratoire ou à Cadarache, devenus au cours de ces années des précieux amis: Anthony (polyglotte à ses heures perdues mais surtout « accro » au CO<sub>2</sub>), Sabine (hydrogéologue mais aussi alpiniste le dimanche), Amandine (la présidente de l'ASTHEC) et Mathieu (le meilleur buteur en activité des mercenaires).

Un grand merci aussi à Olivier et Jean-Eric pour nos discussions et vos conseils avisés, (on garde le contact). Merci aussi à toute l'équipe du labo, Régine, Michel, Guy, Claudine et Joël avec une spéciale dédicace à Pinpin (JCP pour les Mercenaires....). Enfin un merci à tous les collègues du LMTE, entre autres Odile (la 2<sup>ème</sup> maman du labo), Franck (accro au vélo), Ingmar et Véro, Pascal, Christophe, Pierre, Yves, Valérie, Jocelyne... et une dernière dédicace d'avenir avec le Brésil : Vivi, Marta et Rebeca !!!

« La science restera toujours la satisfaction du plus haut désir de notre nature, la curiosité ; elle fournira à l'homme le seul moyen qu'il ait pour améliorer son sort.»

**[ Ernest Renan ] - Extrait de *L'Avenir de la science***



# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES FIGURES .....</b>	<b>7</b>
<b>TABLEAUX .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>11</b>
<b>CHAPITRE I : OBJECTIFS ET CONTEXTE DE L'ETUDE .....</b>	<b>13</b>
<b>1. CONTEXTE DU STOCKAGE GEOLOGIQUE ARGILEUX.....</b>	<b>13</b>
1.1. OBJECTIFS ET FINALITE DU STOCKAGE : LES ENJEUX.....	13
1.2. GEOMETRIE ET SPECIFICITES DES SYSTEMES PROFONDS : LES CONCEPTS, LES MATERIAUX ET LE MILIEU GEOLOGIQUE .....	14
1.3. CONCEPT ET ORGANISATION DES ALVEOLES.....	16
1.4. POSITIONNEMENT DE LA PROBLEMATIQUE « ACTIVITE MICROBIENNE » EN STOCKAGE PROFOND.....	16
<b>2. REACTIVITE DES MATERIAUX.....</b>	<b>18</b>
2.1. LES BARRIERES ARGILEUSES : PROCESSUS DE FORMATION, PHASES ET ELEMENTS CIBLES REACTIFS.....	18
2.1.1. <i>Structure et classification des phyllosilicates.....</i>	18
2.1.2. <i>Formation sédimentaire des argilites : un environnement stable ?.....</i>	20
2.1.3. <i>Phases réactives des argilites : Les smectites.....</i>	21
2.1.4. <i>Le fer : élément cible de la réactivité des argilites.....</i>	22
2.2. FER METALLIQUE : PROCESSUS DE CORROSION ET CONDITIONS PHYSICO-CHEMIQUES ASSOCIEES .....	26
2.2.1. <i>Corrosion métallique.....</i>	26
2.2.2. <i>Formation d'H<sub>2</sub> de corrosion : état et transport en milieu argileux .....</i>	27
2.3. REACTIVITE FER/ARGILE : PRINCIPES ET PROCESSUS.....	29
2.3.1. <i>Corrosion argileuse : réactivité des smectites.....</i>	29
2.3.2. <i>Vision intégrée de la réactivité : Retour sur les modélisations Fer/Argile .....</i>	30
<b>3. ACTIVITE BACTERIENNE DANS LE STOCKAGE .....</b>	<b>33</b>
3.1. PRESENCE MICROBIENNE DANS LES SITES DE STOCKAGE PROFOND.....	34
3.2. EXIGENCE DE LA VIE MICROBIENNE ET LIMITES DANS LES ENVIRONNEMENTS EXTREMES.....	35
3.2.1. <i>Métabolisme bactérien : substrats nutritifs et énergétiques .....</i>	35
3.2.2. <i>Activité microbienne en milieu argileux profond .....</i>	37
3.3. REVUE DES IMPACTS MICROBIENS SUR LA REACTIVITE IMPLIQUANT LES MATERIAUX.....	42
3.3.1. <i>Fonctions d'altération microbienne.....</i>	42
3.3.2. <i>Interaction microbienne sur le Fe(III) structural.....</i>	43
3.3.3. <i>Biocorrosion des matériaux métalliques.....</i>	46
<b>4. ORGANISATION DE L'ETUDE .....</b>	<b>48</b>
4.1. SYSTEMES DE STOCKAGE : ENVIRONNEMENT PROPICE A UNE ACTIVITE BACTERIENNE ? ....	48
4.2. CHOIX D'UN MODELE BACTERIEN.....	49
4.3. QUESTIONS POSEES DANS CETTE ETUDE.....	49
4.4. LA DEMARCHE DE L'ETUDE.....	50



<b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>53</b>
<b>1. MATERIAUX .....</b>	<b>53</b>
1.1. LES PHASES ARGILEUSES .....	53
1.1.1. <i>Argilite de Tournemire</i> .....	53
1.1.2. <i>Argiles purifiées</i> .....	55
1.2. LE METAL ET LES OXYDES.....	58
1.2.1. <i>Le fer métal</i> .....	58
1.2.2. <i>L'hématite</i> .....	58
1.2.3. <i>La magnétite</i> .....	58
1.3. LE MILIEU REACTIONNEL : DE L'EAU INTERSTITIELLE DU SITE A UN MILIEU REPRESENTATIF EN LABORATOIRE.....	58
1.4. LES BACTERIES.....	60
1.4.1. <i>Les bactéries ferriréductrices</i> .....	60
1.4.2. <i>Les biosenseurs</i> .....	62
<b>2. MATERIELS .....</b>	<b>64</b>
2.1. MATERIELS EXPERIMENTAUX .....	64
2.2. MATERIELS ANALYTIQUES.....	67
2.2.1. <i>Mesures des activités microbiologiques</i> .....	67
2.2.2. <i>Altération des phases minérales : mesures chimiques</i> .....	69
2.2.3. <i>Caractérisation et altération des phases minérales : analyse des solides</i> .....	71
<b>PARTIE I : DEVELOPPEMENT BACTERIEN FERRI-REDUCTEUR EN MILIEU GEOLOGIQUE PROFOND .....</b>	<b>75</b>
<b>CHAPITRE III : CARACTERISATION DES NUTRIMENTS ET DU FE(III) STRUCTURAL DISPONIBLES EN CONDITION DE STOCKAGE .....</b>	<b>77</b>
<b>1. ELEMENTS NUTRITIFS ET ENERGETIQUES DANS LES ENVIRONNEMENTS ARGILEUX PROFONDS .....</b>	<b>77</b>
1.1. COMPOSITIONS MINERALOGIQUE ET CHIMIQUE DANS LES ARGILITES .....	77
1.1.1. <i>Composition minéralogique de l'argilite</i> .....	80
1.1.2. <i>Composition chimique des eaux interstitielles</i> .....	81
1.2. LOCALISATION DES RESERVOIRS FER ET SPECIATION DU FER DANS LES MINERAUX .....	81
1.3. DEVELOPPEMENT BACTERIEN FERRIREDUCTEUR : APPROCHE THERMODYNAMIQUE ET NUTRITIVE .....	83
<b>2. APPORT DES COLIS DE DECHETS METALLIQUES POUR LE DEVELOPPEMENT MICROBIEN .....</b>	<b>88</b>
2.1. COMPOSITION DES COLIS .....	88
2.2. FLUX DE NUTRIMENTS .....	89
<b>PARTIE II : (BIO)-DISPONIBILITE ET REACTIVITE DU FER DANS LES MATERIAUX : IMPACT DES ACTIVITES BACTERIENNES FERRI-REDUCTRICES.....</b>	<b>93</b>
<b>CHAPITRE IV: BIOREDUCTION DU FE(III) DANS LES MILIEUX ARGILEUX .....</b>	<b>95</b>
<b>1. PREAMBULE : ALTERATION BACTERIENNE D'UNE ARGILE FERRIFERE .....</b>	<b>95</b>
<b>2. BIOREDUCTION DANS LES SYSTEMES ARGILEUX HETEROGENES . 98</b>	
2.1. IMPACT DES ACTIVITES BACTERIENNES FERRI-REDUCTRICES EN MILIEU ARGILEUX COMPLEXE : LE CAS DES ARGILITES .....	98

ARTICLE I: IMPACT OF IRON-REDUCING BACTERIA ON THE PROPERTIES OF ARGILITES IN THE CONTEXT OF GEOLOGICAL RADIOACTIVE WASTE DISPOSAL ....	98
2.2. IMPACT DES ACTIVITES BACTERIENNES FERRI-REDUCTRICES SUR DES ARGILES PURIFIEES .	114
ARTICLE II: CLAY-IRON REDUCING BACTERIA INTERACTION IN DEEP GEOLOGICAL ENVIRONMENT: EXPERIMENTAL AND MODELING APPROACH.....	115
<b>3. REACTIVITE SPECIFIQUE DES SMECTITES EN PRESENCE DE BACTERIES FERRI-REDUCTRICES .....</b>	<b>122</b>
ARTICLE III: REACTION PARAMETERS FOR SMECTITES ALTERATION INDUCED BY IRB AT LOW TEMPERATURE .....	123
<b>4. COMPLEMENTS ET SYNTHESE .....</b>	<b>139</b>
4.1. MECANISMES DE REDUCTION ET D'ALTERATION .....	139
4.2. BILAN INTERMEDIAIRE .....	143
<b>CHAPITRE V : BIOCORROSION DES MATERIAUX METALLIQUES .....</b>	<b>145</b>
<b>1. FER ET CORROSION EN MILIEU PROFOND .....</b>	<b>145</b>
<b>2. DISSOLUTION BACTERIENNE DES OXYDES DE FER .....</b>	<b>146</b>
<b>3. FER METAL : REACTIONS ABIOTIQUES / BIOTIQUES, ROLE SUR LES VITESSES DE CORROSION .....</b>	<b>150</b>
ARTICLE IV: METALLIC CORROSION PROCESSES REACTIVATION SUPPORTED BY IRON REDUCING BACTERIA: IMPLICATION ON LONG TERM STABILITY OF PROTECTIVE LAYERS .....	150
<b>CHAPITRE VI : MECANISMES DE (BIO)-REDUCTION DU FE(III) EN MILIEU POREUX .....</b>	<b>163</b>
<b>1. DIFFUSION DE COMPOSES REDUCTEURS DANS LES SYSTEMES POREUX (REDUCTION INDIRECTE A DISTANCE).....</b>	<b>164</b>
1.1. EXPERIENCES ABIOTIQUES .....	164
1.2. EXPERIENCES BIOTIQUES .....	165
<b>2. LES TRANSPORTEURS D'ELECTRONS BACTERIENS .....</b>	<b>165</b>
<b>3. LE COUPLAGE REDUCTION/ACIDIFICATION : IMPACT SUR LES PROPRIETES CRISTALLOCHIMIQUES DES MINERAUX.....</b>	<b>168</b>
3.1. LES MECANISMES DE REDUCTION ET D'ACIDOLYSE .....	169
3.2. REDUCTION REVERSIBLE DES NONTRONITES .....	171
3.3. ALTERATION IRREVERSIBLE DES NONTRONITES PAR ACIDOLYSE .....	174
<b>4. LES MECANISMES BACTERIENS .....</b>	<b>175</b>
4.1. REDUCTION « REVERSIBLE » DU FER (III) PAR LES BACTERIES.....	176
4.2. L'ALTERATION BACTERIENNE PAR ACIDOLYSE .....	178
<b>5. PROPOSITION D'UN MODELE REACTIONNEL POUR LA REDUCTION BACTERIENNE DU FER DANS LES SYSTEMES ARGILEUX .....</b>	<b>179</b>
ARTICLE V: ELECTRON SHUTTLE TRANSPORT: EFFICIENT MECHANISM OCCURRING AT A DISTANCE FOR IRB RESPIRATION .....	181
<b>6. CONCLUSION INTERMEDIAIRE .....</b>	<b>193</b>

<b>PARTIE III : CAPACITE DE DEVELOPPEMENT DES BACTERIES FERRI-REDUCTRICES EN CONDITIONS DE STOCKAGE GEOLOGIQUE .....</b>	<b>195</b>
<b>CHAPITRE VII : CONTROLE DE L'ACTIVITE FERRI-REDUCTRICE PAR LES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX.....</b>	<b>197</b>
<b>1. INFLUENCE DE L'ACTIVITE BACTERIENNE SUR LE SYSTEME COUPLE FER METAL - ARGILE .....</b>	<b>197</b>
1.1.    ROLE DE L'HYDROGENE SUR LE METABOLISME BACTERIEN .....	197
1.1.1. <i>Hydrogène dans le stockage : Source énergétique pour la vie microbienne ...</i>	197
1.1.2. <i>Métabolisme bactérien : Hydrogénase .....</i>	197
1.1.3. <i>Réduction des matériaux du stockage profond : Couplage H<sub>2</sub> / Fe(III) .....</i>	199
1.2.    DETERMINATION DES PARAMETRES D'INFLUENCE.....	200
1.2.1. <i>Respiration du Fe<sup>3+</sup> en solution en présence de fer métallique.....</i>	201
1.2.2. <i>Impact du fer métal dans la bio-réduction du Fe(III) structural des smectites..</i>	202
1.2.3. <i>Validation de l'impact de l'activité ferri-réductrice sur la réaction couplée fer métal - argile .....</i>	204
<b>2. INFLUENCE DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LA BIOREDUCTION DU FE(III) STRUCTURAL .....</b>	<b>206</b>
2.1.    INFLUENCE DE LA TEMPERATURE .....	206
2.2.    INFLUENCE DE LA PRESSION .....	207
2.3.    INFLUENCE DE P <sub>H2</sub> .....	209
<b>3. IMPACT DU FE<sup>2+</sup> SUR L'ACTIVITE MICROBIOLOGIQUE .....</b>	<b>211</b>
3.1.    ACTIVITE BACTERIENNE SELON LA CONCENTRATION EN FE <sup>2+</sup> .....	211
3.1.1. <i>Notion de carence et de toxicité .....</i>	211
3.1.2. <i>Impact du Fe<sup>2+</sup> sur l'activité hydrogénase des bactéries ferri-réductrices.....</i>	214
3.2.    MECANISMES D'INHIBITION DES ACTIVITES BACTERIENNES FERRI-REDUCTRICES DANS LE STOCKAGE .....	218
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>223</b>
1.    ACTIVITE BACTERIENNE EN CONDITION DE STOCKAGE : APPLICATION AUX BACTERIES FERRI-REDUCTRICES .....	223
2.    ACCESSIBILITE AU FE(III) STRUCTURAL ET REACTIVITE MICROBIOLOGIQUE EN MILIEU ARGILEUX	225
3.    PROCESSUS GEOMICROBIOLOGIQUES EN CONDITION DE STOCKAGE .....	227
4.    INFLUENCE A L'ECHELLE DU STOCKAGE .....	228
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>231</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>233</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>247</b>

## TABLE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Illustration d'un système multibarrières (Perronnet et al, 2005).	14
<b>Figure 2</b> : Coupe géologique sur le site du laboratoire de recherche souterrain (Andra, 2005).	15
<b>Figure 3</b> : Schéma représentatif des zones de stockage de colis de déchets B et C en profondeur (Andra 2005).	15
<b>Figure 4</b> : Schéma d'une alvéole de colis HAVL (Andra 2005).	16
<b>Figure 5</b> : Représentation 3 D d'une smectite d'après Kohler (2005) et précision sur la composition d'un feuillet TOT.	19
<b>Figure 6</b> : Représentation de la structure en feuillet des phyllosilicates.	21
<b>Figure 7</b> : Relations de stabilité entre les oxydes, les sulfures, les carbonates et les silicates de fer a 25°C et à une pression totale de 1 atmosphère, en présence d'eau.	23
<b>Figure 8</b> : Schéma synthétique des mécanismes d'oxydation à la surface des blocs (zone « edz ») d'après Charpentier et al. 2001.	25
<b>Figure 9</b> : Diagrammes de phases Eh/pH du fer (Taylor and Curtis, 1995).	27
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique de la migration du transfert des gaz dans une alvéole de déchets C (Talandier, 2005).	28
<b>Figure 11</b> : Réactivité fer/argile (lantenais, 2003) : formation de phase ferrifère à 7 Å riches en fer.	29
<b>Figure 12</b> : Résultats de simulation de l'évolution du fer et des produits de réaction au cours de l'expérience fer/argilite (quantité de minéral en g). Observation au MEB de la corrosion de poudre de fer en présence d'argilite après 6 mois de réactivité : agrégat de silicate riche en fer de type greenalite et de cristaux de magnétite (de Combarieu et al., 2007).	31
<b>Figure 13</b> : Schéma du modèle 1d des interactions fer/argile (Bildstein et al., 2006).	31
<b>Figure 14</b> : Le métabolisme bactérien.	35
<b>Figure 15</b> : Nutriments bactériens selon les sources et leurs fonctions (Todar, 2006).	36
<b>Figure 16</b> : Bio-minéralisation de la matière organique dans les systèmes redox, avec les quantités d'énergies $\Delta G^\circ$ résultantes.	38
<b>Figure 17</b> : Modélisation lors du pic thermique des températures attendues dans le champ proche d'une alvéole des colis C (Andra, 2005).	41
<b>Figure 18</b> : Vitesse de dissolution d'une phase minérale de type biotite selon les fonctions d'altération microbienne. Domaine i (acidolyse) ; domaine ii (complexolyse) et domaine iii (immobilisation).	42
<b>Figure 19</b> : Sélection des fonctions d'altérations des espèces bactériennes selon la nature des sols (Balland, 2010).	43
<b>Figure 20</b> : Illustration schématique des différentes stratégies de transfert d'électrons au fer ferrique (Kappler, 2005)	44
<b>Figure 21</b> : Observation au DRX (a) et au MET (b) sur l'illitisation d'une smectite ferrifère par <i>shewanella oneidensis</i> (kim, 2004).	45
<b>Figure 22</b> : Schéma de bactéries en milieu argileux compacté.	46
<b>Figure 23</b> : Mécanisme de biocorrosion métallique (Lee, 1995).	47
<b>Figure 24</b> : Schéma d'une alvéole de stockage et des phénomènes pouvant augmenter l'activité bactérienne.	48
<b>Figure 25</b> : Photo du site de tournemire et localisation de l'ancien tunnel ferroviaire traversant l'argilite du toarcien.	53
<b>Figure 26</b> : Coupe géologique du tunnel de Tournemire avec en renfort une carte montrant l'emplacement de Tournemire (d'après Boisson, 1996) et la localisation des échantillons étudiés.	54
<b>Figure 27</b> : Optimum de bio-réduction/dissolution du fer de la smectite en fonction du pH et de la température après exposition aux bactéries <i>shewanella oneidensis</i> (Kotska et al., 1996).	61
<b>Figure 28</b> : Evolution du taux de croissance moyen de <i>Thermotoga</i> en fonction de la température et du pH (Jeanthon et al., 1995).	62
<b>Figure 29</b> : Photos des deux réacteurs en téflon et en verre.	65
<b>Figure 30</b> : La photo A représente la synthèse d'un gel inorganique hybride (GIH) sans incorporation de nontronite, la photo B représente le GIH synthétisé en présence de nontronite Nau2 et la photo C représente une coupe transversale du GIH - nontronite encapsulé dans un second GIH afin d'enlever l'accessibilité du Fe(III) nontronite pour les bactéries par simple contact de surface du matériau.	66
<b>Figure 31</b> : Schéma expérimental général des expériences d'interaction entre des phases argileuses et des bactéries et/ou du Fe(0).	67
<b>Figure 32</b> : Système permettant de suivre la diffusion des sondes ioniques dans le GIH par microscopie confocale.	73
<b>Figure 33</b> : Cartographie du forage MB2 et de la carotte d'argile échantillonnée.	78
<b>Figure 34</b> : Spectre de diffraction des différents échantillons de l'argilite de Tournemire (sain, fracture et edz).	79
<b>Figure 35</b> : Spectres Mossbauer de l'argilite de Tournemire.	82
<b>Figure 36</b> : Section transversale de l'enveloppe des colis de déchets HAVL (Andra 2005).	88
<b>Figure 37</b> : Evolution de la concentration en fer en fonction du temps pour différents agents d'altération d'une smectite 96	
<b>Figure 38</b> : Evolution temporelle de traceurs de l'activité microbienne (pH, biomasse) lors de la réduction du Fe(III) de la smectite en présence du lactate comme source de carbone et d'électrons.	96
<b>Figure 39</b> : Evolution de la concentration en lactate lors des expériences biotiques (réduction du Fe(III) de la smectite par <i>Shewanella oneidensis</i> ) et abiotiques.	97
<b>Figure 40</b> : Photos de la smectite bio-alterée (gauche) avec ses gels associés par <i>Clostridium aurantibutyricum</i> et de la smectite témoin (droite).	139
<b>Figure 41</b> : Représentation schématique d'une séquence réactionnelle de formation de phase à 7 Å induite par la réduction bactérienne du Fe(III) dans un système bactéries ferri-réductrices – smectite ferrifère.	141
<b>Figure 42</b> : Représentation schématique d'une séquence réactionnelle d'illitisation induite par réduction dans un système bactéries ferri-réductrices – smectite ferrifère.	142
<b>Figure 43</b> : Dissolution de la magnétite après réduction du Fe(III) par <i>Shewanella oneidensis</i> .	147
<b>Figure 44</b> : Dissolution de l'hématite après réduction du Fe(III) par <i>Shewanella oneidensis</i> .	147
<b>Figure 45</b> : Evolution des substrats (lactate) et des produits réactionnels lors de la réduction du Fe(III) de la magnétite par <i>Shewanella oneidensis</i> MR1.	148
<b>Figure 46</b> : Evolution des substrats (lactate) et des produits réactionnels lors de la réduction du Fe(III) de l'hématite par <i>Shewanella oneidensis</i> MR1.	148

<b>Figure 47</b> : Visualisation des processus de réduction/oxydation du Fe(III) dans des GIH enrichis en nontronite en présence de d'agents chimiques réducteurs ou oxydants (dithionite ou de peroxyde d'hydrogène). Rayon = 4,07mm.	164
<b>Figure 48</b> : Visualisation des processus de réduction/oxydation du Fe(III) dans des GIH enrichis en nontronite en présence de la bactérie <i>Shewanella sp.</i>	165
<b>Figure 49</b> : Solubilisation du Fe(III) dans les GIH-nontronite en présence des bactéries <i>Shewanella sp.</i> (d.e : H <sub>2</sub> ). <i>Clostridium sp.</i> (d.e : glucose). et <i>Thermotoga sp.</i> (d.e : peptone). d.e : donneur d'électrons.	166
<b>Figure 50</b> : Altération par acidolyse du GIH-nontronite par la bactérie fermentaire <i>Clostridium aurantibutyricum.</i>	168
<b>Figure 51</b> : Dispositif d'analyse simultanée in vitro en cuve quartz (scellée) du statut du fer structural des GIH en présence d'une solution réductrice composée d'agents chimiques ou de cellules bactériennes.	169
<b>Figure 52</b> : Identification des bandes spectrales du fer dans les nontronites, comparaison entre GIH-nau1 et nau2 (oxyde et réduit) et un gel de silice pur ou dopé en montmorillonite(GIH).	171
<b>Figure 53</b> : Identification des bandes spectrales du fer dans les nontronites après réduction avec du dithionite de sodium (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ).	172
<b>Figure 54</b> : Evolution de l'intensité normalisée (rèf à460 nm) des bandes spectrales caractéristiques du statut du fer dans la nontronite au cours de sa réduction par du dithionite de sodium (2mM à pH7).	173
<b>Figure 55</b> : Estimation selon un modèle d'ordre 1 des constantes de temps de réduction des différents sites Fer(III) dans la nontronite.	174
<b>Figure 56</b> : Evolution du fer structural des nontronites au cours de processus de réduction/altération (initial =couleur orange ; réduit =couleur verte ; altéré =couleur blanchie).	175
<b>Figure 57</b> : Spectres UV-VIS des GIH-nontronite après réduction biotique ( <i>S. oneidensis</i> MR1) et abiotique (dithionite 2mm). Le spectre d'absorbance des quinones est aussi indiqué en comparaison.	176
<b>Figure 58</b> :Oxydation du pyrocatechol par les ions Fe <sup>3+</sup> .	177
<b>Figure 59</b> : Formation schématique du complexe quinhedrone et son spectre d'absorbance (Regeimbal et al., 2003).	177
<b>Figure 60</b> : Schéma proposé du transfert d'électrons catechol – quinone via un complexe stable équimolaire : la quinhedrone.	178
<b>Figure 61</b> : Evolution des bandes spectrales des sites de fer structural de la nontronite nau2 après altération (réduction, acidolyse) bactérienne ( <i>Clostridium aurantibutyricum</i> ). GIH-nontronite_ox= initial ; GIH-réduit=après réduction du Fe(III) ; GIH-altéré (1, 2 et 3)= évolution du blanchiment du gel. Les bandes 1 correspondent au Fe(III) octaédrique et la bande 5 correspond au Fe(II) octaédrique.	179
<b>Figure 62</b> : Mécanisme de réduction / altération des Fe(III)-nontronite à distance via des transporteurs d'électrons extracellulaires bio-induits. la formation à l'état équimolaire de quinhedrone (Q/QH <sub>2</sub> ) au sein des milieux poreux favorise le transfert des électrons entre les transporteurs et la réduction du Fe(III) structural.	180
<b>Figure 63</b> : Schématisation du contrôle des phases minérales argileuses par les activités bactériennes hydrogénotrophes en milieu confiné poreux.	194
<b>Figure 64</b> : Structure d'une hydrogénase indiquant les clusters Fe-S, le site actif de l'H <sub>2</sub> et la chaîne hydrophobe facilitant l'accès à l'H <sub>2</sub> (Volbeda et al. 1995).	198
<b>Figure 65</b> : Réaction dans un contexte organo - minéral - métallique: activation/inhibition.	200
<b>Figure 66</b> : Réduction du Fe(III)-citrate en présence de Fe <sup>(0)</sup> par <i>Shewanella sp.</i> Les valeurs de temps de réduction décrites sont des moyennes des 3 répliquats réalisés.	201
<b>Figure 67</b> : Batch représentant l'activité microbienne de réduction du Fe(III) en contexte fer-argile.	202
<b>Figure 68</b> : Consommation de glucose au cours de la réduction du Fe(III) de la smectite.	203
<b>Figure 69</b> : Suivi de la concentration chimique en solution des éléments structuraux de la smectite au cours des altérations bactériennes en condition de réactivité fer/argile.	203
<b>Figure 70</b> : Influence des oxydants (biologique, chimique et argileux) sur les processus de corrosion métallique.	205
<b>Figure 71</b> : Bio-réduction du Fe(III) de la smectite à 60°C par <i>Thermotoga subterranea.</i>	207
<b>Figure 72</b> : Augmentation de la dissolution du Fe structural de l'argilite en présence de bactéries ferri-réductrices thermophiles.	207
<b>Figure 73</b> : Réacteur à haute pression : dispositif pour la mesure de la croissance bactérienne sous pression croissante (1 à 45 bars).	208
<b>Figure 74</b> : Bio-consommation d'H <sub>2</sub> lors de la réduction du Fe(III) des smectites en fonction du temps.	209
<b>Figure 75</b> : Principe de fonctionnement d'un biosenseur.	211
<b>Figure 76</b> : Mesures par luminométrie (ftpa_lux) et par fluorimétrie (bfrb_gfp 2δ) de l'expression des gènes rapporteurs résultant de la concentration en fer disponible pour les bactéries : limite biologique des milieux carencés en fer.	212
<b>Figure 77</b> : Fenêtre d'activité microbiologique et de croissance bactérienne ferri-réductrice hydrogénotrophe en fonction de la concentration en fer en solution.	214
<b>Figure 78</b> : Représentation en pourcentage des échanges H <sub>2</sub> , HD et D <sub>2</sub> en fonction du temps lors de la consommation de D <sub>2</sub> dans les expériences de réduction du Fe(III) citrate. a) réacteur témoin ; b) en présence de la bactérie <i>Shewanella.</i>	215
<b>Figure 79</b> : Représentation en pourcentage des échanges H <sub>2</sub> , HD et D <sub>2</sub> en fonction du temps lors de la consommation de D <sub>2</sub> dans les expériences de réduction du Fe(III) citrate en présence d'une concentration en Fe <sup>2+</sup> croissante. Un témoin abiotique en présence de 1mM de Fe <sup>2+</sup> est également représenté.	216
<b>Figure 80</b> : Ratio isotopique (τ) de D <sub>2</sub> en fonction du temps pour les différentes expériences biotiques de réduction du Fe(III).	217
<b>Figure 81</b> : Consommation de l'hydrogène en fonction de sa concentration dans le milieu.	219
<b>Figure 82</b> : Images microscope électronique d'une cellule en milieu citrate 20mM (photo A gauche) et d'une cellule en milieu citrate ; préalablement mises en présence d'un excès de Fe <sup>2+</sup> 2mM (photo à droite), (Liu and Zachara, 2001).	220
<b>Figure 83</b> : Diagramme potentiel-pH du fer pour [10 <sup>-2</sup> mol/l] et [10 <sup>-6</sup> mol/l].	221
<b>Figure 84</b> : Mécanismes d'inhibition à l'échelle du pore de l'activité bactérienne ferri-réductrice.	222
<b>Figure 85</b> : Module expérimental de mesure de gonflement du GIH-nontronite par un palper en condition anoxique en jarre (N <sub>2</sub> 90% CO <sub>2</sub> 10%).	247
<b>Figure 86</b> : Cinétique de dégonflement du GIH-nontronite.	248
<b>Figure 87</b> : Mesure des diamètres des GIH-nontronite au cours de l'altération bactérienne.	249
<b>Figure 88</b> : Images de diffusion des sondes ioniques dans le GIH (a), le GIH-nontronite (b), le GIH-nontronite réduit (c), le GIH-nontronite blanchie (d) après altération bactérienne.	251

## TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Classification des phyllosilicates. X représente la charge du feuillet par unité structurale, d'après (Bruno, G. 1993).	19
<b>Tableau 2</b> : Surface spécifique des matériaux argileux mesurée par BET à l'azote (CEREGE, Centre de Recherche et d'Enseignement en Géosciences de l'Environnement).	58
<b>Tableau 3</b> : Composition chimique du milieu synthétique MClay utilisé lors des expériences bactériennes – minéraux ferriques. comparaison avec les milieux naturels.	60
<b>Tableau 4</b> : Produits du métabolisme de la souche <i>Clostridium aurantibutyricum</i> (Véglija, 1996).	61
<b>Tableau 5</b> : Construction des biosenseurs.	63
<b>Tableau 6</b> : Composition chimique en pourcentage d'oxydes de l'argilite de Tournemire.	80
<b>Tableau 7</b> : Composition minéralogique (%massique) des matériaux composites (Perronnet, 2004).	80
<b>Tableau 8</b> : Concentration des espèces chimiques des eaux interstitielles de l'argilite de Tournemire.	81
<b>Tableau 9</b> : Spéciation du fer (mmol/l) dans les phases minérales de l'argilite de Tournemire. Le $Fe^{2+}$ en mmol/l a été mesuré par une méthode colorimétrique à 510nm, le fer total est mesuré par ICP-AES. Le pourcentage de $Fe^{3+} = (Fe\ total - Fe^{2+})/Fe\ total$ .	82
<b>Tableau 10</b> : Phases minérales ferriques présentes dans l'argilite de Tournemire et détermination semi-quantitative des phases $Fe(III)$ .	83
<b>Tableau 11</b> : Composition en éléments substrats, essentiels pour le développement bactérien.	84
<b>Tableau 12</b> : Comparaison de la quantité de biomasse synthétisée selon une approche énergétique du système et des nutriments présents en solution.	86
<b>Tableau 13</b> : Composition chimique du « colis de déchets ».	89
<b>Tableau 14</b> : Composition du « colis de déchets » utilisé pour l'étude.	89
<b>Tableau 15</b> : Estimation d'un flux de nutriments lors de la corrosion du colis (verre+acier).	90
<b>Tableau 16</b> : Tableau d'analyses chimiques (% atomique) de la smectite témoin non altérée et la smectite altérée par analyses EDS.	139
<b>Tableau 17</b> : Mesure de la capacité d'échange cationique (CEC) avant et après altération microbienne.	140
<b>Tableau 18</b> : Quantités de métabolites produits lors de la réduction bactérienne des GIH-nontronite. (t=600h).nd : non détectable.	166
<b>Tableau 19</b> : Formule structurale des nontronites nau1 et nau2 à maille complète.	170
<b>Tableau 20</b> : Détermination de la croissance bactérienne ( $\delta$ croissance) au cours d'une augmentation des conditions de pression (15 bars à 45 bars).	208
<b>Tableau 21</b> : Bilan de l'activité bactérienne ferri-réductrice : consommation d' $H_2$ disponible et réduction du $Fe^{3+}$ de la smectite. La concentration d' $H_2$ correspond à la fraction d' $H_2$ présente dans les réacteurs à la pression de l'expérience (~1,6bar).	210
<b>Tableau 22</b> : Effet de la concentration en $Fe^{2+}$ sur l'activité et le développement des bactéries ferri-réductrices après 24h d'expérience. La consommation d' $H_2$ indiquée correspond à la moyenne de trois réplicats.	213
<b>Tableau 23</b> : Vitesse d'échange de l'enzyme hydrogénase (quantité d'isotope de l'hydrogène /heure) en fonction de la quantité de $Fe^{2+}$ présent : calculée via la pente des ratios isotopiques.	217
<b>Tableau 24</b> : Synthèse des diffusions dans les GIH-nontronite avant et après altération bactérienne. Modèle utilisé $t_{90} = k. l_2^2/de$ avec $k = 1.03$ (symétrie cylindrique) ; apparent diffusion constant (ADC) or effective lateral diffusion (de) exprimé en $10^{-8} cm^2/s$ ; tortuosité ( $1/\tau$ ) déterminée pour srb $1/\tau = de/daq$ avec $daq = 3,65. 10^{-6} cm^2/s$ à 25°C pour SRB (diffusion dans l'eau). * calcul à partir du front de diffusion ( $t_{50}$ ).	250



## INTRODUCTION

---

Cette étude s'attache à décrire la «Réactivité Géomicrobiologique des matériaux et minéraux ferrifères» dans le cadre du stockage géologique de déchets radioactifs de haute activité et à vie longue (HAVL) en milieu argileux profond. L'introduction de matériaux exogènes au sein d'un milieu argileux est susceptible de perturber ou de modifier durablement les conditions physico-chimiques et géochimiques prévalant en profondeur. Que ce soit lors des phases de creusement et d'exploitation du stockage ou bien au cours de son évolution à long terme, l'interaction des différents matériaux présents va libérer des espèces chimiques (fer, soufre, silicium, magnésium...) et gazeuses (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>...). Ces interactions, fluide/roche notamment, peuvent durablement modifier les conditions géochimiques du milieu et engendrer progressivement une altération des composants impliqués dans les différentes configurations de stockage. Ce processus d'altération pourrait remettre en cause les capacités de confinement des différentes enveloppes ouvragées et donc d'influer sur le relâchement et la migration des radionucléides. Par conséquent, la connaissance des propriétés chimiques et mécaniques des matériaux est nécessaire pour évaluer la capacité de confinement du stockage sur le court et le long terme et sa pérennité.

L'existence de micro-organismes vivant profondément sous la surface de la terre est maintenant bien établie. (Gold 1992 ; Parkes et al., 1994, 2000 ; Pedersen, 1996, 1997 ; Whitman et al. 1998). Cette biosphère souterraine (selon les auteurs entre 5 % et 50 % de la biomasse terrestre totale) se retrouve principalement dans les milieux sédimentaires, les gisements de pétrole, les aquifères, les roches volcaniques et basaltiques. Dans ces écosystèmes profonds, même si certains métabolismes microbiens essentiellement hétérotrophes tirent leur énergie de la matière organique sédimentaire, d'autres autotrophes utilisent plutôt des sources d'énergie d'origine géochimique, comme l'hydrogène ou le méthane. Ces modes de fonctionnement alternatifs sont caractéristiques des systèmes profonds. Néanmoins, comme tous les micro-organismes pour survivre et vivre dans ces environnements profonds, ils doivent disposer de tous les éléments nutritifs et oligo-éléments nécessaires pour leur développement tels que carbone, azote, phosphore, soufre, magnésium, fer...).

Dans les environnements argileux profonds étudiés pour le stockage et malgré les conditions hostiles (faible hydratation, faible porosité), la présence de microorganismes endogènes a été démontrée par de multiples études récentes (Stroes Gascoyne et al., 2007 ; Mauclaire et al., 2007 ; Pedersen et al., 2000 ; Poulain, 2006). Les apports nutritifs indispensables peuvent être fournis par les produits d'altérations mentionnés précédemment, qui sont susceptibles de favoriser, d'initier ou de modifier l'activité bactérienne et qui peut en retour entretenir l'altération. Dans ce travail, il a semblé pertinent d'étudier cette boucle altération/nutrition originale et de décrire les paramètres qui la contrôlent, afin d'évaluer son impact sur les propriétés de confinement des composants du stockage.

Même si la nature endémique des microorganismes identifiés peut être longuement discutée (absence de contamination par des apports allochtones), l'impact des activités microbiennes en milieu profond ne peut être sous-estimé. Plusieurs études montrent aujourd'hui, le rôle important des microorganismes dans les cycles biogéochimiques ainsi que leurs capacités impressionnantes à survivre dans les environnements les plus extrêmes. Si le milieu argileux constitue une limite physique à la vie des microorganismes autochtones, l'introduction de souches allochtones, dans un milieu argileux présentant une surface d'exploitation de plusieurs kilomètres carrés est certainement impossible à prévenir.

Ce paramètre microbiologique essentiel est à prendre en compte, quelle que soit son origine (autochtone ou allochtone). Il est actuellement évalué par les différents acteurs des projets de stockage notamment franco-français, tels que l'Andra et l'IRSN ainsi que de



nombreux laboratoires académiques en France et à l'étranger, à travers des études conduites sur les évolutions des matériaux de confinement (argileux et métalliques).

Dans la présente étude, un modèle bactérien basé sur la ferri-réduction a été choisi pour ses critères de viabilité dans le système, et sa capacité à altérer les matériaux dans les conditions du stockage (anoxie, quantité de fer importante, présence d'hydrogène, milieu argileux pouvant contenir du Fe(III) structural). La description de la réactivité globale des matériaux ferrifères du stockage au travers de l'activité des bactéries ferriréductrices constitue le principal objectif du présent travail. En effet, cette activité bactérienne est un des plus importants processus réactionnels dans les sédiments profonds où la présence de phases ferrifères de type smectite et d'oxydes est identifiée.

Cette thèse constitue une étude exploratoire soutenue par un volet expérimental important. Elle s'attachera à décrire le concept dynamique d'une activité microbiologique viable et durable en conditions de stockage géologique profond. Il s'agira notamment de déterminer si la capacité de réduction du Fe(III) structural par les micro-organismes peut avoir des conséquences importantes sur la pérennité des propriétés de confinement des barrières argileuses ou bien lors de l'implication de l'activité microbiologique dans les processus de biocorrosion comme dans le contrôle de l'évolution géochimique de l'environnement du stockage.

# CHAPITRE I : OBJECTIFS ET CONTEXTE DE L'ETUDE

---

## 1. CONTEXTE DU STOCKAGE GEOLOGIQUE ARGILEUX

### 1.1. OBJECTIFS ET FINALITE DU STOCKAGE : LES ENJEUX

Les déchets radioactifs sont issus d'un certain nombre d'activités industrielles comme la production électronucléaire, médicale, la radiothérapie ou d'activités de recherche. En France, près de 85% de déchets radioactifs proviennent du fonctionnement des centrales nucléaires civiles qui utilisent et génèrent des matières radioactives dans les différentes étapes du cycle du combustible nucléaire.

Les déchets HAVL désignent une catégorie de déchets nucléaires à la fois à « Haute Activité » (de l'ordre du Tera Becquerel par gramme,  $10^{12}$  Bq/g) et à « Vie Longue » (supérieure au millier d'années). Ce sont les déchets ultimes de l'énergie nucléaire. Ils sont constitués des produits de fission du combustible, des actinides mineurs formés par capture neutronique et le combustible nucléaire initial appauvri en isotope fissible, mais encore intact. Après leur récupération, ces déchets subissent une première action de traitement consistant à réduire au maximum leur volume et leur toxicité. Pour cela une séparation peut être réalisée entre les produits de fission et les actinides (3 - 5%), qui sont les déchets nucléaires proprement dits, du combustible qui n'a pas encore réagi (95 - 97%), et qui peut être recyclé. Une deuxième phase dite de conditionnement est ensuite entamée dans le but de transformer les déchets en colis solides et stables. En France, ces déchets sont vitrifiés, c'est-à-dire fixés dans une matrice de verre pour limiter le relachement des noyaux radioactifs à l'échelle de temps géologique.

Compte tenu du besoin d'isoler les déchets HAVL (Haute Activité et à Vie Longue) pendant de longues périodes de temps, les recherches ont été rapidement orientées vers le stockage en formation profonde. En France, l'ANDRA (Agence Nationale pour la gestion des Déchets RAdioactifs) a été chargée de la conception et de la démonstration de la faisabilité de ce stockage, ceci sous le contrôle notamment de l'ASN (Autorité de Sûreté Nucléaire) et de son appui technique l'IRSN (Institut de Radioprotection et de la Sûreté Nucléaire). Un effort particulier a été entrepris suite à des décisions politiques ces vingt dernières années : tout d'abord, l'axe 2 de la loi Bataille du 30 décembre 1991 stipule que des études sur les possibilités de stockage réversible ou irréversible en formation géologique doivent être menées. Après examen du « dossier 2005 » de l'ANDRA, le parlement a demandé à l'Andra d'étudier et de dimensionner la faisabilité industrielle d'un stockage réversible en couche géologique, en vue d'une mise en service en 2025.

Différents types de formations rocheuses sont actuellement étudiés dans le monde pour servir d'encaissant, par exemple du granite en Suède et Finlande, des dômes de sel en Allemagne et des roches argileuses en Suisse, Belgique et France (OECD, 1999; ANDRA, 2005; OECD, 2006). Les travaux menés par l'Andra depuis une quinzaine d'années visent à concevoir un stockage en profondeur dans une formation géologique capable d'assurer le confinement des déchets sur de très longues durées (plusieurs centaines de milliers d'années). Ce concept de stockage mobilise les propriétés, notamment de confinement, de la formation géologique retenue, choisie comme barrière pour s'opposer à la dissémination des radionucléides contenus dans les déchets (Lebon, 2007).

## 1.2. GEOMETRIE ET SPECIFICITES DES SYSTEMES PROFONDS : LES CONCEPTS, LES MATERIAUX ET LE MILIEU GEOLOGIQUE

**Le concept multi-barrières :-** Le confinement des déchets nucléaires en formation géologique argileuse profonde repose sur un concept "multi-barrières" (Figure 1). Ce dernier consiste à interposer entre les éléments radioactifs et la biosphère des barrières successives, en vue de minimiser le risque de relâchement des radionucléides :

- Une matrice dans laquelle sont incorporés les radioéléments : le verre pour les déchets HAVL.
- Le conteneur métallique dans lequel sont conditionnés le colis et son surconteneur. Ils ont pour rôle majeur d'éviter la pénétration de l'eau dans les colis et l'arrivée de l'eau au contact du verredurant la phase thermique.
- Dans certaines options, une barrière ouvragée probablement de nature argileuse et compacte (bentonite).
- La formation argileuse en elle même est considérée comme la dernière barrière naturelle dans un stockage profond.

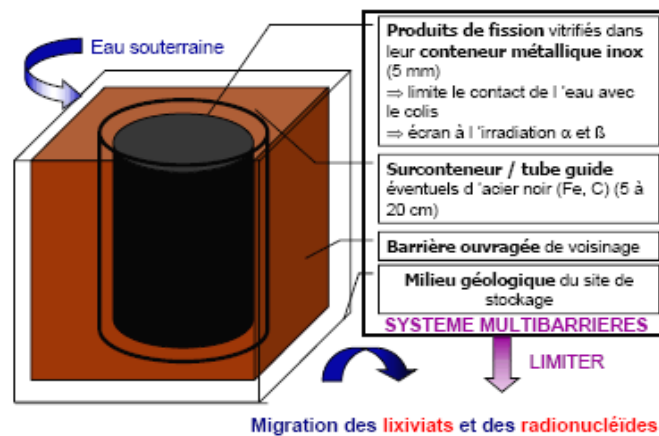


Figure 1 : Illustration d'un système multibarrières (Perronnet et al, 2005)

**Le milieu argileux.-** Le site de Meuse/Haute-Marne appartient à la bordure orientale du Bassin de Paris. Géologiquement, il est constitué d'une alternance de couches sédimentaires à dominante argileuse et de couches calcaires. Au sein de la série sédimentaire, la formation argileuse cible est celle des argilites du Callovo-Oxfordien. Elle est encadré par deux grandes formations calcaires, le Dogger sous-jacent et l'oxfordien carbonaté sus-jacent (Figure 2). Cette couche a pour origine la sédimentation de matériaux détritiques (minéraux argileux jusqu'à 60% en masse, quartz fins) et de carbonates dans une mer relativement calme. Les argilites se sont mises en place entre -158 et -152 millions d'années. Les sédiments déposés ont été progressivement compactés, pendant une quinzaine de millions d'années, sous le poids des dépôts ultérieurs ; ce processus diagénétique s'est accompagné d'une expulsion d'eau. Les argilites ont dès lors acquis des propriétés proches de celles qu'elles ont aujourd'hui, les mouvements de fluides et d'ions y deviennent très lents. Les propriétés texturales du Callovo-Oxfordien lui confèrent une faible perméabilité sur toute son épaisseur. La perméabilité est comprise entre  $5.10^{-14}$  m/s et  $5.10^{-13}$  m/s. Elle est due à une taille de pores de la roche très petite (20-100 nm) ce qui entraîne un transport par diffusion dans l'eau porale. L'argilite peut être décrite comme une barrière argileuse naturelle.

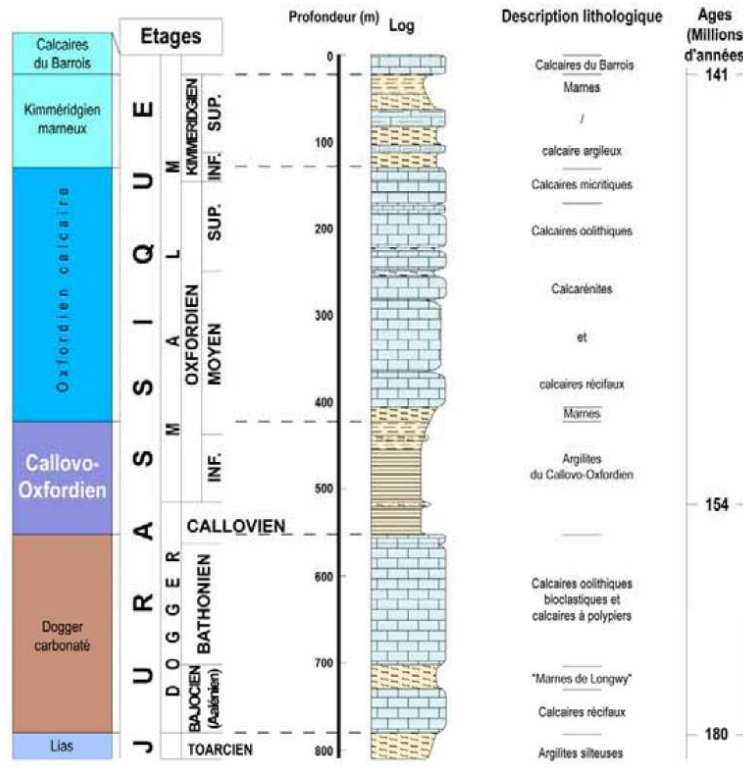


Figure 2 : Coupe géologique sur le site du laboratoire de recherche souterrain (ANDRA, 2005).

L'architecture actuellement retenue pour le stockage des colis de déchets est une répartition par zones des différents types de colis, classée selon leurs degrés de radioactivité et leurs durées vie, dans les alvéoles de stockage à environ 500m de profondeur. Les colis de moyenne activité (MAVL) et les colis de haute activité à vie longue (HAVL) sont décrits par les zones B et zone C respectivement sur la Figure 3.

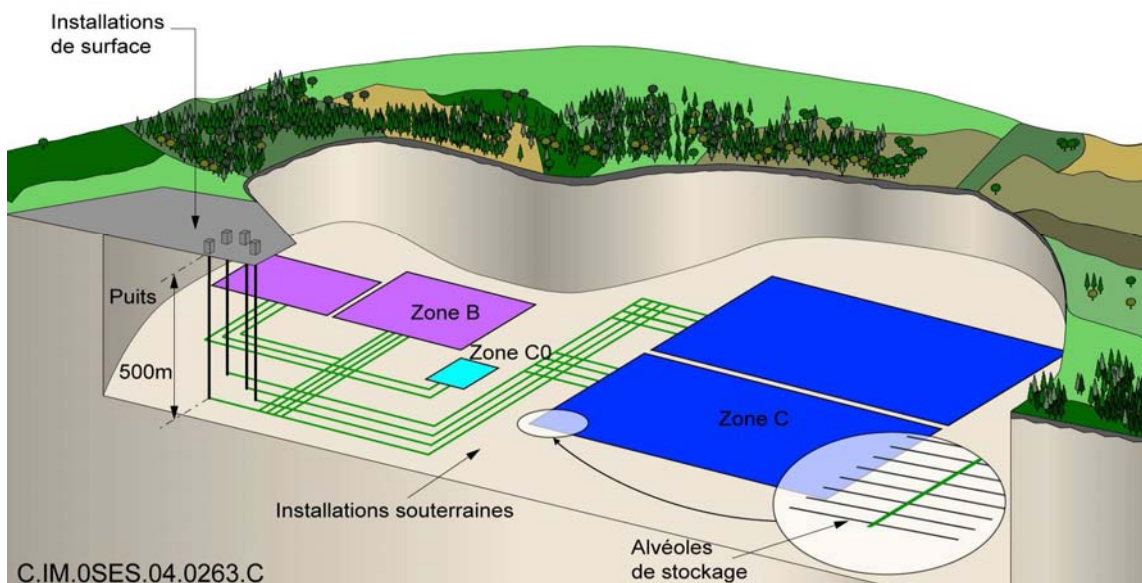


Figure 3 : Schéma représentatif des zones de stockage de colis de déchets B et C en profondeur, (ANDRA 2005).

### 1.3. CONCEPT ET ORGANISATION DES ALVEOLES

Au sein des alvéoles de stockage des colis de déchets HAVL, différents matériaux sont pressentis afin de préserver le confinement des déchets radioactifs en profondeur (Figure 4):

- Les **colis de stockage** qui sont déposés dans des alvéoles et sont séparés par des intercalaires afin de limiter la charge thermique (température inférieure à 90°C dans la roche hôte).
- Un **bouchon métallique** qui a une fonction de protection biologique pendant la phase d'exploitation.
- Un **bouchon d'argile** qui a une fonction de confinement à l'échelle de l'alvéole.
- Un **bouchon en béton** qui a une fonction de maintien mécanique du bouchon d'argile.

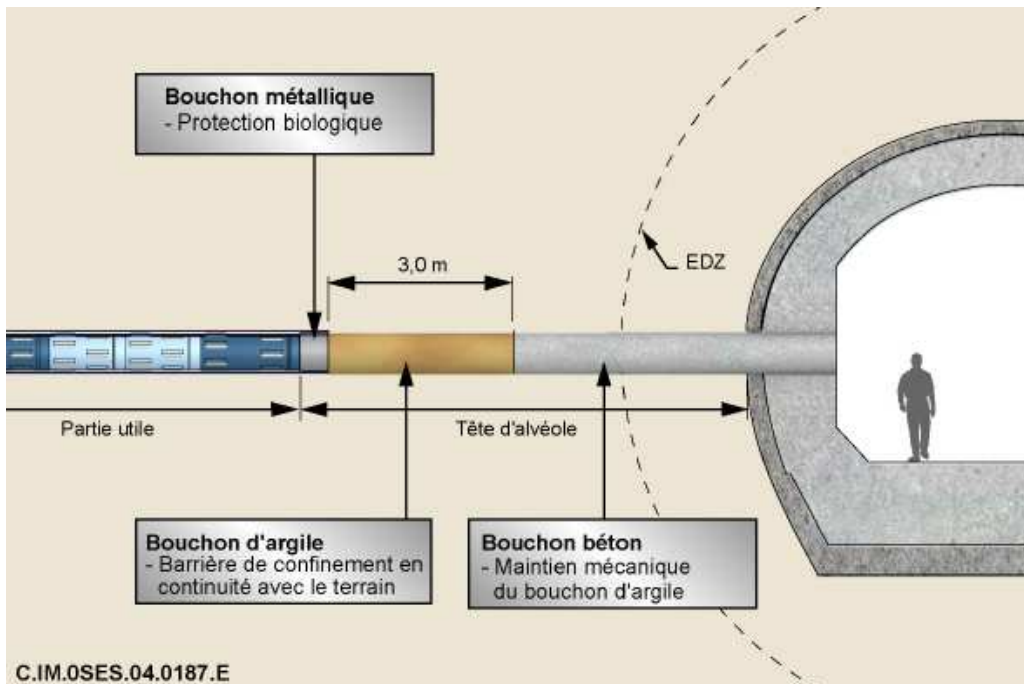


Figure 4 : Schéma d'une alvéole de colis HAVL (ANDRA 2005).

### 1.4. POSITIONNEMENT DE LA PROBLEMATIQUE « ACTIVITE MICROBIENNE » EN STOCKAGE PROFOND.

L'étude de faisabilité s'attache à évaluer les conditions dans lesquelles un stockage pourrait être construit et exploité le stockage tout en préservant la sécurité des travailleurs, du public et de la protection de l'environnement que ce soit à court terme ou à long terme (« dossier Argile, Andra 2005 »).

Afin de comprendre et de maîtriser au mieux l'évolution du stockage, une identification et une hiérarchisation des paramètres influents sont étudiés par les différents acteurs du stockage. Parmi ces paramètres, on peut citer :

- Le site géologique et les propriétés de confinement de la barrière argileuse, en considérant plus particulièrement les aspects géomécaniques, les propriétés physiques et de perméabilité de la roche argileuse afin de limiter le transport de l'eau et à terme des radionucléides dans l'environnement.
- La résistance physique (thermique, radioactive) ou la durabilité, des matériaux utilisés dans le système multi-barrières de confinement des radionucléides.

- L'évolution géochimique des matériaux ainsi que les modifications chimiques de l'environnement du stockage et les différents processus réactionnels (corrosion, dissolution) qui vont prendre place entre les matériaux ainsi que l'influence des produits de ces réactions sur le milieu (production de gaz, évolution physico-chimique du milieu).

C'est sur ce dernier point que va porter l'essentiel de notre étude.

L'évaluation de la faisabilité du stockage géologique dans les séries argileuses du bassin de Paris (argilite du Callovo-Oxfordien en Meuse Haute-Marne) a permis à l'Andra de confirmer l'intérêt des argilites comme barrière efficace pour le stockage géologique des déchets à haute activité et à vie longue (HAVL). Cependant, afin d'évaluer l'évolution du stockage et de ce fait de s'assurer de la pérennité de l'intégrité de la barrière argileuse, il est nécessaire de déterminer les phases réactives dans le stockage susceptibles d'évoluer dans le temps et d'altérer les performances des barrières argileuses dans son rôle de confinement des radionucléides. D'autre part, ces phases réactives sont aussi celles qui vont être le moteur (autant énergétique que nutritif) des processus biogéochimiques prévalant dans ce milieu de stockage profond. Ainsi l'évaluation de la réactivité des matériaux du stockage est primordiale pour garantir la durabilité du confinement et donc la sûreté du stockage.

## 2. REACTIVITE DES MATERIAUX

Cette partie présente les deux systèmes étudiés d'un point de vue de leur réactivité : le **système argileux** et le **système métallique**, ainsi qu'une revue synthétique des recherches entreprises sur la réactivité fer/argile. Elle propose aussi une vision intégrée de la réactivité du système fer-argile pour évaluer les performances à long terme des matériaux dans les conditions d'un stockage géologique des déchets radioactifs. **La connaissance des conditions physico-chimiques prévalant en profondeur ainsi que la réactivité globale du système sont cruciales dans notre étude car ces phases et éléments réactifs gouverneront les réactions microbiennes.** Ainsi plusieurs questionnements doivent être posés et identifiés :

- Dans quelle mesure les argilites peuvent-elles être un système réactif ?
- Quelles phases supportent la réactivité ?
- Et quels sont les éléments qui permettent cette réactivité ?

### 2.1. LES BARRIERES ARGILEUSES : PROCESSUS DE FORMATION, PHASES ET ELEMENTS CIBLES REACTIFS

#### 2.1.1. Structure et classification des phyllosilicates

Les minéraux argileux sont des aluminosilicates en feuillets (phyllosilicates) plus ou moins hydratés sous forme de particules finement divisées dont la taille est de l'ordre du micromètre. Dans les interfaces et surfaces continentales, ils se forment à partir de l'altération physico-chimique d'une roche et sont, par exemple, un des constituants majeurs des sols évolués. Le type d'argile produit dépend directement de la nature de la roche mère, du climat et de la topographie du milieu. Ces phyllosilicates sont composés d'une succession de feuillets composés eux-mêmes d'un empilement de couches tétraédriques (T) principalement siliceuses, de couches octaédriques (O) principalement alumineuses et d'un espace interfoliaire, interface entre deux feuillets (Figure 5).

**Le tétraèdre** est le module de base des minéraux silicatés (silicates). Il est formé par un atome de silicium ( $\text{Si}^{4+}$ ) tétravalent entouré de quatre atomes d'oxygène ( $\text{O}_2^-$ )

L'équilibre électrique est atteint par la compensation des charges positives de l'atome de silicium avec les charges négatives des atomes d'oxygène. Ces atomes d'oxygène sont également liés aux autres tétraèdres voisins et aux couches octaédriques voisines. Une substitution du silicium par un atome d'aluminium ( $\text{Al}^{3+}$ ) et plus rarement de fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) crée un déficit de charge et un déséquilibre électrique au niveau de la couche tétraédrique (T).

**L'octaèdre** est un module constitué d'un atome central,  $\text{Al}^{3+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$ , entouré de 6 groupements hydroxyles ( $\text{OH}^-$ ). Un déficit de charge est aussi présent suite aux substitutions des atomes centraux trivalents ( $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ ) par des atomes centraux divalents ( $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$ ) à l'intérieur de la couche octaédrique (O). Ce déficit de charge permet de distinguer les minéraux dioctaédriques (majorité de deux cations trivalents par maille élémentaire) des minéraux trioctaédriques (majorité de trois cations divalents par maille élémentaire). Plus rarement, des atomes de Ti, Ni, Cr, Mn, Zn peuvent aussi jouer le rôle d'atome central. La couche tétraédrique et la couche octaédrique sont liées par la mise en commun d'atomes d'oxygène.

**L'espace interfoliaire** contient les cations monovalents (K, Na) ou divalents (Ca, Mg) permettant d'équilibrer le déficit général de la structure tétraèdre/octaèdre (TO ou 1:1), tétraèdre/octaèdre/tétraèdre (TOT ou 2:1) ou tétraèdre/octaèdre/tétraèdre/octaèdre (TOTO ou 2:1:1). Sa taille varie suivant le type de cations intégrés ainsi que la quantité de molécule d'eau présente.

**La taille des feuillets** est variable suivant le type de structure (TO, TOT, TOTO). Cependant, les distances caractéristiques sont respectivement de 7, 10 et 14 Å en prenant en compte



l'espace interfoliaire. Une variation de l'épaisseur du feuillet est principalement due à la variation de la taille de l'espace interfoliaire.

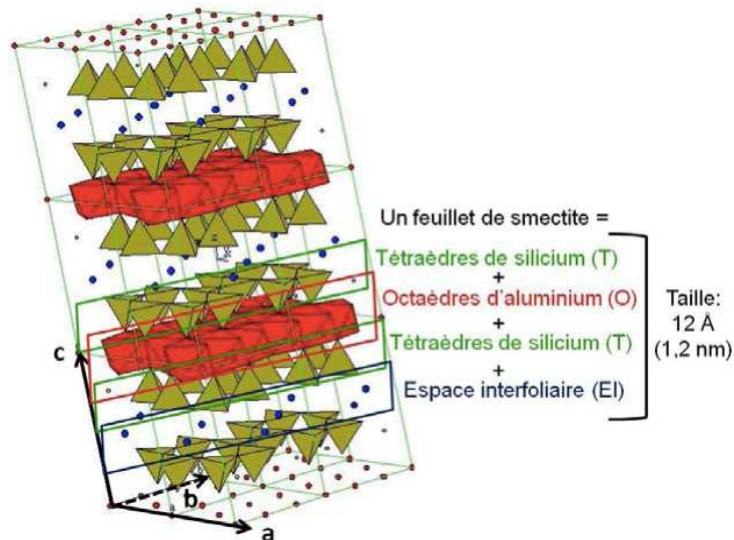


Figure 5: Représentation 3 D d'une smectite d'après Kohler (2005) et précision sur la composition d'un feuillet TOT.

Les minéraux argileux qui ont une composition chimique d'une extrême variété peuvent être classés (Tableau 1) à partir de 3 critères :

- la valeur de la charge interfoliaire  $x$  par demi maille  $[O_{10}(OH)_2]$ . Elle est égale au bilan des substitutions isomorphiques dans le feuillet (remplacement de cations de charge différente créant un défaut ou un excès de charge dans le feuillet) ;
- la subdivision di et trioctaédrique ;
- l'origine de la charge négative en excès (couche T et / ou O).

Feuillet	Groupe	Charge du feuillet par unité $O_{10}(OH)_2$	Couche octaédrique	Exemples
TO	Kaolins	$x \approx 0$	Diocétaédrique	Kaolinite, dickite, nacrite
	Serpentines		Triocétaédrique	Chrysotile, antigorite, berthiéline
TOT	Pyrophyllites	$x \approx 0$	Diocétaédrique	Pyrophyllite
	Talc		Triocétaédrique	Talc, willemséite
			Diocétaédrique	Montmorillonite, beidellite, nontronite
	Smectites	$x$ de 0.2 à 0.6	Triocétaédrique	Saponite, stevensite
			Diocétaédrique	
	Vermiculites	$x$ de 0.6 à 0.9	Diocétaédrique	
Triocétaédrique				
Micas	$x$ de 0.5 à 1.0	Diocétaédrique	Muscovite, illite	
		Triocétaédrique	Phlogopite, biotite	
Micas durs	$x \approx 2.0$	Diocétaédrique	Margarite	
		Triocétaédrique	Anandite	
TOT O'	Chlorites	$x$ variable	Diocétaédrique	Dombassite
			Di-Tri	Cookéite, sudoite
			Triocétaédrique	Clinochlore, chamosite

Tableau 1 : Classification des phyllosilicates.  $X$  représente la charge du feuillet par unité structurale, d'après Bruno, G (1993).



**Afin de déterminer la réactivité de la barrière argileuse naturelle dans le stockage il est nécessaire dans un premier temps de connaître les processus chimiques et géologiques qui ont amené à la formation des argilites, et qui de fait pourraient en contrôler l'altérabilité.**

### 2.1.2. Formation sédimentaire des argilites : un environnement stable ?

L'érosion des continents conduit au dépôt d'argiles détritiques dans les bassins sédimentaires. Cette altération de surface, dite aussi supergène résulte de l'ensemble des interactions fluide-roche à basse température. Les minéraux argileux se forment soit dans les milieux superficiels par altération de minéraux préexistants qui ont cristallisé dans les conditions de température-pression-composition des fluides, soit dans des milieux magmatiques et métamorphiques ou sédimentaires. Les sédiments sont composés de minéraux très différents qui ne constituent pas nécessairement des assemblages stables. Ils peuvent être composés de débris cristallisés dans des conditions de surface dans les altérites et les sols (smectites, kaolinite, oxydes et hydroxydes de Fe, Mn,...) et forment des assemblages hors d'équilibres dans les conditions nouvelles imposées (Meunier, 2003).

La diagenèse des sédiments transforme leurs propriétés physiques et leur composition minéralogique lors de l'enfouissement dans les bassins sédimentaires. Les conditions de pression, température, perméabilité des ensembles rocheux sont modifiées au cours des épisodes d'enfoncement progressif du socle des bassins sédimentaires. Ainsi au cours de l'enfouissement, se succèdent, dans un même volume de roche, des processus de dissolution, de précipitation de phases minérales avec des apports d'éléments chimiques ou d'appauvrissement par évacuation de certains de ces éléments (Force et al., 1991).

La diagenèse commence juste après l'interface sédiment-eau de mer ; elle est dite précoce lorsque cet enfouissement ne conduit pas à une augmentation de la température notable (Chamley, 1999). La porosité très élevée (supérieur à 50%) des sédiments favorise leur capacité d'échange par diffusion chimique avec les ions  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  de l'eau de mer (Sayles et Mangelsdorf, 1977). Ces échanges avec l'eau de mer par diffusion favorisent la croissance cristalline de smectite de types beidellite Al-Fe ou de type montmorillonite (Steinberg et al, 1987).

La transformation minéralogique des argiles est dépendante de la température dans les bassins sédimentaires et n'est pas caractérisable pour des températures inférieures à 80 °C c'est-à-dire entre 1 et 2 km (Velde, 1995 ; Jeannings et Thompson, 1987). La smectite préalablement fabriquée par la réaction des fractions argileuses des sédiments peut se transformer lorsque l'enfouissement progresse et que les échanges avec l'eau de mer diminuent. Elle produit de l'illite qui, dans les premiers stades de la transformation, forme des inter-stratifiés désordonnés avec la smectite (Hower, 1981 ; Srodon et Ebert, 1987). La réaction progressant, l'empilement devient ordonné et le taux d'illite augmente (Lanson, 1990).

Les chlorites magnésiennes et interstratifiées chlorite/smectite se forment soit en contexte volcanique soit dans des séries sédimentaires détritiques ou carbonatées. Leur formation dans les diagenèses sédimentaires se réalise pour des conditions particulières de pH, d'activité en Mg et de quantité de Fe en solution (Hillier, 1993). Les serpentines ferro-magnésiennes de type berthierine se forment dès le début de la diagenèse (Walker et Thompson, 1990) et subsistent à des profondeurs (températures) variables suivant les conditions imposées par le milieu (carbonate, sulfure, hydrocarbure etc).

La kaolinite, bien qu'elle puisse se former en début de diagenèse, est considérée comme une phase minérale stable (Lawrence et Taylor, 1972), qui est généralement le produit final d'une altération supergène souvent continentale (lorsque les interactions eau-roche sont fortes et que l'altération est importante).

Ainsi, les principaux types de roches composant les séries sédimentaires observées dans les bassins sont les grés, les shales et les roches carbonatées (calcaires et dolomies).

Les argiles sédimentaires sont retrouvées préférentiellement dans les shales et les grès. Elles sont généralement composées de mélanges de plusieurs phases en proportions variables : smectites, vermiculites, interstratifiés illite/smectite, kaolinites etc (Jeannings et Thompson, 1987).

Ainsi, la formation des argilites est un processus lent, qui dépend de la température et tend à former avec le temps des phases argileuses peu réactives (faible capacité d'échange). Cependant la présence d'argile de type smectite, aux propriétés d'échange importantes, permet au système de garder un potentiel réactif même si les conditions hydrauliques changent (cas de fissuration tectonique, de zone d'accrétion, et ou d'excavation d'origine humaine comme lors d'un stockage géologique).

### 2.1.3. Phases réactives des argilites : Les smectites

Une propriété fondamentale des argiles de type smectite est le défaut de charges que présentent certaines unités cristallines élémentaires. Des substitutions en cations plus ou moins chargés provoquent une perte de l'électro-neutralité du feuillet. La stabilité de l'édifice cristallin est alors assurée par la présence de cations compensateurs dans l'espace interfoliaire. Ces ions compensateurs qui font partie intégrante de la structure cristalline sont aussi appelés "ions en position échangeable". La surface spécifique et la capacité d'échange cationique importantes conditionnent les propriétés d'adsorption des minéraux argileux substitués (figure 6).

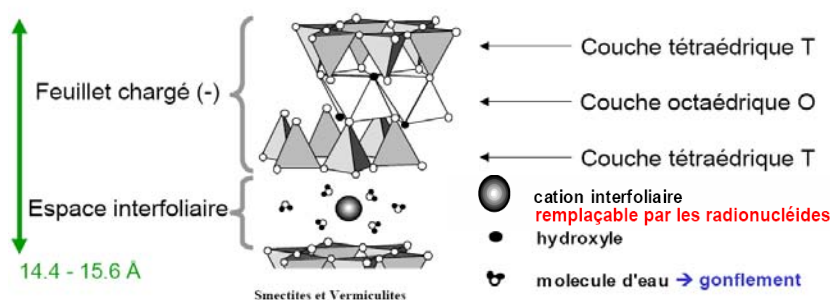


Figure 6 : Représentation de la structure en feuillets des phyllosilicates.

Les smectites sont donc des phyllosilicates hydratés et gonflants et qui selon leur état d'hydratation, ne peuvent pas être considérées comme un solide à part entière mais plutôt comme un état smectique « mésomorphe ordonné » (Habert et al, 2006). Leur extrême réactivité provient de l'eau interfoliaire ainsi que des protons « libres ou structuraux » qui la composent. En effet, les smectites sont définies par un pH caractéristique, de l'ordre de 4, de leur espace interfoliaire, contrairement aux autres minéraux qui sont définis par un pKa global déterminé en surface des solides (Hech et al, 1966 ; Fripiat et al, 1965). Ceci proviendrait d'une source de protons libres dans le système (Jullien et al., 2005). D'autre part, la densité de l'eau interfoliaire devient supérieure à 1 pour de faibles humidités relatives inférieures à 40% (Raynal et Jullien, 2006). Ainsi, les smectites sont entre autres une source de protons à l'origine de leurs réactivités vis-à-vis de l'eau et des processus de corrosion (Jullien, 2006), phénomène essentiel qui sera développé plus tard.

En résumé, cette structure en feuillets et leur composition confèrent des propriétés physico-chimiques d'intérêt environnemental aux argiles : surface spécifique, capacité d'échange cationique, capacité de sorption, potentiel de gonflement, qui sont exploitées dans la bentonite industrielle (Murray, 1977; Elzea et Murray, 1990). Pour ces raisons, elle est pressentie comme un des matériaux des barrières ouvragées dans les sites de stockage des déchets radioactifs.

Les smectites sont sans doute les phases minérales les plus réactives dans les argilites. Cependant, lors de l'excavation/fermeture des galeries, des transitoires d'oxydation-réduction du système argileux vont s'établir et des gradients vont modifier les équilibres chimiques des phases et entraîner une nouvelle réactivité des argilites. Ainsi l'étude des phases porteuses de fer (élément sensible au redox) dans ces environnements profonds est déterminante pour comprendre le potentiel réactif des argilites en condition de stockage. Cela constitue le cœur et le support de la réactivité physico-chimique étudiée dans ce travail.

#### 2.1.4. Le fer : élément cible de la réactivité des argilites

Après l'oxygène, le silicium et l'aluminium, le fer est le 4<sup>ème</sup> élément sur terre en termes d'abondance (4,7% en masse). Il est, d'autre part, un élément majeur dans les argilites et ses propriétés chimiques en font un élément particulièrement versatile dans les environnements continentaux. Son comportement géochimique dépend de nombreux processus physico-chimiques associés ou non avec des matrices argileuses : précipitation/dissolution, adsorption, complexation avec les anions des fluides interstitiels, échange ionique et oxydoréduction.

##### Le fer dans les environnements diagénétiques

Les environnements diagénétiques présentent un grand intérêt pour l'étude des associations fer-argile d'autant qu'un vaste domaine de conditions géochimiques peut être documenté. En particulier, celles attendues lors de l'évolution d'une zone de stockage : le pH est compris entre 6,5 et 9, la température entre 20 et 100°C et la pression varie entre la valeur de la pression atmosphérique et plusieurs dizaines de bars.

Dans ces roches sédimentaires, les quantités et les taux de transformations du fer sont importants. L'aptitude des espèces porteuses de fer à être oxydées ou réduites est conditionnée par le cycle de l'oxygène, du carbone organique et du soufre ainsi que par l'activité microbienne. Dans les premiers centimètres de sédiments ou dans toute autre zone oxydante, les phases porteuses de fer sont de deux types :

- les oxydes et hydroxydes sous forme de ferrihydrite, de goethite et d'hématite (Fernandez et al., 1998) ;
- les silicates tels la nontronite (smectite dioctaédrique  $Fe^{3+}$ ), la glauconite, l'odinite (serpentine  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ) et les minéraux de type argiles vertes "green clays" dans les faciès sédimentaires de type verdine (Odin, 1988 ; Bailey, 1988 ; Odin, 1990). On trouve aussi ces phyllosilicates dans les « ironstones » diagénétiques de type oolithiques (Bhattacharyya, 1983 , 1986) et dans les grès (Hornibrook et Longstaffe, 1996 ; Aagaard et al., 2000 ; Hillier et Velde, 1992 ; Hillier, 1994).

Les phyllosilicates de fer ferrique se forment en présence d'une quantité importante de silice à des températures proche de 20°C (Porrenga, 1967).

Meunier (2003) indique que la glauconite se forme en milieu marin ouvert à faible taux de sédimentation terrigène (Porrenga, 1967), en présence de matière organique au sein de micro-milieus d'une dimension inférieure au millimètre. A l'échelle des microsystèmes, la glauconite se forme par échange chimique entre des débris solides et l'eau de mer. Plus précisément, ce minéral résulte de la dissolution-recristallisation de smectites riches en fer (Buatier et al., 1989).

Le mécanisme invoqué pour la formation de l'odinite est différent. Ce minéral apparaît sur des plate-formes marines peu profondes ou bien dans des récifs de lagon, sous des latitudes tropicales, au sein de microsystèmes anoxiques réducteurs (Odin, 1988). Dans de tels systèmes des fronts redox se forment et les oxy-hydroxydes de fer sont réduits. Le fer

ferreux, ainsi produit, réagit avec les colloïdes et les gels issus de la déstabilisation des smectites pour former de l'odinite. Cette transformation minéralogique s'obtient dans des conditions physico-chimiques assez proches de celles que nous sommes en droit d'attendre en milieu profond et de stockage HAVL.

Les transformations diagénétiques (eau/roche ; salinité) vont débiter dès l'enfouissement des sédiments (Fairbridge, 1967 ; Dapples, 1979) par l'oxydation bactérienne de la matière organique en conditions aérobies et neutres (pH entre 7 et 8). Ces processus vont libérer du dioxyde de carbone qui va se dissoudre dans l'eau et donner lieu à la formation d'ions  $\text{HCO}_3^-$  et de protons. Sous l'effet de la diminution du pH et de la fugacité en oxygène, le milieu va devenir de plus en plus réducteur. La réduction concomitante des oxydes et hydroxides de fer par les bactéries ferri-réductrices, libère du  $\text{Fe}^{2+}$  et des protons. Il se forme alors de la magnétite ou des carbonates (sidérite  $\text{FeCO}_3$ ). En conditions réductrices plus sévères, le fer(II) se combine aux sulfures ( $\text{HS}^-$  et  $\text{H}_2\text{S}$ ) produits par l'action des bactéries sulfato-réductrices (formation de pyrrhotite  $\text{FeS}$  et pyrite  $\text{FeS}_2$ ). Néanmoins on peut noter qu'une concentration en  $\text{Fe}^{2+}$  faible permet la formation de  $\text{FeS}$  alors qu'il faut une plus forte concentration en  $\text{Fe}^{2+}$  pour former  $\text{FeCO}_3$  invoquant une affinité du fer plus importante pour les sulfures (Garrels et Christ, 1965). L'affinité du soufre pour le fer est indéniable. D'autres phases minérales, peuvent se former en l'absence de soufre dans le système. Ainsi en présence de forte concentration en silicium et aluminium, les phyllosilicates de type berthierine pourront se former. La berthierine évolue ensuite en chlorite avec l'augmentation de la température du milieu.

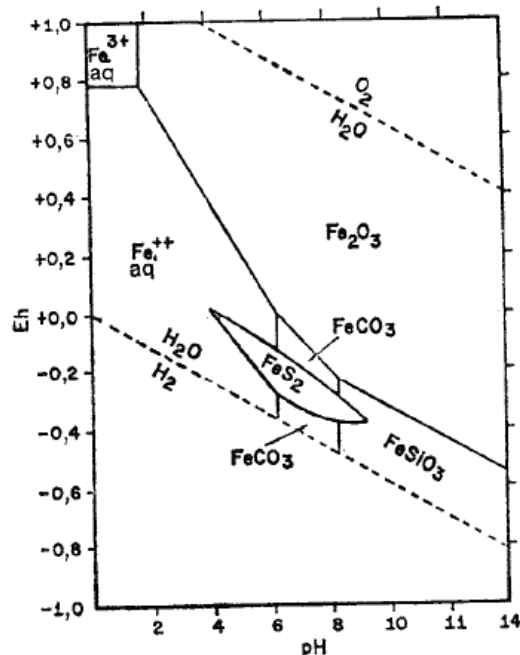


Figure 7 : Relations de stabilité entre les oxydes, les sulfures, les carbonates et les silicates de fer à 25°C et à une pression totale de 1 atmosphère, en présence d'eau. La quantité totale de soufre dissous égale à  $10^{-6}$  M et celle du carbonate égale à  $10^{-2}$  M (Garrels et Christ, 1965).

#### Phases porteuses de fer dans les argilites

Les phases minérales ferrifères présentes dans les argilites sont constituées de pyrite, sidérite, dolomite ferrifère, argile ferrifère, et oxyde de fer principalement.

Dans les phases argileuses, le fer est un des éléments principaux intervenant dans les substitutions cationiques des argiles. Il est présent dans ces structures sous deux états de valence : sous forme ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) et sous forme ferreuse ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Généralement  $\text{Fe}^{2+}$  remplace  $\text{Mg}^{2+}$  dans les trioctaédriques tandis que  $\text{Fe}^{3+}$  remplace  $\text{Al}^{3+}$  dans les dioctaédriques, mais les deux états de valence peuvent exister dans les argiles. Le rapport ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) est caractéristique des conditions redox du milieu au moment de la formation de l'argile. Le fer(III) occupe essentiellement des sites octaédriques, même s'il remplace parfois  $\text{Al}^{3+}$  en substitution tétraédrique.

Dans les phyllosilicates de type 1:1, le  $\text{Fe}^{2+}$  est très abondant, ce qui donne une diversité plus grande des pôles ferrifères dans cette famille. Quatre familles ferrifères ont été définies : la greenalite, la berthierine, l'odinite et la cronstedtite.

Dans les smectites, le fer est essentiellement dans l'état  $\text{Fe}^{3+}$  et se substitue à  $\text{Al}^{3+}$ . La substitution dans les smectites trioctaédriques est majoritairement tétraédrique alors que dans les dioctaédriques, la substitution est essentiellement octaédrique.

**Ainsi, selon l'état d'évolution du processus diagénétique des argilites, le fer sera majoritairement retrouvé, sous l'état de valence  $\text{Fe}^{2+}$ . La présence de  $\text{Fe}^{3+}$  structural des smectites ainsi que la présence d'oxyde / hydroxyde de fer détermineront la forme réactive du système en évolution. Cependant, cette stabilité des argilites caractérisée par l'état redox du système et la présence de fer sous l'état de valence ( $\text{Fe}^{2+}$ ) va être perturbée par une phase transitoire oxydante lors du creusement des galeries souterraines. Quelles sont les conséquences de cette phase d'oxydation sur la stabilité des argilites ?**

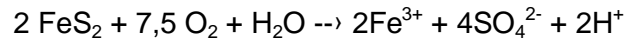
#### Oxydation dans les argilites, une source de $\text{Fe}^{3+}$

Lors du creusement d'un ouvrage souterrain tel que le stockage de déchets radioactifs, la mise à l'affleurement de sédiments naturels place les argiles dans des conditions différentes de celles de leur gisement et entraînent des modifications de leurs propriétés. Il se produit en particulier plusieurs changements importants dans les conditions physico-chimiques des barrières argileuses telles que : une variation de la teneur en eau, une variation de la composition chimique de l'eau interstitielle au contact de l'argile, un changement de l'environnement biologique et enfin, un changement des conditions d'oxydoréduction (Cabrerera et al, 2001).

Au sein des dispositifs de stockage de déchets, la perturbation oxydante majeure correspond dans un premier temps à l'intrusion et à la diffusion de l' $\text{O}_2$  atmosphérique dans l'excavation. Dans les scénarios de référence (« dossier Andra 2005 »), cet épisode est très bref et précède, de quelques centaines d'années tout au plus, le retour à des conditions réductrices qui vont prévaloir dans la suite de la vie du stockage.

Cependant cette perturbation oxydante peut modifier la nature des minéraux ferreux réducteurs par l'oxydation du  $\text{Fe}^{2+}$  structural en  $\text{Fe}^{3+}$  tels que la pyrite, la sidérite et les silicates de fer (chlorites, serpentine, berthierine) présents dans l'argilite (Burt, 1989). Ainsi, des échantillonnages ont été réalisées par l'IRSN sur le site de Tournemire (Aveyron, France), afin d'établir l'inventaire minéralogique dans la zone perturbée par l'excavation (EDZ), qui est la zone la plus soumise à des modifications des conditions d'oxydo-réduction (Charpentier et al, 2001). Dans cet environnement pouvant contenir jusqu'à 50% de minéraux argileux, les pyrites ont été observées dans l'ensemble des échantillons, en quantité significative (2 à 2,5%). Les cristaux de pyrite présentent deux habitus, plus ou moins réactifs : automorphes cubiques (forme relativement stable) ou framboïdes (très réactive). Au contact de l'air, plusieurs mécanismes d'oxydation ont été

décrits, soit par l'oxygène de l'air (Séveque, 1986), soit par le fer ferrique (Garrels et Thompson, 1960, Hofmann, 1999) soit par oxydation bactérienne (Mustin et al., 1992). Ainsi la pyrite est très sensible aux conditions d'oxydoréduction, mais demeure stable. Quel que soit le mécanisme d'oxydation des pyrites qui entre en jeu, l'équation chimique peut être représentée par (Panin et al. 1985) :



L'oxydation du fer et du soufre des pyrites provoque la génération d'eaux sulfatées acides au voisinage des microsites d'altération. Ces eaux sont cependant rapidement neutralisées par les carbonates et sont à l'origine d'une paragenèse secondaire typique : sulfates (Fe, Ca), hydroxydes de fer entre autres. Ainsi, l'oxydation en présence d'eau adsorbée se traduit par des transformations minéralogiques à la surface des parois du tunnel et des galeries : corrosion des pyrites et néoformation de phases secondaires, telles que gypse ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), célestine ( $\text{SrSO}_4$ ), jarosite ( $\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2 \cdot (\text{OH})_6$ ) et oxydes / hydroxydes de fer (Charpentier et al., 2001). Bien que la teneur en eau des argilites de Tournemire, particulièrement dans la zone du tunnel, soit très faible (Boisson, 1997), l'oxydation des sulfures s'est produite car elle est particulièrement efficace en présence de films d'eau (condensation) et de l'oxygène de l'air. Ces minéraux induisent une modification significative des équilibres eau-roche de la zone endommagée par le creusement de l'ouvrage souterrain (Figure 8).

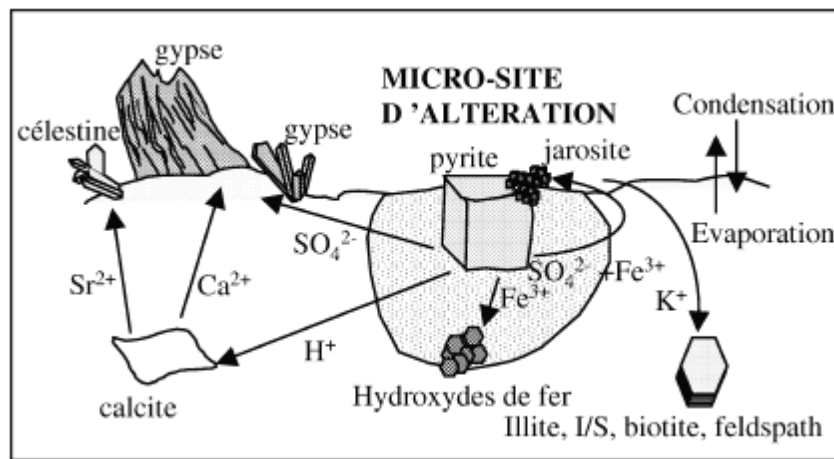


Figure 8 : Schéma synthétique des mécanismes d'oxydation à la surface des blocs (zone « EDZ ») d'après Charpentier et al. (2001).

Bien que les argilites soient des environnements stables, gouvernés par des conditions réductrices, certaines phases telles que les smectites peuvent être des phases support de la réactivité via leur capacité importante d'interaction (échanges ioniques et gonflement) avec l'eau interstitielle du site. D'autre part, durant l'évolution des conditions physico-chimiques du stockage, le fer, et plus précisément son état de valence, pourra être un des éléments majeurs de la réactivité du système argileux. L'identification des éléments cibles porteurs de la réactivité minérale est cruciale pour la détermination de l'impact bactérien sur le stockage. En effet, selon les conditions redox et énergétiques du système, les activités microbiennes seront sélectionnées par l'environnement du stockage. Ainsi le Fe(III) des phases minérales présentes peut être le moteur des activités bactériennes ferriréductrices dans ces environnements profonds.

D'autre part, l'introduction de matériaux exogènes tels que les contenants métalliques de déchets radioactifs dans les argilites peut aussi être une nouvelle

**source de réactivité dans le stockage. En quoi et comment les colis métalliques interviennent dans cette réactivité ?**

## **2.2. FER METALLIQUE : PROCESSUS DE CORROSION ET CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES ASSOCIEES**

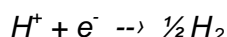
### *2.2.1. Corrosion métallique*

Quand un métal est soumis à un milieu oxydant (aqueux ou gazeux), il a tendance à évoluer vers sa forme la plus stable thermodynamiquement : la forme oxydée. La corrosion des métaux est un processus électrochimique. La réaction impliquée est une réaction d'oxydation où le métal (réducteur) perd des électrons et passe de son état de valence zéro à une forme ionique  $M^{n+}$ . Ainsi, en milieu aqueux, l'oxydation se traduit par la réaction anodique suivante :  $M \rightarrow M^{n+} + n e^-$  (Féron et al., 2008).

Par exemple, l'oxydation du fer en ion ferreux a un potentiel de  $-0,44$  V.



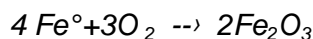
Ainsi que la réaction cathodique associée qui, en milieu acide, est :



Pour avoir une réaction de corrosion, il faut que le métal soit en présence d'un oxydant ayant un potentiel plus élevé.

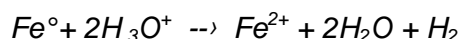
Il existe plusieurs types d'oxydants dans les environnements aqueux: **le dioxygène ( $O_2$ ) aqueux ou gazeux; les protons ( $H^+$ ) de l'eau, l'ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ), les nitrates ( $NO_3^-$ ), les sulfates ( $SO_4^{2-}$ ) et la matière organique/  $CO_2$ .**

En présence de dioxygène dissous dans de l'eau, l'oxydation conduit à la formation d'oxyde ferrique :



L'oxydation du métal peut également se produire avec d'autres espèces ioniques agissant comme accepteur d'électrons.

En milieu aqueux, en présence de protons ( $H_3O^+$  dans l'eau), quelque soit le pH, la corrosion du fer métallique peut s'écrire :



Cette réaction consomme  $2H^+$ , donc la **concentration en  $OH^-$  augmente** et le pH devient plus basique. Cette corrosion aqueuse produit aussi du **dihydrogène** ( $H_2$ ) qui tend à rendre le système plus réducteur en consommant les oxydants présents dans le système.

En présence de plusieurs oxydants, les processus d'oxydo-réduction sont concomitants mais leur cinétique diffère. Elle est dépendante du potentiel redox des couples (l'oxydant le plus fort  $O_2 > NO_3^- > Fe^{3+} > SO_4^{2-} > H^+$ ) ainsi que de la concentration de l'oxydant au contact du métal.

La réaction d'oxydation se produit soit par dissolution du matériau dans le milieu, soit par la **formation d'oxydes, d'hydroxydes, d'oxy-hydroxydes** ou d'autres composés oxydés dont la stœchiométrie est plus ou moins complexe. Ils sont adhérents ou non aux surfaces corrodées. Dans la majorité des cas, les métaux et alliages ne doivent leur longévité qu'à la formation en surface d'une couche d'oxyde (appelée couche de passivation) qui joue un rôle de barrière entre le milieu oxydant et la surface du matériau (McDonald, 1992), réduisant ainsi la vitesse d'oxydation à une valeur négligeable et permettant de stabiliser l'épaisseur de la couche d'oxyde et donc la durée de vie du matériau.

### Cas de la corrosion d'un colis de stockage

Dans les conditions de pH et de potentiel redox attendues (pH 8-9 et Eh -400 à -600mV) dans un stockage après sa fermeture, la formation d'oxydes de fer de type magnétite est pressentie. C'est la phase la plus stable thermodynamiquement (Figure 9).

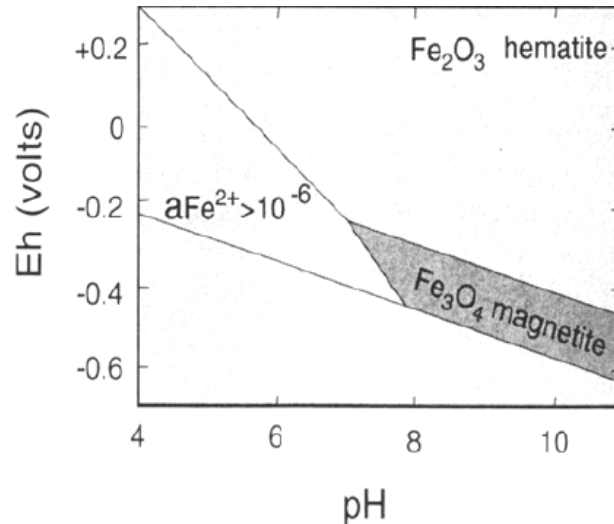


Figure 9 : Diagrammes de phases Eh/pH du fer. (Taylor, K. G. et Curtis, C. D. 1995).

Cette corrosion métallique concerne toute la durée de vie de l'ouvrage puisqu'elle n'est limitée que par la quantité d'eau disponible dans l'argile et l'environnement des colis. En contact avec le milieu argileux humide, le conteneur métallique du stockage se corrode sous des conditions anoxiques et produit en l'absence de tous autres éléments chimiques de l'hydrogène ainsi que des oxydes de fer. En plus de la chimie du milieu, la cinétique de cette dégradation dépendra des vitesses de circulation des espèces oxydantes dans la porosité de l'argile.

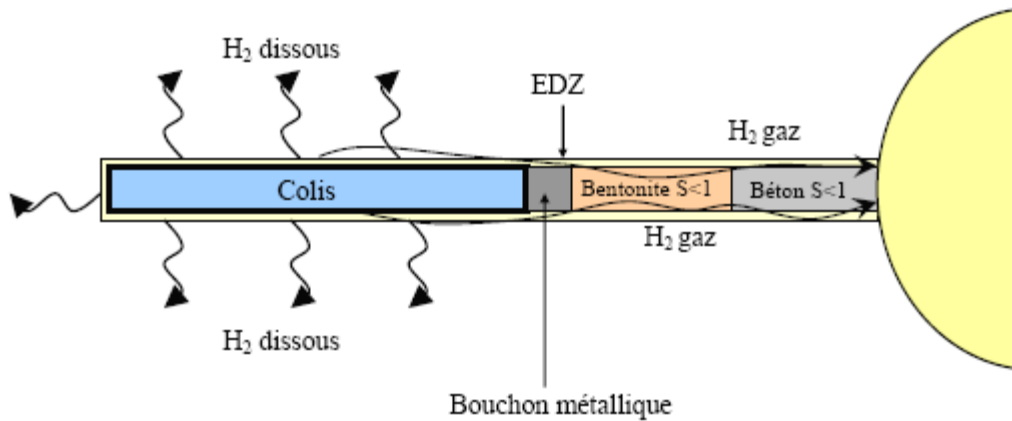
#### 2.2.2. Formation d' H<sub>2</sub> de corrosion : état et transport en milieu argileux

Que le concept de stockage prévoit l'emploi ou non d'une barrière ouvragée, le conteneur métallique contenant le colis primaire se retrouvera toujours en contact d'un milieu argileux totalement ou partiellement saturé. Sa corrosion au contact de l'eau interstitielle est donc inévitable. Ainsi, la perturbation anthropique due au stockage des déchets radioactifs au sein de la couche argileuse entraînera notamment, en phase réductrice saturée, une production significative d'hydrogène (par corrosion du fer ou radiolyse de l'eau) diffusant dans le milieu poral. D'autre part, il est probable que le système argileux se fissure ce qui va induire des circulations préférentielles de fluides accentuant la réactivité.

De nombreuses études ont essayé de quantifier la production possible d'H<sub>2</sub> au cours du stockage géologique, ainsi que les paramètres géomécaniques (surpression du gaz au contact de l'argile, migration dans la porosité, fracturation des macroporosités...) et de sûreté qui pourraient intervenir (Talandier, 2005). Les quantités d'H<sub>2</sub> produites par alvéole lors du stockage, par exemple pour les colis C, sont très importantes, **supérieures à 10<sup>6</sup> moles d'H<sub>2</sub> / alvéole.**

L'un des principaux problèmes lié à ce gaz est son devenir dans l'alvéole : l'hydrogène va progressivement migrer dans le milieu, soit au travers de l'alvéole jusqu'à la galerie, soit directement au travers de l'argilite (Figure 10).





**Figure 10 : Représentation schématique de la migration du transfert des gaz dans une alvéole de déchets C (Tallandier, 2005).**

Ainsi deux modes de migration sont à considérer :

- Une migration d'hydrogène sous forme dissoute.
- une migration d'hydrogène à l'état gazeux.

D'après Tallandier (2005), la part d'hydrogène pouvant migrer sous forme dissoute par diffusion dans le milieu géologique sur la période de corrosion est comprise entre 7% et 20% pour des vitesses de corrosion variant entre 2 et 4µm/an.

Ensuite, la poche de gaz formée en surpression peut vaincre les barrières capillaires de la formation géologique. L'augmentation de pression pourrait la fissurer et créer des chemins préférentiels facilitant la migration des radionucléides. Des premières études couplant expérimentation et modélisation sur le transfert de l'H<sub>2</sub> dans les argilites (Boulin, 2008) ont permis de mettre en évidence que les argilites proches de la saturation ont une porosité accessible au gaz, certes inférieure à 1% voire 0,1% de la porosité totale, mais suffisante pour laisser passer le gaz. Cette porosité est composée de pores de l'ordre de 50 à 200 nm de diamètre, mis en évidence lors de la caractérisation des réseaux. A partir des mesures de perméabilité au gaz (de 10<sup>-22</sup> m<sup>2</sup> à 10<sup>-20</sup> m<sup>2</sup>), la pression maximale atteinte au sein d'une alvéole de stockage serait de 83 bars (8,3 MPa), inférieur à la limite de pression de fracturation de la porosité dans l'argilite du Callovo-Oxfordien estimé à 12MPa. D'autre part, elle serait aussi inférieure à la pression effective de gaz conduisant à une microfissuration estimée à 9 MPa (Andra, 2005).

**Ainsi, l'H<sub>2</sub> sera un produit réactionnel majeur de la réactivité des matériaux au cours du stockage profond. En conditions anoxiques, la corrosion du fer métal produira 1 mole de d'H<sub>2</sub> par mole de fer corrodé :**



### 2.3. REACTIVITE FER/ARGILE : PRINCIPES ET PROCESSUS

#### 2.3.1. Corrosion argileuse : réactivité des smectites

En plus d'une corrosion aqueuse faisant intervenir les protons de l'eau, l'oxydation du fer métal peut faire intervenir des agents oxydants provenant des argiles et plus précisément des smectites.

Toutes les études conduites au laboratoire, (Mosser-Ruck et al., 2010 ; Perronnet et al., 2007 ; 2008, Lantenois et al. 2005, Papillon et al. 2003, Habert et al. 2001 ; 2005 ; Guillaume 2003 ; 2004 et Latrille et al. 2001) ont systématiquement mis en évidence une forte réactivité au cours des interactions fer / argiles avec la formation de phyllosilicates à 7Å riches en fer dans les conditions représentatives des scénarios de référence d'enfouissement de déchets radioactifs HAVL (Figure 11).

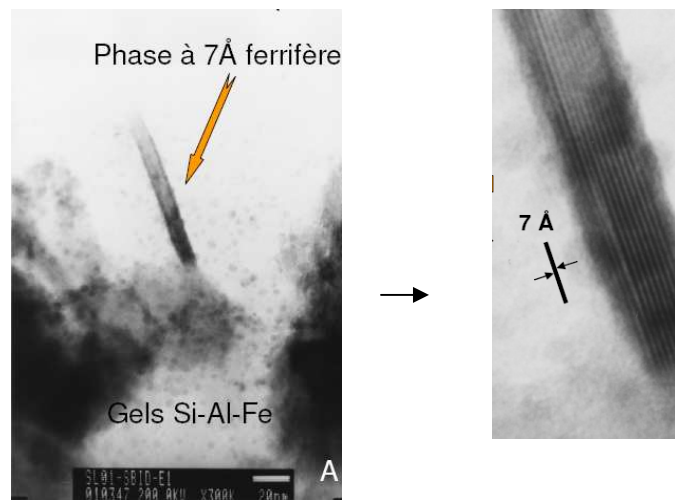


Figure 11 : Réactivité fer/argile (Lantenois, 2003) : formation de phase ferrifère à 7 Å riches en fer.

De même, les expériences en milieux argileux compactés ont mis en évidence la formation d'un front de réactivité, marqué par la diffusion du fer, depuis les conteneurs jusqu'à la barrière ouvragée (Papillon et al., 1999). Cette réactivité est dépendante de la proximité entre le métal et les matériaux argileux, elle est accentuée par l'effet du gradient thermique sur les migrations élémentaires observées dans l'expérimentation in-situ de Stripa (Latrille et al., 2001). Ainsi, le fer produit (réduit ou oxydé) va migrer dans la barrière argileuse.

En effet, la smectite peut libérer des agents oxydants puissants comme le cation  $Fe^{3+}$  structural et les protons (structuraux ou dans l'interfoliaire) qui peuvent entrer en contact avec la surface du métal.

Le premier processus qui peut être décrit est la corrosion du Fer métal ( $Fe^0$ ) au contact du  $Fe^{3+}$  qui produit du  $Fe^{2+}$ . Les demi-équations rédox couplées donnent :



Ainsi cette réaction est seulement possible s'il y a contact entre les deux matériaux.

Cette réaction débute dès que la température est supérieure à 40°C et devient significative si  $T > 80^\circ C$  (Papillon et al. 2003). Ainsi dès que la consommation des

oxydants présents dans le système, autres que ceux apportés par la smectite, est effective (oxygène occlus, protons de la solution), les processus de corrosion se poursuivent au dépens des smectites cette fois-ci (Lantenois et al. 2005).

Même si le processus de transformation est commun à toutes les smectites étudiées, celles-ci ont un degré de sensibilité différent au fer métal : l'altération des phyllosilicates débute pour des seuils en rapport massique Fe(0)/argile différents (Perronnet, 2008). De même, les propriétés cristallochimiques des smectites ont une forte influence sur la réactivité. Ainsi, les études de Lantenois (2003), ont montré que seules les smectites dioctaédriques sont réactives. Elles le sont d'autant plus que l'ouverture de l'espace interfoliaire est grande, que le contenu en Fe<sup>3+</sup> octaédrique est élevé, qu'il est clustérisé et que leur déficit de charge est tétraédrique (beidellite).

D'autres paramètres doivent être pris aussi en compte afin de comprendre ce potentiel oxydant des smectites. En effet, il existe une corrélation entre l'hétérogénéité énergétique des sites d'interaction des surfaces latérales et le degré d'avancement de la réactivité Fe<sup>(0)</sup>-smectite. Perronnet et al, (2007) ont montré aussi que le contact Fe<sup>(0)</sup>-smectite n'a pas lieu dans l'espace interfoliaire. C'est donc du fait d'interactions à distance que l'ouverture de l'espace interfoliaire influence la sensibilité de la smectite au Fe<sup>(0)</sup>. Ainsi les auteurs mettent en avant le mécanisme capital du contact du fer métal sur les faces latérales, qui déclencherait le processus de corrosion et le caractère réactif des smectites dioctaédriques.

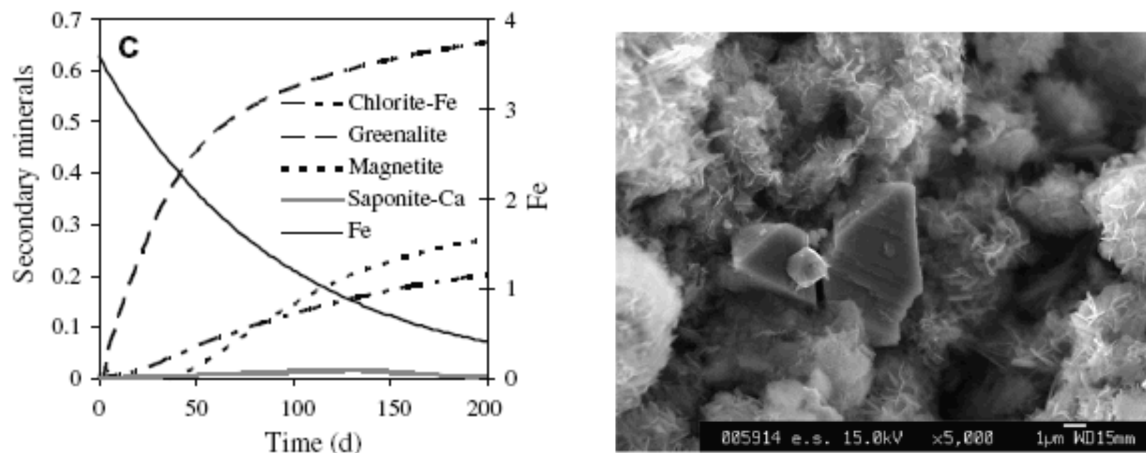
Le second processus décrit est la corrosion par le proton de la smectite. En effet la smectite possède des protons dans sa structure ainsi que dans l'interfoliaire. 3 types de réactions possibles sont décrites : Fe<sup>0</sup>H<sup>+</sup> de bords de feuillets, Fe<sup>0</sup>H<sup>+</sup> structuraux des feuillets et Fe<sup>0</sup>H<sup>+</sup> de l'espace interfoliaire (Lantenois, 2003). Cette hypothèse met en avant le rôle du H<sup>+</sup> comme un agent de la corrosion. En effet, Habert (2001) décrit en premier une réaction directe entre le fer et l'argile en absence d'eau libre, le métal est oxydé au contact de la smectite par son « eau constitutive ». Cette réaction impliquerait le prélèvement de protons de la smectite par le fer métal. Lantenois (2003) a mis en évidence, la corrosion à pH basique (faible quantité de H<sup>+</sup>) en présence de smectites dioctaédriques. Ainsi l'hypothèse décrite dans cette corrosion argileuse est que les protons de la smectite peuvent être délocalisés, mobilisables et accessibles (H<sup>+</sup> bordure et structuraux) au contact de fer métallique ; ce qui favoriserait l'interaction du Fe<sup>(0)</sup> réducteur sur les oxydants de la smectite, dont le Fe<sup>3+</sup> octaédrique. Ce mécanisme implique que le milieu réactionnel se localise dans la smectite (Habert, 2001) et met en avant l'état particulier des smectites qui peuvent être représentées sous la forme d'un électrolyte.

**En résumé, la réactivité entre le Fe<sup>(0)</sup> et la smectite est gérée par une réaction redox impliquant les agents oxydants de l'argile : H<sup>+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, qui sont transformés en H<sub>2</sub> et Fe<sup>2+</sup>. Elle conduit à la déstabilisation des smectites en gels réticulés à l'intérieur desquels peuvent nucléer des serpentines riches en fer. Par une réaction d'échange d'ions, le Fe<sup>2+</sup>, libéré par la réaction de corrosion du Fe<sup>(0)</sup>, peut rester soluble en solution uniquement dans l'espace interfoliaire où les H<sup>+</sup> délocalisés génèrent un pH de 4.**

### 2.3.2. *Vision intégrée de la réactivité : Retour sur les modélisations Fer/Argile*

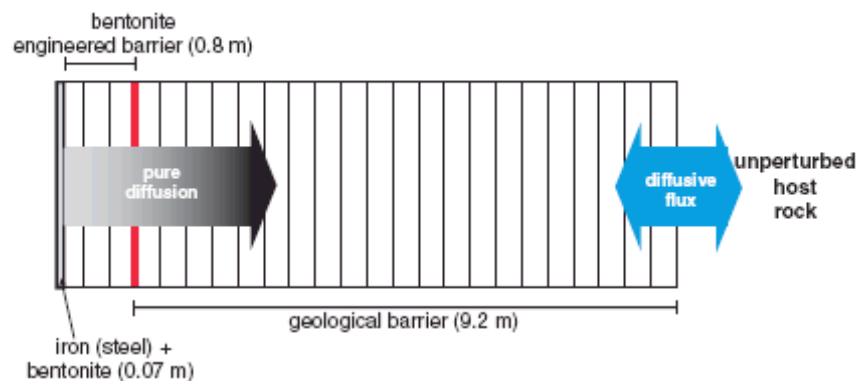
La mise en œuvre de ces schémas réactionnels dans des simulations quantitatives est une approche déterminante dans la compréhension de la phénoménologie d'ordre global.

Des études couplant expérimentation et modélisation d'expérience de réactivité Fer/Argile en batch ont permis de mettre en évidence la bonne représentation des phénomènes observés (Figure 12). La magnétite, la greenalite et la chlorite-Fe sont les principales phases néoformées de la réactivité Fe/Argile (De Combarieu et al., 2007).



**Figure 12 : 1. Résultats de simulation de l'évolution du fer et des produits de réaction au cours de l'expérience Fer/argilite (quantité de minéral en g). 2. Observation au MEB de la corrosion de poudre de fer en présence d'argilite après 6 mois de réactivité : Agrégat de silicate riche en fer de type greenalite et de cristaux de magnétite (De Combarieu et al., 2007).**

A une plus grande échelle, des modèles couplés chimie-transport, ont été utilisés afin de simuler en plus de l'interface fer-argile, la dynamique du système comprenant l'eau du site le fer métal la bentonite et l'argilite, ceci sur des échelles allant de 10000 ans (Bildstein et al., 2006) jusqu'à 100000 ans (Marty et al., 2010) ; (Figure 13).



**Figure 13 : Schéma du modèle 1D des interactions Fer/Argile (Bildstein et al., 2006).**

Quel que soit le code de calcul utilisé, CRUNCH (Bildstein et al., 2006) ou KARMAT (Marty et al., 2010), les calculs prédisent une évolution du système assez similaire :

- A la surface du fer métal, des oxydes de fer de type magnétite (80% en l'absence de bentonite et 35% en présence de bentonite) se forment préférentiellement par corrosion. La sidérite est formée en très faible quantité. Les oxydes ont tendance à diminuer la porosité du système.
- Dans la zone proche de l'interface côté argile, la réactivité fer/argile entraîne la formation de saponite et chlorite ferrifères (Marty et al., 2010) et de cronstedtite (Bildstein et al., 2006). L'intensité de ce processus dépend de la quantité en smectite (bentonite ou provenant de l'argilite).

- La dissolution des smectites présentes dans les matériaux (bentonite et argilites) se produit toujours aux interfaces fer/argile et s'accompagne d'une augmentation de la porosité.

**Ainsi, la formation d'une couche d'oxyde de type magnétite, stable dans le temps, en surface des conteneurs est pressentie quelles que soient les modélisations et expériences de réactivité Fer/Argiles.**

En résumé, la réactivité des matériaux est un processus dont l'estimation est essentielle pour évaluer les performances des composants du stockage géologique des déchets radioactifs. Cette partie a permis d'identifier différents paramètres pouvant engendrer une réactivité des matériaux.

L'aspect réactif des argilites peut être activé par différents processus tels que : l'oxydation des minéraux, la température, la pression d' $H_2$ , les contraintes mécaniques avec l'ouverture de la porosité. D'autre part, différentes phases ont pu être identifiées comme support de la réactivité telle que : les smectites, le fer métallique et l'eau interstitielle. Enfin, le Fe(III) et les protons sont identifiés comme les éléments qui permettent cette réactivité.

Ainsi, l'apport anthropique de colis de déchets radioactifs en formation de stockage profond tend à rendre le système argilite de plus en plus réactif. En effet, des processus de corrosion métallique aqueuse ou argileuse vont être le moteur de la réactivité dans le stockage et initier la formation de produits, notamment les oxydes de fer et  $H_2$ , dont les réactions sont à fort potentiel énergétique.

Un autre paramètre pourrait cependant intervenir dans la réactivité de ce système de stockage. En effet, les activités bactériennes sont dépendantes des conditions physico-chimiques et des équilibres géochimiques du système. Ainsi, afin de déterminer l'impact des microorganismes il est nécessaire de définir :

- **Quels sont les paramètres indispensables pour le développement bactérien dans ces environnements profonds et parfois hostiles ?**
- **Quelles espèces bactériennes peuvent se développer et être sélectionnées par le milieu de stockage ?**
- **Quelles sont enfin les réactions bactériennes mise en jeu ?**

### 3. ACTIVITE BACTERIENNE DANS LE STOCKAGE

Tous les êtres vivants utilisent les différentes formes d'énergie disponibles dans leur environnement immédiat afin de croître, de maintenir un état d'équilibre métabolique, ou tout simplement de préserver leur viabilité. La disponibilité des sources d'énergie est un facteur clé pour déterminer la taille, la distribution et l'activité des populations biologiques, et, à terme, les limites pour la vie elle-même. Afin de comprendre l'interaction entre les microorganismes et leur habitat, la demande biologique en énergie doit être comprise et quantifiée. Un ensemble de contraintes - théoriques, biochimiques, fondées sur la composition des milieux de cultures, sur les paramètres physico-chimiques doit être pris en compte pour essayer de répondre à ces questions.

Les recherches aux frontières de la microbiologie environnementale - en particulier, la découverte de microorganismes dans des sédiments de plusieurs millions d'années, ou même dans les environnements profonds du sous-sol, a profondément modifié notre point de vue sur les limites de la vie des organismes et notre compréhension face à leurs besoins en énergie. Les cellules procaryotiques dans les environnements de subsurface terrestre ou sous-marins peuvent représenter jusqu'à 10% des êtres vivants de la biomasse (microorganismes sur terre).

La diversité des espèces bactériennes et des minéraux présents sur terre offre un énorme potentiel aux interactions dans les environnements hydriques. Les premiers travaux liant les domaines de la géologie et de la microbiologie ont été publiés au début du siècle dernier, traitant notamment de l'implication de microorganismes dans la formation de sulfure d'hydrogène et de carbonates de calcium (Nadson, 1903). Depuis, l'étude des interactions microbe-minéral est devenu un sujet de première importance dans la thématique des sciences de l'environnement et de la vie. Il a été montré que les bactéries ont des effets prononcés sur la croissance cristalline (Gorshkov, 1992; Kohler, 1994; Ehrlich 1999; Kawano et Tomita, 2001) et la dissolution des minéraux (Bennett, 1996 ; Liermann et al., 2000b; Rosenberg et Maurice, 2003; Aouad et al., 2006; O'Reilly et al., 2006). L'association de minéraux avec des bactéries et/ou des exsudats bactériens provoque souvent une augmentation des taux d'altération à l'interface minéral/bactéries et plusieurs mécanismes ont été suggérés afin d'expliquer cet effet (Marshall et al., 1971; Van Loosdrecht et al., 1990; Maurice et Warren, 2006). Il a été, par ailleurs, observé que les interactions minéral/bactéries peuvent modifier la composition chimique de l'eau environnante, notamment son pH et son état d'oxydoréduction. De plus, il est maintenant admis que la connaissance détaillée de ces interactions est essentielle afin de mieux comprendre la chimie de l'hydrosphère et de la lithosphère (Ehrlich, 1996; Liermann et al., 2000a; Haas, 2004).

L'interaction entre l'activité bactérienne et les argiles, en particulier la smectite, a été abordée dans des études pionnières publiées par Stotzky (1966a; 1966b) et Stotzky et Rem (1966; 1967). L'impact des propriétés caractéristiques de la montmorillonite (i.e. capacité d'échange cationique et surface spécifique) sur l'activité et l'écologie des microorganismes du sol a surtout été regardé au sein des micro-habitats microbiens. Récemment, les modifications induites par l'activité bactérienne sur la charge des feuillets de smectite riche en fer (nontronite) ont été principalement étudiées. Il est aujourd'hui admis qu'une réduction (anaérobie), chimique ou biologique, du fer(III) structural provoque une déstabilisation de la smectite en augmentant la charge de surface et une diminution de la capacité d'hydratation (Kim et al., 2005; 2006; Stucki et Kostka, 2006)

Malgré les nombreuses études sur ce sujet, l'amélioration des connaissances sur les interactions microbe/minéral reste au premier plan, spécialement en ce qui concerne la complexité des réactions chimiques dans le système bactérie/smectite.

### **3.1. PRESENCE MICROBIENNE DANS LES SITES DE STOCKAGE PROFOND**

Depuis la découverte dans les années 80, des écosystèmes hydrothermaux océaniques, l'existence d'une biosphère profonde active marine ou continentale suscite un grand intérêt tant chez les biologistes que chez les géologues. Les approches microbiologiques conventionnelles ont rapidement permis de décrire un nombre significatif de nouveaux genres et de nouvelles espèces microbiennes appartenant à des types métaboliques variés : hydrogénotrophes, thermophiles et hyperthermophiles aérobies et anaérobies, méthanogènes, méthanotrophes, sulfato et sulfo-réducteurs, etc... Plus récemment, les approches moléculaires (pyroséquençage) ont confirmé l'existence d'une diversité phylogénétique très importante et bien supérieure à celle envisagée auparavant. Elles montrent la capacité d'adaptation des microorganismes à des environnements très variés et singuliers, dont les caractéristiques physico-chimiques diffèrent assez fortement de celles rencontrées dans leur niche écologique habituelle. Ces résultats posent aussi ouvertement la question de l'existence d'activités microbiennes en milieux profonds et confinés et de leur durabilité.

La question d'une activité bactérienne au sein d'un site de stockage reste encore largement ouverte. D'une part, l'activité des bactéries indigènes peut être indirectement stimulée par les perturbations physiques et hydriques engendrées par la mise en place des ouvrages (galeries, puits...) ou l'apport de nutriments par les matériaux employés. En effet, l'introduction de matériaux exogènes au sein d'un milieu argileux profond est susceptible de modifier significativement les conditions géochimiques de ce milieu réducteur et d'induire progressivement la libération de composés chimiques (comme l'hydrogène, le fer et des nutriments) pouvant initier ou modifier certaines activités microbiennes. D'autre part, les circulations non contrôlées d'engins de ventilation et d'hommes peuvent contribuer à l'apport de bactéries allochtones.

Ainsi, au sein de formations géologiques profondes, notamment en milieu granitique et malgré des conditions hostiles (pression lithostatique et hydrostatique, hydratation réduite, présence de composés toxiques), la présence de microorganismes endogènes a été démontrée (Pedersen, 1996 ; 2000a ; Pedersen et al., 2000a ; West et al., 2002 ; Stroes-Gascoyne et West, 1997). Plus récemment, dans un contexte argileux, des recherches ont mis en évidence la présence de bactéries sulfato-réductrices dans des argiles commerciales (bentonite MX 80) identifiées comme matériau potentiel pour le stockage géologique. Ces bactéries présentes dans la bentonite commerciale ont la capacité de survivre à la dessiccation de la bentonite, à de hautes températures et à une haute teneur en salinité (Masurat et al., 2008 ; Stroes Gascoyne et al., 2010). D'autre part, le rôle de l'activité de l'eau (<0,96) sur la croissance bactérienne fait toujours débat (Motamedi et al., 1996 ; Pedersen et al., 2000b).

Dans les milieux argileux naturels, des analyses par génotypage ont permis d'identifier différentes espèces de microorganismes dans le site du Callovo-Oxfordien de Meuse/Haute-Marne ainsi que dans l'argile à Opalinus du Mont Terri et l'argilite de Tournemire (Poulain, 2006 ; Stroes-Gascoyne et al., 2007 ; Mauclaire et al., 2006 ; Urios et al., 2010). Dans ces études, les auteurs expliquent que la présence de bactéries Gram-négatives et d'espèces sulfato-réductrices révèle la quantité suffisante d'éléments nutritifs pour soutenir la croissance des communautés autochtones et non autochtones dans cet environnement. Mais, peu de communautés microbiennes viables ont été retrouvées. Ceci est probablement dû à un métabolisme en « sommeil », en raison des restrictions d'espace et d'eau.

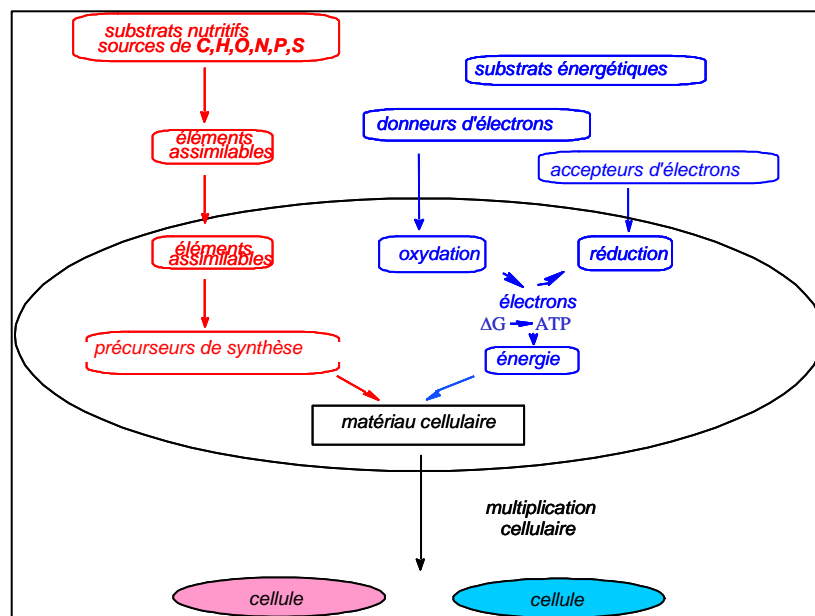
**Cependant, des perturbations comme lors de l'excavation des galeries souterraines avec la formation d'une zone faillée (de 0,5 à 1m de profondeur) nommée EDZ (Excavation Damaged Zone) autour des galeries et des alvéoles et lors de**

**l'exploitation du stockage pourraient fournir de l'espace, de l'eau et des nutriments pour relancer l'activité des microorganismes.**

### 3.2. EXIGENCE DE LA VIE MICROBIENNE ET LIMITES DANS LES ENVIRONNEMENTS EXTREMES

#### 3.2.1. Métabolisme bactérien : substrats nutritifs et énergétiques

Les bactéries sont relativement petites avec une taille moyenne de 0,5 à 5  $\mu\text{m}$  de longueur. Les plus petites tailles retrouvées vont de 0,1 à 0,2  $\mu\text{m}$  (*Mycoplasme sp*) mais peuvent atteindre 750  $\mu\text{m}$  pour les plus grandes (*Thiomargarita namibiensis*). En conséquence, elles ont une grande surface spécifique comparée à leur volume (par exemple, 55  $\text{m}^2/\text{g}$  pour *Shewanella putrefaciens*, Haas 2004). Comme la surface contrôle le taux de transport d'éléments nutritifs dans une cellule ainsi que le taux de déchets éliminés ; la taille bactérienne affecte à la fois les cellules du métabolisme et de la croissance. Pour réussir une croissance que ce soit dans la nature ou en laboratoire, les bactéries ont besoin d'eau, d'une source d'énergie, de carbone et d'une gamme d'autres nutriments (Figure 14).



**Figure 14 : Le métabolisme bactérien**

Les bactéries puisent dans leur **milieu nutritif** les substrats à partir desquels elles synthétisent leurs propres constituants (Figure 15). Cette synthèse s'effectue à partir de monomères précurseurs : les métabolites essentiels, auxquels s'ajoutent des vitamines et des molécules résultant de l'activité externe des exoenzymes bactériennes. Selon les groupes bactériens, différentes sources d'énergie et de substrats carbonés sont utilisées, définissant le type trophique de la bactérie. D'un point de vue chimique, la biomasse microbienne est principalement constituée de Carbone 50%, Hydrogène 8%, Oxygène 20%, Azote 12%, Phosphore 3%. Le reste des éléments (Na, Ca, S, K, Mg...) représente environ 4%. La formule brute suivante,  $\text{C}_{4.2}\text{H}_8\text{O}_{1.25}\text{N}_{1.16}\text{P}_{0.1}\text{S}_{0.03}$  est une manière de représenter la composition moyenne d'une bactérie. Elle est nécessairement variable d'une espèce à l'autre en fonction de l'état physiologique (Pelmont, 1993).

Le carbone est le principal constituant de tous les matériaux cellulaires et donc le principal élément nutritif des bactéries (Madigan et al., 2003; Konhauser, 2007). Après le carbone, le deuxième élément le plus abondant dans une cellule est l'azote. Cet



élément est un constituant majeur des acides aminés, des nucléotides, des acides nucléiques et des coenzymes. Le phosphore est surtout nécessaire comme un constituant des acides nucléiques et des phospholipides, alors que le soufre est un élément constitutif d'acido - acides (cystéine, méthionine) et plusieurs co-enzymes. Le potassium est le principal cation inorganique et agit comme un cofacteur de certaines enzymes. Les autres cations inorganiques cellulaires sont le magnésium et le calcium qui sont des cofacteurs de réactions enzymatiques. Le fer est l'élément clé des cytochromes et joue donc un rôle majeur dans le transfert d'électrons et donc la respiration cellulaire.

Element	% of dry weight	Source	Function
Carbon (C)	~50	organic compounds or CO <sub>2</sub>	Main constituent of cellular material
Nitrogen (N)	~12	NH <sub>3</sub> , NO <sub>3</sub> , organic compounds, N <sub>2</sub>	Constituent of amino acids, nucleic acids, nucleotides, and coenzymes
Phosphorous (P)	~3	inorganic phosphates (PO <sub>4</sub> )	Constituent of nucleic acids, nucleotides, phospholipids, LPS, teichoic acids
Sulphur (S)	~1	SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup> , organic sulphur compounds	Constituent of cysteine, methionine, glutathione, several coenzymes
Potassium (K)	~1	Potassium salts	Main cellular inorganic cation and cofactor for certain enzymes
Magnesium (Mg)	~0.5	Magnesium salts	Inorganic cellular cation, cofactor for certain enzymatic reactions
Sodium (Na)	~0.5	Sodium salts	Mostly required by marine bacteria
Calcium (Ca)	~0.5	Calcium salts	Inorganic cellular cation, cofactor for certain enzymes
Iron (Fe)	~0.2	Iron salts	Component of cytochromes and certain nonheme iron-proteins and a cofactor for some enzymatic reactions

**Figure 15 : Nutriments bactériens selon les sources et leurs fonctions (Todar, 2006).**

Pour fonctionner correctement, le métabolisme bactérien doit disposer d'une source d'énergie. Pour les bactéries, cette source d'énergie est d'origine soit photonique, soit chimique. Dans le premier cas, le processus de récupération d'énergie correspond à une conversion de l'énergie lumineuse (photons incidents) en énergie électrique puis en liaisons chimiques (photosynthèse, phototrophe). Dans le second, il s'agit d'un transfert d'énergie électrique (par oxydation d'un donneur d'électrons) en liaisons chimiques (chimiosynthèse, chimiotrophe) l'oxydation-réduction des réactions faisant intervenir des molécules inorganiques ou organiques.

Les bactéries phototrophes ou chimiotrophes, peuvent utiliser, pour se développer et croître des sources de carbone organiques ou inorganiques, elles sont dites alors organotrophes et lithotrophes respectivement.

Les bactéries chimio-lithotrophes puisant leur énergie dans l'oxydation de substances minérales (hydrogène, composés azotés ou soufrés, fer ou oxyde de carbone) sont qualifiées d'autotrophes et peuvent vivre dans un environnement purement minéral. A l'inverse, l'activité des bactéries chimio-organotrophes dépend de la présence et de la qualité de composés organiques élaborés dans leur environnement, elles sont qualifiées d'hétérotrophes. Ce dernier type trophique est le plus commun dans le monde bactérien comme dans la majorité des cellules eucaryotes.

Leur métabolisme dépend aussi et de manière très spécifique (fonction de l'espèce), des **conditions physico-chimiques environnantes** : température, pression, pH, salinité, pO<sub>2</sub>.... Cette diversité métabolique est à l'origine de l'ubiquité des microorganismes dans un large éventail d'habitats. Les bactéries thermophiles et hyperthermophiles, par exemple, sont adaptées aux températures très élevées (de 40°C à 80°C en moyenne) et ont été identifiées dans des échantillons provenant des grands fonds marins et des événements hydrothermaux (Huber et al., 1989) alors que d'autres ont été retrouvées dans le permafrost sibérien à des

températures de -20°C (Rivkina et al., 2000). Les bactéries acidophiles peuvent vivre dans des environnements particulièrement acides (en-dessous de pH 2) et chargés en métaux comme dans les eaux issues de drainage minier. Les alcalinophiles peuvent croître à des valeurs de pH de 11 et sont souvent associées à des sols riches en carbonates (Konhauser, 2007). Elles sont aussi présentes dans les constructions en béton (Diercks et al., 1991 ; Jestin et al., 2004), où elles perturbent la stabilité mécanique des ouvrages.

### 3.2.2. *Activité microbienne en milieu argileux profond*

#### Métabolismes sélectifs et adaptables

Dans les environnements argileux profonds, les ressources énergétiques et nutritionnelles sont limitées. En effet, malgré les teneurs non négligeables en **matière organique** présente dans le système, leur biodisponibilité et leur biodégradabilité sont souvent réduites en raison de la chimie plus ou moins complexe et du degré de maturité des composants organiques présents (matière réfractaire). En effet, plus cette matière organique est mature (degré d'oxydabilité faible) plus la récupération d'énergie sera difficile. Si on compare différentes argilites étudiées pour un éventuel stockage géologique des déchets nucléaires, on s'aperçoit que la nature de la matière organique et sa proportion dans les argilites sont très variées (Deniau et al., 2007). Ainsi la matière organique retrouvée dans l'argilite de Tournemire est mature, de l'ordre de 1% et est composée principalement d'un hydrocarbure aromatique : l'acide benzoïque. L'argilite du Callovo-Oxfordien est plus riche en composés organiques (environ 1,5%) et est moins mature que celle de Tournemire. Enfin, l'argilite de Boom (Belgique) contient une plus grande quantité de matière organique, 1 à 5% et est immature (début de la diagénèse). Par ailleurs, lors de l'excavation et de la mise en place des colis, des composés organiques -actuellement non quantifiable- vont être introduits dans le système à partir des colis de déchets HAVL et des poussières d'exploitation adhérentes aux parois des galeries.

Cependant, lors du stockage géologique des déchets radioactifs, une seconde et nouvelle source énergétique apparaît dans le système et peut permettre le développement bactérien à travers des réactions d'oxydo-réduction : l'hydrogène ( $H_2$ ). Ce gaz, produit par corrosion aqueuse des colis métalliques ainsi que par radiolyse de l'eau, va pouvoir pénétrer dans la barrière argileuse, soit par diffusion soit par convection au travers des fractures des argilites produites de façon anthropique. Les quantités d' $H_2$  produites sont dépendantes de la composition en déchets radioactifs contenus dans les alvéoles, mais seront de l'ordre de  $10^6$  moles par alvéole dans le cas des colis HAVL (Andra, 2005). Le di-hydrogène circule dans la porosité et sa fraction dissoute dans l'eau porale, est, de fait, biodisponible. Enfin, cette source d'énergie est facilement utilisable par les bactéries, car sa diffusion à travers la membrane et le cytoplasme des cellules est purement passive (coût énergétique faible pour les cellules).

En conditions réductrices, les bactéries chimio-organotrophes ou chimio-lithotrophes peuvent utiliser différents éléments, ions ou substances minérales ( $NO_3^-$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_2$ ) comme accepteurs d'électrons. Le transfert d'électrons ne s'effectue que si la variation d'enthalpie libre à pression constante ( $\Delta G$ ) de la réaction d'oxydo-réduction est négative (réaction exergonique). L'énergie libérée est proportionnelle à la différence des deux potentiels de deux couples d'oxydo-réduction.

Ainsi, en fonction des potentiels redox des couples impliqués, les quantités d'énergie récupérées sont plus ou moins importantes. Ces processus d'oxydo-réduction ont lieu dans les processus de diagénèse précoce des sédiments à partir de la dégradation progressive de la matière organique en fonction de la profondeur et des substances minérales disponibles (Figure 16).

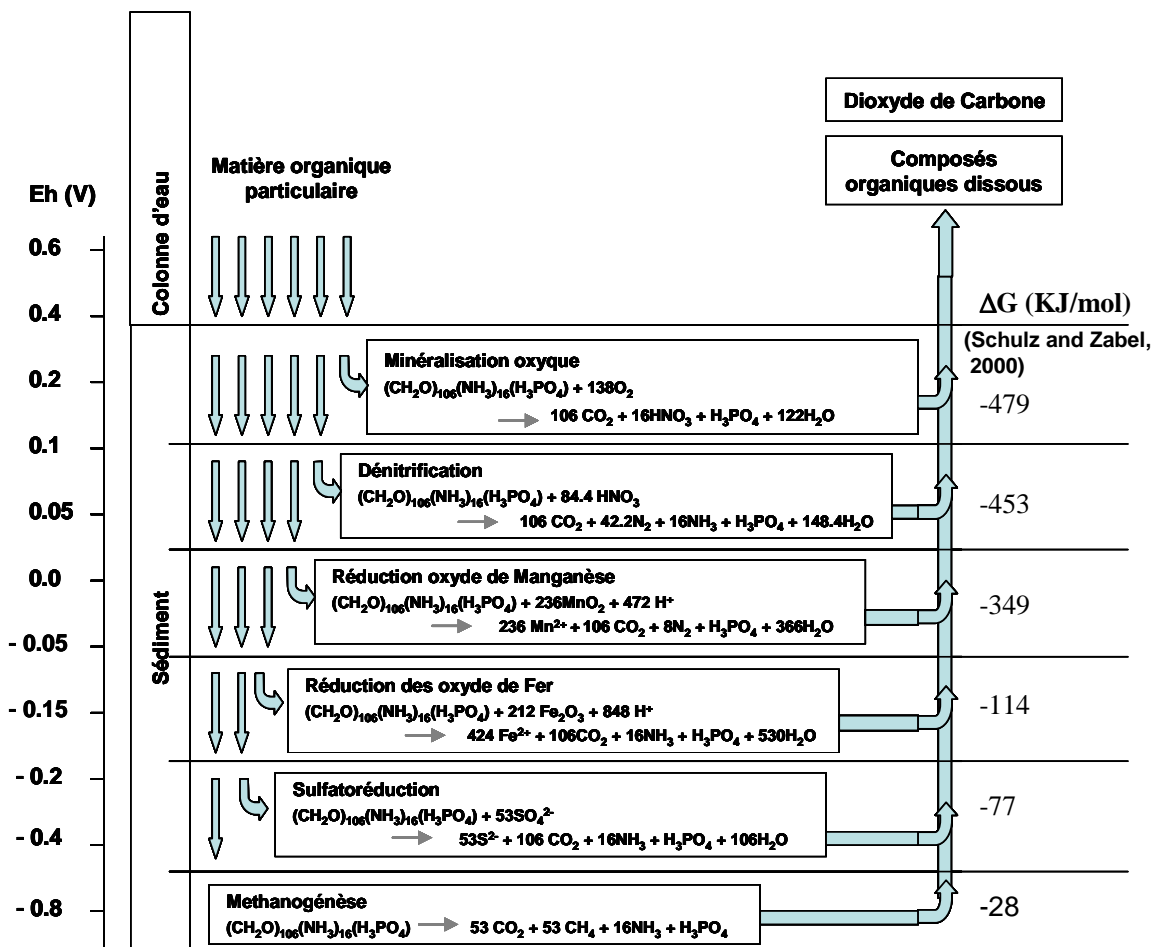


Figure 16 : Bio-minéralisation de la matière organique dans les systèmes redox, avec les quantités d'énergies  $\Delta G^\circ$  résultantes.

L'énergie libre de ces réactions d'oxydoréductions est récupérée sous forme biochimique par les bactéries, l'ATP, par synthèse couplée. L'énergie nécessaire à la synthèse et l'activité de 1g de cellules demandent 64 kJ (Thauer et al., 1977 ; 1984). Cette valeur, déterminée à la fois de manière théorique et expérimentale est utilisée comme référence dans les calculs d'estimation de la biomasse bactérienne. Ces réactions se font de la façon la plus rentable énergétiquement pour les bactéries, selon l'utilisation des substances minérales présentes. Ainsi, les accepteurs d'électrons les plus énergétiques pour les bactéries sont dans l'ordre:  $\text{l'O}_2 > \text{NO}_3^- > \text{MnO}_2 > \text{Fe}^{3+} > \text{SO}_4^{2-}$ .

Dans un système naturel de couche argileuse, les oxydants disponibles dans le milieu pour la réduction bactérienne ne sont pas nombreux du fait de la nature du matériau. Cependant, une proportion significative de fer de valence III sera présent au cours du stockage : dans la structure des argiles, notamment des smectites, dans les oxydes et hydroxydes de fer et dans les produits de corrosion (magnétite et hématite). Ainsi, le milieu argileux pourrait être le siège d'une réduction bactérienne du **Fe(III) structural** des phases minérales présentes. Ces réactions de réductions bio-induites peuvent avoir des conséquences plus ou moins néfastes sur l'argile et ses minéraux accessoires, dissolution, transformation, et notamment sur les vitesses de corrosion des conteneurs métalliques. Plus précisément, la durabilité des matériaux argileux est primordiale pour la sûreté du stockage, notamment sur les propriétés de confinement comme le scellement (bentonite) ou la barrière argileuse (argilite).

D'autre part, le milieu poral peut contenir une quantité de **sulfate** qui peut aussi être utilisée par les microorganismes comme accepteur d'électrons. La réduction des sulfates a beaucoup été étudiée au travers des bactéries sulfato-réductrices car elles sont susceptibles d'engendrer un impact significatif dans les processus de biocorrosion des matériaux métalliques. On estime que 20% des problèmes de corrosion sont dus à l'activité microbienne. Cette seconde réaction a cependant une conséquence moindre sur le matériau argileux. En effet, la réduction des sulfates entraîne la formation d' $\text{HS}^-$  qui, en présence de fer, précipite sous forme de sulfure de fer (pyrite, pyrrhotite).

En conclusion, la sélection d'espèces microbiennes adaptées aux conditions de stockage de déchets radioactifs peut ainsi entraîner et causer de nombreuses modifications de l'environnement proche du stockage.

### Survie ou vie en milieu extrême

#### **Interaction radioéléments-microorganismes.**

Durant le stockage, les microorganismes, qui seront situés proches des colis métalliques, subiront une radioactivité intense du fait de la présence des déchets. Cela peut exercer une pression sélective sur les espèces bactériennes.

Dans cette partie « interaction radioéléments-microorganismes », deux points sont discutés :

- La résistance des bactéries aux radiations
- Une revue sur les impacts des activités microbiennes sur la mobilité des radionucléides.

La présence de microorganismes dans des sites radioactifs n'a été que récemment étudiée. Les premières études se sont focalisées sur les anciens sites miniers ou d'armement nucléaire où des bactéries viables ont été retrouvées (Landa, 2004 ; Fredrickson et al., 2004). Cette activité bactérienne a été retrouvée en présence d'une forte concentration en éléments radioactifs, 10 à 20  $\mu\text{Ci } ^{137}\text{Cs.g}^{-1}$ . Différentes espèces ont pu être isolées dont *Arthrobacter species*, *Rhodococcus* et *Nocardia*. Ces espèces ont des caractéristiques proches de *Deinococcus radiodurans* et sont capables de survivre à de fortes doses de radiation  $\sim 20 \text{ KGy}$  et à la dessiccation. D'autre part des microorganismes anaérobies ont été retrouvés dans des eaux collectées à plus de 160 m de profondeur d'un site de stockage de déchets radioactifs de faible activité en Sibérie, Russie (Nazina et al., 2004). De même, des bactéries ont été retrouvées dans des piscines d'entreposage de déchets nucléaires de la Hague, France (Galès et al. 2004) ainsi qu'en Espagne (Chicote et al., 2004). Dans le premier site, les bactéries retrouvées (*Ralstonia sp*, *Burkholderia sp*) pouvaient survivre sous de très hautes activités et directement en présence d'hydrogène (produit par la radiolyse de l'eau) et de  $\text{CO}_2$  comme seuls substrats énergétiques. Les caractéristiques sélectives du milieu ont entraîné une adaptation et une sélection d'espèces hydrogénotrophes capables de se développer et de persister dans le milieu. Certaines propriétés métaboliques des microorganismes peuvent leur permettre de modifier les milieux environnants, à partir de nouvelles sources énergétiques, telles que l' $\text{H}_2$  (produit de radiolyse ou de corrosion). Ces résultats montrent que **la radioactivité de sites des déchets nucléaires n'est pas inhibitrice de la vie microbienne. Les produits de radiolyse peuvent être aussi une source énergétique de certaines espèces microbiennes (cas de bactéries hydrogénotrophes).**

Le destin des radionucléides dans l'environnement est dépendant des conditions physico-chimiques du milieu ainsi que de la présence des microorganismes. En effet, ceux-ci peuvent affecter les radionucléides en changeant directement leur état d'oxydation ou en produisant indirectement des composés réduits ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , ligands).

Cette activité microbienne va entraîner un changement de solubilité des radionucléides par différents mécanismes tels que la biosorption (Lloyd et Macaskie, 2000), la

bioaccumulation (Suzuki et Banfield 1999), la biotransformation (Lovley et al., 1996 ; Lloyd, 2003) et la bio-minéralisation par ligands (Posgate, 1979).

Dans des conditions extrêmes : températures élevées et fortes radiations, plusieurs microorganismes extrémophiles ont la capacité de réduire des produits de fission tels que : technétium<sup>VII</sup> (*Deinococcus radiodurans*, *Thermoterrabacterium ferrireducens*...). De même le sélénium<sup>VI</sup> (*Rhodobacter sphaeroides*), le césium, le strontium peuvent aussi être réduits ou bio-minéralisés par les microorganismes. Les actinides tels que l'uranium peuvent être réduits par les bactéries, soit lorsque ce mécanisme est couplé à la réduction du Fe(III) telles *Shewanella putrefaciens* (Frederickson, 2000), soit quand il est utilisé comme substrat énergétique pour les bactéries (*Sulfatoréductrice SRB*, *D.radiodurans*) (Abdelouas, 2000 ; Frederickson, 2000). L'U<sup>VI</sup>, forme oxydée de l'uranium, est soluble et mobile dans les milieux aqueux. La réduction bactérienne de l'U<sup>VI</sup> en U<sup>IV</sup> provoque sa précipitation et donc son immobilisation dans les sols. *S. putrefaciens* peut se développer en tirant son énergie de l'oxydation de l'H<sub>2</sub> par le chlorure d'uranyle. D'autre part, l'action biologique apparaît comme responsable en grande partie des dépôts d'uranium dans les sédiments marins, et certains gisements d'uranium pourraient avoir été bâtis par accumulation d'origine biologique (Lovley et Coll, 1991)

En d'autres termes, la migration des radionucléides dans les environnements proches d'un stockage de déchets nucléaires peut être fortement dépendante des microorganismes. Leur solubilité et mobilité sont dirigées par des mécanismes de biotransformation des radionucléides, réduction des métalloïdes (uranium, technétium). Ainsi, dans ces conditions extrêmes, les microorganismes peuvent aider au confinement pour finalement limiter la dispersion des radionucléides dans l'environnement. Cependant, les radionucléides sont souvent retrouvés sorbés à la surface des oxydes et hydroxydes de fer et manganèse dans les sols et dans les environnements de subsurfaces (Nealson et Little, 1997 ; Lovley, 1995). L'altération des oxydes de fer par les microorganismes peut aussi favoriser la migration des radionucléides.

### **La porosité du milieu argileux : limite au développement bactérien ?**

Les différentes études de diversités microbiennes (partie 3) démontrent de multiples potentialités de développement de la vie microbologique dans les environnements argileux naturels (Poulain, 2006 ; Stroes-Gascoyne et al., 2007). Cependant, ces études ont mis en évidence une faible activité bactérienne dans le milieu argileux et la présence de nombreuses bactéries sous forme sporulée. Ces spores sont des formes de résistance aux conditions hostiles ou défavorables du milieu comme la dessiccation ou la raréfaction des sources de carbone et d'énergie.

Un autre facteur limitant pour l'activité bactérienne dans ces roches de couvertures argileuses est la porosité du milieu. Elle évolue selon les argilites et la pression de compaction mais en milieu homogène, la taille des pores est de l'ordre 10 nm (Andra, 2005). Il existe cependant des hétérogénéités dans ces couvertures argileuses, avec la présence de macropores (supérieur à 100 nm) et de microfissurations souvent d'origine tectonique.

Malgré tout cette porosité reste inaccessible, même aux bactéries de petites tailles (entre 0,1 et 2 µm). Les bactéries retrouvées sont probablement dans des macroporosités afin de persister sous forme de spores. Dans ces conditions, leur activité est très ralentie mais suffisante pour préserver leur ADN ce que confirme les analyses de biologie moléculaire.

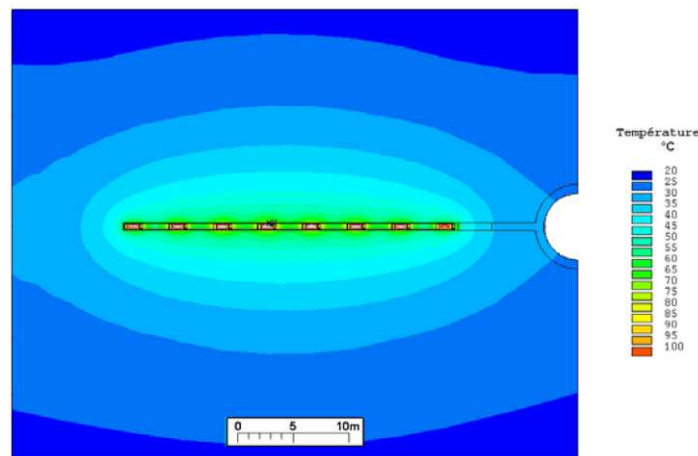
Ainsi, dans un milieu argileux homogène, le développement bactérien est fortement limité par un espace poral faible et par les conditions du milieu qui peuvent être limitantes pour leur métabolisme.

Cependant, une augmentation de cette porosité, par exemple lors de l'excavation (formation de l'EDZ) et la mise en place du stockage, peut favoriser, au moins localement, le

développement microbien. Les microorganismes sous forme de spores vont pouvoir, à un moment donné, dans des conditions favorables, se développer de nouveau et coloniser le milieu.

**Gradient de température : rôle sur les cinétiques bactériennes.**

Lors du stockage géologique des déchets radioactifs, une importante source de rayonnements ionisants avec dégagement de chaleur, appelé la charge thermique, va se produire dans le champ proche du stockage. La propagation de la chaleur dans le système se fait par conduction (transmission de chaleur par vibration des atomes de proche en proche). La température moyenne de l'argilite du site à 500m de profondeur est de l'ordre de 20°C. Le maximum de température (pic thermique) à l'interface chemisage/argilite sera (selon les prédictions actuelles) inférieur à 90°C à environ 10-15 ans après l'introduction des colis de déchets radioactifs (ASN, 2010). Une température uniforme du site de l'ordre de 45-50°C est obtenue après 1000 ans au sein du module de déchets HAVL. Une modélisation de ces phénomènes a été réalisée (figure 17) concernant le pic thermique des colis C (Andra, 2005).



**Figure 17 : Modélisation lors du pic thermique des températures attendues dans le champ proche d'une alvéole des colis C (Andra, 2005).**

En considérant, les prédictions de températures et les propriétés de diffusivité thermique ( $10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ ) dans l'argilite, ici du Callovo Oxfordien, on peut observer que ce gradient thermique influencera une zone maximum de 40m de diamètre autour des alvéoles et que dans une zone de 20m de diamètre autour de l'alvéole des températures supérieures à 35°C seront présentes.

Dans ces zones impactées la température peut avoir un rôle non négligeable sur la croissance bactérienne et donc sur les cinétiques d'altération des minéraux argileux. En effet, la température est un élément clé sur le développement microbien et une très grande majorité des bactéries connues et cultivables ont une activité maximale entre 30 et 40°C. D'autre part, la diversité microbienne implique une résistance aux conditions extrêmes et notamment à des températures élevées. C'est le cas des bactéries thermophiles, qui n'ont une activité qu'à haute température, allant de 50-60°C jusqu'à 100°C.

Ainsi l'augmentation de la température du site de stockage n'est pas un paramètre inhibant l'activité bactérienne, bien au contraire : il peut favoriser très rapidement le développement des microorganismes si la disponibilité des sources d'énergie et de nutriments au sein du milieu est garantie.

Ces différentes études montrent que la disponibilité des ressources dans les environnements profonds du stockage, ainsi que la présence d'une forte radioactivité ne sont pas des facteurs limitants pour le développement et la croissance bactérienne. Dans des conditions d'espace et d'eau plus favorables, le développement bactérien est fortement pressenti. Mais la question qui demeure est le rôle de l'activité microbienne sur cet habitat et son impact (positif ou négatif) sur la résistance des matériaux de confinement et les propriétés des barrières argileuses. Beaucoup de travaux se bornent à la description de figures de corrosion ou la caractérisation de biofilms, sans réels appuis expérimentaux permettant de mesurer les conséquences du métabolisme bactérien sur les matériaux. Cependant, l'utilisation du Fe(III) structural des matériaux argileux et des produits de corrosion, comme accepteur d'électrons dans des réactions énergétiques de croissance bactérienne, peut avoir un effet fondamental sur le comportement à long terme de la barrière argileuse et sur les propriétés de confinement des radionucléides dans l'environnement.

### 3.3. REVUE DES IMPACTS MICROBIENS SUR LA REACTIVITE IMPLIQUANT LES MATERIAUX

#### 3.3.1. Fonctions d'altération microbienne

L'activité microbiologique peut favoriser ou engendrer des processus d'altération des matériaux ou des phases minérales. La nature de ces altérations dépend des espèces bactériennes, des phases minérales présentes ainsi que des conditions géochimiques du milieu.

Quatre types de processus d'altérations peuvent être décrits :

- l'acidolyse (dissolution par l'action des  $H^+$ )
- la complexolyse (dissolution par action des ligands, chélatant bio-induits)
- l'immobilisation (formation de précipité diminuant la dissolution)
- l'oxydoréduction (dissolution par déstabilisation des charges de la structure cristalline)

Un modèle d'altération microbienne en fonction du pH a été décrit par Balland et al., 2010 (Figure 18).

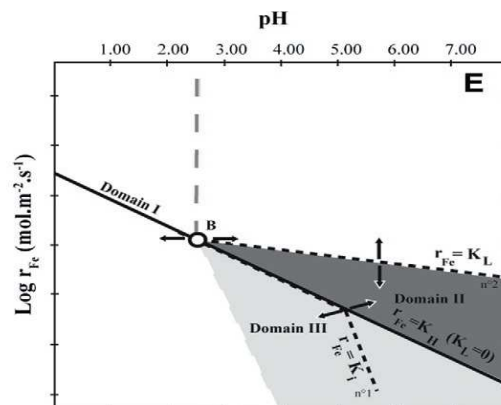
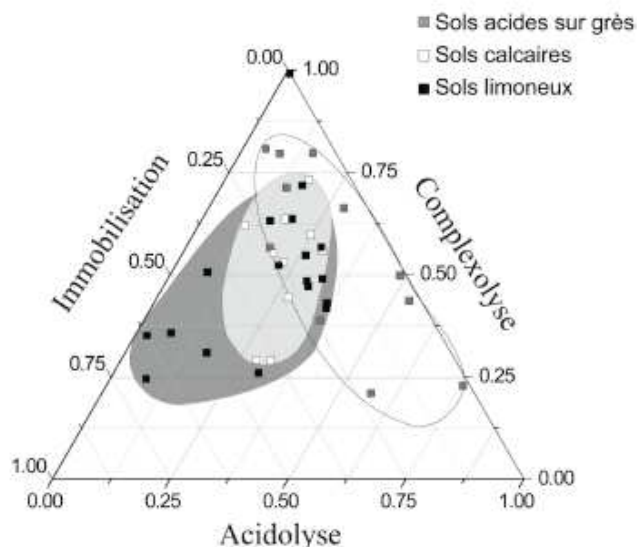


Figure 18 : Vitesse de dissolution d'une phase minérale de type biotite selon les fonctions d'altération microbienne. Domaine I (acidolyse) ; domaine II (complexolyse) et domaine III (immobilisation).

D'autre part, la nature des phases minérales et les conditions géochimiques sélectionnent non seulement les espèces bactériennes mais aussi leurs fonctions

d'altération. En effet selon la nature des sols, les différentes espèces bactériennes présentes ont une fonction d'altération principale commune (Figure 19).



**Figure 19 : Sélection des fonctions d'altérations des espèces bactériennes selon la nature des sols (Balland, 2010). Chaque point correspond à une espèce bactérienne extraite des sols.**

La fonctionnalité d'altération des phases minérales par des mécanismes d'oxydoréduction peut avoir des impacts plus importants. Le changement de valence des éléments oxydables ou réductibles entraîne une déstabilisation de l'édifice cristallin par un changement de la charge structurale et donc une dissolution importante des phases initiales. Cette fonction microbienne est étudiée via la réduction du Fe(III) ou des sulfates.

### 3.3.2. Interaction microbienne sur le Fe(III) structural

Il a été démontré que dans les réseaux d'adduction d'eaux potables, la présence de phases ferrifères pouvaient favoriser le développement de bactéries (Appenzeler et al., 2005), notamment par la présence de Fe (III). En effet, le Fe(III) est insoluble dans l'eau pure à pH neutre et, en conséquence, les bactéries peuvent l'utiliser à travers le fer porté par les minéraux comme la ferrihydrite, l'hématite, la goethite et les minéraux argileux (Stucki et al., 1987; Roden et Zachara, 1996; Bonneville et al., 2004; Stucki et Kotska, 2006). De même, les bactéries sont impliquées dans de nombreuses interactions avec les différentes formes du fer (aqueux ou sous forme minérale). Elles sont décrites dans la littérature comme des agents essentiels et efficaces dans la formation de minéraux ferrifères tels que lors des processus de bio-minéralisation (Miot et al., 2009).

#### Réduction des oxydes de Fe(III)

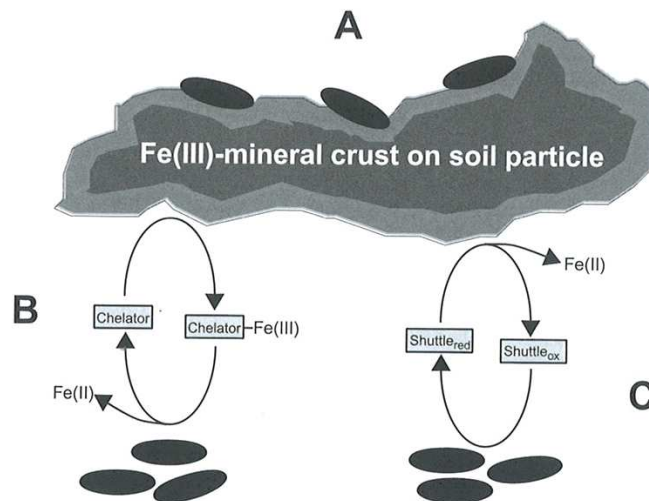
De nombreuses études antérieures ont porté sur la réduction des oxydes de fer dans les sols par les bactéries (Thamdrup et al., 2000 ; Cornell et al., 2003). La réduction de ces minéraux dépend du nombre de sites réactifs disponibles à la surface du minéral, c'est-à-dire des surface-OH réactives dans le cas des hydroxydes de fer (Roben, 2003). Le Fer (III) est utilisé par les bactéries comme accepteur d'électrons afin d'obtenir de l'énergie. Ceci influence la géochimie de nombreux environnements (Lovley, 1997, Thamdrup, 2000). Selon les conditions physico-chimiques du milieu, le mode d'action de



réduction des oxydes de fer peut être différent. En milieu acide, la dissolution du fer ferrique peut se réaliser sans contact des bactéries. (Bridge et al., 2000).

Dans des conditions de neutralité, le fer ferrique est souvent l'accepteur d'électrons dominant bien qu'il soit peu soluble. Différentes stratégies microbiennes (Figure 20) sont proposées pour expliquer la réduction du Fe(III) (Hernandez et al., 2001 ; Lovley et al., 2004):

- Le contact physique entre la surface des bactéries et la surface du minéral permet de libérer directement les électrons.
- Des chélateurs du fer augmentent la solubilité du Fe(III) et favorisent la réduction du Fe(III).
- Des composés « transporteurs d'électrons » transfèrent les électrons de la cellule au Fe(III), sans nécessité de contact physique.



**Figure 20: Illustration schématique des différentes stratégies de transfert d'électrons au fer ferrique (Kappler, 2005)**

Plusieurs espèces microbiennes ferri-réductrices ont la capacité d'oxyder des composés aromatiques tels que le benzène, le toluène, le phénol, que l'on retrouve dans la matière organique des argilites et dans les zones contaminées (Lovley et al., 1991 ; Jahn et al., 2005). Ces espèces peuvent aussi oxyder des composés plus simples et dont le suivi et le rendement sont plus exploitables en laboratoire (acides organiques).

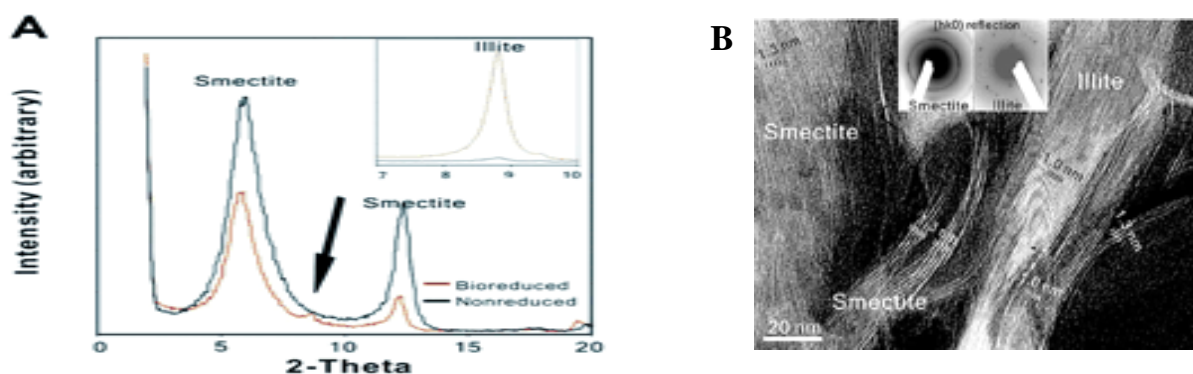
#### Cas des smectites.

Des études récentes sur les Fe-smectites ont également montré que les bactéries peuvent induire des modifications, comme par exemple la dissolution partielle des particules d'argile (Kostka et al., 1999 ; Dong et al., 2003a). On peut penser que la réduction du Fe (III) entraîne un déséquilibre de charges des smectites qui peut déclencher une dissolution des minéraux (Lantenois, 2005). Des substances métaboliques, tels que les acides organiques ou des chélateurs, peuvent dissoudre les minéraux avant la réduction du Fe (O'Reilly et al., 2006). Dans ce dernier cas, le Fe (III) serait libéré en solution avant la réduction microbienne. Ici, la production de certains chélateurs du fer (sidérophores) est un processus commun afin de rendre plus biodisponible le fer (Neilands et al., 1989 ; Gram et al., 1994 ; Hersman et al., 2000).

Il a été montré que la réduction du Fe (III) des smectites, en particulier dans la nontronite, a modifié radicalement les propriétés de l'argile. Kim et al., (2004) ont observé, par exemple que *Shewanella* sp déclenche la transformation de la smectite en illite. La réduction du Fe (III) dans les sites octaédriques des smectites conduit à une plus grande divergence des charges et à une nette augmentation des couches négatives libres. Cette charge favorise ensuite la réduction de l'épaisseur de l'espace interfoliaire hydraté et la fixation du cation ( $K^+$ ).

#### Modification physique des argiles par réduction microbienne du Fe(III)

Il est aujourd'hui admis qu'une réduction (anaérobie), chimique ou biologique, du Fe(III) dans la structure de la smectite provoque une augmentation de la charge de surface. Il a également été montré que de telles modifications diminuent la capacité d'hydratation de la smectite riche en fer (Kostka et al., 1996, 1999; Lee et al., 2006;). Dans une expérience réalisée en conditions anaérobies par Kim et al., (2004), il a même été décrit que l'activité de *Shewanella oneidensis* induisait la transformation de la smectite en illite par la fixation de potassium dans l'espace interfoliaire (Figure 21). Dans cette expérience, la réaction a lieu à 25°C en seulement 2 semaines. **Les auteurs suggèrent donc que l'interaction "smectite riche en fer – bactéries" peut jouer un rôle clé en tant qu'initiateur des réactions argilo-minérales dans les environnements anaérobies.**

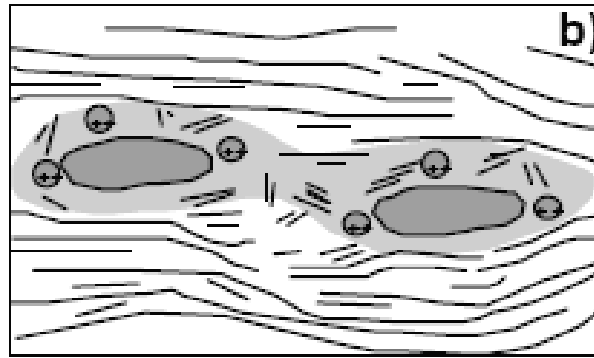


**Figure 21 : Observation au DRX (A) et au MET (B) sur l'illitisation d'une smectite ferrifère par *Shewanella oneidensis* (Kim, 2004).**

Des études sur le comportement d'hydratation des argiles en présence de bactéries montrent de nombreux changements texturaux.

En conditions de volume confiné (figure 22), une smectite sodique en présence de bactéries montre que l'augmentation de l'épaisseur totale des couches d'eau observée est due à l'augmentation de la porosité de l'échantillon induite par les bactéries.

D'autre part, la présence de bactéries ferri-réductrices au cours de l'hydratation en condition réductrice d'une nontronite ferrifère conduit à une réduction du Fe(III) structural du minéral argileux, ainsi que la diminution de l'ordre des couches d'eau au sein des feuillets avec une augmentation des hétérogénéités (Berger, 2008).



**Figure 22: Schéma de bactéries en milieu argileux compacté.**

Les bactéries présentes dans la porosité libèrent des substances organiques qui agrègent la proximité. Puis après la lyse cellulaire, il y a augmentation de l'hétérogénéité avec espace disponible pour le gonflement (Berger, 2008).

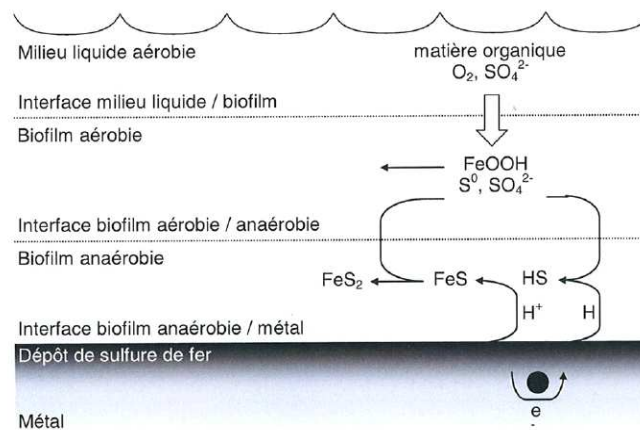
Donc, dans ces milieux confinés, les bactéries peuvent interagir avec les surfaces des argiles et entraîner une modification de l'arrangement des feuillets et donc une modification des propriétés d'échange des argiles.

### 3.3.3. Bio-corrosion des matériaux métalliques

La corrosion induite par les microorganismes ou bio-corrosion est un problème majeur qui peut représenter jusqu'à 10 % des coûts totaux de la corrosion (Iverson, 1986).

Les microorganismes n'interviennent, dans la plupart des cas, que de façon indirecte sur la bio-détérioration des matériaux. En effet, l'activité microbienne peut provoquer une modification des conditions au niveau de l'interface matériau/solution en produisant des substances corrosives ou des catalyseurs ainsi qu'en consommant des ions métalliques ou l'oxygène du milieu. Cette activité engendre un changement des conditions physico-chimiques à la surface du matériau et peut favoriser les réactions de corrosion (Kivisakk et al., 2010).

Quand un métal est immergé dans un milieu non-stérile, des microorganismes peuvent adhérer à la surface du métal et former un biofilm. Les biofilms sont, en général des structures complexes avec une épaisseur non uniforme. Ils sont constitués par les cellules des microorganismes morts ou vivants, par les substances polymériques extracellulaires (SPE), et par les produits organiques et inorganiques issus de leur activité biologique. Parmi ces substances, il peut y avoir des acides aminés, des acides organiques, des enzymes, des sucres, des alcools, etc. Certaines de ces substances peuvent être à l'origine des problèmes de corrosion (Heitz, 1996 ; Flemming et al. 1996). Le biofilm offre des avantages aux microbes qui le forment. Il offre une protection contre les substances toxiques dans le milieu et contre la déshydratation, il peut stocker les nutriments et facilite l'interaction symbiotique entre différentes espèces de microorganismes. L'activité des microorganismes dans le biofilm peut favoriser la corrosion du métal.

Cas des bactéries sulfato et thiosulfato-réductrices : Modèle de bio-corrosion

**Figure 23 : Mécanisme de bio-corrosion métallique (Lee, 1995)**

La production de sulfures dans le milieu, par l'activité des bactéries sulfato-réductrices, peut être très importante dans le processus de corrosion. Les sulfures produits par réduction des sulfates peuvent tout d'abord catalyser les réactions anodiques par sulfuration de l'anode. Puis, le produit de corrosion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) présent en solution est précipité sous forme de sulfure de fer ( $\text{FeS}$ ) (Figure 23). Ceci provoque un transfert d'électrons du fer métal vers le sulfure de fer formant une pile galvanique tout en accélérant la corrosion qu'elle soit généralisée ou perforante. Mais ceci n'explique pas les vitesses enregistrées. Les activités des bactéries sulfato et thiosulfato-réductrices, peuvent réguler localement le pH et conduire à une production ou une consommation d'acidité. Sur les zones anodiques, la précipitation du sulfure de fer produit de l'acidité, alors que le pH reste stable et neutre sur les zones cathodiques. Ces modifications du pH sont retrouvées localement à l'interface biofilm-métal. Le métabolisme bactérien induit donc un couplage galvanique anode/cathode par acidification différentielle (Campaingolle, 1996). De plus, le thiosulfate apparaît être l'accepteur d'électrons le plus performant pour les phénomènes de bio-corrosion (Crolet, 1998). Les vitesses de corrosion peuvent atteindre jusqu'à 1cm/an, alors qu'elles atteignent seulement 1mm/an pour les sulfates.

Cas des bactéries ferri-réductrices (IRB : Iron Reducing Bacteria)

Les processus de biocorrosion par des espèces IRB ont été moins étudiés que les bactéries sulfato-réductrices (Castaneda et Benetton, 2008; Rainha et Fonseca, 1997; Féron et al. 1997). Toutefois, la réduction bactérienne des composés d'ions ferriques insolubles en ion ferreux solubles a déjà été proposée pour faciliter la dissolution de la couche protectrice des produits de corrosion formés sur des surfaces des alliages de fer (Videla, 1996). Il a également été signalé que les espèces IRB sont impliquées dans la formation de biofilms qui favorisent la corrosion (Geesey, 1991). Néanmoins, le rôle des IRB en biocorrosion est encore sujet à débat : en effet des études suggèrent qu'elles peuvent, en formant un biofilm, constituer une protection pour l'acier au carbone (Dubiel et al. 2002; Lee et Newman, 2003; Herrera et Videla, 2009).

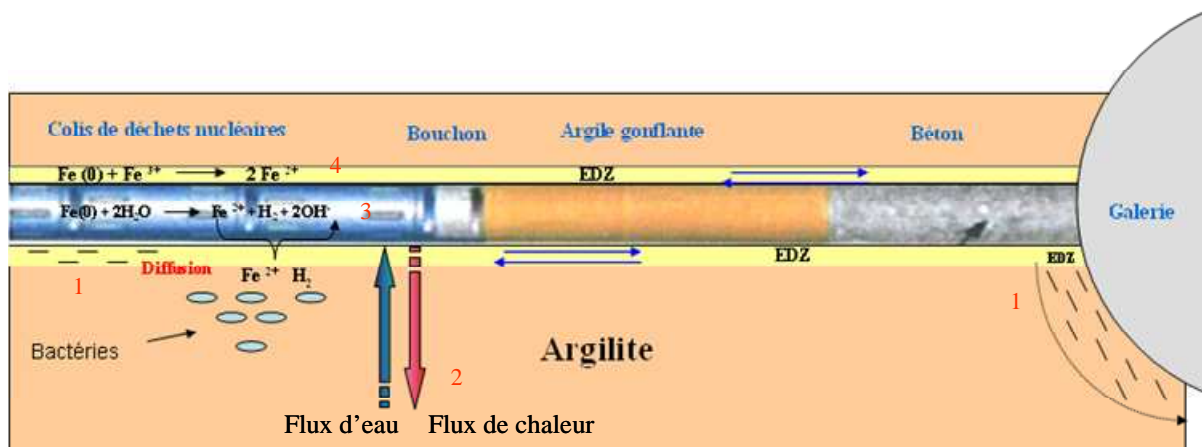
Dans tous les cas, les processus de bio-corrosion sont retrouvés dans différents milieux aquatiques (eaux salines, eaux douces). Dernièrement, certains auteurs ont mis en évidence la présence de bactéries (les espèces IRB en forte concentration et des espèces SRB dans une moindre mesure) qui ont engendrés des processus de corrosion dans les pipelines (Elshawesh et al., 2008). D'autre part des auteurs (Rajasekar et al., 2007)

montrent que les espèces présentes dans les pipelines ont la capacité de dégrader les composés aliphatiques et aromatiques du pétrole, tout en ayant une capacité oxydante, donc corrosive, des oxydes de fer et de manganèse

## 4. ORGANISATION DE L'ETUDE

### 4.1. SYSTEMES DE STOCKAGE : ENVIRONNEMENT PROPICE A UNE ACTIVITE BACTERIENNE ?

L'environnement du stockage va être modifié au contact des colis de déchets radioactifs. Ces modifications vont entraîner des changements physiques et chimiques du milieu qui influenceront positivement ou négativement les communautés bactériennes endogènes ou exogènes (Figure 24).



**Figure 24 : Schéma d'une alvéole de stockage et des phénomènes pouvant augmenter l'activité bactérienne.**

On peut évoquer différents phénomènes pouvant se produire dans l'alvéole et dans le champ proche du stockage :

- 1. Désaturation du milieu par excavation
- 2. Gradient thermique
- 3. Corrosion métallique en milieu saturé
- 4. Réactivité à l'interface fer/argile

Malgré les conditions difficiles d'un environnement de stockage profond, nous venons de voir qu'une activité bactérienne pouvait être pressentie au cours de l'évolution du stockage. En effet, ni la radioactivité, ni la température et ni les faibles porosités ne peuvent être des paramètres capables d'inhiber totalement le développement bactérien. Un autre paramètre très important pour le développement de l'activité microbienne dans le stockage est la disponibilité des ressources nutritives et énergétiques. En effet, les argilites sont appauvries (environ 1%) en substrat carboné tel que la matière organique pouvant constituer une source énergétique et nutritive efficace pour la croissance bactérienne. Cependant il a été décrit précédemment que la genèse du stockage entraînerait la formation de nouveaux produits de corrosion tel que de l'H<sub>2</sub> et des oxydes de fer qui constituent des composés énergétiques. C'est le cas aussi d'autres éléments provenant de l'altération des colis et de la barrière argileuse et qui peuvent donc être potentiellement des substrats pour les activités

bactériennes. D'autre part, l'augmentation de la température peut favoriser la disponibilité en substrat bactérien et augmenter les cinétiques d'altération ou microbiologiques.

Ainsi l'environnement et les produits de dégradation de composants du stockage peuvent être considérés comme une source énergétique proprement dite pour favoriser les réactions microbiennes.

**Un des objectifs de cette étude est de déterminer et de quantifier dans quelle mesure cette nouvelle source énergétique issue du stockage pourrait favoriser le développement microbien et quel impact les activités bactériennes pourraient engendrer sur l'évolution des matériaux.**

#### **4.2. CHOIX D'UN MODELE BACTERIEN**

L'estimation de la diversité microbiologique (autochtone ou allochtone) pouvant se retrouver dans ces environnements modifiés est très difficile à obtenir. Il est en effet impossible de prévenir les perturbations d'ordre anthropiques, dont l'introduction de souches exogènes, dans un milieu argileux présentant un volume d'exploitation de plusieurs kilomètres cubes. Il est donc plus facile d'admettre, la présence d'une diversité bactérienne importante au sein du stockage, quelle que soit son origine.

Ainsi, partant de l'idée qu'il est bien trop réducteur de prédire les espèces bactériennes présentes lors du stockage à partir des seules espèces indigènes, le choix d'un modèle microbien global est indispensable. Cette population microbienne sera décrite par sa capacité à se développer dans cet environnement argileux profond et pour sa faculté à altérer des matériaux. Ce choix est dépendant des conditions géochimiques prévalant dans ces environnements anaérobies, notamment en termes d'accepteur et de donneur d'électrons. Dans ces conditions, le choix d'un modèle bactérien ferri-réducteur s'impose comme étant le plus adapté pour décrire la dynamique des conditions du stockage (anoxie, quantité importante en fer, présence de H<sub>2</sub>, milieu argileux pouvant contenir du Fe(III) structural). En effet, ces microorganismes ferri-réducteurs sont toujours retrouvés dans les environnements riches en fer (Vargas et al., 1998 ; Gold, 1992). Le Fe(III) est identifié comme étant un des tous premiers accepteurs d'électrons pour la respiration microbienne anaérobie. De plus, l'activité ferri-réductrice est un des plus importants processus réactionnels dans les sédiments profonds où la présence de phases ferrifères de type smectite et d'oxydes est identifiée (Dong et al., 2000).

**Il s'agira de déterminer dans cette étude si les capacités de réduction du Fe(III) structural par les micro-organismes peuvent avoir des conséquences importantes dans la pérennité des propriétés de la barrière argileuse en termes de confinement, de rétention des radionucléides, ou dans leurs implications dans les processus de bio-corrosion comme dans le contrôle de l'évolution géochimique de l'environnement du stockage.**

#### **4.3. QUESTIONS POSEES DANS CETTE ETUDE**

D'un point de vue plus fondamental, cette étude s'efforcera de répondre à différentes questions actuellement en suspens et pourtant essentielles pour caractériser et définir les mécanismes réactionnels qui surviennent lors des interactions bactéries/minéraux ferrifères dans le cas d'un stockage en milieu géologique profond:

a) Sur les matériaux argileux

- Quelle est l'activité bactérienne ferri-réductrice en milieu argileux profond, notamment en termes de disponibilité des ressources en nutriments et en énergie ?
- Quelle est la réactivité associée à l'interaction bactérie/argilite et ses conséquences ?
- Quelles sont les phases réactives dans les argilites qui sont affectées par cette réactivité microbienne ?
- Quelles sont les paramètres qui contrôlent la réduction du Fe(III) structural des smectites et les transformations minéralogiques associées ?
- Quelles sont les conséquences de cette activité ferri-réductrice sur les propriétés d'une barrière argileuse et ses limites en terme d'accessibilité au Fe(III) en milieu poreux ?

b) Sur les matériaux métalliques

- Quelles sont les conséquences de cette activité sur les processus de corrosion des matériaux métalliques ?
- Quelle peut être l'influence de cette activité microbienne sur la durabilité des éléments métalliques dans le stockage ?

c) Sur la réactivité microbienne globale

- Quelle est l'activité bactérienne ferri-réductrice en condition de stockage (réactivité fer/argile) et les limites fonctionnelles associées ?

#### **4.4. LA DEMARCHE DE L'ETUDE**

Pour répondre à ces questions et décrire globalement la dynamique de l'activité géomicrobiologique au sein d'un stockage géologique, une approche très exploratoire a été entreprise, avec une composante expérimentale forte. Après une introduction générale, suivie d'une étude bibliographique du système réactionnel dans son ensemble, les travaux sont présentés selon trois parties principales :

- **Partie I : Développement bactérien ferriréducteur en milieu géologique profond :**

Le but de cette première partie est de caractériser les conditions géochimiques des environnements argileux profonds du point de vue de leur capacité à permettre le développement des espèces microbiennes. Pour cela, un bilan des espèces chimiques nutritives et énergétiques présentes dans le système pour ce développement bactérien a été dressé. Il s'est agit notamment de déterminer les phases ferrifères réactives et de décrire la dynamique initiale des échanges au sein du stockage. (*Chapitre 3*)

- **Partie II : (Bio)-disponibilité et impact sur les matériaux ferrifères du stockage :**

Cette seconde partie a pour objectif de caractériser la disponibilité du Fe(III) structural au sein des phases ferrifères (argiles et oxydes) pour les activités bactériennes ferriréductrices. **Les résultats sont décrits sous la forme de cinq articles acceptés ou en cours de soumission.**

Dans le Chapitre 4, la (bio)-disponibilité du fer a été étudiée dans les matériaux argileux. Ce chapitre est structuré en trois sous parties. Tout d'abord, la disponibilité du fer est décrite au sein de structures argileuses complexes, cas de l'argilite de Tournemire, afin d'être représentative des milieux argileux profonds. Ensuite, la réactivité propre des minéraux argileux constitutifs des argilites (smectite, illite et kaolinite) a été décrite afin de déterminer et de hiérarchiser les phases argileuses les plus réactives dans le cas d'une réduction bactérienne. Enfin, la dernière étape a été d'identifier les paramètres contrôlant l'altération de ces minéraux, notamment en termes de dissolution et de transformation des smectites.

L'influence des activités bactériennes ferriréductrices sur les processus de biocorrosion du fer métallique est présentée au Chapitre 5. La disponibilité du Fe(III) des produits de corrosion (magnétite et hématite) a été investiguée dans un contexte de corrosion active.

Dans les deux chapitres précédents, la réactivité des matériaux ferrifères a été décrite à partir de milieu dispersé et sur des phases purifiées. Or dans la réalité, cette réactivité intervient dans un milieu poreux. Ainsi, dans le Chapitre 6, nous avons déterminé quels pourraient être les paramètres qui vont influencer sur la biodisponibilité du fer dans un milieu poreux. Pour cela un milieu poreux simplifié incorporant des smectites ferrifères a été synthétisé et l'impact de l'activité bactérienne ferri-réductrice a été quantifié.

Dans tous les cas, les processus réactionnels majeurs seront décrits pour chaque matériau (métallique et argileux) impliqué dans la pérennité du confinement du stockage.

- **Partie III : Capacité de développement des bactéries ferri-réductrices en condition de stockage géologique :**

L'objectif de cette dernière partie est de déterminer les paramètres qui pourront contrôler le développement d'une activité bactérienne ferriréductrice au sein d'un stockage. Ceux-ci sont étudiés au travers de couplages réactionnels au sein d'une réactivité globale fer/argiles. Le but étant de définir les limites de l'activité microbienne et ses conséquences dans un système couplé. (Chapitre 7).

Finalement, l'ensemble de ces travaux sera analysé et intégré dans une discussion générale avant que cette étude exploratoire ne puisse être conclue dans une dernière partie qui ouvrira les perspectives en termes de prédiction du comportement de l'interface bactérie/minéral et d'ingénierie géomicrobiologique.





## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

---

### 1. MATERIAUX

#### 1.1. LES PHASES ARGILEUSES

##### 1.1.1. Argilite de Tournemire

###### Site de Tournemire

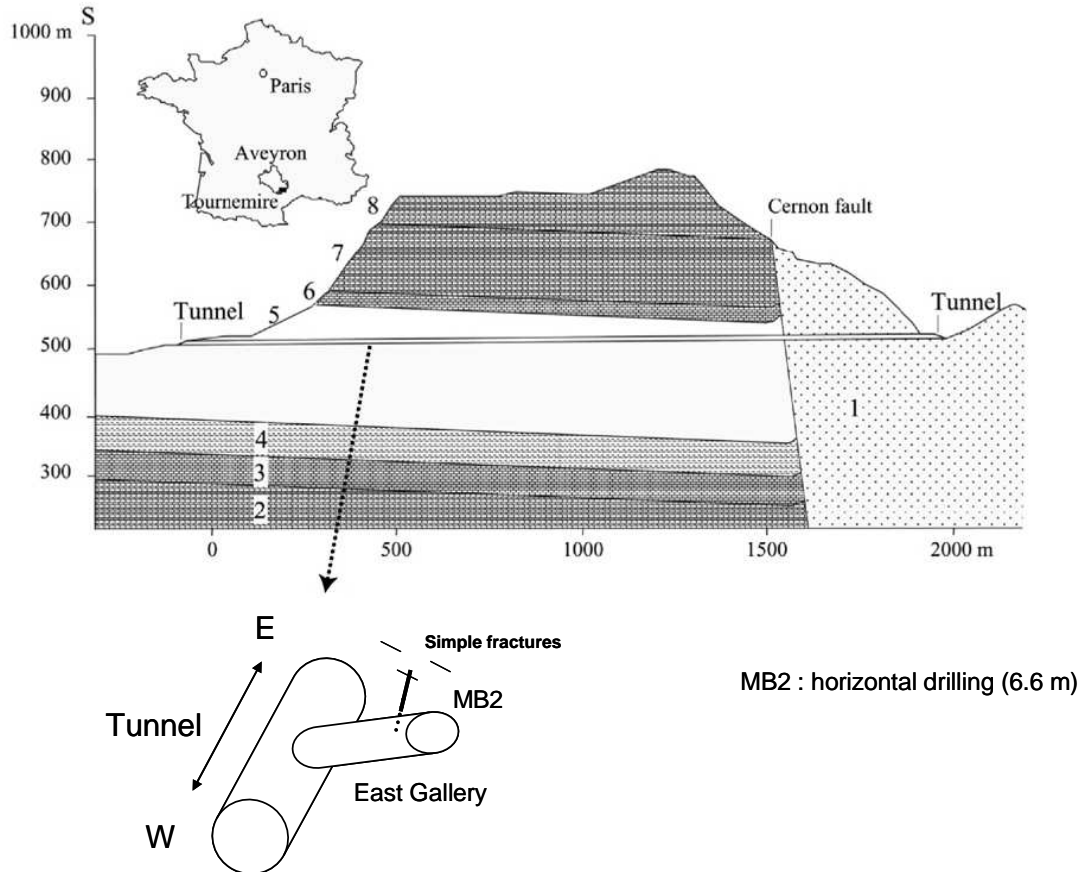


**Figure 25 : Photo du site de Tournemire et localisation de l'ancien tunnel ferroviaire traversant l'argilite du Toarcien. (Source IRSN).**

###### Contexte géologique

Le site de Tournemire (Figure 25) est situé dans un bassin marin mésozoïque à la frontière sud du Massif central français et correspond à une structure sub-horizontale monoclinale faillée traversée par la faille de Cernon (80 km de longueur). C'est une faille inverse d'orientation E-W (Boisson, 1996). Une formation argileuse massive est intercalée entre deux aquifères calcaires : l'aquifère de l'Aalénien dans la partie supérieure (Jurassique moyen) et l'aquifère régional du Carixien dans la partie inférieure. La couche argileuse est constituée d'argilite du Toarcien (200m d'épaisseur) et de marnes subhorizontales indurées du Domérien (50m d'épaisseur) de formations jurassiques (Cabrera et al., 2001; Patriarche et al., 2004). L'argilite de Tournemire affiche une texture typique anisotrope induite par la diagénèse et l'alternance stratigraphique de niveaux carbonatés massifs et de couches détritiques riches en argile (Charpentier et al., 2001).

Le site de Tournemire a été choisi comme laboratoire d'expérimentation dans le milieu argileux par l'IRSN, pour la facilité d'accès que procure un ancien tunnel ferroviaire de près d'un siècle, de 1885 m de long traversant une épaisse couche argileuse de plus de 200 m d'épaisseur (Figure 26). Ce tunnel donne accès directement à la formation du Toarcien, permettant ainsi la réalisation d'expérimentations in situ ou de forages par le prélèvement d'échantillons au sein de la couche argileuse.



**Figure 26 : Coupe géologique du tunnel de Tournemire avec en renfort une carte montrant l'emplacement de Tournemire (d'après Boisson, 1996) et la localisation des échantillons étudiés. Les échantillons d'argiles ont été prélevés dans des conditions sèches avec du gaz argon comprimé. Le forage MB2 est représenté par des lignes noires dans le croquis. Les zones géologiques sont décrites ci -contre : 1: Hettangian, calcaire et dolomite; 2: Sinemurian, calcaire et dolomite, 3: Carixian, calcaire; 4: Domerian, marls; 5: Toarcian, schistes et marnes; 6: Aalenian, Calcaire; 7: Bajocian, calcaire et dolomite; 8: Bathonian, calcaire et dolomite**

Echantillonnage de l'argilite de Tournemire

Le prélèvement de la roche argileuse à été réalisé lors d'un forage (nommé MB2 de 6,6 m de long réalisé à 1 m de hauteur du sol du tunnel) horizontal avec de l'argon comprimé, perpendiculaire à la galerie Est en Octobre 2007. La carotte d'argilite récupérée traverse une alternance de zones ayant des caractéristiques bien précises : une zone argileuse fracturée (de 0 jusqu'à 1m) classiquement nommée EDZ (Excavation Damaged Zone) qui est une conséquence de la perturbation causée par l'excavation de la galerie. Puis une zone saine de 4,7m à 5, 5m et enfin une zone traversant une fracture tectonique humide. Trois

échantillons de base (une carotte de 30 cm de longueur et 10,1 cm de diamètre) de l'argilite de Tournemire des zones distinctes ont été prélevés. Les échantillons ont été introduits dans des sacs aluminisés et conservés à 4°C de manière à minimiser autant que possible l'oxydation des minéraux argileux et de la matière organique. Des conditions d'anaérobiose et de stérilité stricte ont été appliquées au cours du forage ainsi que lors de toutes les étapes des études en laboratoire. Un sous-carottage dans une chambre anaérobie (90% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>) a permis d'obtenir des échantillons d'étude qui ont été broyés dans un mortier en agate. Une poudre homogène d'argilite est tamisée à 2µm et conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité dans des bacs de silica-gel.

Cette fraction argileuse utilisée pour les expériences dans cette thèse, a été caractérisée de manière à connaître la surface spécifique des grains d'argilite par une analyse BET à l'azote.

### 1.1.2. Argiles purifiées

Cinq types d'argiles ferrifères ont été utilisés dans cette étude afin d'étudier la réactivité de ces phases vis-à-vis des activités bactériennes ferriréductrices.

**Beidellite ferrifère de Ward's** : Cette smectite riche en Fe<sup>3+</sup> structural est dénommée ainsi car commercialisée par Ward's. Le lot utilisé dans la présente étude est référencé 49 F 5108.

**Illite du Puy PyOr2**: Ce lot correspond à un échantillonnage du BRGM des horizons inférieurs du gisement du bassin Oligocène du Velay situé à proximité du Puy. Elle est particulièrement riche en Fe<sup>3+</sup> structural.

**Kaolinite BT** : Elle est extraite dans la carrière de Fumel à 50 km à l'ouest de Cahors (Lot et Garonne, France). Elle est exploitée par la société CTE Libos en vue de son utilisation dans la fabrication de matériaux réfractaires. Elle est contient du Fe<sup>3+</sup> structural.

**Montmorillonite MX80** : C'est un matériau argileux commercialisé dont les smectites sont sodi-calciques et de type Wyoming. Cette bentonite est pressentie comme matériaux argileux de la barrière ouvragée dans les alvéoles du stockage géologique des déchets radioactifs.

**Nontronite Nau2** : Elle provient de la collection de minerais d'argiles (université de Purdue, U.S). Elle est très riche en Fe<sup>3+</sup> structural.

L'objectif est de décrire l'évolution des phases argileuses seules et isolées des minéraux accessoires pouvant perturber la lecture de la réactivité physico-chimique. Pour cela une purification est indispensable. Une phase d'échange ionique a été réalisée pour les phases gonflantes de types smectites (Beidellite, Montmorillonite et Nontronite) afin d'homogénéiser la réponse chimique des argiles vis-à-vis de l'altération.

#### 1.1.2.1. Protocole de purification des phases argileuses échangées au sodium ou au magnésium

L'objectif de cette phase est triple : La décarbonatation de matériaux argileux (roche argileuse, bentonite), l'extraction de la fraction < 2µm et l'échange au sodium ou au magnésium pour les phases argileuses de types smectites.

#### Cas des phases argileuses : Beidellite – Illite – Kaolinite – Montmorillonite

##### Décarbonatation :

Le but de cette opération est d'éliminer les minéraux carbonatés présents dans la roche.

On introduit dans un bêcher de 1 L :

100 g de matériau réduit en poudre

600 mL d'eau déionisée

On rajoute ensuite progressivement du HCl, à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ . On veille à ne pas descendre en dessous de pH 4 afin d'éviter d'altérer les minéraux argileux

On maintient en agitation en contrôlant le pH pendant 10 heures

On complète ensuite à 1L avec de l'eau déionisée

On centrifuge ensuite à 2000 tr/min pendant 5 min.

On élimine le surnageant après avoir vérifié sa limpidité, sinon on réitère autant de fois que nécessaire.

Dispersion et séparation granulométrique

Le but de cette étape est d'extraire la fraction argileuse  $< 2\mu\text{m}$  des fractions granulométriques plus importantes ainsi que d'échanger la fraction argileuse au sodium ou au magnésium (beidellite ferrique de Ward's) d'après Crédoz (2009).

On récupère le culot de centrifugation et on le remet en suspension avec de l'eau déionisée dans le même bêcher de 1L que précédemment. On peut utiliser les ultrasons pour disperser les agrégats par une séquence de 30 secondes au maximum afin de ne pas déstabiliser la structure des phases argileuses

On ajoute NaOH, à 0,1M ou ( $\text{MgOH}_2$ ) à 0,1M pour amener le pH à 8-9 et saturer la solution en cations sodiques ou magnésiens et ainsi favoriser l'échange d'ions.

On agite 10 heures pour avoir une suspension homogène.

On verse la solution dans des flacons de centrifugation de 1L jusqu'au trait de graduation = 600 mL.

On centrifuge 1 min 55s à 750 tr/min.

On récupère ensuite le surnageant entre les repères 600 et 400 mL.

Caractéristiques :

Axe-surface de la suspension (repère 600 mL) = 9,3 cm

Axe-coupure (repère empirique 400 mL) = 12,1 cm

Durée = 1 min 55 sec à 750 trs/min

Coupure granulométrique :  $2 \mu\text{m}$ .

Ces opérations de remise en suspension et de centrifugation sont réitérées afin de récupérer le maximum de suspension argileuse.

La suspension argileuse ( $< 2 \mu\text{m}$ ) est ensuite rincée à l'eau déionisée deux fois.

Les suspensions argileuses récupérées sont ensuite déposées dans des coupelles afin d'être séchées à  $25^\circ\text{C}$  par simple évaporation dans une étuve ventilée, puis broyées et conservées dans des flacons « NALGENE » en polyéthylène haute densité.

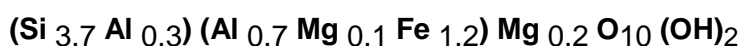
Cas de la phase argileuse : Nontronite Nau2

La préparation des nontronites Nau2 a été réalisée par le LEM (Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy Université) comme décrit par Michot et al (2006).

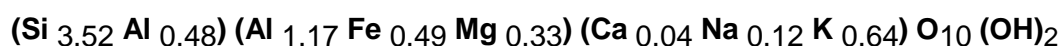
Les échantillons de nontronites (NAu2) utilisés dans cette étude, proviennent de la collection de minerais d'argiles (l'université de Purdue, U.S). La fraction argileuse est échangée trois fois dans une solution 1M de NaCl et lavée par dialyse en utilisant une eau ultra-pure (Milli-Q), jusqu'à obtenir une conductivité de la solution < 5µS. une telle procédure permet d'enlever efficacement les résidus de minéraux solubles, (c.-à-d. la calcite) qui ont pu être dissous dans les échantillons lavés. Les suspensions ont ensuite été placées dans des cônes Imhoff® pendant 24h pour enlever par précipitation les impuretés minéralogiques majeures (principalement des oxydes de fer, quartz et des feldspaths). La pureté minéralogique (>99.9%) des particules traitées a été vérifiée par Diffraction des Rayons X (XRD) et spectrométrie infrarouge. La sélection de la taille des particules colloïdales a été réalisée par centrifugations successives de 7000 à 17.000g. La taille sélectionnée dans cette étude est celle qui a subi une centrifugation à 7000g. Cette procédure a permis de sélectionner des tailles de particules colloïdales de nontronite. Sur la base de plus de 150 analyses d'images au microscope électronique à Transmission (MET, Philips®), Les caractéristiques de la taille des particules de nontronite ont pu être déterminées avec précision : longueur : 705 nm ; largeur : 138nm ; épaisseur : 1.05nm, (Grybos et al., 2010).

1.1.2.2. Formule structurale des argiles purifiées

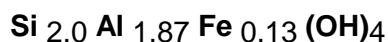
La **beidellite de Ward's** : Elle a été purifiée et échangée au magnésium et a pour formule structurale :



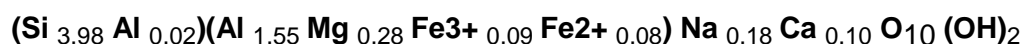
L'**illite du Puy PyOr2** : L'analyse en MET-EDS des illites de l'**illite PyOr2** révèle qu'elles ont pour formule structurale :



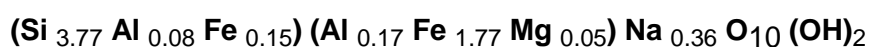
La **kaolinite BT** : Dans cette étude, on l'utilise purifiée de ses minéraux accessoires avec pour formule structurale :



La **bentonite MX-80** : Dans cette étude, elle a été purifiée et échangée au sodium et a pour formule structurale :



La **Nontronite Nau2** : Dans cette étude, elle a été purifiée et échangée au sodium et a pour formule structurale (Michot et al., 2006) :



1.1.2.3. *Analyse texturale des matériaux argileux après purification*

Echantillons	Surface spécifique (BET) m <sup>2</sup> /g
Beidellite	55
Illite	122
Kaolinite	32
MX 80	23
Nau2	80
Tournemire	63

**Tableau 2 : Surface spécifique des matériaux argileux mesurée par BET à l'azote (Cerege, centre de recherche et d'enseignement en géosciences de l'environnement).**

## 1.2. LE METAL ET LES OXYDES

### 1.2.1. Le fer métal

C'est un réactif chimique de la marque Merck. Sa faible granulométrie, < 10 µm, est utilisée afin d'activer les réactions. Il est pur à 99.9778 % en pourcentage massique. Les éléments N, Cl, S, Pb, Cu, Mn, Zn et As sont présents en traces.

### 1.2.2. L'hématite

L'oxyde provient de la marque Rectapur Prolabo : Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 99%, Ref : 24193.188.

### 1.2.3. La magnétite

L'oxyde provient de la marque Aldrich : Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 98% <5µm, Cat N°: 31,006-9.

## 1.3. LE MILIEU REACTIONNEL : DE L'EAU INTERSTITIELLE DU SITE A UN MILIEU REPRESENTATIF EN LABORATOIRE

Le choix d'un milieu réactionnel à la fois représentatif du site et non limitant en besoin nutritif pour le développement bactérien est crucial pour le système d'étude « interaction bactéries – minéraux ferrifères ».

Pour cela, un milieu synthétique appelé MClay, a été préparé en se basant :

- Sur la composition des milieux de culture bactériens minimum dans la littérature (milieu M1 ; Kostka et Nealson, 1998) en tenant compte de la composition en éléments nutritifs essentiels: carbone, azote, phosphore, soufre ; des éléments à l'état de traces ainsi que des acides aminés et des vitamines comme agents de croissance ou co-facteur du métabolisme.

- Sur la composition chimique de l'eau interstitielle de sites argileux (Tournemire ou du Callovo-Oxfordien) afin de respecter les ordres de grandeur (en mmol) qui y sont retrouvés.

*Un tableau récapitulatif des expériences est décrit ci-dessous (Tableau 3).*

Remarque :

L'absence de fer aqueux ainsi que de Silicium et Aluminium dans le milieu MClay, est justifiée afin de caractériser au mieux l'altération des minéraux argileux ferrifères.

Le pH initial du milieu à 7 est contrôlé par l'ajout d'un tampon organique : l'HEPES.

L'ajout d'un donneur d'électrons organique : le lactate de sodium entraîne une augmentation de la concentration en  $\text{Na}^+$  ce qui permet de se rapprocher de la valeur initiale en Na dans les eaux interstitielles de site. Cependant la concentration en  $\text{Cl}^-$  reste faible comparée à sa concentration dans le milieu naturel profond. Cela n'a toutefois aucune conséquence sur les activités bactériennes et les mécanismes induits sauf sur la corrosion (Abd El Wanees et al., 2008 ; Zhou et al., 2007) ou les chlorures sont connus comme des agents de corrosion. Cependant, le but de notre étude étant de caractériser l'influence bactérienne sur les processus d'altération des phases argileuses ou des produits de corrosion, l'absence volontaire d'une concentration en chlorure comparable à celle en milieu profond est négligeable dans notre étude et est aussi plus pratique pour la fabrication du milieu MClay.

La présence d'acides aminés en faible concentration ou d'éléments à l'état de traces est tout à fait justifiée dans les milieux naturels bien qu'ils ne soient pas mesurés dans les eaux de sites référencées.



Composition chimique eaux (mmol.L <sup>-1</sup> )	Callovo-Oxfordien Vinsot et al, 2008	Tournemire Beaucaire et al, 2009	Expérience abiotique minérale	Expérience abiotique organique	Expérience biotique H2	Expérience biotique organique
pH	7.20	8.20	7.00	7.00	7.00	7.00
Eh	-200.00					
Na+	45 - 55	9.50	2.00	12.00	2.00	12.00
Cl-	28 - 47	6.15	0.97	0.97	0.97	0.97
SO42-	11.1 - 19	0.01 - 20	10.10	10.10	10.10	10.10
Ca2+	6.5 - 8.1	0.09	0.49	0.49	0.49	0.49
Mg2+	5 - 6.9	0.38	1.01	1.01	1.01	1.01
HCO3-		4.50	2.00	2.00	2.00	2.00
K+	0.65 - 1.1	0.22	0.99	0.99	0.99	0.99
TIC	4.2-4.5	-	-	-	-	-
TOC mg.L-1 ou lactate	~10	~5	-	10.00	-	10.00
Si	0.12 - 0,16	0.10	-	-	-	-
Fe2+	0.093	2.00E-07	-	-	-	-
Fe3+	6.00E-09	-	-	-	-	-
PO42-	6.50E-03	0.0033	0.6	0.6	0.6	0.6
NH4+	2.11E-04	0.2	9	9	9	9
Zn2+			1.00E-06	1.00E-06	1.00E-06	1.00E-06
Cu2+			2.00E-07	2.00E-07	2.00E-07	2.00E-07
Mn2+			1.26E-06	1.26E-06	1.26E-06	1.26E-06
Se4+			1.50E-06	1.50E-06	1.50E-06	1.50E-06
Mo4+			3.80E-06	3.80E-06	3.80E-06	3.80E-06
Co			5.00E-06	5.00E-06	5.00E-06	5.00E-06
Bo			5.60E-05	5.60E-05	5.60E-05	5.60E-05
L-arginine			1.15E-04	1.15E-04	1.15E-04	1.15E-04
DL-serine			1.90E-04	1.90E-04	1.90E-04	1.90E-04
L-glutamine			1.18E-04	1.18E-04	1.18E-04	1.18E-04
Acide nicotinique			1.00E-04	1.00E-04	1.00E-04	1.00E-04
Thiamine-HCl			5.00E-06	5.00E-06	5.00E-06	5.00E-06
Biotine			1.00E-06	1.00E-06	1.00E-06	1.00E-06
Tampon HEPES			-	1,68E+01	1,68E+01	1,68E+01
Culot bactérien			-	-	x	x

**Tableau 3 : Composition chimique du milieu synthétique MClay utilisé lors des expériences bactéries – minéraux ferrifères. Comparaison avec les milieux naturels.**

#### 1.4. LES BACTERIES

Afin d'étudier l'activité des bactéries vis-à-vis du fer qu'il soit dans la structure des matériaux ou soluble, deux modèles bactériens ont été choisis :

- Le modèle ferri-réducteur pour caractériser la réaction de réduction du Fe(III) structural des matériaux. Pour cela trois types de bactéries ferriréductrices (IRB) ont été sélectionnés comme modèle pour les expériences bactéries – minéral dans ce mémoire.
- Le modèle biosenseur, qui utilise des bactéries transformées génétiquement, est utilisé afin de pouvoir mesurer spécifiquement le besoin en fer comme nutriment pour le développement des bactéries, à savoir les effets de carence et les effets de toxicité de leur métabolisme.

##### 1.4.1. Les bactéries ferriréductrices

Deux bactéries dites « mésophiles » : Activité entre 25 à 50°C

La bactérie *Shewanella oneidensis* strain MR1 (CIP\* 106686), provient d'un isolement bactérien des sédiments anoxiques du lac Oneida, NY (Myers et Nealson, 1988), et a fait l'objet de plusieurs études génétiques et phylogéniques (Saffarini et al., 1994).

*Shewanella oneidensis* est une bactérie Gram négatif à respiration obligatoire pour son métabolisme, elle ne peut pas réaliser la fermentation (Scott et Nealson, 1994). Les espèces du genre *Shewanella* sont des bactéries anaérobies facultatives, capables de réduire une importante variété de composés comme accepteur d'électrons terminal, incluant l'O<sub>2</sub>, les nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), les nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), les oxydes de Fe(III) et de manganèse. Les conditions optimales de croissance de température et de pH de *S. oneidensis* sont décrites ci-dessous (Figure 27).

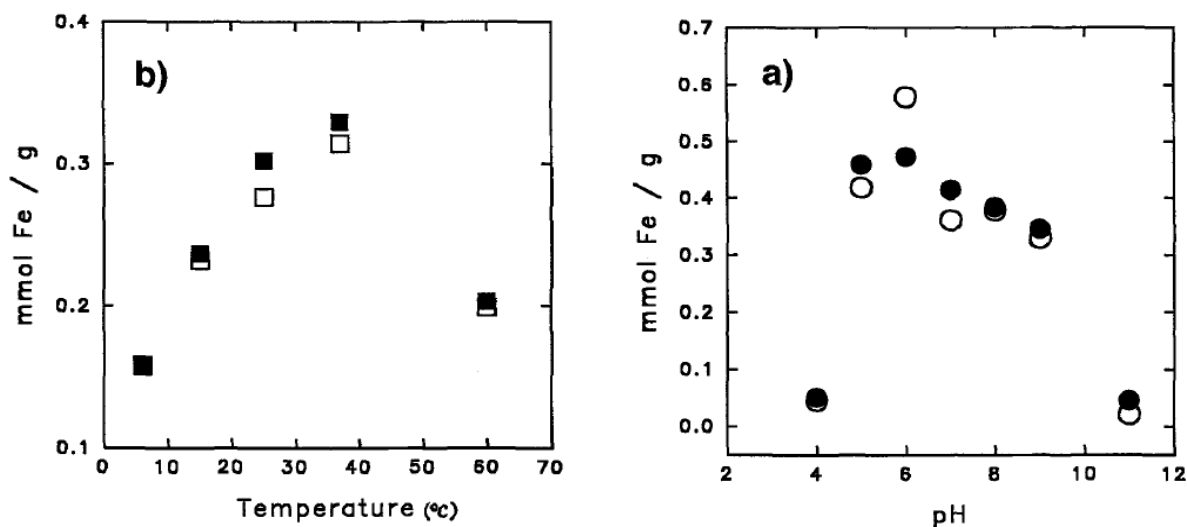


Figure 27 : Optimum de bio-réduction/dissolution du Fe de la smectite en fonction du pH et de la température pour la bactérie *Shewanella oneidensis* (Kotska et al., 1996).

*Shewanella oneidensis* MR1 a la capacité d'utiliser des substrats organiques comme donneur d'électrons ainsi que d'utiliser l'H<sub>2</sub> moléculaire. Elle possède en effet des hydrogénases au niveau de sa membrane externe, permettant de fixer et d'oxyder l'H<sub>2</sub> afin de récupérer les électrons de la réaction. Ce métabolisme hydrogénotrophe sera notamment utilisé dans les processus de biocorrosion dans cette étude.

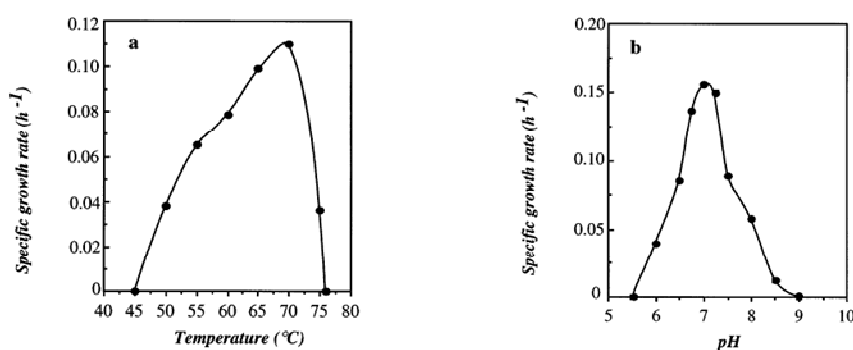
La bactérie *Clostridium aurantibutyricum* provient d'un isolement de boues résiduaires polluées (Végliá, 1996) et fut utilisée dans un procédé de dépollution de sols et de déchets contenant des hydroxydes de fer et de métaux lourds (Végliá et al., 1996). C'est une bactérie strictement fermentaire possédant un métabolisme très efficace (Tableau 4) qui peut produire, lors de l'oxydation de molécules organiques riches énergétiquement (glucose), des acides organiques (acide butyrique et acétique) et du gaz (H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>). Elle est aussi connue pour avoir une action importante comme agent de réduction du Fe(III) dans les sols (Stemmler et al., 2004), et notamment sur la réduction des goethites (Dominik et al., 2002).

Substrat	Acides organiques produits (mol/mol de substrat)		Fe solubilisé (g/mol de substrat)	CO <sub>2</sub> produit (mol/mol de substrat)
	Acétique	Butyrique		
Glucose	0.222	0.200	>5,090	2,718

Tableau 4 : Produits du métabolisme de la souche *Clostridium aurantibutyricum* (Végliá, 1996)

Une bactérie dite « thermophile » : Activité entre 50 à 80°C

La bactérie *Thermotoga subterranea* strain SL1T provient d'un isolement d'un réservoir continental de pétrole dans le bassin Est de Paris, France (Jeanthon et al., 1995) et fait partie de la collection de la station biologique de Roscoff. C'est une bactérie thermophile capable d'utiliser le Fe(III) pour sa respiration (Slobodkin et al., 1999). L'ordre des thermotogales est strictement anaérobie, thermophile et chimiohétérotrophique. Leur dénomination provient de leur caractéristique morphologique : la présence d'une gaine externe appelée « toga ». Sa température optimale de croissance est de 70°C et son pH optimum est compris entre 6,5 et 7,5 (Figure 28).



**Figure 28 : Evolution du taux de croissance moyen de *T. subterranea* en fonction de la température et du pH (Jeanthon et al., 1995).**

Préparation des inoculums bactériens pour les expériences de réduction du Fe(III) structural des argiles ou des oxydes.

Avant d'introduire un inoculum bactérien dans les réacteurs, il est nécessaire de conditionner et de quantifier les bactéries. Pour cela, on pré-cultive les bactéries dans des réacteurs en présence de Fe(III)-citrate. Ensuite, on détermine la quantité de bactéries présentes après réduction bactérienne du Fe(III)-citrate, par l'association de deux techniques : un comptage bactérien sur boîte de pétri et une mesure d'absorbance de la densité bactérienne par spectrophotométrie UV-VIS dans le milieu de culture incolore. Le protocole détaillé est explicité ci-dessous :

- *Shewanella oneidensis* MR-1 est initialement préparée dans un milieu de culture MClay contenant 20 mM Fe(III)-citrate et 10 mM de lactate comme accepteur et donneur d'électrons.
- *Clostridium aurantibutyricum* est initialement préparée dans un milieu de culture riche « LB (Luria Broth) » contenant du NaCl à 5g/l avec du glucose comme donneur d'électrons (10mM) en condition anaérobie.
- *Thermotoga subterranea* est initialement préparée dans un milieu de culture MClay contenant 20 mM Fe(III)-citrate et 2mM de peptone comme source de carbone.

Les cultures bactériennes sont centrifugées 4500 tours/min et lavées 3 fois avec du milieu Mclay en respectant les conditions d'anaérobiose stricte sous hotte anaérobie. Une mesure de la densité bactérienne est réalisée. Ensuite les culots bactériens sont re-suspendus dans le milieu Mclay avant d'être introduits (4% V/V) dans les réacteurs expérimentaux. La re-suspension dans le milieu Mclay nécessite de respecter une

population bactérienne de  $\sim 10^7$  bactéries / ml dans les réacteurs afin d'être homogène pour chaque expérience.

#### 1.4.2. Biosenseurs bactériens

Une description détaillée du principe de fonctionnement d'un biosenseur est décrite au chapitre VII, partie 3.

##### Souches et plasmides

L'ensemble, des souches bactériennes et vecteurs utilisés et/ou construits au cours de cette étude, est listé dans le tableau ci-dessous.

Souche / plasmide	Caractéristiques	Référence / origine
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
PAO1	<i>P. aeruginosa</i> sauvage (WT)	Banin et al., 2005
PAO1 (2Δ)	dérivé de PAO1, pyoverdine et pyochéline déficient ( $\Delta pvdD \Delta pchEF$ )	Ghysels et al., 2004
LIM05	fusion <i>bfrB::gfp</i> (CTX) intégrée au chromosome de PAO1	cette étude
LIM07	fusion <i>bfrB::gfp</i> (CTX) intégrée au chromosome de PAO1 2Δ	cette étude
LIM08	fusion <i>pvdA::gfp</i> (CTX) intégrée au chromosome de PAO1	cette étude
Souche FTPA PAO1-lux-39-H3	fusion <i>ftpA::lux</i> (Tn5) intégrée au chromosome de PAO1, Récepteur de la ferripyochéline (complexe fer pyochéline)	Lewenza 2005*
LIM10	fusion <i>pvdA::gfp</i> (CTX) intégrée au chromosome de PAO1 2Δ	cette étude
<b>Plasmides</b>		
pUC18T-mini-Tn7T-Gm	Ap <sup>R</sup> ; <i>oriT</i> ; Gm <sup>R</sup> sur mini-Tn7	Choi et al., 2005
mini-CTX-pvdA-GFP	Ap <sup>R</sup> ; Tc <sup>R</sup> ; fusion <i>pvdA::gfp</i> dans mini-CTX-lacZ	Banin et al., 2005
pUC18T-mini-Tn7T-Gm-lux	mini-Tn7 pour la construction de fusions <i>luxCDABE</i>	Choi et al., 2005
pPROBE-GT	Gm <sup>R</sup> ; <i>gfp</i> ; pour la construction de fusions <i>gfp</i>	Miller et al., 2000
pTNS1	Plasmide <i>helper</i> pour la transposition de Tn7	Choi et al., 2005
mini-CTX-bfrB-GFP	Ap <sup>R</sup> ; Tc <sup>R</sup> ; fusion <i>bfrB::gfp</i> dans mini-CTX-lacZ	Cette étude

Tableau 5 : Construction des biosenseurs <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Résistance : Gentamycine (Gm<sup>R</sup>), Ampicilline (Ap<sup>R</sup>), Tetracycline (Tc<sup>R</sup>)

### Préparation des milieux et conditions de culture

Les cultures bactériennes ont été réalisées en milieu Luriani Broth (10 g/l NaCl, 10 g/l bacto-tryptone, 5 g/l extrait de levure, pH=7) à 37°C. Si nécessaire, le milieu est additionné d'ampicilline (100 mg/l) et/ou de gentamycine (30 mg/l) et/ou de tétracycline (100 mg/ml) pour les cultures de *P. aeruginosa*.

Pour les mesures de fluorescence, *P. aeruginosa* a été cultivée dans du milieu DCAA (5 g/l casamino-acid traité par Chelex 100 pendant 24h, filtré, stérilisé, puis additionné de MgCl<sub>2</sub> (0,4 mM) et le cas échéant d'aliqotes fabriquées à partir d'une solution mère FeCl<sub>3</sub> (0,1 M). Alternativement, les mesures ont été réalisées en milieu minimum (KCl 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,8 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 mM, citrate de sodium 2 mM, MOPS 50 mM pH6,5, FeSO<sub>4</sub> 30 µM, glucose 2 g/l).

### Manipulation d'ADN et techniques génétiques

Toutes les techniques de biologie moléculaire utilisées au cours de cette étude (techniques de PCR, purification de fragments d'ADN, extraction et purification d'ADN plasmidique et génomique, digestion par des enzymes de restriction, de phosphorylation, ligation, transformation et électroporation d'*E. coli*) ont été réalisées selon des protocoles standards (Sambrook et al., 1974). *P. aeruginosa* a été transformée par électroporation selon la méthode de Choi et al., (2006). L'insertion de dérivés de mini-Tn7 dans le chromosome de *P. putida* a été réalisée par conjugaison tétraparentale selon la méthode décrite par Choi et Schweizer (2006).

## 2. MATERIELS

### 2.1. MATERIELS EXPERIMENTAUX

L'approche expérimentale est basée sur l'utilisation de « Batch » agités. Le système permet de favoriser les interactions entre les matériaux ainsi que de quantifier les faibles altérations en solution (effet de concentration dans un volume fermé). D'autre part, ce choix expérimental a été fait pour mieux caractériser les effets en milieu géologique profond où les processus de transport sont faibles (diffusion très lente  $\sim 10^{-13} \text{m.s}^{-1}$ ) d'où la non utilisation « lourde » de systèmes en cinétique en présence de bactéries.

Deux types de réacteurs sont utilisés selon les expériences recherchées (Figure 29).

- Réacteurs en téflon: expériences altération argileuse
- Réacteurs en verre: expériences d'altération des oxydes ou seulement observation de la réduction du Fe(III).

La présence de silice dans le verre empêche l'utilisation de ces réacteurs pour les expériences d'altération avec les matériaux phyllosilicatés tels que les argiles. Les réacteurs en verre sont utilisés seulement pour les expériences de corrosion (les oxydes de fer ou le fer métal).



**Figure 29 : Photos des deux réacteurs en téflon et en verre. 2 sorties avec septum permettent de créer des conditions réductrices (balayage gazeux) et de réaliser des prélèvements de gaz et de solution au cours du temps, de façon stérile.**

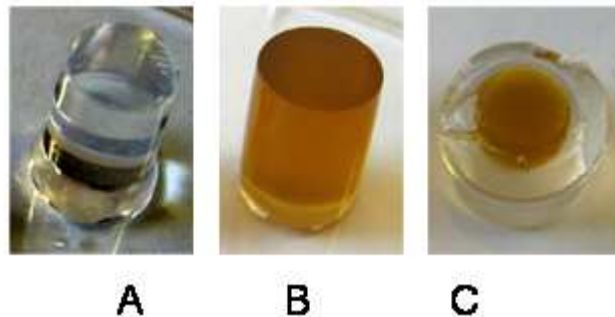
Le matériel argileux soit en poudre dispersée (chapitre 3, partie A) soit en volume compartimenté « GIH-Nontronite », (chapitre 3, partie B) est utilisé dans les expériences d'altérations argileuses.

- L'argile sous forme de poudre :
  - **Argilite de Tournemire**
  - **Smectite : Beidellite ferrifère ; Montmorillonite MX80.**
  - **Illite du Puy PyOR2**
  - **Kaolinite BT**
  
- L'argile sous forme volumique compartimentée.
  - **Nontronite Nau2**

#### Synthèse GIH - nontronite (protocole + caractéristique) :

La suspension de nontronite Nau2 a été immobilisée dans une matrice inorganique réticulée de silice utilisant une technique sol-gel. Pour cela, un précurseur liquide (généralement alcoxysilane) est tout d'abord hydrolysé. L'hydrolyse est alors suivie d'une polycondensation, ce qui mène à une transition sol-gel. Cet état souple, permet le mélange de composants divers à l'intérieur avec des concentrations variées de particules minérales dans ce gel. Cependant les particules minérales doivent être à l'état soluble afin de favoriser l'homogénéisation lors de la polymérisation du gel. Dans cette étude, le tetraethylorthosilicate (TEOS, 99,99%, Fluka) a été employé comme précurseur liquide en raison de son taux de réaction relativement lent et contrôlable. La solution silicatée a été préparée par sonication (55 kilohertz) d'un mélange de TEOS, d' H<sub>2</sub>O et d' HCl (0,1 N) avec un rapport de volume de 1 : 0.2 : 0,12 à 40°C jusqu'à ce qu'une solution claire soit obtenue. La suspension de nontronite a été ensuite mélangée à une solution de silice de rapport volumique (4.35:10) afin d'avoir une concentration de particules 4.35g/l de nontronite dans chaque Gel Inorganique Hybride (GIH) de 1ml volumique. Ceci correspond à une quantité de Fe dans chaque GIH-nontronite égale à 45µmol. Avant l'incorporation de nontronite, le pH de la solution de silice a été ajusté à pH 4 utilisant une solution de NaOH (0,1 N) pour éviter

la dissolution minérale des nontronites, et a été ensuite augmenté à pH 5 pour accélérer l'auto-condensation et la transition sol-gel. La solution de silice hybride de nontronite (300ml) a été distribuée dans les plaques stériles de 96 puits de 1.5ml chacun (Deepwell) et laissée pendant 10 minutes à la température ambiante pour la condensation des gels. Les silica-gels hybrides ont été alors stérilisés par autoclave dans la solution synthétique pendant 30 minutes à 110°C, et stockés dans l'eau pour éviter le rétrécissement jusqu'à leur utilisation. La coloration homogène des GIH-nontronite (Figure 30, photo B) montre que les particules de nontronites sont bien dispersées dans le gel de silice. Les observations microscopiques des gels (non montrées) n'ont indiqué aucun agrégat des particules de nontronite. L'état des nontronites peut être considéré comme une suspension colloïdale à l'échelle du pore. La caractéristique de gel de silice du GIH-Nontronite lui donne d'excellentes propriétés optiques et une porosité homogène (40 à 100nm) empêchant toute possibilité de migration aux bactéries dans le GIH. La synthèse d'internalisation d'un GIH-nontronite dans un second GIH se fait de la même manière sauf que le pH n'est pas augmenté à 5 mais à 4, 2 afin de permettre une condensation plus lente favorisant le maintien d'une structure unique par la formation de liaisons entre la phase liquide et le solide (Figure 30, photo C).



**Figure 30 :** La photo A représente la synthèse d'un Gel Inorganique Hybride (GIH) sans incorporation de nontronite, la photo B représente le GIH synthétisé en présence de nontronite Nau2 et la photo C représente une coupe transversale du GIH - nontronite encapsulé dans un second GIH afin d'enlever l'accessibilité du Fe(III) nontronite pour les bactéries par simple contact de surface du matériau.

Schématisation des expériences « Batches » : Bactéries – Argile – Fe(0), (Figure 31)

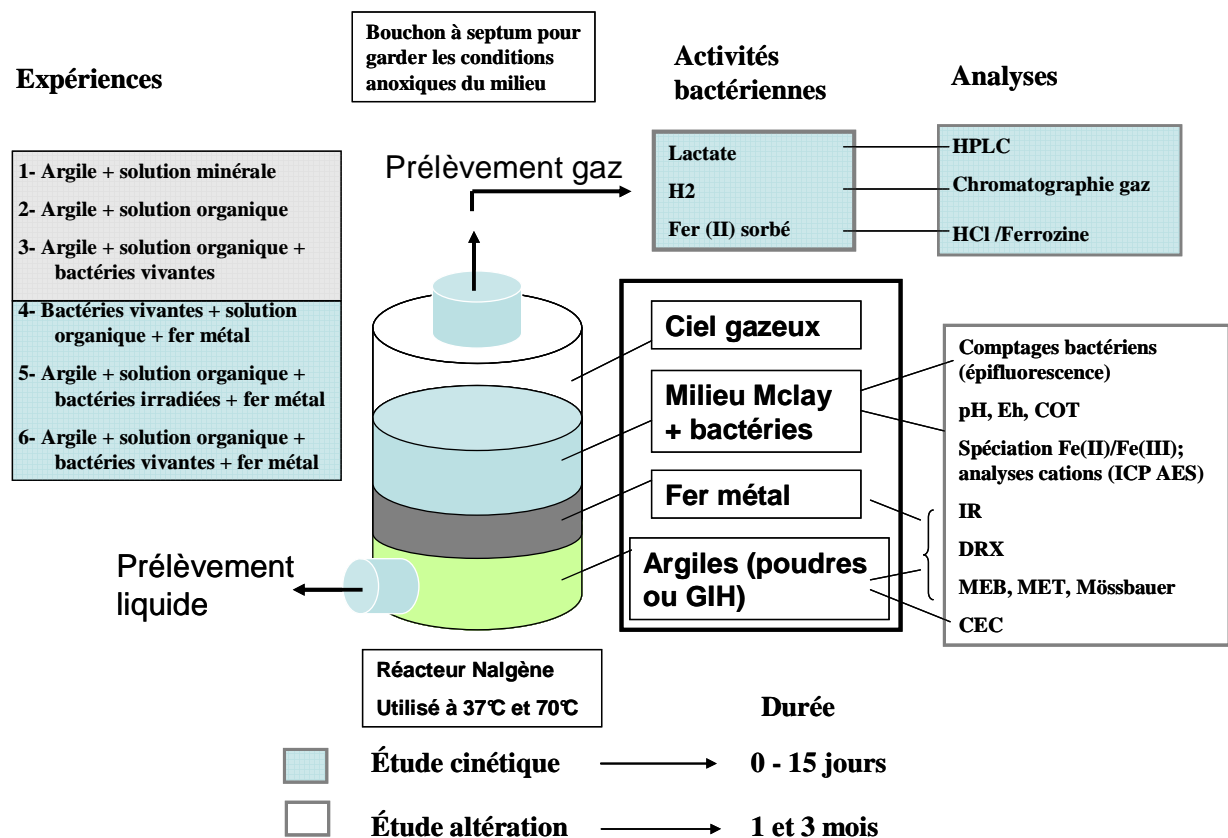


Figure 31 : Schéma expérimental général des expériences d'interaction entre des phases argileuses et des bactéries et/ou du Fe(0). Le donneur d'électrons, l'acide organique, peut être remplacé par l'H<sub>2</sub> selon les expériences. Dans les expériences de biocorrosion, l'argile est enlevée ou substituée par des oxydes de fer de type magnétite ou hématite.

## 2.2. MATERIELS ANALYTIQUES

Les moyens mis en œuvre ont pour finalité l'identification et le suivi de l'impact de l'activité microbologique et de ses conséquences sur la réponse géochimique du milieu.

### 2.2.1. Mesures des activités microbiologiques

L'évolution de l'activité microbologique est décrite dans cette étude comme un catalyseur réactionnel de la réactivité globale du système. L'activité de ce catalyseur est suivie par :

#### Comptages bactériens

L'évolution de la densité cellulaire a été déterminée par des comptages de dénombrement de colonies sur boîte (milieu LB agar) ainsi que par des mesures de densité optique de la turbidité bactérienne des milieux expérimentaux. Une calibration de la quantité de bactéries déterminée par comptage sur boîte et la densité optique correspondante pour



chaque espèce bactérienne est réalisée. Ceci dans le but d'introduire une quantité de bactéries homogène  $\sim 10^7$  bactéries/ml dans les réacteurs expérimentaux.

La viabilité et le comptage des cellules bactériennes ont été vérifiés en utilisant un dénombrement direct par épifluorescence. Ce mode d'observation en lumière incidente au microscope requiert l'utilisation d'un mélange de deux fluorochromes spécifiques qui se fixent sur le matériel génétique de la bactérie. Le fluorochrome Syto® 9 (sondes moléculaire, Eugene, OR, Etats-Unis) qui se fixe aux acides nucléiques des bactéries (vivantes et mortes) fluoresce en vert et l'iodure de propidium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) qui pénètre seulement dans les bactéries ayant des membranes endommagées (cellules mortes) fluoresce en orange. L'iodure de propidium réduit l'action du Syto 9 permettant ainsi de discriminer les bactéries vivantes de celles qui sont mortes. **Cette méthode a été plus particulièrement utilisée afin de suivre la viabilité des bactéries dans nos expériences (en présence d'argile ou de fer métallique-oxyde, ou en fonction de la concentration en  $Fe^{2+}$  en solution).**

*Le protocole est basé sur les kits bactériens de viabilité de LIVE/DEAD® BacLight™*

Il s'agit de mélanger 20  $\mu$ L du mélange de fluorochromes et 20  $\mu$ L de l'échantillon. Le mélange est ensuite incubé à l'obscurité pendant 15 minutes. 20  $\mu$ L du mélange sont placés entre lame et lamelle (méthode état frais), et sont observés directement au microscope à épifluorescence (filtres spéciaux) à l'objectif 40. Le comptage des bactéries s'effectue sur plusieurs champs afin de faire une moyenne statistique de la population bactérienne (environ 10 champs). Le nombre de bactéries par mL d'échantillon est déterminé à partir du volume (20  $\mu$ L) nécessaire pour recouvrir toute la surface de la lamelle ainsi qu'en prenant en compte la surface d'un champ au microscope optique et le nombre moyen de bactéries par champ.

#### Mesure du donneur d'électrons : substrat organique

- Glucose

Si le glucose est utilisé comme donneur d'électrons, sa consommation peut être suivie grâce à un « glucose-mètre » (EBIO Compact Eppendorf®), la technique de dosage utilisée repose sur une méthode enzymatique par dosage de l'eau oxygénée après action d'une enzyme, la glucose-oxydase. Celle-ci est fixée sur une membrane (Biosen®), l'eau oxygénée est dosée par conductimétrie, le courant est proportionnel à la concentration en glucose. 20 $\mu$ L d'échantillon liquide sont nécessaires pour le dosage.

- Lactate

Si le lactate est utilisé comme donneur d'électrons, sa consommation par les bactéries est suivie par chromatographie liquide à haute performance, HPLC, (Varian® 9050). La solution de l'échantillon est éluée via une solution  $H_2SO_4$  0.01N à travers une colonne MetaCarb 67H qui permet de séparer les acides organiques selon leur taille et leur charge puis la détection des acides présents est réalisée par absorbance UV visible.

#### Mesure des gaz par chromatographie phase gazeuse (CPG)

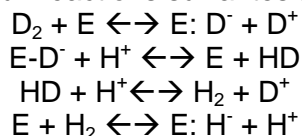
La composition en gaz de  $H_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$  est suivie au cours du temps par chromatographie en phase gazeuse. Le suivi de l'hydrogène, consommé ou produit par la bactérie est un des paramètres clés de notre étude. Un contrôle de l'absence d'oxygène est également effectué.

L'appareil utilisé est un chromatographe phase gazeuse composé de trois colonnes (voie 1 : tamis moléculaire, détection de l'azote et l'oxygène, voie 2 : porapak, détection du dioxyde de carbone, voie 3 : tamis moléculaire, détection de l'hydrogène). Le gaz porteur est composé d'azote (voie 3) ou d'hélium (voie 1 et 2). La détection est effectuée par une méthode catharométrique (comparaison des conductivités).

Mesure de l'activité hydrogénase : échange H<sub>2</sub>/D<sub>2</sub>, activité du biocatalyseur

L'activité hydrogénase est déterminée grâce à la technique de l'échange hydrogène-deutérium. (Vignais et al, 2002). Le deutérium est utilisé ici comme substrat des activités enzymatiques bactériennes. Le but est de suivre la consommation du D<sub>2</sub> et production de H<sub>2</sub> et HD au cours du temps. Cette technique utilise un spectrophotomètre de masse, les pics suivants sont observés pour les différents gaz présents: [HD] : m/e=3, [H<sub>2</sub>] : m/e=2, [D<sub>2</sub>] : m/e=4, [O<sub>2</sub>] : m/e=32, [CO<sub>2</sub>] : m/e=44. L'amplitude du signal mesurée en ampères est directement proportionnelle à la concentration des gaz présents. La consommation de H<sub>2</sub> peut être superposée à l'échange Hydrogène-Deutérium.

Au cœur de l'enzyme, on assiste aux réactions suivantes (E représente l'enzyme) :



Chaque échange isotopique avec D<sub>2</sub> comme substrat conduit à la formation d'une molécule de HD, et chaque échange isotopique avec une molécule de HD conduit à la formation d'une molécule de HD ou H<sub>2</sub> avec une probabilité 0,5.

Soit  $\Sigma = [HD] + [H_2] + [D_2]$  la concentration totale en hydrogène moléculaire.  $\frac{d\Sigma}{dt}$  représente la consommation en « Hydrogène » des bactéries ( $\frac{d\Sigma}{dt} < 0$ ).

Soit  $\tau$ , le ratio isotopique de D dans le gaz en pourcentage est calculé comme suit:

$$\tau = \frac{[D_2] + 0,5[HD]}{([D_2] + [HD] + [H_2])}$$

La dérivée du ratio isotopique est proportionnelle à la vitesse d'échange et donc à l'activité hydrogénase. Cette valeur est utilisée afin de caractériser l'activité hydrogénase dans les expériences.

- Protocole :

Les réacteurs sont, dans un premier temps, balayés au gaz avec 100% de deutérium [D<sub>2</sub>]. Une surpression de 120 mbar est appliquée sur chaque réacteur dès que l'équilibre de solubilité de D<sub>2</sub> est atteint. L'analyse des gaz de chaque réacteur est réalisée par un spectromètre de masse qui est initialement balayé à l'argon avant l'injection des gaz échantillonnés. Ensuite, 0,5 mL de gaz sont prélevés dans chaque réacteur et injectés à travers le septum du spectromètre de masse pour ionisation des éléments et détection de la masse des éléments présents.

### 2.2.2. Altération des phases minérales : mesures chimiques

Mesure des cations en solution

Les solutions ont été analysées en utilisant la Spectroscopie d'Emission Atomique à Plasma couplée inductible (ICP-AES Jobin Yvon® ultra-trace 2000) avec une incertitude de 5%, afin de déterminer les concentrations en cations existant initialement dans les matériaux argileux et en solution ainsi qu'après réaction microbiologique tels que : Si, Al, Fe, Ca, Mg, Na, K. La solution expérimentale est prélevée (2 ml) et filtrée à 0.2µM afin d'éliminer les

particules solides et biologiques de la suspension puis acidifiée (3% V/V d' $\text{HNO}_3$ ) avant d'être analysée.

- **Bilan sur le fer**

La réduction bactérienne du Fe(III) structural des matériaux argileux ou des oxydes va entraîner une repartition du fer dans différents réservoirs, tels que le fer en solution, le fer précipité en de nouvelles phases minérales, le fer adsorbé sur des surfaces minérales principalement sur les argiles ou encore absorbé comme nutriment par les bactéries. Le fer ingéré par les bactéries n'a pas été quantifié mais il est non significatif comparé aux autres réservoirs de fer. Différentes techniques sont décrites ci-dessous afin de déterminer la proportion de  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  dans les phases minérales argileuses ainsi que la part du fer réduit ( $\text{Fe}^{2+}$ ) après réduction par les activités bactériennes ferriréductrices :

Minéralisation HF et spéciation du fer dans les phases minérales argileuses

Le but est de mesurer dans les argiles et argilites le ratio  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  et le Fe tot

La solution de minéralisation est composée: 1ml de 48% de HF, 6ml de 3.6N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et 1 ml de 10% 1,10 phénanthroline dans 95% d'éthanol.

Gamme étalon utilisée : Sel de Mohr  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  calibration de 0 à  $8\mu\text{g}/\text{ml}$

Nombres d'échantillons : 5 répliques

Protocole: D'après Stucki and Anderson (1981) et Komadel and Stucki (1988)

Les échantillons sont dissous et chauffés pendant 30 min à ébullition dans une solution contenant 1ml de 48% de HF, 6ml de 3.6N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et 1 ml de 10% 1,10 phénanthroline dans 95% d'éthanol. Quand la dissolution est terminée, 10 ml d'une solution d'acide borique 5% sont ajoutés afin d'éliminer l'excès d'HF. La solution résultante est ensuite diluée dans une fiole de 100ml d'eau, portée à ébullition et ensuite agitée. Le  $\text{Fe}^{2+}$  est déterminé en transférant 10ml d'aliquote dans une seconde fiole de 100ml en ajoutant 4ml d'une solution à 10% de citrate de sodium. La fiole est mise ensuite à l'obscurité afin d'éviter la photo réduction de phen- $\text{Fe}^{3+}$ . L'absorbance est déterminée après 30 à 60 min de réaction à 510nm et référée à une gamme standard préparée dans les mêmes conditions.

Le Fe(tot) est déterminé en transférant 5ml d'aliquote de la 1ere fiole dans une troisième fiole de 100ml contenant 2ml de citrate de sodium 10%. 2ml  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  sont ajoutés et le reste est dilué dans de l'eau portée à ébullition. L'absorbance est mesurée par ICP-AES équipé d'une chambre de nébulisation en téflon.

Mesure de la spéciation du fer total en solution ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ )

La méthode décrite par Stookey (1970) permet de mesurer la quantité de  $\text{Fe}^{3+}$  réduit. Il s'agit d'une méthode colorimétrique (coloration à la ferrozine), qui permet de différencier la part de  $\text{Fe}^{2+}$  (réduction bactérienne) de la part de  $\text{Fe}^{3+}$  (dissolution du minéral) en solution. Elle est quantifiée par une mesure au spectrophotomètre UV à 562 nm. Le protocole utilisé provient d'une modification par Viollier et al (2000).

Mesure du fer réduit adsorbé ou précipité : méthode colorimétrique, (spéciation et extraction HCl)

Cette méthode est décrite par Kostka et al (1999). Elle permet d'extraire le  $\text{Fe}^{2+}$  qui a été réduit biologiquement et qui est précipité ou sorbé sur les surfaces minérales argileuses. En effet, la précipitation des ions en solution est favorisée par les échanges d'ions au sein de la structure de l'argile. Les  $\text{Fe}^{2+}$  précipités sur le matériau argileux sont remis en solution par un traitement avec 0.5N HCl et peuvent ensuite être dosés avec la méthode précédemment

décrite. Les opérations de traitement et de mesure du Fe sont réalisées sous hotte anaérobie afin d'éviter la réoxydation des  $\text{Fe}^{2+}$  en conditions aérobies.

La quantité totale de fer réduit est donnée par la relation :

$$\text{Fe réduit total} = \text{Fe réduit en solution} + \text{Fe réduit après précipitation}$$

#### Mesure des anions en solution

Les espèces en solutions anioniques ( $\text{PO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{HCO}_3^-$ ) essentielles au développement bactérien sont dosées par colorimétrie par spectrométrie UV-Vis.

- Le dosage colorimétrique de l'**alcalinité** est effectué à  $\lambda = 590$  nm. Le principe détaillé de la méthode utilisée est décrit par Podda F. et Michard G., Acad. Sc., Paris, 319, série II, 651-657 (1994). Trois réplicas sont réalisés par mesure.
- Le dosage colorimétrique **des nitrates** est effectué à  $\lambda=520$ nm. Le principe détaillé est décrit par le KIT dosage (VWR Spectroquant® 1.14773.0001). Dans l'acide sulfurique concentré, les ions nitrates forment avec un dérivé de l'acide benzoïque un composé nitré rouge qui est dosé par photométrie à  $\lambda=520$ nm. Les ions nitrites sont éliminés par l'ajout d'acide amidosulfurique. Trois réplicas sont réalisés par mesure.
- Le dosage colorimétrique **des orthophosphates** est effectué à  $\lambda=712$ nm. Le principe détaillé est décrit par le KIT (VWR® .1.11138.0001). Dans une solution sulfurique, les ions orthophosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) forment avec les ions heptamolybdates de l'acide phosphomolybdique, qui est ensuite réduit par l'acide ascorbique en bleu de phosphomolybdène. Ce composé est dosé par photométrie à  $\lambda=712$ nm après étalonnage. Trois réplicas sont réalisés par mesure.
- Le dosage colorimétrique **des sulfates** est effectué à  $\lambda=590$ nm. Le principe détaillé est décrit dans le KIT (VWR® 1.14411.0001). L'iodate de baryum réagit avec les ions sulfates en milieu aqueux organique pour former des ions iodates et un précipité blanc de sulfate de baryum. En présence de tanin, les ions iodates forment un composé coloré rouge-brun. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'ions iodates et donc à la quantité d'ions sulfates. Trois réplicas sont réalisés par mesure.

#### *2.2.3. Caractérisation et altération des phases minérales : analyse des solides*

En fin d'expérience, les réacteurs sont introduits sous une hotte anaérobie (90%  $\text{N}_2$ , 5%  $\text{H}_2$  et 5%  $\text{CO}_2$ ) afin d'éviter toute réoxydation des matériaux réduits. Les matériaux sont extraits des réacteurs par centrifugation et élimination du surnageant puis ils sont préalablement séchés sur papier filtre dans la hotte anaérobie avant d'être lyophilisé. La poudre récupérée est ensuite broyée et est caractérisée par différentes techniques analytiques :

#### DRX (Diffraction des rayons X)

Des échantillons de roche (argileuse ou d'oxydes de fer) ont été caractérisés avant et après altération microbiologique, par Diffraction des Rayons X (DRX). À la fin de chaque expérience, les solides ont été lavés soigneusement deux fois avec 50 ml d'eau ultra-pure. La boue de la suspension finale a été soit :

- déposée sur des lames en verre dédiées à l'analyse DRX et séchée à l'air dans la hotte anoxique ou au glycol (pour homogénéiser les diffractions par un gonflement maximal des smectites) pour permettre une orientation favorable des particules et une diffraction efficace.
- séchée par lyophilisation puis broyée pour en faire une poudre fine pour une analyse par DRX standard.

Des balayages de DRX ont été enregistrés entre 2 et 40° 2  $\theta$  (temps de comptage de 2s par angle de 0.02° 2  $\theta$ ) avec un diffractomètre de type Bruker® D8 (source de rayonnement de Cu à 40 kilovolts et à 40 mA) équipé d'un miroir de Göbel et d'un détecteur Sol-X.

#### MEB (Microscopie électronique à balayage)

La microscopie électronique à balayage (SEM) a été utilisée afin d'observer les matériaux initiaux ainsi que les produits d'altération des réactions bactériennes / minéraux à l'échelle micrométrique. L'examen au MEB « Philips XL 30 » et des analyses EDX ont été réalisés avec un détecteur Si-Li à large fenêtre (Oxford Instrument®). Des analyses semi-quantitatives ont été réalisées en utilisant le logiciel INCA®-Oxford Instrument fournissant le pourcentage atomique total pour chaque analyse.

#### MET (Microscopie électronique à transmission)

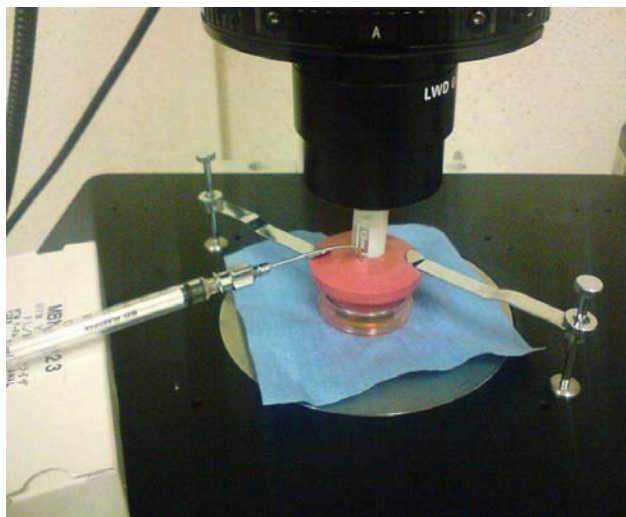
La Microscopie électronique à transmission (TEM) a été utilisée afin d'identifier l'évolution des compositions initiales des matériaux argileux après interaction avec les microorganismes ferri-réducteurs à l'échelle nanométrique. L'évolution structurale et chimique des roches et de quelques phases minérales primaires et secondaires a été observée et analysée par TEM. Les échantillons sont dilués dans une solution d'eau ultra-pure puis, l'échantillon solide de la suspension finale a été déposé sur les 200 mailles de carbone qui composent les grilles de Cu consacrées au TEM puis séché à l'air pendant 24 H. Les observations ont été effectuées par un microscope électronique à transmission, JEOL FX 2000, à 200 kilovolts avec une résolution point par point de 2,7Å. Des analyses EDX ont été exécutées avec un détecteur Si-Li à large fenêtre (Oxford Instrument®) et à l'aide d'une fenêtre atmosphérique fine (SATW) de fente de 30 mm<sup>2</sup>. Des spectres ont été acquis en mode convergent, en une minute avec un temps de mort < 20% et un nombre global de coups entre 500 et 2000. Des analyses semi-quantitatives ont été réalisées avec le logiciel NCA®-Oxford Instrument fournissant le pourcentage atomique total pour chaque analyse. Des formules structurales moyennes ont été établies sur l'ensemble d'analyses de cristallites choisies sans contamination de minéraux accessoires.

#### Capacité d'échange cationique (CEC)

La capacité d'échange cationique a été mesurée sur les matériaux argileux avant et après interaction bactérienne en utilisant un complexe d'éthylène-diamine de Cuivre selon Bergaya et al (1997) afin de déterminer l'influence microbienne sur les propriétés des argiles telles que la rétention des cations sur les smectites (Perronnet et al., 2008). Les résultats sont basés sur une moyenne de 3 répliqués pour chaque échantillon.

#### Mesure de la diffusion par microscopie confocale dans les GIH-nontronite

La microscopie confocale est utilisée pour mesurer la diffusion de deux sondes ioniques utilisées comme des traceurs chromophores (hydrophile SR6G et hydrophobe SRB, SulfoRhodamine B) par fluorescence dans les GIH-nontronite. Les deux chromophores sont dilués au 1/100<sup>ème</sup> en milieu aqueux. Le GIH-nontronite est fixé dans une coupelle en verre contenant de l'eau milliQ (2mL) par un dispositif artisanal contenant un cône plastique et un bouchon septum (Figure 32). Le but étant d'immobiliser le GIH-nontronite contre la paroi en verre et de suivre la diffusion des chromophores au sein des gels. Pour cela, 0,5mL de la solution de chromophores est ajouté de façon homogène dans la solution d'eau milliQ. La diffusion des sondes ioniques dans les gels est calculée à travers un modèle T90 = k. L<sup>2</sup>/De avec k = 1.03 (symétrie cylindrique) ; diffusion effective (De) exprimé en 10<sup>-8</sup>cm<sup>2</sup>/s.



**Figure 32 : Système permettant de suivre la diffusion des sondes ioniques dans le GIH par microscopie confocale.**

#### Mesure pétro-physique de l'argilite

Les carottes d'argilites de diamètre 10 cm pour environ 35 cm de long ont été sciées sur site après le forage. Les paramètres suivants ont été mesurés sur site : la porosité totale, la teneur en eau volumétrique, la teneur en eau gravimétrique et le degré de saturation en fonction de la distance du forage (Matray et al., 2007). La masse totale des échantillons humides ( $M_{tot}$ ) a été mesurée juste après le sciage. Puis, le volume apparent des échantillons humides ( $V_{tot}$ ) a été déterminé par le principe d'Archimède, en pesant le déplacement du pétrole (kerdane) avec un kit de mesure de densité (Sartorius YDK 01), d'après la méthode détaillée dans Monnier et al., 1973. Cette détermination exige (i) de saturer l'échantillon en pétrole juste après la mesure de  $M_{tot}$ , (ii) de déterminer le rapport entre la densité de kerdane et de connaître la température (iii) des mesures supplémentaires parmi lesquelles la masse de l'échantillon humide à l'air après saturation en huile ( $W_a$ ) et la masse témoin après immersion en pétrole ( $w_p$ ). Les prises ont été alors séchées au four à 105°C et à 150°C jusqu'à la stabilisation (c.-à-d. après 2 à 4 jours pour chaque température) pour mesurer leur masse respective  $M_{105^\circ}$ ,  $M_{150^\circ}$ . Toutes les masses ont été déterminées sur place avec la même échelle précise (OHAUS, type Aventurier AR3130 ayant une répétabilité de 0,001 g pour les masses s'étendant entre 0 et 310 g).

#### Spectroscopie Mossbauer ( $^{57}\text{Fe}$ )

L'effet Mössbauer consiste en l'absorption résonnante de rayonnement gamma par le noyau de l'élément chimique étudié. Le noyau interagit avec les champs électrique et magnétique créés par son environnement. Les niveaux nucléaires sont donc perturbés (levée de dégénérescence partielle ou totale) et des transitions entre les sous-niveaux des états fondamental et excité sont induites. Cette technique permet ainsi de distinguer précisément et de quantifier les différents types de fer selon la nature de leur environnement et de leur état de valence. Les spectres Mössbauer  $^{57}\text{Fe}$  enregistrés pour l'échantillon d'argilite de Tournemire ont été réalisés au LCPME (Villiers-lès-Nancy, France) à la température de 150K. Le traitement des spectres est numérique. Une décomposition est réalisée en utilisant des bandes lorentziennes à positions, largeurs et intensités variables (Benali et al., 2001). Cet ajustement permet de quantifier la proportion de différents "types de fer" caractérisés par leur valence et leur environnement chimique. Il est possible de distinguer un  $\text{Fe}^{2+}$  d'un  $\text{Fe}^{3+}$ , du fer en position octaédrique ou en position tétraédrique, du fer présent dans une argile ou dans un oxyde.



# **PARTIE I :**

## **DEVELOPPEMENT BACTERIEN FERRI-REDUCTEUR EN MILIEU GEOLOGIQUE PROFOND**

---





## CHAPITRE III : CARACTERISATION DES NUTRIMENTS ET DU FE(III) STRUCTURAL DISPONIBLES EN CONDITION DE STOCKAGE

---

L'objectif de ce chapitre est de déterminer la concentration en éléments substrats (nutritifs ou énergétiques) disponibles pour le développement bactérien à l'état géochimique initial, que ce soit en milieu argileux profond non-perturbé et en conditions de stockage.

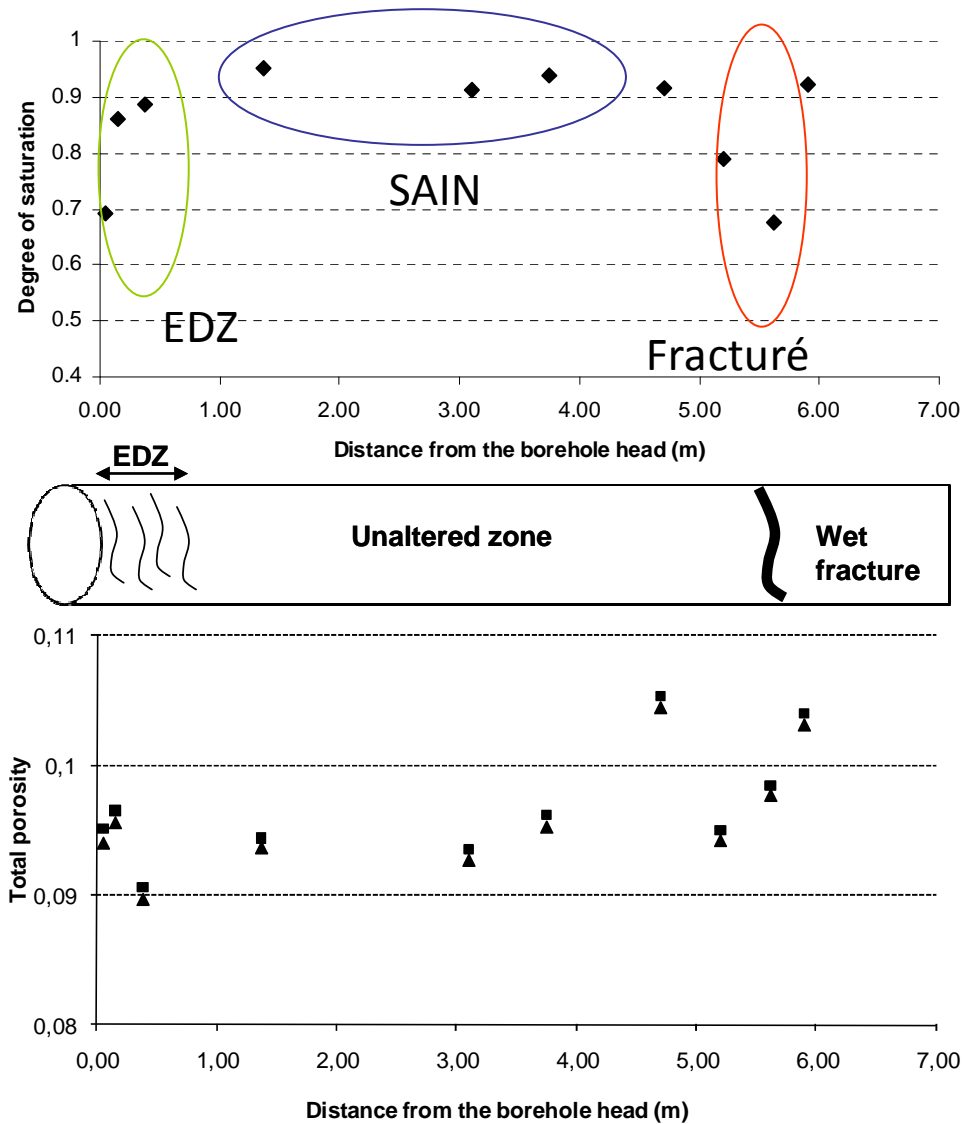
Il s'agit ici de décrire à l'état « passif », les espèces chimiques présentes dans le système ainsi que de déterminer les phases ferrifères présentes ou susceptibles de se former en cours de vie du stockage et potentiellement accessibles par les microorganismes ferriréducteurs.

### 1. ELEMENTS NUTRITIFS ET ENERGETIQUES DANS LES ENVIRONNEMENTS ARGILEUX PROFONDS

#### 1.1. COMPOSITIONS MINERALOGIQUE ET CHIMIQUE DANS LES ARGILITES

Les nutriments peuvent exister sous deux états dans le milieu : soit sous forme soluble dans l'espace poral, soit sous forme solide. Les nutriments solubles sont directement assimilables par les bactéries, en revanche pour les formes solides, les bactéries doivent mettre en place des mécanismes coûteux en énergie pour utiliser des éléments qui sont limités en solution afin de se développer. Afin de déterminer la disponibilité géochimique des éléments substrats pour le développement bactérien en milieu géologique profond, des prélèvements sur site ont été réalisés dans l'Aveyron au niveau d'une couche argileuse, l'argilite de Tournemire (Voir chapitre 1).

Le forage de l'argilite de Tournemire (MB2) a été entrepris en novembre 2007. Des mesures pétrophysiques (degré de saturation et porosité) ont été réalisées sur 10 échantillons prélevés à différentes longueurs de la carotte d'argilite (voir protocole, chapitre 1). Ces résultats ont mis en évidence des hétérogénéités de l'argilite (Figure 33).



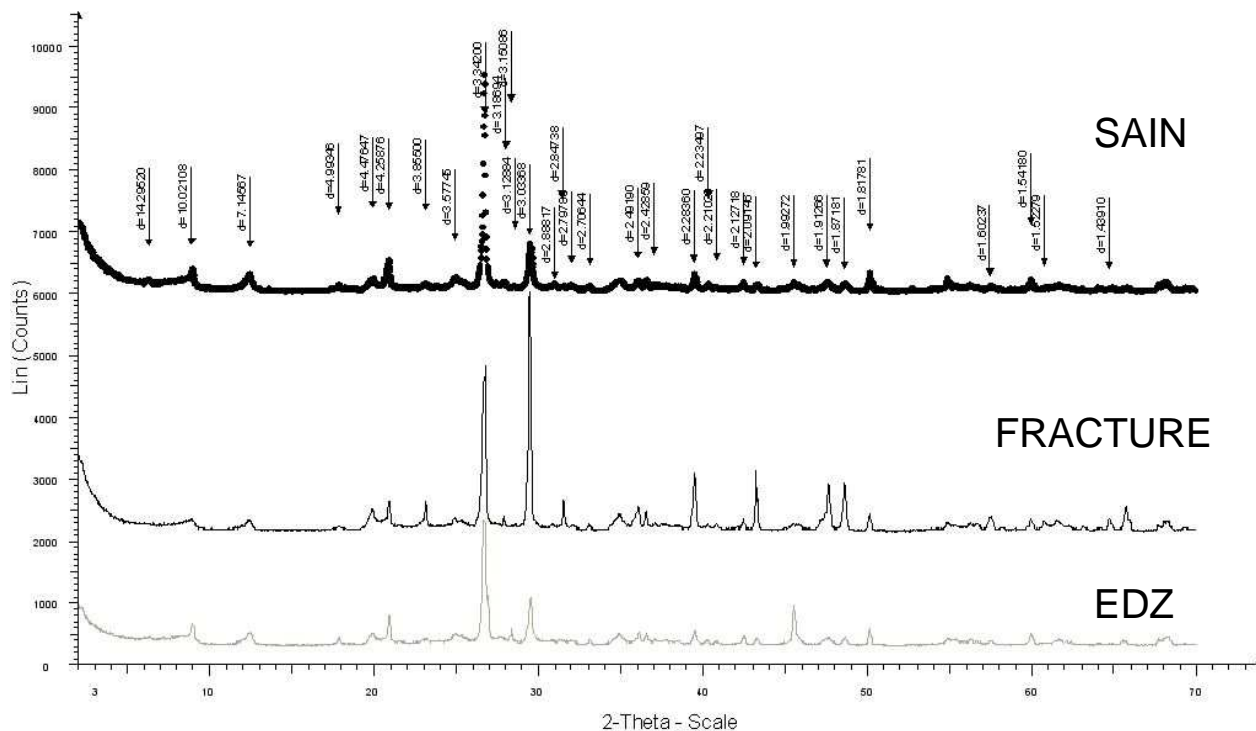
**Figure 33 : Cartographie du forage MB2 et de la carotte d'argile échantillonnée. La porosité totale et le degré de saturation de l'argilite sont représentés en fonction de la distance du forage MB2 (2007). Les carrés noirs et les triangles noirs représentent la porosité totale à 150°C et à 105°C, respectivement.**

Trois zones peuvent être distinguées :

- une zone fracturée désaturée proche de la paroi (cercle vert sur la figure), l'EDZ (Excavation Damaged Zone)
- une zone saine (cercle bleu sur la figure), saturée (entre 0.9 et 1) avec une porosité moyenne stable et s'établissant entre 9 et 10% pour la porosité totale.
- une zone fracturée humide (cercle rouge sur la figure), présentant une forte désaturation (0.79 et 0.67 pour les cotes 5.20 m et 5.62 m respectivement) et une porosité légèrement plus importante (10-11%).

Ces résultats sont cohérents avec les valeurs de porosité obtenues sur d'autres forages, réalisés dans le Toarcien supérieur à la Station Expérimentale de Tournemire (Matray et al., 2007).

Des échantillons de chaque zone (EDZ, SAIN, FRACTURE) ont été récupérés et conservés dans des sacs aluminisés sous vide afin d'être caractérisés (voir protocole, chapitre 1). La caractérisation par diffraction des rayons X des échantillons d'argilites est décrite dans la figure 34.



**Figure 34 : Spectre de diffraction des différents échantillons de l'argilite de Tournemire (Sain, Fracture et EDZ).**

Les pics caractéristiques des phases minérales de l'argilite sont les suivants :

- Chlorite : 14,2 Å.
- Illite : 10,02 Å et 4,99 Å.
- kaolinite : 7,15 Å et 3,57 Å.
- Quartz (4,25 Å, 3,34 Å, 2,12 Å, 2,23 Å, 1,81 Å, et 1,54 Å).
- Calcite (3,03 Å, 2,49 Å, 2,28 Å, 2,09 Å, 1,91 Å, 1,87 Å et 1,52 Å).
- Feldspaths (le microcline : 3,25 Å, 1,99 Å ; l'albite : 3,20 Å et 3,18 Å ).
- Pyrite : 3,12 Å, 2,70 Å, 2,42 Å, 2,21 Å, 1,91 Å et 1,63 Å.
- Dolomite : 2,88 et 1,99 Å.
- Sidérite : 2,79 Å.

Les résultats des diffractogrammes des différents échantillons montrent peu de différences concernant les phases minérales présentes. La seule différence majeure est la présence en plus grande quantité de calcite dans l'échantillon fracturé humide, par rapport aux deux autres échantillons (EDZ et Sain). Ceci peut s'expliquer par la formation de géode de calcite dans les fractures par précipitation, lors des alternances de saturation/désaturation des fractures.

L'interprétation générale des résultats a amené au choix de la caractérisation d'un seul échantillon pour notre étude : la zone saine (fraction la plus homogène).

### 1.1.1. Composition minéralogique de l'argilite

#### L'argilite de Tournemire

Echantillon Tournemire	% Perte au Feu	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> %	CaO %	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> %	K <sub>2</sub> O %	MgO %	MnO %	Na <sub>2</sub> O %	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> %	SiO <sub>2</sub> %	TiO <sub>2</sub> %	S (%)
<b>Cette étude</b>	13.62	16.73	8.99	5.56	3.14	1.92	0.05	0.28	0.27	48.55	0.85	99.9
<b>Perronnet 2004</b>	12.25	17.6	7.3	5.7	3.1	2	0.005	0.4	0	50.5	1	99.9
<b>Kohler 2005</b>	15.77	16.67	9.63	4.55	2.98	1.97	0.05	0.32	0.24	47.37	0.82	100.37

**Tableau 6 : Composition chimique en pourcentage d'oxydes de l'argilite de Tournemire**

Les différentes études sur l'argilite de Tournemire montrent que la composition chimique est homogène d'un emplacement de ce laboratoire expérimental à un autre (Tableau 6).

La proportion des phases minérales de l'argilite est décrite dans le tableau 7.

	<b>Argilite de Tournemire</b>
<b>Minéraux argileux</b>	
Illite/Smectite	25.8
Illite	21.5
Kaolinite	13
Chlorite/smectite	4.3
<b>Minéraux accessoires</b>	
Quartz	17.2
Calcite	12.8
Hématite	traces
Dolomite	0.7
Gypse	
Pyrite	2.3
Sidérite	2.3
Total	99.9
Matière organique	1%
C organique	/
CO <sub>2</sub> total	/
S	1.5 %
CEC (meq.100 g <sup>-1</sup> )	10

**Tableau 7 : Composition minéralogique (%massique) des matériaux composites (Perronnet, 2004).**

La matière organique retrouvée à Tournemire est une matière organique considérée comme mature (niveau d'oxydation faible) et composée principalement de kérogène dont un hydrocarbure, l'acide benzoïque (Deniau et al., 2007).

### 1.1.2. Composition chimique des eaux interstitielles

Des prélèvements d'eaux interstitielles du site argileux de Tournemire ont été réalisés via un piquage sous pression d'un ancien forage « TF5 » (Beaucaire et al., 2008) et des analyses de la composition chimique de cette eau ont été réalisées, notamment pour les espèces anioniques,  $\text{PO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , considérées comme indispensables en terme de substrats nutritifs pour le développement bactérien (Tableau 8).

	pH	Ca <sup>2+</sup> mM	Mg <sup>2+</sup> mM	Na <sup>+</sup> mM	K <sup>+</sup> mM	Cl <sup>-</sup> mM	Si mM
Cette étude	8	0.28	0.24	10.85	0.12	6.3	0.24
Beaucaire 2009	7.8 - 8.2	0.09	0.38	9.5	0.22	6.15	0.1
	Fe µM	Mn µM	Al µM	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> mM	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mM	PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> µM	COT mg
Cette étude	0.18	0.16	0.08	0.07	8	8.4	5
Beaucaire 2009	0.1	-	-	0.01 - 20	4.5	-	5

**Tableau 8 : Concentration des espèces chimiques des eaux interstitielles de l'argilite de Tournemire.**

Les analyses chimiques montrent que les principaux éléments nutritifs (carbone, phosphore et soufre) sont présents en solution à des teneurs significatives.

Les résultats chimiques et minéralogiques de l'argilite de Tournemire montrent que la composition du milieu permet de supporter un développement bactérien : une grande partie des nutriments et des sources énergétiques est en effet présente que ce soit dans la solution ou dans les phases argileuses. Toutefois, le manque de données pour certains éléments comme l'azote soluble et la biodisponibilité de certains nutriments ou oligoéléments essentiels (fer et matière organique) peuvent être des paramètres limitants.

D'autre part, même si les minéraux peuvent être considérés comme des sources d'oligoéléments difficilement assimilables, la plupart des bactéries sont capables de développer des stratégies pour extraire ces éléments essentiels des matrices minérales en cas de carence sévère (Neilands, 1974, 1989, Barker, 1997, 1998). Ainsi, dans le système géologique profond, la caractérisation et la localisation des réservoirs nutritifs et énergétiques des phases solides sont nécessaires afin d'évaluer les ressources bio-disponibles pour supporter une activité microbiologique en environnement profond et en conditions de stockage géologique.

Donc, la caractérisation du réservoir fer et notamment la proportion de phase minérale Fe(III) est primordiale pour déterminer le potentiel d'activité bactérien ferriréducteur.

## 1.2. LOCALISATION DES RESERVOIRS FER ET SPECIATION DU FER DANS LES MINERAUX

Le fer, Fe(II) et Fe(III), est porté par différentes phases minérales au sein de l'argilite. La forme Fe(II) est retrouvée dans des structures cristallines, telles que la pyrite ( $\text{FeS}_2$ ), la sidérite ( $\text{FeCO}_3$ ) et la chlorite  $(\text{Si,Al})_4(\text{Mg,Al,Fe(II)})_6\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ . La forme Fe(III) est retrouvée dans les structures cristallines telles que les oxydes ferriques (goethite, hématite) et les smectites  $(\text{Si,Al})_4(\text{Mg,Al,Fe(III)})_2\text{O}_{10}(\text{OH})_2$  principalement. La localisation et la quantification du Fe(III) structural est essentielle pour évaluer la part potentiellement accessible pour les activités bactériennes ferriréductrices.

Une technique de minéralisation à l'acide fluorhydrique (HF) couplée à un indicateur coloré spécifique du  $\text{Fe}^{2+}$ , la phénanthroline, a été mise en oeuvre afin de quantifier la

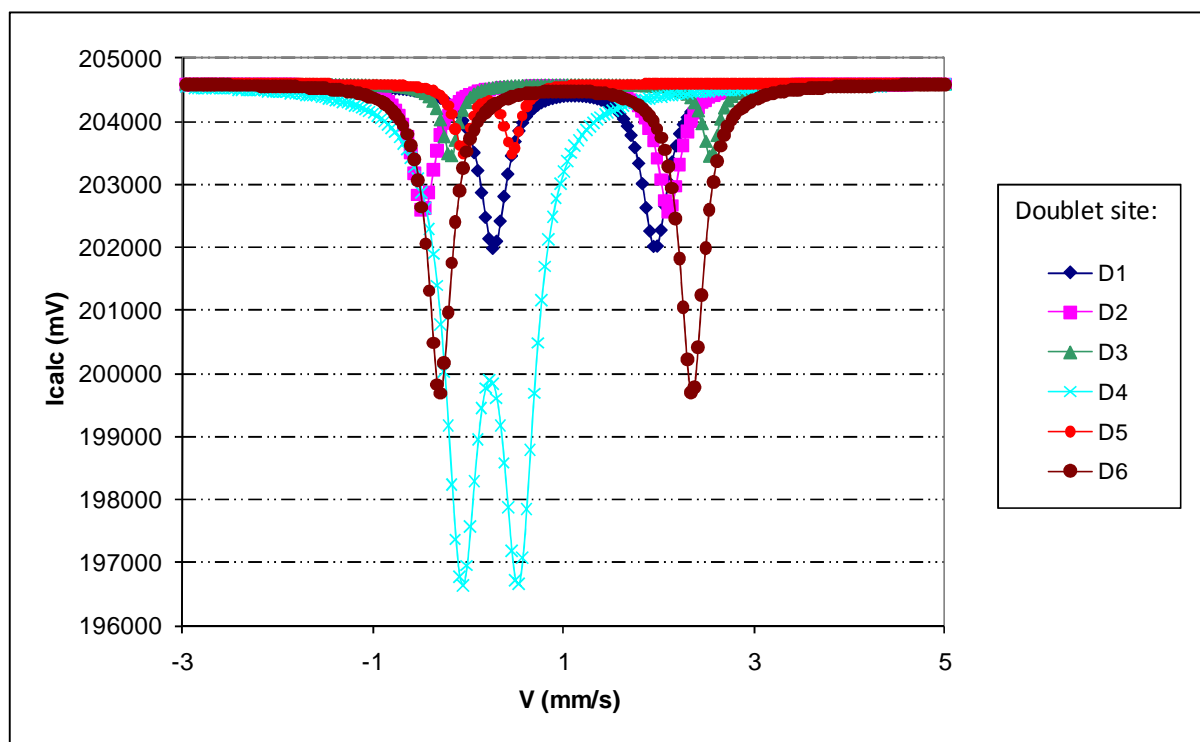
proportion de Fe(III) structural au sein des argilites (Komadel et Stucki, 1988 ; Stucki et Anderson, 1981). Pour cela, 5 échantillons, de 200 mg chacun, d'argilite de Tournemire broyée, homogénéisée et tamisée < 2µm ont été utilisés afin de subir une minéralisation à HF dans des pots en téflon. Les résultats sont décrits dans le tableau 9.

Argilite de Tournemire		Fe <sup>2+</sup> (mmol/l)	Fe total (mmol/l)	Ratio Fe <sup>3+</sup> /Fe <sub>total</sub>
	Sample 1		65,36	76,77
Sample 2		69,97	81,48	0,1411
Sample 3		68,20	80,10	0,1486
Sample 4		67,30	78,30	0,1405
Sample 5		67,50	78,60	0,1412

**Tableau 9 : Spéciation du fer (mmol/l) dans les phases minérales de l'argilite de Tournemire. Le Fe<sup>2+</sup> en mmol/l a été mesuré par une méthode colorimétrique à 510nm, le fer total par ICP-AES. Le pourcentage de Fe<sup>3+</sup> = (Fe total - Fe<sup>2+</sup>)/Fe total.**

Les résultats des analyses chimiques montrent que l'argilite de Tournemire contient entre 14 et 15% de fer sous forme de Fe(III) structural.

La localisation des phases ferrifères dans l'argilite a été déterminée à l'aide de la spectrométrie Mossbauer (Figure 35).



**Figure 35 : Spectres Mossbauer de l'argilite de Tournemire.**

Les résultats des spectres indiquent la présence de différentes phases minérales ferrifères (Tableau 10).

Tournemire brut Doublet site	CS (mm/s) /Fe	QS (mm/s)	AR (%)	Phases correspondantes
D1	1.21	1.7	14	Sidérite
D2	0.93	2.58	9	Chlorite FeII
D3	1.28	2.73	4	Illite. FeII
D4	0.33	0.59	47	Pyrite + FeIII montmorillonite
D5	0.30	0.5	3	FeIII argile
D6	1.13	2.65	23	Chlorite FeII

**Tableau 10 : Phases minérales ferrifères présentes dans l'argilite de Tournemire et détermination semi-quantitative des phases Fe(III).**

Ces résultats montrent que le Fe(III) est localisé dans les phases minérales argileuses, principalement de type montmorillonite. La présence de Fe(III) est retrouvée dans au moins deux de phases minérales argileuses distinctes, alors que les quantités présentes dans les phases de type chlorite ou dans les oxydes de fer de types goethite ne semble pas être significatives.

**Ainsi, le Fe(III) est présent à hauteur d'environ 14% du fer total dans les argilites de Tournemire (matériau utilisé dans cette étude) et est principalement localisé dans des phases argileuses de type smectite.**

A partir des résultats d'analyses des nutriments et des phases ferriques retrouvées dans l'argilite, une estimation du développement potentiel de bactéries ferriréductrices a été réalisée via une approche théorique.

### **1.3. DEVELOPPEMENT BACTERIEN FERRIREDUCTEUR : APPROCHE THERMODYNAMIQUE ET NUTRITIVE**

L'approche utilisée ici pour déterminer le développement bactérien ferriréducteur potentiel dans les environnements argileux profonds est fondée sur les aspects nutritifs et énergétiques :

- un inventaire géochimique, dans le but de fournir des informations sur les éléments nutritifs dans les eaux interstitielles mesurées au sein de l'argilite.
- les réactions thermodynamiques favorables pour les processus d'oxydoréduction du métabolisme bactérien, notamment la présence en Fe(III) structural.

Le calcul réalisé est un calcul statique qui ne prend pas en compte les flux de nutriments : il minimise donc le développement bactérien potentiel. Il est cependant calculé pour des conditions thermodynamiques à 80°C afin de rester dans une approche représentative du stockage géologique.

Le concept étudié correspond à une fraction volumique de l'argilite de Tournemire au niveau de l'EDZ (~10% de porosité dans notre étude et jusqu'à 20% de porosité dans la littérature (Beucaire et al., 2009)). Le système est donc dimensionné pour 1 dm<sup>3</sup> de roche et



comprend une fraction solide saturée à 20% de porosité afin de maximiser l'apport de nutriments. Le bilan global de nutriments est réalisé dans l'eau interstitielle du site à l'exception du Fe(III) qui se trouve essentiellement dans la phase solide.

### Nutriments disponibles et hypothèses de calculs

Les données d'entrées pour le calcul de biomasse proviennent des mesures effectuées sur les eaux interstitielles et sur la roche argileuse du site de Tournemire.

Cependant, l'azote n'a pas pu être mesuré dans les analyses chimiques. Les données de la littérature (Vinsot et al. 2008) ont été utilisées, soit une teneur en ammonium de  $2,11 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  (Eau du Callovo-Oxfordien).

De plus, la matière organique a été caractérisée uniquement sous forme de carbone organique total : c'est le seul donneur d'électrons disponible dans le système milieu argileux profond. Afin de simplifier les données d'entrée sur ce paramètre, la matière organique est assimilée à un acide organique : l'acétate.

Le Fe (III) structural a été identifié dans l'argilite de Tournemire, principalement dans les matériaux argileux à hauteur de 14% du fer total. La masse de Fe(III) équivalente dans l'argilite est déterminée à partir de la masse solide, contenue dans le volume de  $1 \text{ dm}^3$  de roche. Avec une valeur de densité de l'argilite de  $2,75 \text{ g/m}^3$ , le Fe(III) est quantifié à hauteur de 17 g pour 2,2 kg d'argilite. Les données sont récapitulées dans le Tableau 11.

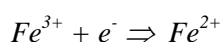
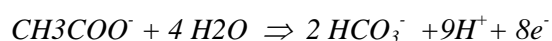
Concentration en élément (mol/l)	Aqueux					Solide
	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{HCO}_3^-$	$\text{PO}_4^{2-}$	$\text{NH}_4^+$	Acétate	$\text{Fe}^{3+}$
Argilite	1,00E-04	8,00E-03	8,40E-06	2,11E-04	2,10E-04	3,14E-01

**Tableau 11: Composition en éléments substrats essentiels pour le développement bactérien.**

Le métabolisme nutritif permet de fournir la matière aux microorganismes. Les substrats consommés sont essentiellement transformés en biomasse microbienne. D'un point de vue chimique, la biomasse microbienne est principalement constituée des éléments suivants : Carbone, Hydrogène, Oxygène, Azote, Phosphore et Soufre. On peut retenir pour la biomasse aquatique la formule chimique moyenne suivante :  $\text{C}_5 \text{ H}_7 \text{ O}_2 \text{ N}_{0,75} \text{ P}_{0,05} \text{ S}_{0,025}$  (Grogan et Mac Kinley, 1989).

### Approche thermodynamique des réactions microbiennes et biomasse

#### Réactions mises en jeu : Oxydation de l'acide acétique / réduction du Fe(III)



Par convention, nous représenterons ici toutes les demi-réactions sous la forme de réactions de réduction, normalisées pour un électron échangé. Ainsi si l'on considère les deux demi-réactions citées ci-dessus, avec les enthalpies libres qui leur sont associées :



L'enthalpie libre associée à la réaction complète est :



Les énergies des demi-réactions d'oxydation sont également fréquemment données dans la littérature en échelles d'intensité d'oxydoréduction (notée  $p_e$ ) ou de potentiel d'oxydoréduction (noté  $E_H$ ), reliées par les relations suivantes :

$$\Delta G = \ln(10) \cdot (p_{e1} - p_{e2}) = F \cdot (E_{H1} - E_{H2})$$

avec les définitions suivantes :

R : constante des gaz parfaits (= 8,314 J.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>)

T : température (en K)

F : constante de Faraday (= 96490 C.mol<sup>-1</sup>)

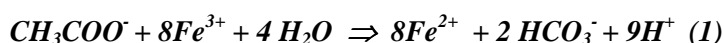
$p_e$  : intensité d'oxydoréduction (adimensionnelle)

$E_H$  : potentiel d'oxydoréduction (en V)

Pour une température de 25°C, la relation ci-dessus devient :

$$\Delta G = 5,71 \cdot RT \cdot (p_{e1} - p_{e2}) = 96,5 \cdot (E_{H1} - E_{H2}) \quad \text{en kJ.mol}^{-1} \text{ d'e}^{-} \text{ échangé}$$

Ainsi la réaction biotique considérée et sa variation d'enthalpie libre à 80°C associée est



Avec,  $\Delta G = -70.7$  kJ/mol d'électron transféré (Hanselmann, 1986; Amend et Shock 2001).

Par convention, les réactions d'oxydoréduction dont l'enthalpie libre est inférieure à **15 kJ.mol<sup>-1</sup> d'électron échangé seront considérées comme non exploitables par les bactéries** (rendement énergétique insuffisant). D'autre part, l'énergie nécessaire à la réaction de synthèse d'un gramme de biomasse dans cette étude est :  $\Delta G_w^0 = -64$  kJ.mol<sup>-1</sup> d'e<sup>-</sup>, valeur standard (Thauer et al., 1977; Thauer et Morris 1984).

**Ainsi, la réaction d'oxydation de l'acide acétique couplée à la réduction du Fe<sup>3+</sup> (1) des minéraux est une réaction favorable énergétiquement pour les activités bactériennes.**

**D'autre part, les conditions redox (Eh) du système argileux profond sont aussi favorables aux réactions de réduction du Fe(III) par les microorganismes ferri-réducteurs. Les simulations de la chimie des eaux interstitielles dans les argilites estiment un Eh entre -140 mV et -170 mV (Gaucher et al., 2006).**

Estimation de la production de biomasse bactérienne, sur la base de la disponibilité des substrats énergétiques

A partir de cette donnée thermodynamique, on peut estimer la synthèse de biomasse pouvant être produite par l'énergie de la réaction d'oxydoréduction ( $I$ ). Cette synthèse est dépendante de la concentration initiale des éléments et de l'élément dont la concentration limite la réaction. Dans notre système d'étude, l'acide acétique est l'élément limitant (en comparaison avec la quantité en Fe(III) présent). Ainsi, la quantité d'énergie produite par la réaction ( $I$ ) est :

$$[\text{Acide acétique}] \times \text{nombre d'électron échangés} \times \Delta G^0 = -1, 19.10^{-1} \text{ kJ}$$

Potentiellement, la biomasse produite =  $-1, 19.10^{-1} / - 64 = 1,86.10^{-3} \text{ g de biomasse pour } 1\text{dm}^3 \text{ d'argilite.}$

Cette valeur doit toutefois être corrélée avec la concentration en nutriments nécessaires à la formation de biomasse dans le système.

Il faut donc estimer la production de biomasse en prenant en compte les nutriments disponibles en utilisant la formule moyenne représentant la composition élémentaire de la biomasse ( $C_5 H_7 O_2 N_{0,75} P_{0,05} S_{0,025}$ ).

Ainsi, pour produire 1 g de biomasse microbienne, l'environnement devra fournir aux microorganismes, sous une forme assimilable, au moins :

- 536 mg de C
- 68 mg de H
- 286 mg de O
- 94 mg de N
- 14 mg de P
- 7 mg de S

A partir des éléments nutritifs disponibles dans la phase aqueuse ( $0,2 \text{ dm}^3$ ), on peut déterminer la quantité de biomasse qui pourra être synthétisée (Tableau 12).

Eléments	Composition biomasse (mg/g)	Biomasse énergétique (g)	Nutriments disponibles (mg)	Biomasse nutriment (g)	Consommation nutriment réelle (g)
<b>C</b>	536	9,95E-04	1,92E-05	3,58E-05	3,37E-06
<b>H</b>	68	1,26E-04	-	-	4,27E-07
<b>O</b>	286	5,31E-04	-	-	1,80E-06
<b>N</b>	94	1,74E-04	5,91E-07	<b>6,29E-06</b>	5,91E-07
<b>P</b>	14	2,44E-06	5,21E-08	3,72E-06	8,80E-08
<b>S</b>	7	6,96E-06	6,40E-07	9,14E-05	6,16E-10
<b>CHONPS</b>	1000	<b>1,86E-03</b>	-	-	<b>6,29E-06</b>

**Tableau 12: Comparaison de la quantité de biomasse synthétisée selon une approche énergétique du système et des nutriments présents en solution. L'intitulé « biomasse énergétique » décrit les éléments nécessaires à la synthèse de biomasse possible, selon l'énergie apportée par la réaction (1). L'intitulé « biomasse nutriment » décrit la quantité de biomasse synthétisable par rapport à la quantité de nutriments présents. L'intitulé « consommation nutriment réelle » décrit la quantité de nutriments consommés dépendant du nutriment limitant, ici l'azote.**

D'après les résultats obtenus, les nutriments considérés en solution sont les paramètres limitants du développement de biomasse. L'énergie apportée par la réaction d'oxydoréduction (1) peut supporter le développement de 1,86 mg de bactérie dans 1 dm<sup>3</sup> d'argilite, alors que les nutriments peuvent supporter la synthèse de 6,29 µg de bactéries par dm<sup>3</sup>. L'azote apparaît ici, comme l'élément limitant à la synthèse de biomasse dans le système.

**Ainsi, les conditions énergétiques et nutritives du système argileux peuvent supporter le développement de bactéries ferriréductrices.**

En considérant la masse d'une bactérie de l'ordre  $7.10^{-16}$ g, la quantité de bactéries pouvant être synthétisée est estimée à  $4,5.10^7$  bactéries/ml dans la phase aqueuse du volume 1dm<sup>3</sup> d'argilite considéré.

Ce calcul théorique porte sur le bilan énergétique et nutritif conduisant, à la synthèse de biomasse dans les environnements argileux profonds. Cependant, ces calculs ne prennent pas en compte les flux d'eau pouvant apporter des nutriments dans les argilites, ce qui explique la faible biomasse susceptible d'être produite.

Par ailleurs, ces conditions décrivent l'état initial du système de stockage. En présence de fer métallique, de nouvelles sources énergétiques et de nutriments peuvent apparaître, notamment la formation d'hydrogène et de magnétite. Un bilan de l'apport des colis de stockage est réalisé afin de visualiser les possibles flux de nutriments apportés lors de la corrosion des colis de déchets métalliques, et susceptibles d'augmenter les rendements de biomasse possible au sein du stockage.

## 2. APPORT DES COLIS DE DECHETS METALLIQUES POUR LE DEVELOPPEMENT MICROBIEN

Il s'agit ici, de se replacer dans le contexte du stockage et d'évaluer l'apport potentiel des colis (altération du verre, corrosion des composants métalliques) en termes de flux de nutriments et de composés oxydables (notamment  $H_2$ ), permettant de favoriser le développement bactérien dans les environnements du stockage.

Pour cela, une évaluation des flux de matières provenant des colis est réalisée en s'appuyant sur la géométrie du système dans le concept de stockage actuel défini par le dossier Argile (Andra, 2005), et tenant compte de l'ensemble des constituants.

### 2.1. COMPOSITION DES COLIS

La mise en place de colis de déchets radioactifs en milieu argileux profond entraînera une forte réactivité dans le système ainsi qu'une source d'éléments nutritifs extérieurs, pouvant favoriser le développement microbien. Comme il a été décrit dans le paragraphe « métabolisme bactérien » du chapitre 1, les éléments essentiels pour la croissance bactérienne sont notamment le carbone, l'azote, le phosphore et le soufre. Ainsi, afin de caractériser l'apport de l'altération des colis sur le développement de biomasse microbienne, les colis de déchets ont été décrits non seulement par leur teneur en fer (élément majeur du conteneur) mais aussi par les teneurs en éléments traces.

Afin d'étudier cette réactivité sur le long terme, l'approche utilisée dans cette étude est de définir un « colis de déchets » représentatif du stockage des colis HAVL et qui est caractérisé par plusieurs composants tels que : le chemisage, le surconteneur (selon les scénarios) et le colis lui-même contenant une enveloppe primaire et la matrice vitreuse (Figure 36).

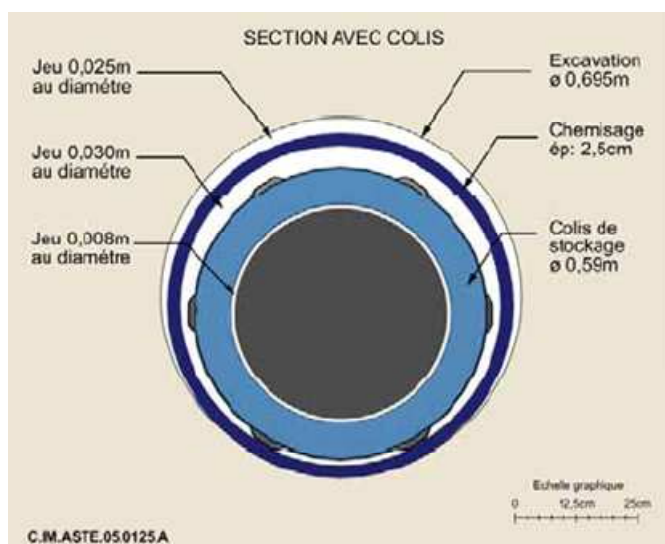


Figure 36 : Section transversale de l'enveloppe des colis de déchets HAVL (Andra 2005)

Dans notre étude, le « colis de déchets » est défini par :

- un colis COG-150. CO.2 (enveloppe + matrice vitreuse) ; (Andra, 2005) .
- un surconteneur : P235 ; (Andra, 2005) .

Le volume total d'acier (0,179 m<sup>3</sup>) est déterminé en sommant le volume du conteneur primaire, du surconteneur, et du chemisage. Le volume de verre est de 0,139 m<sup>3</sup>.

La composition chimique des éléments du « colis de déchets », utilisée dans cette étude est présentée dans le Tableau 13.

Famille	Colis COG-150 Verres Umo			Surconteneur	P 235		
Colis-type	CO.2						
Eléments	g/colis	mol/colis	%mol/colis	Eléments	g/colis	mol/colis	%mol/colis
C	222	18.4845962	0.20651025	C	3675	305.995004	1.14933519
N	0	0	0	N	205.8	14.6895075	0.05517465
P	5650	182.434614	2.03816286	P	1029	33.2257023	0.12479769
S	166	5.17617711	0.05782835	S	1029	32.0860617	0.12051713
Fe	487962	8744.83871	97.6974985	Fe	1464061.2	26237.6559	98.5501753
Total	494000	8950.9341	100	Total	1470000	26623.6522	100

Tableau 13 : Composition chimique du « colis de déchets »

La composition en éléments du « colis de déchets » est déterminée par la somme des éléments du colis COG-150 et des éléments du surconteneur P235 (tableau 14).

"Colis de déchets"		
Eléments	mol/colis	%mol/colis
C	324,4796	0,00912111
N	14,6895075	0,00041292
P	215,660316	0,0060622
S	37,2622389	0,00104744
Fe	34982,4946	0,98335633
Total	35574,5863	1

Tableau 14 : Composition du « colis de déchets » utilisé pour l'étude

## 2.2. FLUX DE NUTRIMENTS

Pour le calcul du flux d'éléments, la vitesse d'altération du colis est considérée comme constante et basée sur la vitesse de corrosion du conteneur en acier :  $V_{alt} = 1 \mu\text{m}/\text{an}$  (Bildstein et al., 2006, De Combarieu et al., 2007). Le volume total du colis (0,328 m<sup>3</sup>) peut être ramené à un cylindre de 30 cm de rayon. Cette vitesse d'altération s'appuie alors sur une surface de 1,90 m<sup>2</sup>, ce qui conduit à une vitesse volumique de  $1,9 \cdot 10^{-6}$  m<sup>3</sup>/an. Les flux de nutriments, provenant de l'altération peuvent ainsi être estimés à partir de leur teneur dans le colis, à l'exception de l'hydrogène, produit lors de la corrosion de l'acier stochiométriquement (Tableau 15).

Colis	Volume (m3)	surface (m2)	rayon (m)
		0.318	1.91
vitesse corrosion	1 $\mu\text{m}/\text{an}$		
	1.91E-06 $\text{m}^3/\text{an}$		
Elements	teneur mol/colis	teneur mol/m3	flux mol/an
Fe	34982	110008	0.2097
H <sub>2</sub>	34982	110008	0.2097
C	324	1020	0.0019
S	37	117	0.0002
P	216	678	0.0013
N	15	46	0.0001

**Tableau 15 : Estimation d'un flux de nutriments lors de la corrosion du colis (verre + acier)**

Les résultats du calcul (Tableau 15) montrent que, malgré leur faible teneur, les éléments nutritifs tels que le carbone, l'azote, le phosphore et le soufre sont relâchés par le colis avec un flux de l'ordre de la millimole par an, dans la solution interstitielle de l'argilite. En solution, les éléments du colis se retrouveront sous forme ionique, potentiellement assimilable pour les bactéries. La corrosion du colis entraîne également un flux important de fer et d'hydrogène (0,2 mol/an). Ces flux sont responsables de modifications significatives de la chimie des eaux et de la minéralogie dans la zone colis et dans les zones proches de l'interface colis de déchets / argilite.

Ce flux, s'il reste constant, sera maintenu pendant une période de l'ordre de 150 000 ans, jusqu'à altération complète du colis. D'autre part, dans l'environnement spécifique des argilites, les propriétés physiques de la barrière argileuse imposent une migration lente des espèces aqueuses par diffusion. Ce phénomène favorise l'accumulation et la perurbation du milieu proche de l'interface colis / argilite selon l'élément considéré.

L'hydrogène, produit lors de la corrosion du colis va contrôler de manière durable les conditions redox dans le système proche de l'interface fer/argile. De plus, sa formation est également couplée avec la consommation de protons de la solution, engendrant une augmentation du pH. Des simulations portant sur la réactivité fer/argilite en conditions de stockage ont été réalisées dans des travaux précédents (Bildstein et Trotignon, 2007) et mettent en évidence :

- Un pH maximal à l'interface compris entre 9,5 et 10,5.
- Une décroissance rapide du pH sur les 1<sup>er</sup> mètres des argilites pour atteindre une valeur de pH entre 7,5 et 8.

D'autre part, l'hydrogène produit en quantité importante, est susceptible de migrer dans la porosité de l'argilite afin de compenser l'augmentation forte de la  $P_{\text{H}_2}$  à l'interface. Cette migration est mise en évidence dans les simulations numériques (Talandier, 2005 ; Bildstein et al., 2006; Boulin, 2008), et peut porter sur de longues distances au sein de l'argilite. La diffusion de l'hydrogène est dépendante de la porosité de la barrière argileuse ainsi que de sa réactivité avec les éléments oxydants du système, notamment les sulfates dissous. L'activité microbienne est aussi reconnue comme pouvant contrôler la concentration en hydrogène du milieu dans les environnements réducteurs (Hoehler et al., 1998 ; 2001 ; Libert et al., 2010).

La simulation numérique des flux en  $\text{Fe}^{2+}$ , produits par la corrosion dans le système montre qu'ils sont très importants. Néanmoins, une grande partie participe à la précipitation de produits de corrosion du colis, principalement de la magnétite et de la sidérite, à l'interface avec l'argilite (sulfures de fer de type pyrite et pyrrhotite ; aluminosilicates de fer).

Les flux de fer du colis vers l'argilite pourraient donc être fortement limités (Bildstein et Trotignon, 2007).

Selon leur nature, les nutriments peuvent soit migrer dans la porosité, soit précipiter à l'interface entre le colis et l'argilite. Les carbonates, les phosphates et les sulfures libérés lors de la corrosion sont très réactifs en solution, notamment avec le  $Fe^{2+}$  et sont susceptibles de précipiter sous forme de sidérite, de vivianite/apatite et de pyrrhotite/pyrite. Les flux de ces éléments vers l'argilite seront donc certainement limités, voire même inversés (flux de l'argilite vers la zone colis).

A l'inverse, l'ammonium, produit dans la réaction de corrosion du colis, est quant à lui, peu réactif en solution, et donc susceptible de migrer par diffusion dans le milieu.

Par ailleurs, la réactivité à l'interface entre l'acier et l'argilite peut également entraîner une déstabilisation des phases minérales primaires de l'argilite. C'est notamment le cas pour les minéraux carbonatés (sidérite, dolomite et calcite) et pour les sulfates (célestite), et dans une moindre mesure des minéraux argileux. La dissolution de ces phases est donc susceptible de libérer des carbonates et des sulfates en solution.

Ainsi, l'introduction de colis métalliques en environnement argileux entraîne des flux d'éléments significatifs proches de l'interface entre les colis et l'argilite, notamment de nutriments. Le devenir de ces nutriments dans l'environnement du stockage est déterminant pour la localisation d'un possible développement bactérien. La réactivité des éléments nutritifs avec les éléments en solution nous amène à considérer que l'activité bactérienne pourrait être favorisée dans les environnements proches du colis de stockage. En effet, les conditions de viabilité bactérienne dépendent des substrats accessibles qu'ils soient nutritifs ou énergétiques. A cet égard, la zone proche du colis semble regrouper un grand nombre de conditions favorables, notamment la présence d'éléments pouvant permettre des réactions d'oxydoréduction : l'hydrogène en grande quantité et la magnétite (produit de corrosion contenant du  $Fe^{3+}$ ). D'autre part, le phosphore, élément présent en faible proportion dans les environnements argileux profonds ; (et donc limitant pour le développement bactérien) est susceptible d'être localisé uniquement dans l'environnement proche du colis suite à la précipitation de vivianite ou d'apatite.

Ainsi, la zone proche de l'interface semble être une zone très favorable aux développements microbiens, notamment des bactéries ferriréductrices. De plus, cette zone (EDZ) est considérée comme une zone particulière du stockage, car l'excavation de la roche brute peut entraîner des dommages importants notamment en termes de porosité avec la formation de fissures. Cette perturbation pourrait donc favoriser, non seulement la diffusion de nutriments mais aussi l'implantation et le développement de microorganismes.

Par ailleurs, en termes de conditions de température, les calculs d'évolution du gradient thermique montrent que les températures élevées, environ 90°C, dues au dégagement de chaleur des colis, ne perdureront que sur des durées inférieures à la centaine d'années et que pendant la plus grande partie de la vie du stockage la température moyenne se situera autour de 40°C (Andra, 2005).

Malgré le contexte favorable pour le développement de bactéries ferriréductrices dans cette zone, il faut également noter que celui-ci dépend de l'accessibilité au Fe(III) des phases minérales, des argiles et des produits de corrosion (magnétite). La réactivité bactérienne et son impact sur les matériaux du stockage sont directement liés à cette accessibilité. Ainsi, le chapitre suivant est consacré à la biodisponibilité et la réactivité bactérienne sur les phases ferrifères du stockage.





## **PARTIE II :**

### **(BIO)-DISPONIBILITE ET REACTIVITE DU FER DANS LES MATERIAUX :**

#### **IMPACT DES ACTIVITES BACTERIENNES FERRIREDUCTRICES**

---

Dans, les milieux géologiques profonds, l'accessibilité et la disponibilité chimique des éléments nutritifs ou énergétiques contenus dans les phases solides sont des conditions nécessaires à la survie des microorganismes. Lorsque ces éléments essentiels sont prisonniers de structures minérales stables ou résistantes à la dissolution, les bactéries doivent mettre en place différentes stratégies, plus ou moins coûteuses en énergie pour les mobiliser. L'éloignement des réservoirs ou la perméabilité du milieu sont alors des facteurs limitants. Les argilites sont identifiées dans de nombreux concepts comme une barrière de confinement ultime. C'est donc dans les argilites, avec leur très faible porosité structurale, que cette disponibilité en éléments sera la plus limitante et que l'espace disponible au développement bactérien sera le plus contraint. La viabilité de l'activité bactérienne devient alors directement dépendante des flux de nutriments dans un système poreux. Dans ces matériaux destinés au stockage, la biodisponibilité du fer peut être ainsi caractérisée et observée à différentes échelles :

- à l'échelle de la particule (microscopique) où l'accessibilité et la disponibilité sont strictement dépendantes de la texture (cristallochimie, habitus et surface réactives) des minéraux impliqués dans la réactivité. C'est le cas des expériences en microcosme (i.e. réacteur de type batch) où l'argile est parfaitement dispersée (broyée et tamisée à 2 $\mu$ m). La réactivité est alors optimale et il est possible d'observer les mécanismes réactionnels et les interactions bactérie-minéral.
- - à l'échelle de l'échantillon (millimétrique) où l'accessibilité est majoritairement dépendante du volume des matériaux et de la porosité (méso-macro-porosité). C'est le cas des expérimentations sur échantillons macroscopiques de matériaux ferrifères (e.g. argilite) dont la porosité est inférieure à la taille minimale d'une bactérie (100nm).
- enfin, à l'échelle d'une structure réaliste (centimétrique) et organisée (matériaux) afin de tenir compte en plus, de l'aspect volumique et de la densité du matériau.

Ce dernier aspect n'est pas abordé dans ce chapitre, mais dans une approche intégrée (Chapitre 7) et les perspectives de l'étude seront présentées dans la partie discussion/conclusion.

Dans ce travail, la **biodisponibilité du fer(III)** sera étudiée en tenant compte de la réactivité des matériaux argileux ferrifères et des oxydes de fer impliqués dans les processus de corrosion métallique. En effet, le stockage profond est caractérisé par des concepts présentant un système conteneur – argile. Il s'agira ainsi de comprendre la réactivité bactérienne ferri-réductrice impliquant à la fois les matériaux argileux et les composants métalliques.

Cette partie comporte trois chapitres :

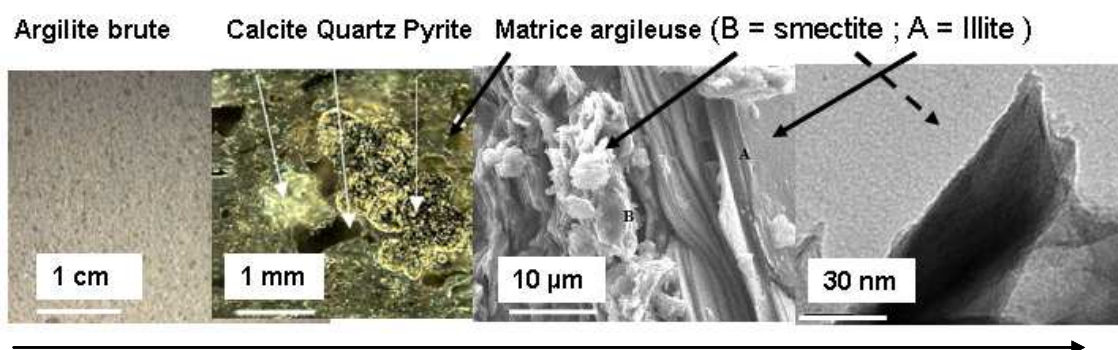
- BIOREDUCTION DU FER(III) DANS LES MILIEUX ARGILEUX (Chapitre IV)
- BIOCORROSION DES MATERIAUX METALLIQUES (Chapitre V)
- MECANISMES DE (BIO)-REDUCTION DU FER(III) EN MILIEU POREUX (Chapitre VI)

## CHAPITRE IV: BIOREDUCTION DU FE(III) DANS LES MILIEUX ARGILEUX

Dans ce chapitre, la réactivité bactérie / minéraux ferrifères est étudiée **d'un point de vue microscopique**. C'est-à-dire, l'accessibilité est strictement dépendante de la surface réactive des matériaux. C'est le cas des expériences en Batch où l'argile est à l'état dispersé (broyée et tamisée à 2 $\mu$ M). Ceci permet d'accélérer la réactivité et d'observer les mécanismes réactionnels des interactions bactérie-minéral.

La disponibilité du Fe(III) et les processus de réduction ferriréductrice des bactéries sont étudiés ici en présence de différents substrats :

- des matériaux complexes de type argilite,
- des matériaux purifiés représentatifs des phases argileuses composant le cortège minéralogique des argilites,
- des smectites, décrites comme étant les minéraux argileux les plus réactifs dans les systèmes argileux étudiés où l'altération est plus précisément suivie.

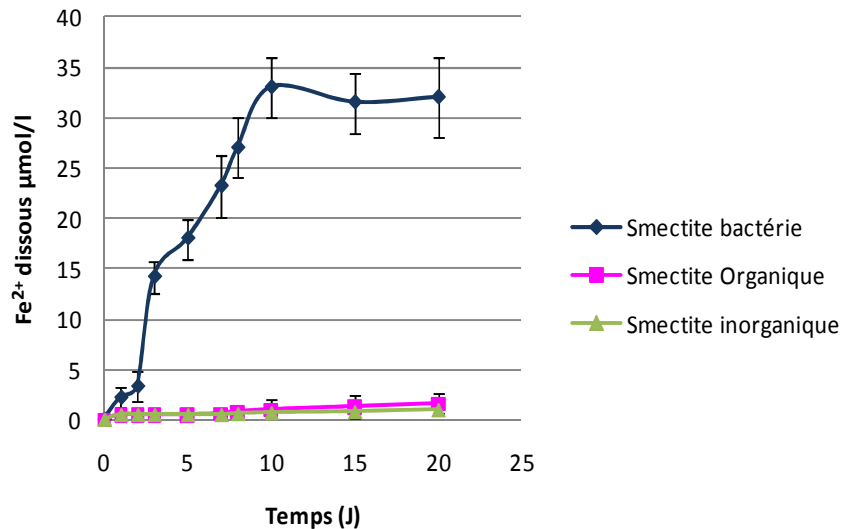


### Méthode expérimentale et de caractérisation multi-échelle de la réactivité IRB-Argile

Les résultats et discussions sont présentés sous forme d'articles scientifiques soumis ou acceptés. En préambule, les principaux traits de l'activité ferri-réductrice des bactéries sont présentés dans un système modèle et serviront de fil conducteur au long de ce mémoire.

## 1. PREAMBULE : ALTERATION BACTERIENNE D'UNE ARGILE FERRIFERE

Afin de caractériser l'impact des processus bactériens de réduction du Fe(III) structural des minéraux argileux, trois séries d'expériences sont réalisées en conditions anaérobies (voir tableau solution chapitre 2) sur une argile modèle, une beidellite ferrifère (1,5mg/ml) en présence ou non de bactéries (*Shewanella oneidensis*). Les deux expériences réalisées en conditions abiotiques en présence de solution (milieu de culture) amendée ou non en matière organique (substrats carbonés et tampons pH) servent de témoin. Le lactate, qui est le seul donneur d'électrons disponible dans le système pour la bactérie *Shewanella oneidensis*, sert à la fois de source d'énergie et de carbone. Le seul accepteur d'électrons dans le système est le Fe(III) structural du minéral argileux considéré.

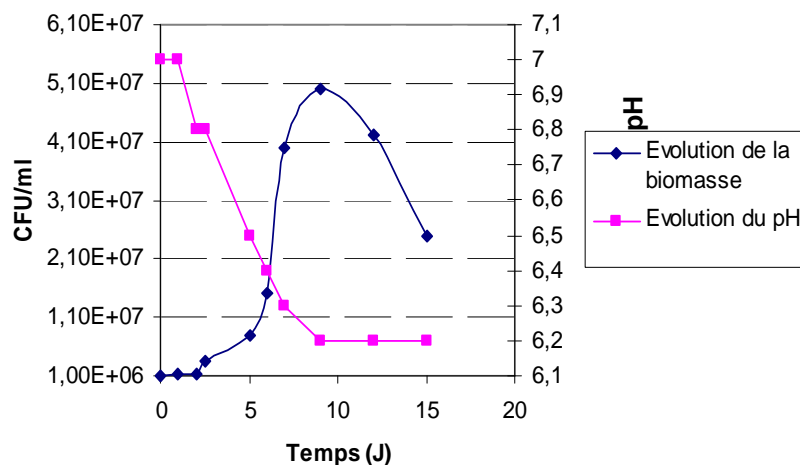


**Figure 37 : Evolution de la concentration en Fe en fonction du temps pour différents agents d'altération d'une beidellite. : 1. *Shewanella oneidensis* MR-1 + Milieu tamponné + Lactate 2. Milieu tamponné + Lactate 3. Milieu = solution minérale voir chapitre II).**

La figure 37, montre une mise en solution progressive du fer structural de la beidellite dans les trois conditions opératoires, qui signe le processus d'altération de l'argile. Cependant, le degré d'altération varie de manière significative entre les expériences abiotiques et biotiques. Les premières ont un comportement similaire et le niveau d'altération reste très faible. En revanche, en présence de bactéries ferriréductrices l'altération est significative avec une augmentation linéaire de la concentration en fer entre 0 et 10 jours qui précède une phase stationnaire.

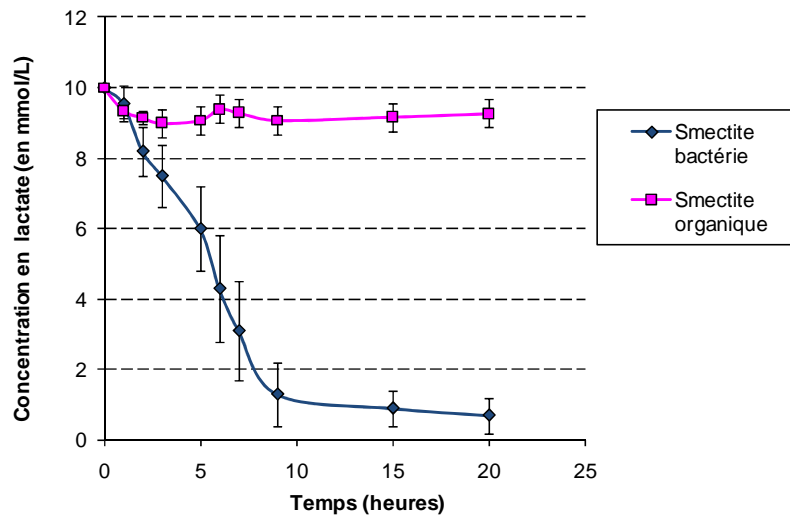
La dissolution de la beidellite est corrélée ici avec l'évolution de trois traceurs de l'activité microbienne, dont l'évolution est décrite sur la figure 38 et 39 ci dessous :

- 1. l'évolution de la biomasse bactérienne en solution
- 2. l'évolution du pH lors de l'oxydation du lactate



**Figure 38 : Evolution temporelle de traceurs de l'activité microbienne (pH, biomasse) lors de la réduction du Fe(III) de la smectite en présence du lactate comme source de carbone et d'électrons.**

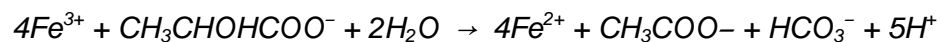
- 3. la consommation du substrat organique, le lactate



**Figure 39: Evolution de la concentration en lactate lors des expériences biotiques (réduction du Fe(III) de la smectite par *Shewanella oneidensis* MR1) et abiotiques.**

L'allure des courbes de la figure 38 est caractéristique de la croissance cellulaire en fonction de la consommation en substrat (ici reflétée par l'évolution du pH). Elle est composée d'une phase de latence (0 et 3 jours), suivie une phase exponentielle (entre 3 et 9 jours) précédant une phase stationnaire (palier), enfin si les conditions ne sont plus favorables, d'une phase de déclin (ici après 10 jours). Cette phase de déclin indique que l'activité bactérienne de réduction et de dissolution du Fe(III) est limitée par la disponibilité du substrat carboné, ici le lactate (figure 39). La dissolution du fer et la transformation de l'argile se poursuivent jusqu'à consommation quasi-complète du lactate marquée par une stabilisation du pH (figure 38). Finalement, les évolutions de la biomasse, du pH, du lactate et du fer sont synchrones et corrélés. Cependant, la concentration en Fe<sup>2+</sup> dissous représente entre 1 et 5 % de la totalité du fer réduit. Le fer réduit reste soit dans la structure de la smectite, soit se sorbe à la surface du minéral ou dans des phases altérées ou bien encore précipite.

Le processus de ferri-réduction obéit à l'équation suivante, qui couple l'oxydation du lactate à la réduction du Fe(III) :



$$\Delta G^0 = -321 \text{ KJ.mol}^{-1}$$

Elle représente le mécanisme de respiration en condition anaérobie (couple énergétique lactate/Fe(III)) des bactéries ferriréductrices.

Ces résultats permettent aussi de valider deux hypothèses de travail :

- L'effet négligeable de la solution Mclay (inorganique ou organique) sur la dissolution et la réactivité de l'argile (Fe<sup>2+</sup>, éléments structuraux de l'argile).
- La corrélation entre les indicateurs d'activité microbienne (pH, biomasse) et les traceurs du processus d'altération (les quantités de fer total ou de Fe<sup>2+</sup> libérées en solution).

## 2. BIOREDUCTION DANS LES SYSTEMES ARGILEUX HETEROGENES

### 2.1. *IMPACT DES ACTIVITES BACTERIENNES FERRI-REDUCTRICES EN MILIEU ARGILEUX COMPLEXE : LE CAS DES ARGILITES*

Le but de cet article est double. Il s'agit de déterminer à la fois l'accessibilité des microorganismes au Fe(III) structural des minéraux argileux contenus dans des argilites et les conséquences d'une activité microbiologique importante sur la stabilité des phases minérales de ces milieux profonds. Il pose aussi la question de la viabilité des microorganismes et de leur activité durable en milieu argileux complexe.

## ARTICLE I

### Impact of iron-reducing bacteria on the properties of argilites in the context of geological radioactive waste disposal

L. Esnault, M. Libert, O. Bildstein & M. Jullien  
*CEA, DEN, DTN, CE Cadarache, St Paul lez Durance, 13108, France*

C. Mustin  
*LIMOS UMR 7137 CNRS-UHP Nancy I, Science Faculty, Vandoeuvre les Nancy cedex,  
54506 France*

F. Marsal  
*IRSN/DSU/SSIAD/BERIS, B.P. 17, 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex*

To be submitted to Applied Clay Science

Résumé : La présence de microorganismes indigènes dans des environnements argileux profonds conduit à s'interroger, dans le contexte de stockage géologique de déchets radioactifs, sur l'influence possible des activités bactériennes sur les propriétés de confinement des matériaux du stockage. Cette étude contribue à la caractérisation de l'impact des bactéries ferriréductrices sur la réactivité dans les environnements argileux profonds, notamment l'argilite en tant que barrière de confinement ultime des colis de déchets radioactifs. Des bactéries capables de réduire le Fe(III) structural au sein d'échantillons d'argilites provenant du site de Tournemire (Aveyron, France) sont étudiées dans des expériences en batch. Les résultats montrent la disponibilité du Fe(III) structural des argilites pour les réactions enzymatiques du métabolisme ferri-réducteur de ces bactéries. L'activité bactérienne active de manière significative l'altération des matériaux argileux, composant les argilites, principalement les interstratifiés Illite/Smectite (I/S). Un mécanisme microbiologique d'illitisation des smectites a ainsi été mis en évidence et implique une bio-réduction du Fe(III) dans les argilites. L'activité bactérienne peut donc impacter les conditions physicochimiques qui prévalent dans ce type de milieu argileux profond.

# Impact of iron-reducing bacteria on the properties of argillites in the context of geological radioactive waste disposal

L. Esnault, M. Libert, O. Bildstein, M. Jullien, F. Marsal, C. Mustin

*CEA, DEN, DTN, CE Cadarache, St Paul lez Durance, 13108, France*

*LIMOS UMR 7137 CNRS-UHP Nancy I, Science Faculty, Vandoeuvre les Nancy cedex, 54506 France*

*IRSN/DSU/SSIAD/BERIS, B.P. 17, 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex*

## Abstract

The presence of indigenous microorganisms in deep clayey environments rises the issue, regarding radioactive waste geological disposal, of the influence of bacterial activity on the confinement properties of materials, including the clayey host rock. Iron-reducing bacteria (IRB) activity is assessed in batch experiments in the presence of argillite samples from the in situ experimental laboratory at Tournemire (Aveyron, France). The results show the availability of structural Fe(III) from the argillite for bio-chemical reactions. A significant impact of IRB on the alteration of clayey minerals, mainly the Illite/Smectite mixed layer (I/S), is observed, which may modify the physicochemical conditions prevailing in such deep clayey environments.

## 1. Introduction

Various radioactive waste disposal designs and strategies are currently being assessed by different countries. Argillaceous formations are considered in several European countries as potential host rocks for disposal of high-level radioactive waste in deep geological formations (OECD, 1999; 2006). For the designs based on a multi-barrier system for radionuclide confinement such as that developed in France, the clayey rock is the last natural barrier which avoids or delays the radionuclide migration into the environment. Their very low water velocity (due to a very low permeability and diffusivity), coupled with a large thickness (several tens of metres) and a high sorption capacity, make these rocks potentially interesting for a repository (Andra, 2005; Jullien et al., 2005).

The confinement capacity of a clayey rock particularly depends on the clay minerals which are present in a high proportion (roughly 40-50%). However, the construction of a disposal facility may lead to perturbations of these minerals, notably within an altered zone with the presence of fractures formed around the excavated disposal cells called excavation damaged zone (EDZ) (Bossart et al., 2002; Charpentier and Cathelineau, 2001). Furthermore, after closure of the cells, water re-saturation and canister corrosion will proceed, releasing iron in reduced conditions. Iron may react with the host rock and alter clay mineral properties (Perronnet et al., 2007, 2008; Lantenois et al., 2005; Jullien et al., 2005; Papillon et al., 2001). Another source of alteration may be due to microbial activities. Indeed, these activities are able to modify the properties of clay minerals (Stucky and Kotska, 2006) and could affect the radionuclide confinement capacity of argillaceous host rocks in the deep multi-barrier environment.

Since the discovery of microorganisms in deep geological environments (Pedersen et al. 1996, Pedersen, 2000a, 2005; Mauclaire et al. 2006; Stroes Gascoyne et al. 2007), the possible life of microorganisms in clayey host rocks investigated for the radioactive waste disposal is questionable. This deep microbial presence should not be underestimated, as investigations have shown its major role in soil mineral transformation phenomena such as bio-mineralisation, biogeochemical weathering, and



redox cycling (Lovley, 1987, 1991; Lovley et al. 1996; Kotska et al. 1996). They also have an impact on the alteration of phyllosilicate minerals (Vargas et al. 1998; Kashefi et al. 2004; Kappler et al. 2005).

Microorganisms in argillaceous formations or in their interstitial water are usually found in very small numbers ( $10^1$ - $10^3$  cells per ml) with poor diversity (Stroes Gascoyne et al., 2007). These results are consistent with argillite characteristics, i.e. small porosity (10-100nm), low available water, and probably limiting nutrient/energetic sources for bacteria metabolism. Indeed, research on microorganism lives and survival capacity inside deep geological disposal conditions should be investigated more precisely in terms of energetic and nutrient aspects. Availability of the sources for microbial development seems to be possible but really depends on the thermodynamic conditions (Esnault, et al. 2009). Furthermore, the presence of indigenous microorganisms like *D. africanus* was recently found in commercial bentonite (Pedersen et al., 2000b; Masurat, et al., 2008). *D. africanus* can survive in a state of desiccation in bentonite at high temperatures and salinity. According to different authors, the microbial activity in these clay environments is strongly decreased with a water activity of  $<0.96$ , a swelling pressure of  $>2$  MPa and for a dry density maintained at  $1.6$  g/cm<sup>3</sup> (Motamedi et al., 1996; Stroes-Gascoyne et al., 2010). Under such conditions, microbial cells are likely to survive as dormant cells or inactive spores. However, disruptions related to the operations of the facilities such as the excavation of tunnels or the introduction of radioactive waste could provide space, water and nutrients able to stimulate the activity of autochthon microorganisms and may lead to the growth of external bacterial communities which will be specific to this environment.

The changes in the oxidation state of the structural iron in clay minerals control their physical and chemical properties in the natural environment (Kim et al. 2005; Jaisi et al. 2007). Many authors have already shown a possible microbial Fe(III) reduction of mineral oxides (Stucki et al., 1987; Roden and Zachara, 1996; Hyacinthe and Bonneville, 2006; Stucki and Bergaya, 2006) or pure Fe-rich clays such as nontronite mineral (Kotska et al., 1996; Dong et al., 2003). For example, as a result of Fe(III) reduction to Fe(II), the specific area of clay minerals decreases, their cation exchange capacity (CEC) increases and their swelling capacity decreases (Stucki and Bergaya, 2006; Stucki and Kotska, 2006). Moreover, it has been demonstrated that a pure culture of bacteria as well as enrichment cultures of Fe(III)-reducing bacteria from rice paddy soil and subsurface sediments are capable of conserving energy for growth with the structural Fe(III) bound in smectite clay as the sole electron acceptor (Acht nich et al., 1995; Boone et al., 1995; Kotska et al., 2002). In this Fe(III)-reduction process, a high diversity of bacteria has been observed in a phylogenetic analysis, i.e. *Clostridium* and *Desulfitobacterium* and *Proteobacterium* (members of the Geobacteraceae) in the natural environment (Kotska et al., 2002). Moreover, there is an alterability hierarchy on the reactivity of minerals, which depends on the nature of the mineral phases directly correlated to the availability of structural Fe(III) clay: smectite  $>$  kaolinite  $>$  illite (Lantenois et al., 2005; Esnault et al., 2010).

The hypothesis considered for the present study is that bacterial communities may use an Fe(III) respiration metabolism from Fe(III)-mineral in the reducing conditions expected in the post closure phase. Besides being ubiquitous in clays and clay minerals (Horne, 1978; Moore and Reynolds, 1997), high amounts of iron from canister corrosion will be produced and may entail a microbial species selection as iron-reducing bacteria (IRB). Moreover, Fe(III) is more thermodynamically energetic for microbial development than other oxidising elements found in deep grounds, e.g. sulphate. The availability for bacterial respiration of structural Fe(III) of clay minerals within clayey formations such as argillite is currently insufficiently determined. The context chosen was a geological environment used for researches related to radioactive waste disposal where the target level is argillite. This study attempts to assess the potential reactivity of argillite in presence of IRB and to determine the target minerals for bacterial alteration.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Experiments

This study was performed in conditions representative for those expected in a deep underground waste disposal during the post-closure phase, i.e. in an anoxic environment and at a temperature of 40°C.

#### 2.1.1 Argillite samples

The argillite samples were collected from a borehole in the Tournemire massif (indurated Toarcien shales) in IRSN's underground laboratory located in the Aveyron region in France. These samples were introduced in aluminised bags and conserved at 4°C. Strict anaerobic conditions were applied during core storage and all stages of the laboratory studies to minimise the oxidation of clayey minerals and organic matter as much as possible. The clay used for experiments has a specific area of 63 m<sup>2</sup>/g which was determined by nitrogen BET analysis. The total iron proportion in argillite is estimated at 5.7% wt. Iron speciation analysis shows the presence of 14% Fe<sup>3+</sup> related to total iron, mainly in clayey minerals (Esnault et al. 2010).

#### 2.1.2 Bacteria

Two anaerobic bacteria have been chosen for the clay-bacteria experiments: the iron-reducing bacteria (IRB) *Shewanella oneidensis* strain MR-1 (CIP\* 106686) and *Clostridium aurantibutyricum* (793T DSMZ). *S. oneidensis* strain MR-1 has been isolated from anoxic sediments in Lake Oneida, NY (Myers and Nealson, 1988) and has been the subject of many physiological and genetic studies on *S. oneidensis* (Saffarini et al. 1994). MR-1 is an obligate-respiratory bacterium incapable of fermentation (Scott and Nealson, 1994). The second, *Clostridium aurantibutyricum*, is a fermentative bacterium with a efficient metabolism which can produce a high proportion of organic acid (acetic acid, butyric acid) and is involved in iron(III) reduction in soils (Stemmler et al. 2004), as well as in the reduction of goethite (Dominik et al. 2002).

*Shewanella oneidensis* MR-1 and *Clostridium aurantibutyricum*, were grown initially in a pre-culture (Mclay medium) with 50mM Fe(III) citrate as the electron acceptor prior to transfer bacterial pellet into experimental reactors with argillite.

#### 2.1.3 Batch System

Two types of experiments (abiotic and biotic) were performed in anaerobic sterile Teflon reactors. A synthetic medium (Mclay) similar to the chemical composition of the natural argillite interstitial water (Beaucaire et al. 2008) supplemented by a concentration of phosphorus and nitrogen to avoid limited bacterial development was prepared using 18 MΩ-0.2 micron-filtered water and sterilization by heating according to Kotska et al. (1996). Cultures were washed 3 times with the medium and then transferred to the anaerobic sterile Teflon reactors containing 100 mL of the culture medium (Mclay). A total of 2.0 mg/ml of sterile argillite (irradiated with a cobalt irradiator at 35 kGy) was added with 20 mM of glucose or 20mM of lactate for the *Clostridium* and *Shewanella* species experiments respectively as unique electron donor in the system. Anaerobic conditions were obtained by bubbling a gas mixture: 90% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>. These batch reactors were incubated under mixing at 40°C in the dark. Three replicates were performed for each biotic or abiotic experiment at pH 7. Control experiments were carried out in the same conditions without bacteria between pH 5 and 7. All the samples were taken under strict anoxic conditions in an anaerobic glove box (90% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

The initial cell density of all cultures,  $1 \times 10^7$  cell.ml<sup>-1</sup>, was estimated by the relationship between the optical density (absorbance at 500 nm) and the direct cell count (microscopy).

## 2.2 Analyses

### 2.2.1 Geochemical analyses:

Bacterial reduction was followed by the chemical analysis of donor and acceptor electron variations in solution. Electron donors were measured using ionic chromatography (Varian® 9050 detection by variable UV-VIS wavelength; Column MetaCarb 67H and eluting H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.01N) for lactate concentration, and with a glucose meter (EBIO Compact Eppendorf®; detection by glucose oxidase membrane Biosen®) for the glucose concentration.

The experimental solution was monitored over time for total Fe (dissolved Fe(II)+Fe(III)), Si, Al, and other solutes which can react with clay minerals like Ca, K, Mg and Na. This was done by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (Ultra-trace 2000 ICP-AES, Jobin Yvon®).

### 2.2.2 Mineralogical analyses

Clay samples were characterized initially and after reaction by X-Ray Diffraction (XRD). At the end of each experiment, the crushed rocks were collected and washed carefully twice with 50 mL ultrapure water. Slurry of the final suspension was deposited on XRD-dedicated glass slides and air-dried to enable a favourable orientation of the particles for an efficient diffraction. XRD scans were recorded between 2 and 40°2θ (counting time of 2s per 0.02°2θ step size) with a Bruker D8 diffractometer (Cu radiation at 40 kV and 40 mA) equipped with a Göbel mirror and a Sol-X detector.

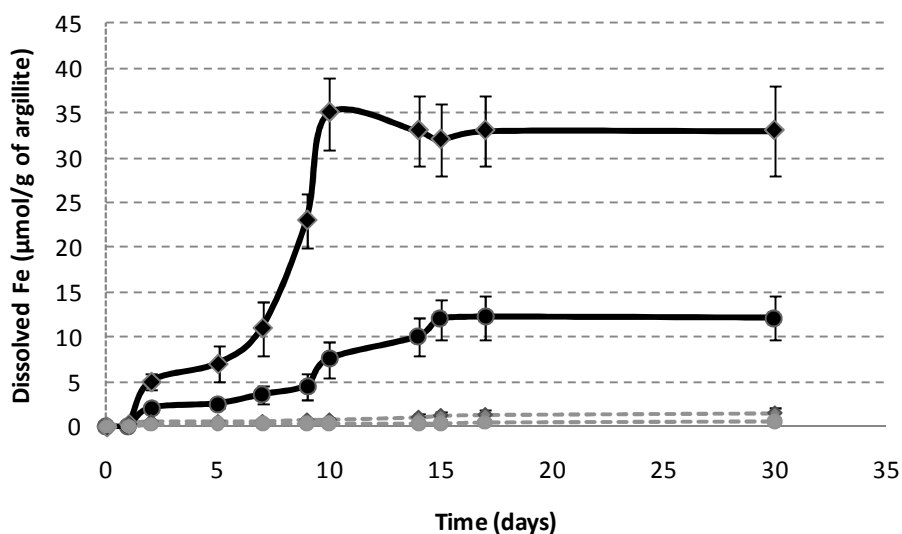
Scanning Electron Microscopy (SEM) was performed using Philips® XL 30 and EDX analyses were performed with a large window Si-Li detector (Oxford Instrument). Semi-quantitative analyses were calculated with INCA®-Oxford Instrument software providing total atomic percentage for each analysis.

Transmission Electron Microscopy (TEM) was used to identify the evolution of the initial composition of argillite samples after interaction with bacteria: the structural and chemical evolution and some primary and secondary mineral phases were analyzed. Slurry of the final suspension was deposited on TEM-dedicated 200 mesh carbon slides and air-dried during 24 h. The observations were performed on a JEOL 2000 FX Transmission Electron Microscope at 200 kV with a point by point resolution of 2.7 Å. EDX analyses were performed with a large window Si-Li detector (Oxford Instrument) and a super atmospheric thin window (SATW) slit of 30 mm<sup>2</sup>. In convergent mode, spectra were acquired in one minute with a death time < 20% and a global count number of 500-2000. Semi-quantitative analyses were calculated with the above INCA®-Oxford Instrument software. Mean structural formulae have been built on set of selected crystallite analyses without any accessory mineral contamination.

The cationic exchange capacity was measured on argillite in biotic and abiotic experiments using an ethylenediamine complex of Cu according to Bergaya and Vayer (1997) in order to determine the microbial influence on the sorption capacity of the argillite, e.g. retention as an indicator of clay reactivity (Perronnet et al. 2008). The results are based on an average of 3 replicates for each sample.

### 3. Results

#### 3.1 Bacterial reduction of Fe(III) from argillite minerals



**Fig. 1.** Dissolution of Fe from argillite during the structural Fe(III) reduction of clay minerals by IRB (average of 3 replicates). The black curve represents biotic experiments (circle for *Shewanella* sp and diamond for *Clostridium* sp). The abiotic experiments are plotted with grey circles for the experiment at pH 7 and with diamonds for the experiment at pH 5.

In the presence of bacteria (*Shewanella* sp or *Clostridium* sp), the dissolved Fe concentration increases in the solution over time (Figure 1), induced by the alteration of iron-rich minerals. Dissolution is higher for *Clostridium* sp than *Shewanella* sp and the kinetics are much faster. The iron concentration of 35  $\mu\text{mol/g}$  and 13  $\mu\text{mol/g}$  of argillite found in solution corresponds to 2.2% and 6.7% of total Fe in argillite for the *Clostridium* sp. and *Shewanella* sp. experiments respectively. The dissolution of argillite minerals in the presence of bacteria was found to be linear up to 10 days for *Clostridium* sp and up to 15 days for the *Shewanella* sp. This step was followed by a stationary state until the final 30 days of sampling. During these dissolution experiments, bacterial activity promotes a decrease in the pH (from pH = 7 to pH = 5.3 for *Clostridium* sp. and to pH = 6.2 for *Shewanella* sp). In order to differentiate Fe(III) bioreduction from the effect of organic acid on argillite dissolution, two abiotic controls were performed at two pH levels (pH = 5 and pH = 7 with glucose and lactate as organic compounds respectively) commonly used in final biotic experiments. Contrary to biotic experiments, the experiments showed the poor dissolution of the clay minerals in abiotic conditions, with a Fe concentration < 2  $\mu\text{M}$  (1.2 $\mu\text{mol/g}$  and 1.9 $\mu\text{mol/g}$  of argillite for pH = 7 and pH = 5 respectively). These abiotic results show that argillite may sustain alteration by iron-reducing bacteria directly through structural Fe (III) reduction activities.

Moreover, bacterial activities are accompanied by the consumption of organic compounds (lactate for *Shewanella* sp. and glucose for *Clostridium* sp.). *Shewanella* sp is an obligate-respiratory bacterium incapable of fermentation, which means that the consumption of lactate is coupled with the reduction of oxidising elements such as Fe(III) minerals in the system (Figure 2). The low consumption of organic compounds can be observed in abiotic experiments and could be explained by a sorption effect on minerals (Figures 2 and 3).

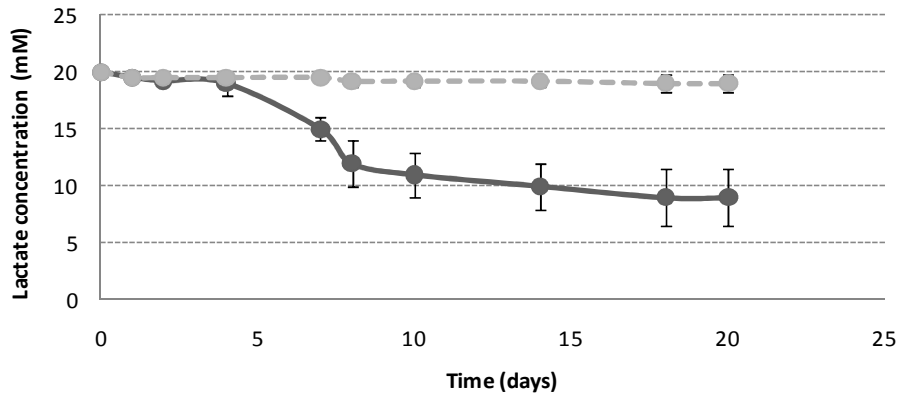


Fig. 2. Lactate consumption with or without *Shewanella oneidensis* MR-1 during Fe(III) respiration of argillite (average of 3 replicates). The abiotic experiment (control) is represented in grey, while the biotic experiment is represented in black.

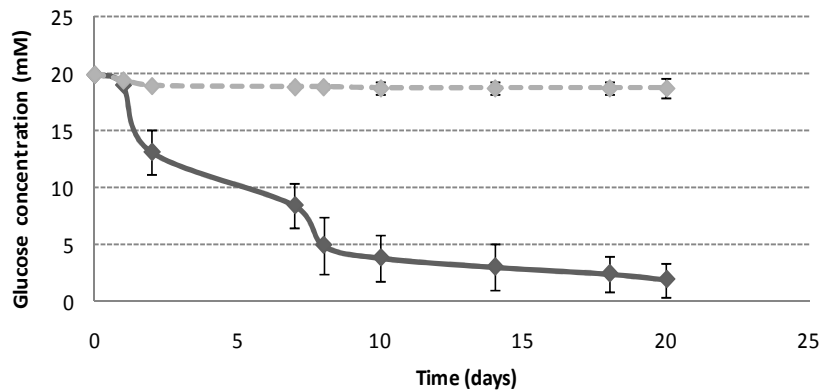


Fig. 3. Glucose consumption by *Clostridium aurantibutyricum* during Fe(III) respiration of argillite (average of 3 replicates). The abiotic experiment is plotted in grey while the biotic experiment is plotted in black.

The consumption of organic compounds by IRB species may also explain the difference between bacterial alteration kinetics. Glucose or lactate oxidation by *Clostridium* sp and *Shewanella* sp respectively are directly related to iron solubilisation (Figure 1 to 3). In the case of *Clostridium* sp, there is no latency phase, and the fermentation of glucose produces organic compounds and molecular H<sub>2</sub> which may indirectly reduce Fe(III). On the contrary, lactate consumption by *Shewanella* sp. seems to begin after a latency phase explained as a dependency to the bioavailability of the Fe(III) mineral. The nature of the organic substrates and the microbial activity play an important role in the Fe(III) reduction of the minerals. This additional energy significantly increases the dissolution of clay minerals.

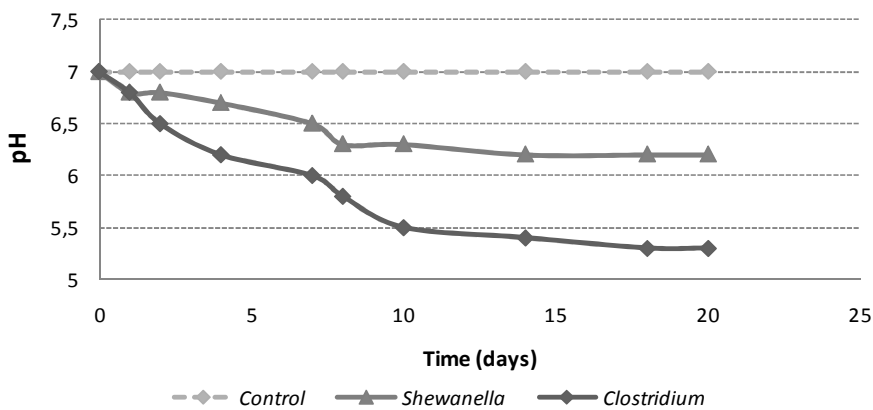


Fig. 4. Evolution of pH during bacterial experiments

According to the results presented above (Figure 4), bacterial activity promotes a decrease in the pH from 7 to 6.2 for *Shewanella* sp. and to pH=5.3 for *Clostridium* sp.

### 3.2 Impact on the cationic exchange capacity of argillite

The two biotic experiments show variations in the cationic exchange during microbial Fe(III) reduction (Figures 5 and 6). After the introduction of argillite in the batch experiment, we observe equilibrium between calcite and solution with a prior dissolution of carbonate minerals (1 mM to 1.5 mM) in both experiments. During bacterial activity, physicochemical modification is observed in solution by a sharp increase in the Ca concentration directly resulting from calcite dissolution (from 1.5 mM to 1.8 mM for *Shewanella* sp. and from 1.5 mM to 7.2 mM for *Clostridium* sp.). In the case of the *Clostridium* sp experiment (Figure 6), there is a decrease in the Ca concentration in solution (from 7.2 mM to 5.0 mM), before reaching an equilibrium concentration of 5.8 mM at the end of the bacterial activity (precipitation of Ca minerals will be described in the section on clay mineral alteration).

Moreover, a decrease in the cation (Na, K and Mg) concentration in solution can also be observed during the microbial activity (5 to 15 days for the *Shewanella* sp. experiment, and 2 to 15 days for the *Clostridium* sp. experiment). The following cation exchange proportion can be observed:

- K = 11% ( $\pm 2\%$ ) and 42% ( $\pm 5\%$ ) for *Shewanella* sp. and *Clostridium* sp. respectively,
- Mg = 19% ( $\pm 3\%$ ) and 9% ( $\pm 2\%$ ) for *Shewanella* sp. and *Clostridium* sp. respectively.

Contrary to the biotic batches, the abiotic experiments show no sensitive variation of these cations (Na, K, Mg) in solution. Therefore, IRB activity promotes a new distribution of cations between initial material and bio-altered phases. The appearance of new gel phase resulting from alteration argillite minerals could support global increase in CEC.

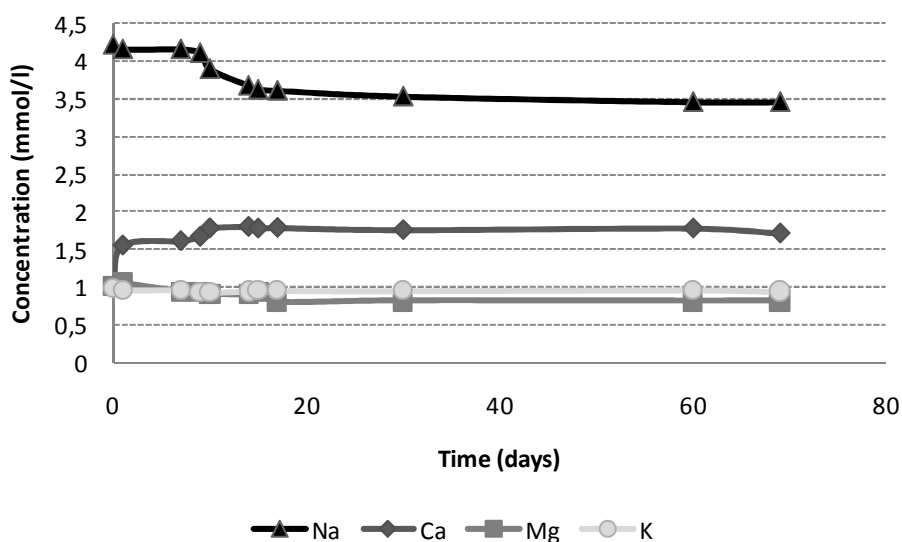


Fig. 5. Variation in the exchangeable cations in solutions during the *Shewanella* sp experiments (average of 3 replicates).

In these experiments, chemical analyses did not detect a significant concentration of aluminum in the solution of batch experiments.

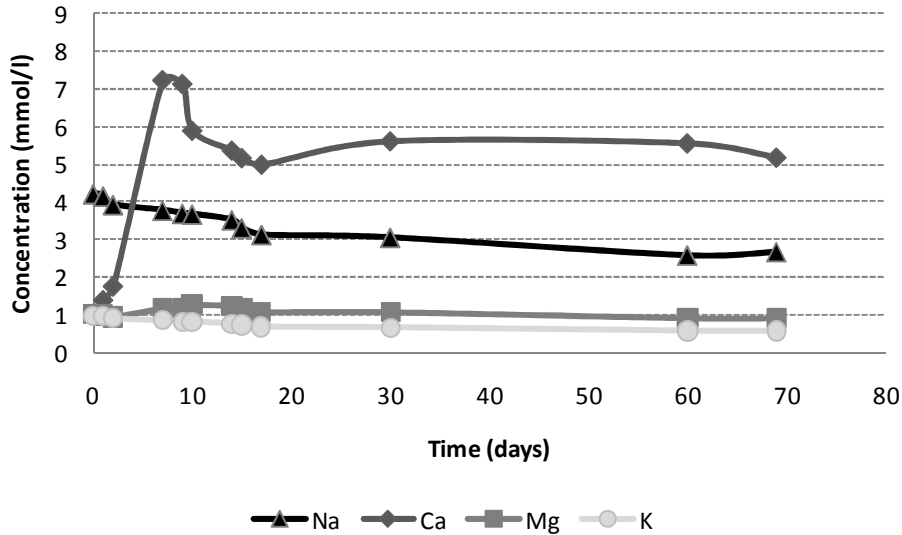


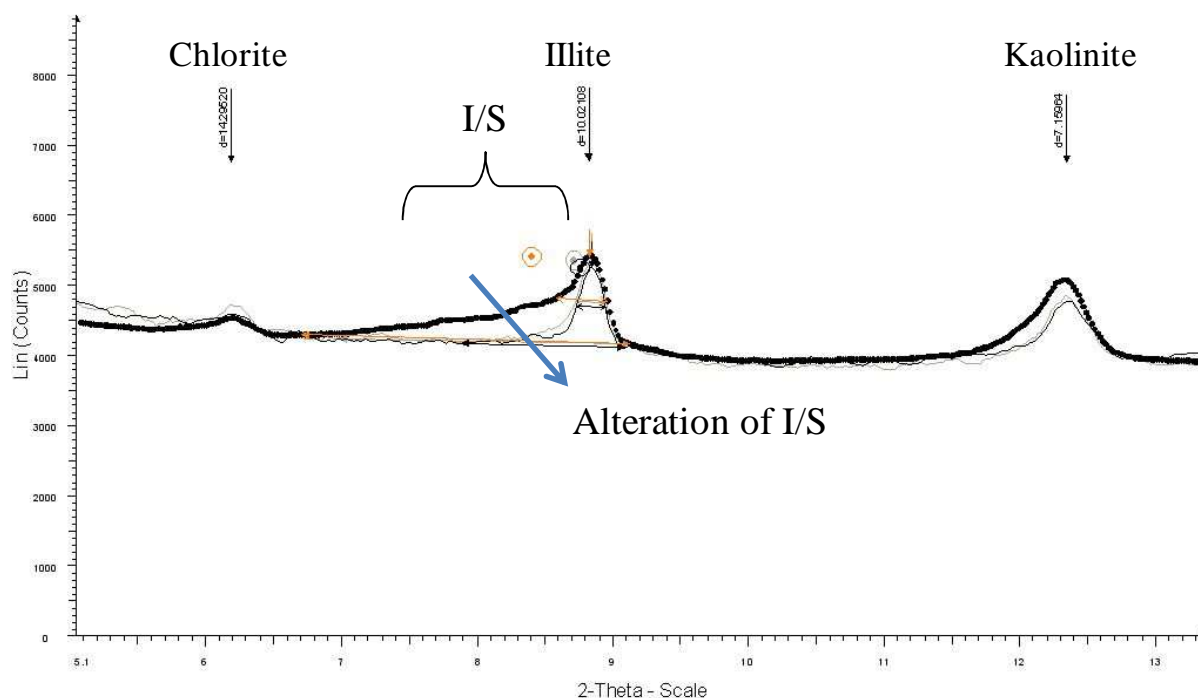
Fig. 6. Variation in the exchangeable cations in solution during the *C. aurantibutyricum* experiments (average of 3 replicates).

Measurement of the cationic exchange capacity (CEC) of the argillite samples used in experiments shows significant modifications. Whereas chemical analysis show more variations in the exchange cationic elements in *Clostridium aurantibutyricum* experiments, the measurement of CEC shows a capacity higher for *Shewanella* sp than *Clostridium aurantibutyricum* experiments at  $13 \pm 1$  and  $10 \pm 1$  meq/100 g respectively. These values are higher or equal than the abiotic experiments i.e.  $9 \pm 1$  meq/100 g. Like other studies (Stucki, 2006; Stucki and Kotska, 2006) on pure smectite mineral, bio-reduction entails an increase in the CEC. However, cation exchange seems to be less available depending on the bacteria in question. Cations are probably fixed on secondary phases.

### 3.3 Impact on argillite mineral

#### 3.3.1 Alteration of clay mineral phases

XRD spectra show the impact of bacterial respiration of Fe(III) of argillite (Figures 7 and 8). During bacterial alteration, I/S interlayer disappears significantly (Figure 7). Peak areas of I/S spectrum for biotic experiments decrease significantly compared with the abiotic experiment (net area: 162.4) and are dependant on the bacterial activity (net area = 118.4 and 101.9 for *Shewanella* sp and *C. aurantibutyricum* respectively). The smectite phase appears as seems to be the most sensitive mineral to bio-alteration. Thus, The smectite phases were commonly described as the most reactive clay minerals in such environments (Jullien et al., 2005), , and represents here also the main target for bacterial activity in order to reach the structural Fe(III). This process, which is essential to IRB life, may allow growth and sustainable development in this deep geological environment.



**Fig. 7.** XRD spectrum of argillite - zoom of the fraction of oriented clay minerals. The abiotic experiment (dotted black line), the *Shewanella sp* experiment (thin grey line) and the *C. auranbutyricum* experiment (thin black line) are plotted according to the clay size ( $d$  in nm). The pick at  $14.3\text{\AA}$  corresponds to the chlorite phase, the peak at  $10.02$  corresponds to the illite phase, and the peak at  $7.16$  corresponds to the kaolinite phase. The Illite/smectite mixed layer (I/S) zone is represented on the graph. Observed replicates for each sample show a reproducible result.

### 3.3.2 Alteration of argillite minerals

As previously described, the physicochemical parameters (notably pH) change during the microbial Fe(III) reduction of clay minerals. This phenomenon is highlighted by the dissolution processes of carbonated phases and carbonaceous cements in the XRD spectra, mainly as calcite ( $d= 3.03\text{\AA}$ ;  $2.28\text{\AA}$ ;  $2.09\text{\AA}$ ;  $1.91\text{\AA}$ ;  $1.87\text{\AA}$ ) and dolomite ( $d= 2.89\text{\AA}$ ) for *Clostridium auranbutyricum* experiment (Figure 8). The siderite peak ( $d=2.79\text{\AA}$ ) and the ankerite peak ( $d=2.86\text{\AA}$ ) remain stable in all XRD spectra. However, Mg-calcite appears as a secondary mineral for the reactivity involving the *Clostridium auranbutyricum* ( $d= 2.98\text{\AA}$ ). This precipitation could explain the decrease in the Ca concentration in solution during the experiment.

The second event in terms of mineral alteration is the new formation of K-feldspath mineral ( $d= 3.18\text{\AA}$ ) influenced by bacterial activity. .

The third main result is the lack of any significant alteration/dissolution of pyrite ( $d= 3.12\text{\AA}$ ;  $2.70\text{\AA}$ ;  $2.42\text{\AA}$ ;  $1.63\text{\AA}$ ). This is another indicator for the microbial mechanisms of reduction/dissolution of iron rich minerals from clay fractions.



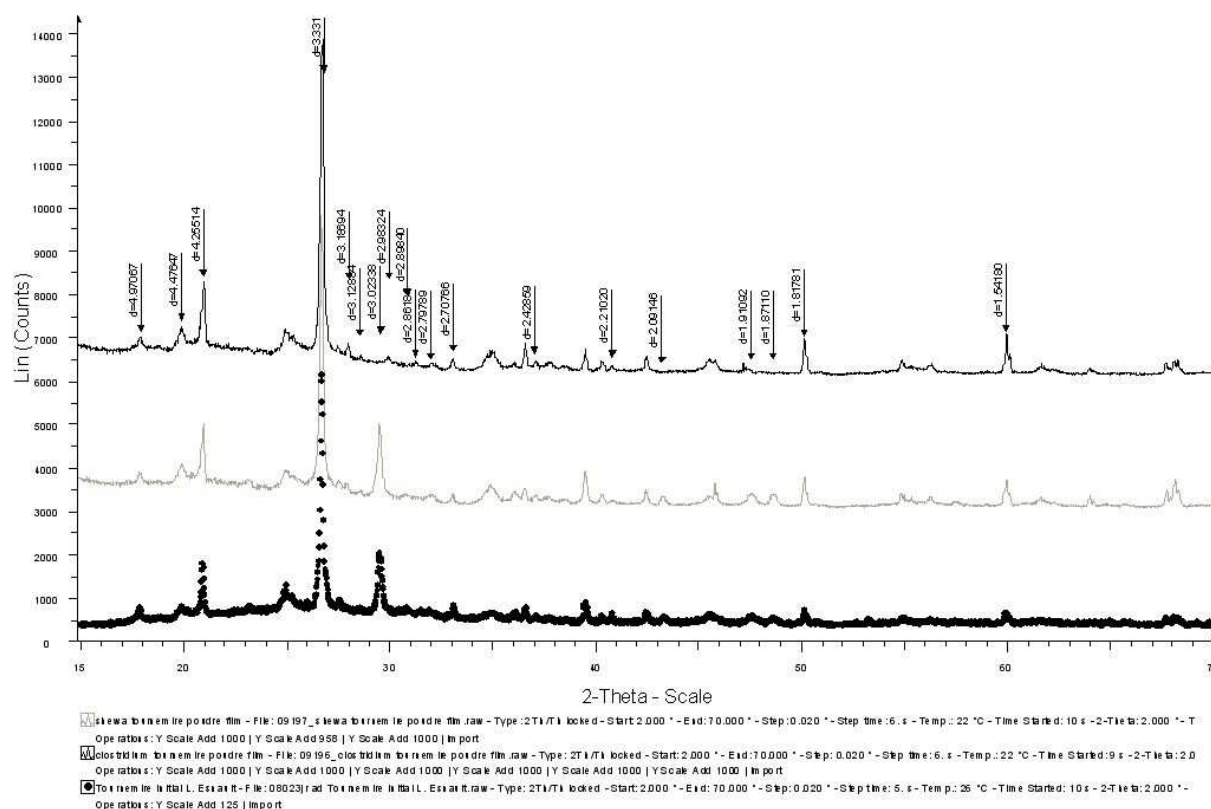


Fig. 8. XRD spectrum of argillite -zoom of argillite mineral fractions. The abiotic experiment (dotted black line), the *Shewanella sp* experiment (thin grey line) and the *C. aurantibutyricum* experiment (thin black line) are plotted in this figure according to the clay size ( $d=nm$ ).

### 3.3.3 Microscopic evidence of argillite bioalteration

Microscopic SEM examinations (Figure 9) have shown significant amorphous gel in biotic experiments (Pictures 1 and 2), which is induced by mineral dissolutions. These “gel phases” – not observable in XRD – are able to fix cations from solution. Bio-reduction effects are visible with the neo-formation of illite as rodlike form from the I/S mixed layer mineral dissolution (Picture 2). This rod-like form is characteristic of illite new-crystallization (Credoz et al. 2010). The crystallisation of minerals occurs after a first phase of weathering “gel”. These “gels” consist essentially of silicon with an enrichment K and Fe. In this illite formation, an increase in the concentration of Fe and K is observed in the structure compared with the I/S phase (table 1). The second indication of Fe(III) microbial reduction is the formation of iron phosphate mineral, vivianite ( $Fe_3(PO_4)_2$ ), surrounding the I/S mixed layer mineral (Picture 4). This new crystallisation is not significant considering the low concentration of phosphorus in interstitial water in the studied underground environment but here, it illustrated a convergence of the Fe reduction potential of IRB species on clayey rocks. At last, no relevant pyrite alteration can be observed in the biotic experiment (Picture 3) compared with the abiotic experiment.

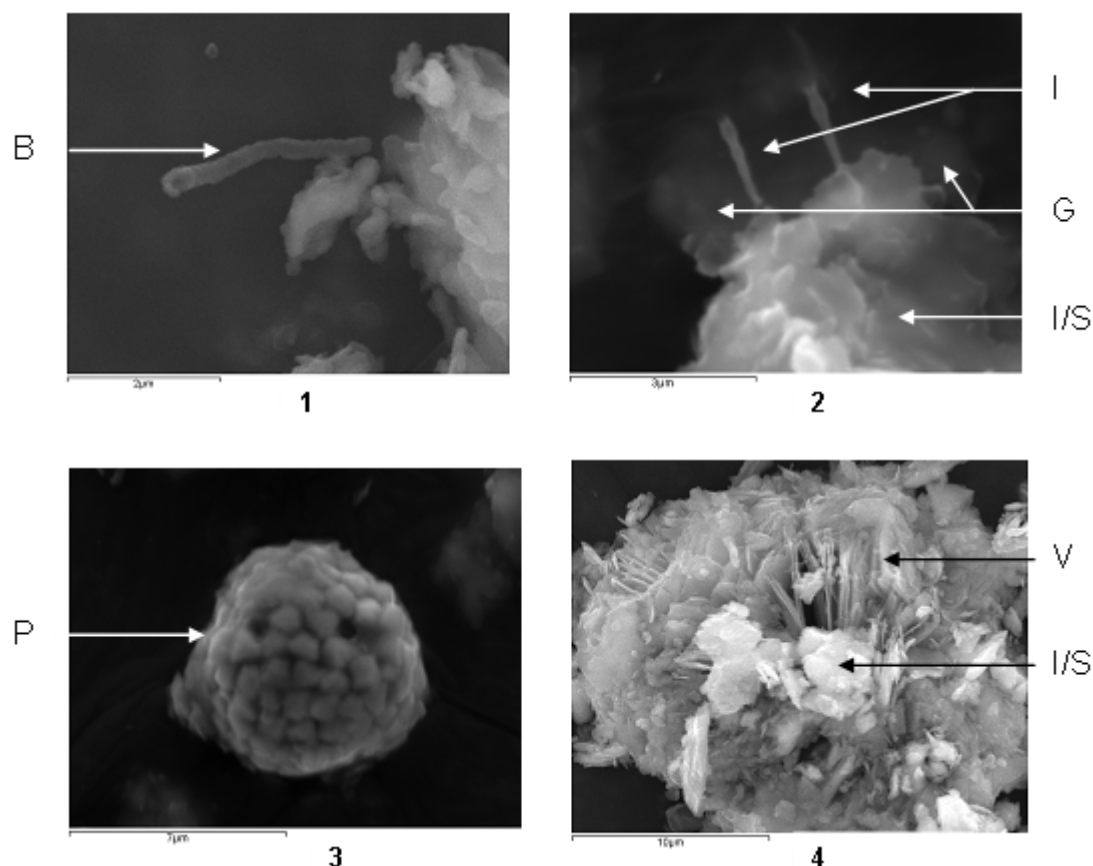
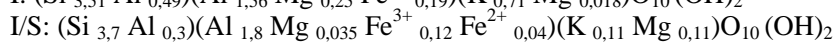
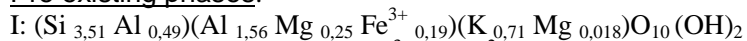


Fig. 9. (1-2-3-4): Evidence of bio-alteration by scanning electronic microscopy. 1: *Shewanella* sp (B) in contact with the clay minerals of the argillite sample. 2: Crystallisation of illite rodlike (I) and “gel” alteration (G) in *Clostridium* experiments. 3: Presence of pyrite (P) in framboidal form in the biotic and abiotic experiment. 4: Bio-alteration of the illite/smectite mixed layer (I/S) and the formation of vivianite (V) as secondary minerals.

Pre existing phases:



New-crystalised phase:

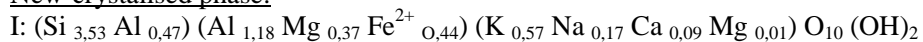


Table 1: Structural mineral analysis by TEM for the biological experiment. These results are a representative average of several EDX analyses for each reported clay mineral.

#### 4. Discussion and conclusion

The form and concentration of reactive Fe(III) minerals are of paramount importance to the environmental significance of microbial Fe(III) reduction in sedimentary environments (Kotska et al., 2002). Clay minerals are of particular importance due to their high reactive potential and account for a large fraction of Fe-containing minerals in nature (Komadel and Stucki, 1988; Kotska et al. 1999). In deep clayey environments such as argillite rocks, energetic reaction's rates are weak and are usually considered to be promoted by very slow redox processes, which are controlled by mineral phases that have a low reactivity such as Iron sulphurs, sulphates and oxides. These conditions are enhanced by

properties of the clayey rocks, such a low velocity (permeability and diffusivity) which limits their perturbations (Cabrera et al. 2001).

However, clay minerals are not devoid of any energetic phases. Microbial activities may highlight the reactive phases in the argillite and their exchange potential with the external environment. Although found in small quantities, the proportion of Fe(III) in clay minerals is sufficient to provide the required energy for bacterial development. In the presence of electron donors (natural organic matter), IRB can access the structural Fe(III) of clay minerals (mainly located in the I/S mixed layer zone) for respiration. Thus, Fe(III) from argillite is available for bio-chemical reactions in the system. A major impact of the bio-reduction processes is the dissolution of the illite/smectite mixed layer phase. Use of 2 different bacteria with specific activities, has allowed to determine main stages of the mineral reaction induced by microbial structural Fe(III) reduction.

- First stage was observed in *Shewanella* experiments. Microbial Fe(III) reduction entails a dissolution of smectite phases and the formation of reactive phases “gels and relicts of smectite” which increase cationic exchange between cations of the solution and solid, when bacterial activity is “less”.
- Second stage was observed in *Clostridium* experiments. Microbial Fe(III) reduction allows the smectite to illite transformation, that induces an increase of less reactive phases (illite), when bacterial activity is “high”.

In this last case, this will cause a decrease in the argillite cation retention capacity and thus a less favorable radionuclide delay in the case of radionuclide migration processes. The formation of less-reactive phases such as illite during the bio-reduction of smectite is consistent with other experiments (Kim et al. 2004) ; it could be a key mechanism to account for when assessing the evolution of clayey barrier properties. Moreover, microbial activity may influence and control physicochemical parameters such as the pH (decrease) of the system and could play a role in the barrier porosity (increase) by the dissolution of calcite which is the mineral binder of the clay matrix.

In radioactive waste disposal systems, electron donors could be found in higher quantities than natural deep clayey environment. Actually, the small amount of organic matter in this environment (roughly 1%) considered as low energetic matter and related to the high level of maturation (Deniau et al. 2008) could be supplied by another energetic source. In these deep geological conditions, the energetic supply could be provided by H<sub>2</sub> resulting from the corrosion of the metallic containers. H<sub>2</sub> as a new energetic element will not be limiting for bacterial growth and could be decisive in the selection of microbial species as hydrogenotrophic bacteria (Lin et al. 2005; Libert et al. 2010).

Finally, the anthropogenic perturbation of clayey barriers could promote the development of hydrogenotrophic IRB species in deep geological repositories. Bioavailability of energetic and nutrients sources, such as H<sub>2</sub> and Fe(III), are essential for such bacterial activity. It has been shown that IRB species could significantly impact the clayey material by bioreduction of structural Fe(III). This study thus demonstrates that IRB could have a direct influence on the confinement properties of argillite, particularly through biological controls on the stability of mineral phases (smectite and calcite) in deep clayey environments. More generally, bacterial activity could be an important parameter on clay mineral alteration and should be taken into account within the studies carried out as support of the safety assessment of waste disposal.

## Références

- Acht nich, C., Schuhmann, A., Wind, T., Conrad, R., 1995. Role of interspecies H<sub>2</sub> transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic Paddy soil. *Fems Microbiol. Ecology* 16, 61-69.
- Andra, 2005. Dossier argile 2005 : Tome architecture et gestion du stockage géologique. Rapport Andra..
- Beaucaire, C. Michelot, J.L., Savoye, S., Cabrera, J., 2008. Groundwater characterisation and modelling of water-rock interaction in an argillaceous formation (Tournemire, France). *Appl. Geochem.* 23, 2182-2197.

- Boone, DR., Liu, Y., Zhao, ZJ., Balkwill, DL., Drake, GR., Stevens, TO., Aldrich, HC., 1995. *Bacillus infernus* sp. Nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 441-448.
- Bossart, P., Meier, P.M., Moeri, A., Trick, T., Mayor, J. C., 2002. Geological and hydraulic characterisation of the excavation disturbed zone in the Opalinus Clay of the Mont Terri Rock Laboratory. *Engineering Geol.* 66, 19-38.
- Cabrera Nunez, J., Beaucaire, C., Bruno, G., De Windt, L., Genty, A., Ramambasoa, N., Rejeb, A., Savoye, S., Volant, P., 2001. Projet Tournemire. Synthèse des programmes de recherche 1995-1999. Institut de Protection et de Sûreté Nucléaire, Département de Protection de l'Environnement, Service d'Etudes et de Recherches sur la Geosphère et l'Élimination des Déchets. Fontenay aux Roses, DPRE/SERGD 01-19, 202.
- Charpentier, D., M. Cathelineau M., 2001. Mineralogical evolution of argillites in dehydrated-oxidised zones: the example of the argillitic walls from Tournemire (Aveyron-France) tunnel. *C. R.A.S. Series IIA Earth and Planetary Science* 332, 601-607.
- Creoz, A., Bildstein, O., Jullien, M., Raynal, J., Trotignon, L., Pokrovsky, O., 2010. Mixed-layer illite-smectite reactivity in acidified solution. Implications for clayey caprock stability in CO<sub>2</sub> geological storage. *App. Clay Science*, in press.
- 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(2-3), 475-485.
- Dominik, P., Pohl, H.N., Bousserhine, N., Berthelin, J., Kaupenjohann, M., 2002. Limitations to the reductive dissolution of Al-substituted goethites by *Clostridium butyricum*. *Soil Biology Biochem.* 34, 1147-1155.
- Dong, H., Kostka, J.E., Kim, J.W., 2003. Microscopic evidence for microbial dissolution of smectite. *Clays Clay Miner.* 51, 502-512.
- Esnault, L., Libert, M. Bildstein, O. Jullien, M., 2010. Clay-Iron Reducing Bacteria interaction in deep geological environment: experimental and modeling approach. *Water-Rock Interaction* 13, 939-942.
- Esnault, L., Libert, M., Jullien, M., Mustin, C., 2009. Availability of nutrient sources for bacterial development in deep clay environments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 73, A338.
- Faiza Bergaya, G.L., Vayer, M., 1997. CEC of clays: Measurement by adsorption of a copper ethylenediamine complex. *Appl. Clay Science* 12, 275-280.
- Gales, G., Libert, M., Sellier, R., Cournac, L., Chapon, V., Heulin, T., 2004. Molecular hydrogen from water radiolysis as an energy source for bacterial growth in a basin containing irradiating waste. *FEMS Microbiol. Lett.* 240, 155-162.
- Horne, R. A., 1978. *The Chemistry of Our Environment*. Wiley, New York.
- Hyacinthe, C., Bonneville, S., 2006. Reactive iron(III) in sediments: Chemical versus Microbial extractions. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70 (16), 4166-4180.
- Jaisi, D.P., Dong, H. L., Liu, C. X., 2007. Influence of biogenic Fe(II) on the extent of microbial reduction of Fe(III) in clay minerals nontronite, illite, and chlorite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 1145-1158.
- Jullien, M., Kohler, E., Raynal, J., Bildstein, O., 2005. Physicochemical Reactivity in Clay-Rich Materials: Tools for Safety Assessment. *Oil Gas Science and Technol. Rev. IFP* 60, 107-120.
- Kappler, A., Pasquero, C., Konhauser, K.O., Newman, D. K., 2005. Deposition of banded iron formations by anoxygenic phototrophic Fe(II)-oxidizing bacteria. *Geology* 33, 865-868.
- Kashefi, K., Holmes, D. E., Lovley, D.R., Tor. J.M., 2004. Potential importance of dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms in hot sedimentary environments, In Wilcock, W.S. D, DeLong, E.F., Kelley, D.S., Baross, J.A., Cary, S.C. (eds.), *The seafloor biosphere at mid-ocean ridges*. American Geophysical Union, Washington DC, 144, pp.119-211.
- Kim, J., Dong, H.L., Seabaugh, J., Newell, S.W., Eberl, D. D., 2004. Role of microbes in the smectite-to-illite reaction. *Science* 303, 830-832.
- Kim, J.W., Furukawa, Y., Dong, H.L., Newell, S. W., 2005. The effect of microbial Fe(III) reduction on smectite flocculation. *Clays Clay Miner.* 53, 572-579.

- Komadel, P., Stucki, J. W., 1988. Quantitative assay of minerals for Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> using 1,10-phenanthroline: A rapid photochemical method. *Clays Clay Miner.* 36 (4), 379-381.
- Kostka, J.E., Dalton, D.D., Skelton, H., Dollhopf, S., Stucki, J. W., 2002. Growth of iron(III)-reducing bacteria on clay minerals as the sole electron acceptor and comparison of growth yields on a variety of oxidized iron forms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6256-6262.
- Kostka, J.E., Stucki, J.W., Nealson, K.H., Wu, J., 1996. Reduction of structural Fe(III) in smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* strain MR-1. *Clays Clay Miner.* 44, 522-529.
- Kostka, J.E., Wu, J., Nealson, K.H., Stucki, J. W., 1999. The impact of structural Fe(III) reduction by bacteria on the surface chemistry of smectite clay minerals. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 3705-3713.
- Lantenois, S., Lanson, B., Muller, F., Bauer, A., Jullien, M., Plançon, A., 2005. Experimental study of smectite interaction with metal Fe at low temperature 1: smectite destabilization. *Clays Clay Miner.* 53, 597-612.
- Libert, M., Esnault, L., Jullien, M., Bbildstein, O., 2010. Molecular Hydrogen : an energy source for bacterial activity in nuclear waste disposal. *Phys. Chem. Earth*, in press.
- Lin, L.H., Hall, J., Lippmann-Pipke, J., Ward, J.A., Lollar, B.S., Deflaun, M., Rothmel, R., Moser, D., Gihring, T.M., Mislouack, B., Onstott, T. C., 2005. Radiolytic H<sub>2</sub> in continental crust: Nuclear power for deep subsurface microbial communities. *Geochem. Geophys. Geosyst.* 6.
- Lovley, D. R., 1987. Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron - a Review. *Geomicrobiol. J.* 5, 375-399.
- Lovley, D. R., 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol Rev.* 55, 259-287.
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Bluntharris, E.L., Phillips, E.J., Woodward, J. C., 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382, 445-448.
- Masurat, P., Eriksson, S., Pedersen, K., 2008. Evidence of indigenous sulphate-reducing bacteria in commercial Wyoming bentonite MX-80. *Appl. Clay Science*, in press.
- Mauclaire, L., Mckenzie, J.A., Schwyn, B., Bosart, P., 2006. Detection and cultivation of indigenous microorganisms in Mesozoic claystone core samples from the Opalinus Clay Formation (Mont Terri Rock Laboratory). *Phys. Chem. Earth Parts A/B/C* 32, 232-240.
- Moore, D. M., Reynolds, R.C., 1997. X-ray diffraction and the identification and analysis of clay minerals. Oxford University Press, New York, NY.
- Motamedi, M., Karland, O., Pedersen, K., 1996. Survival of sulfate reducing bacteria at different water activities in compacted bentonite. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 83-87.
- Myers, C.R., Nealson, K.H., 1988. Microbial reduction of manganese oxides: Interaction with iron and sulfure. *Geochim. Cosmochim. Acta* 52 (11), 2727-2732.
- OECD, 1999. Conference in the evaluation of safety deep geological repositories. Its development and communication. N.E. Agency.
- OECD, 2006. Safety of Geological Disposal of High-level and Long-lived Radioactive Waste in France: An International Peer Review of the Dossier 2005 Argile Concerning Disposal in the Callovo-Oxfordian Formation 6, 88-164.
- Papillon, F., Jullien, M., Bataillon, C., 2001. Carbon steel behaviour in compacted clay : two long term tests for corrosion prediction. Prediction of long term corrosion, behaviour in nuclear waste systems. EFC Publications, Feron, D., Mac Donald, D.D. (Eds), 36, pp.439-454.
- Pedersen, K., Arlinger, J., Ekendahl, S., Hallbeck, L., 1996. 16S rRNA gene diversity of attached and unattached bacteria in boreholes along the access tunnel to the Aspo hard rock laboratory, Sweden. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19, 249-262.
- Pedersen, K., 2000a. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives. *FEMS Microbiol. Lett.* 185, 9-16.
- Pedersen, K., Motamedi, M., Karnland, O., Sanden, T., 2000b. Mixing and sulphate-reducing activity of bacteria in swelling, compacted bentonite clay under high-level radioactive waste repository conditions. *J. App. Microbiol.* 89, 1038-1047.
- Pedersen, K., 2005. The deep intraterrestrial biosphere. G.M Gadd, K.T: Semple and H.M. Ippin-Scott (Eds). *Microorganisms and earth systems advances in geomicrobiology*. Cambridge Society for General Microbiol., Cambridge University Press pp. 233-245.

- Perronnet, M., Villiéras, F., Jullien, M., Razafitianamaharavo, A., Raynal, J., Bonnin, D., 2007. Towards a link between the energetic heterogeneities of the edge faces of smectites and their stability in the context of metallic corrosion. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 1463-1479.
- Perronnet, M., Jullien, M., Villiéras, F., Raynal, J., Bonnin, D., Bruno, G., 2008. Influence of time and temperature on Fe(0)-bentonite reactivity: Insights for transitory gel formation and maturation. *Appl. Clay Science* 38, 187-202.
- Roden, E.E., Zachara, J. M., 1996. Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environ. Science Technol.* 30, 1618-1628.
- Saffarini, D.A., Dichristina, T.J., Bermudes, D., Nealson, K. H., 1994. Anaerobic respiration of *Shewanella putrefaciens* requires both chromosomal and plasmid-borne genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 119, 271-277.
- Scott, J.H., Nealson, K. H., 1994. A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *J. Bacteriol.* 176, 3408-3411.
- Stemmler, S.J., Loyaux-Lawniczak, S., Berthelin, J., 2004. Effect of soil water content on the microbial reduction of iron oxides. *C.R. Geoscience* 336, 1171-1179.
- Stroes-Gascoyne, S., Schippers, A., Schwyn, B., Poulain, S., Sergeant, C., Simonoff, M., Le Marrec, C., Altmann, S., Nagaoka, T., Mauclair, L., McKenzie, J., Daumas, S., Vinsot, A., Beaucaire, C., Matray, J. M., 2007. Microbial community analysis of Opalinus Clay drill core samples from the Mont Terri Underground Research Laboratory, Switzerland. *Geomicrobiol. J.* 24, 1-17.
- Stroes-Gascoyne, S., Hamon, C.J., 2008. The effect of intermediate dry densities (1.1-1.5 g/cm<sup>3</sup>) and intermediate porewater salinities (60-90 g NaCl/L) on the culturability of heterotrophic aerobic bacteria in compacted 100% bentonite. Nuclear Waste Management Organization. NWMO TR-2008-11. 65pp.
- Stroes-Gascoyne, S., Hamon, C.J., Maak, P., Russell, S., 2010. The effects of the physical properties of highly compacted smectitic clay (bentonite) on the culturability of indigenous microorganisms. *Appl. Clay Science* 47, 155-162.
- Stucki J.W, Komadel P., Wilkinson H.T., 1987. Microbial reduction of structural Fe<sup>3+</sup> in smectites. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51:1663-1665.
- Stucki, J.W., Bergaya, F., 2006. Properties and Behaviour of Iron in Clay Minerals.. developments in : *Clay Scienc.* Elsevier Chap. 8, 423-475.
- Stucki, J.W., Kkostka, J. E., 2006. Microbial reduction of iron in smectite. *C. R Geoscience* 338, 468-475.
- Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E.L., Lovley. D.R., 1998. Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early earth. *Nature* 395, 65-67.

## **2.2. IMPACT DES ACTIVITES BACTERIENNES FERRIREDUCTRICES SUR DES ARGILES PURIFIEES**

Bien que la disponibilité du Fe(III) structural des matériaux argileux au sein de l'argilite ait été démontrée, les processus réactionnels ont été observés d'un point de vue global sans pouvoir identifier et mesurer l'impact de l'activité microbienne sur chacune des phases argileuses présentes. Afin de mieux appréhender la réactivité des systèmes bactérie-argile en environnement profond, une connaissance approfondie de la réactivité de chaque phase minérale est nécessaire. Elle permettra d'établir une hiérarchisation des paramètres contrôlant la réactivité entre les phases argileuses.

Pour répondre à ces interrogations, trois phases argileuses ferrifères purifiées ont été sélectionnées. Elles constituent des modèles d'étude représentatifs des phases argileuses présentes dans les argilites que ce soit en termes de qualité (composition minéralogique) ou de quantité (abondance). Ce choix tient aussi au fait que leurs réactivités sont connues et ont déjà été étudiées dans des expériences abiotiques simulant des interactions fer/argile (Perronnet et al., 2008 ; Lantenois, 2003). Elles pourront servir de référence aux études menées, dans ce travail, en présence de bactéries ferriréductrices.

Les trois phases choisies sont :

- une smectite dite de Ward's (beidellite ferrifère) ;
- une illite (Illite du Puy, PyOR2) ;
- une kaolinite (Kaolinite BT).

Les caractéristiques minéralogiques et chimiques de ces argiles purifiées sont décrites dans le chapitre II "Matériels et Méthodes".

## ARTICLE II.

### Clay-iron reducing bacteria interaction in deep geological environment: experimental and modeling approach

L. Esnault, M. Libert, O. Bildstein & M. Jullien

*CEA, DEN, DTN, CE Cadarache, St Paul lez Durance, 13108, France*

C. Mustin

*LIMOS UMR 7137 CNRS-UHP Nancy I, Science Faculty, Vandoeuvre les Nancy cedex, 54506 France*

Water-Rock Interaction – Birkle & Torres-Alvarado (eds) 2010 Taylor & Francis Group, London, P: 939-942 ISBN 978-0-415-60426-0

Résumé : Le rôle des microorganismes sur la réactivité de minéraux argileux dans les environnements profonds est déterminant pour améliorer la connaissance de la stabilité des matériaux de confinement du stockage géologique. Le potentiel biologique réactif dans ces conditions extrêmes a été caractérisé dans le but de comprendre la réactivité associée des minéraux argileux (smectite, illite et kaolinite ferri-fères) dans les argilites, notamment en termes de paramètres cinétiques. Les expériences montrent une hiérarchie d'altérabilité qui dépend à la fois de la nature des phases minérales ainsi que de la disponibilité du Fe(III) structural des argiles étudiées : Smectite > kaolinite > illite, avec un bilan de réduction du Fe (III) structural de l'ordre de 22 % pour smectite, 19.6 % pour kaolinite et 5.1 % pour illite. Le code couplé chimie - transport HYTEC a été utilisé pour déterminer des paramètres cinétiques des smectites (phase argileuse la plus réactive) en se basant sur les résultats d'expériences à 40°C des interactions bactéries - smectite. L'activité bactérienne ferri-réductrice entraîne une augmentation de la solubilité du minéral (en raison des changements du pH et des conditions de redox,  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ ) ainsi qu'une augmentation du taux d'altération.



# Clay-iron reducing bacteria interaction in deep geological environment: experimental and modeling approach

L. Esnault, M. Libert, O. Bildstein & M. Jullien

*CEA, DEN, DTN, CE Cadarache, St Paul lez Durance, 13108, France*

C. Mustin

*LIMOS UMR 7137 CNRS-UHP Nancy I, Science Faculty, Vandoeuvre les Nancy cedex, 54506 France*

**ABSTRACT:** The role of microorganisms on reactivity of minerals in deep environment is a key to improve the prediction of geological disposal safety. New kinetics parameters on clays minerals in argillite environments are obtained to understand the reactive biologic potential in these extreme conditions. The experiments show an alterability hierarchy which depends on the nature of minerals phases directly correlated to the availability of structural Fe(III) clay: Smectite > kaolinite > illite, with a Fe(III) reduction of 22% for smectite, 19.6% for kaolinite and 5.1% for illite. The reaction-transport code HYTEC was used to determine kinetics parameters based on the clay-iron reducing bacteria interactions observed in experiments at 40°C. Bacterial activity induces an increase in the solubility of the mineral (due to changes in pH and redox conditions) and an increase in the alteration rate.

## 1 INTRODUCTION

Numerous concepts for geological disposal of nuclear waste are based on a multibarrier system involving disposal of nuclear wastes in a clayey host rock, as is the case of the French concept. Experiments are performed in an underground research laboratory to investigate the suitability of the Callovo-oxfordian (COx) argillites to store nuclear waste at around 500 m below the surface (Andra 2005). Clays present interesting properties to prevent the radionuclide dispersion and migration in the environment: low porosity and permeability, cations retention and swelling of clay minerals, particularly of smectite phases (Meunier 2003).

The most important parameters for the safety assessment concern the lifetime of steel containers and the confinement properties of argillite. Thus, the understanding of the phenomena taking place at the interface between the clayey environment and the steel containers is a key to the prediction of the long-term evolution and the safety of the storage system. To improve the modeling of such systems, many processes have to be investigated in order to determine the controlling parameters. Among these processes, the role of microorganisms must be taken into account.

### 1.1 Bacterial activity in deep clayey environment

Since the discovery of the sustainability of microbial communities in extreme conditions, a significant amount of work has been achieved to find evidences of the presence of microorganisms in deep geological environments. Such evidences were recently reported in the COx argillites and in the Opalinus argillites (Mauclaire et al. 2007) and in industrial bentonite materials (Masurat 2008). A broad bacterial diversity was observed, including Sulfate Reducing Bacteria (SRB), Iron Reducing Bacteria (IRB) and other aerobic or anaerobic species. They are always found in small quantities and usually in the form of spores. On the other hand, experiments on the cultivability of microorganisms into compacted clay buffer (e.g., MX80 bentonite) have been tested under several conditions:

- High-level radioactive waste repository conditions (Pedersen et al. 2000);

- Variation of water activity (Motamedi et al. 1996).

The results show an ability of microorganisms to survive in these hostile conditions (water activity higher than 0,96).

## 1.2 Selection of microbial species: Case of IRB

In the nuclear waste disposal environment, the most abundant electron acceptors are sulfates and ferric iron. The biotic reaction using Fe(III) are more energetic for bacterial growth, and occurs before reactions involving sulfates in progressively reducing conditions.

The corrosion of the metallic iron (Fe<sup>0</sup>) from the containers has several effects, including the production Fe(III)-bearing minerals which promote IRB species development. Firstly, it will lead to highly reduced conditions due to the corrosion process with production of H<sub>2</sub> and the formation of secondary iron minerals, such as mixed ferric/ferrous oxide and oxy-hydroxide compounds (Esnault et al. 2009b). Secondly, it is responsible for a potential loss of confinement properties such as swelling and capacity to exchange cations (Jullien et al. 2005).

This possible bacterial selectivity in this environment should be taken into account especially by also looking at the availability of structural Fe(III) from the smectite octahedral layer.

## 1.3 Availability of structural Fe(III) in argillite for Bacteria development

Recently, new experiments have shown the possibility of IRB species to access the Fe(III) present in clay minerals in argillites and to perform Fe(III) respiration for bacterial development in deep geological environment conditions (Esnault et al. 2009a, b).

These first results demonstrate the availability of structural Fe(III) in argillites used as an energetic source for IRB development in deep geological conditions.

In order to evaluate the impact of bacteria on the stability of clay minerals, experiments are performed in anoxic conditions with a low redox potential, and a temperature of 40°C (close to the mean temperature during the storage life). Three pure clay minerals containing structural Fe(III) were chosen, smectite, illite and kaolinite, which constitute major clay components of argillites. The objective is to determine the biotic contribution to the dissolution kinetics of the different clay minerals. Finally, a modeling approach by reaction-transport code HYTEC (HYdrological Transport coupled with Equilibrium Chemistry) will be developed to simulate Clay-Iron Reducing Bacteria interaction at 40°C over a period of 10,000 years (temperature and timescale expected for the corrosion stage).

# 2 MATERIAL AND METHODS

## 2.1 Clay minerals

Fractions of pure clays samples < 0.2 μm were used: a ferruginous smectite, the PyrO2 illite, the BT kaolinite. Purified samples were extracted by centrifugation and checked by XRD analysis. Specific areas of pure clay minerals ( $S_{\text{clay}}$ ) were determined by BET analysis: Kaolinite (32 m<sup>2</sup>/g), Illite (122 m<sup>2</sup>/g), and Smectite (55 m<sup>2</sup>/g). This parameter will be used to compare the reactivity between pure clay minerals and argillites in the presence of bacteria.

The total Fe content of clays used for these experiments was obtained by Perronnet et al. (2005): total Fe = 1.66 mmol Fe/g for the smectite; 0.84 mmol Fe/g for the illite; and 0.197 mmol Fe/g for the kaolinite). Mössbauer analyses show that the iron is only constituted by Fe(III) and localized in the structure of clay mineral.

## 2.2 Bacterial species

An anaerobic bacterium, “*Shewanella oneidensis* strain MR-1” (Pasteur Institut Collection, Paris, France, 106686), was used in the clay-bacteria experiments. It was isolated from the anoxic sediments of Lake Oneida, NY (Myers & Nealson 1988; Venkateswaran et al. 1999), and has been the subject of many physiological and genetic studies. MR-1 is an obligate-respiratory bacterium, incapable of fermentation.

*Shewanella oneidensis* MR-1 was initially grown in a culture medium containing 50 mM Fe(III)-citrate and lactate as the electron acceptor.

## 2.3 Interstitial water of experiment solution

The final culture medium was synthesized using a composition close to that of the argillites interstitial water analyzed by (Beaucaire et al. 2008). An excess of element like phosphorus and nitrogen was added to avoid limiting the reactions.

## 2.4 Batch System

The culture medium was prepared using 18 M $\Omega$ -0.2 micron-filtered water and was sterilized by heating. Cultures were washed 3 times with the medium and then transferred to sterile polypropylene tubes. An amount of 1.50 mg/ml sterile clay (irradiated with a cobalt irradiator, 35 kGy) was added with 10 mM of lactate. Then these batches were introduced in anoxic Mart jar (80% N<sub>2</sub>, 20% CO<sub>2</sub>) and incubated at 40°C in the dark. All the samplings were carried out under strict anoxic conditions within an anaerobic glove box (90% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

The initial cell density of all cultures, 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cell.ml<sup>-1</sup>, was estimated by the relationship between optical density (absorbance at 500 nm) and direct cell counts (microscopy).

## 3 RESULTS

The dissolution of pure clay mineral was observed in biotic or abiotic conditions and monitored through the evolution of aqueous Fe in solution (Figure 1).

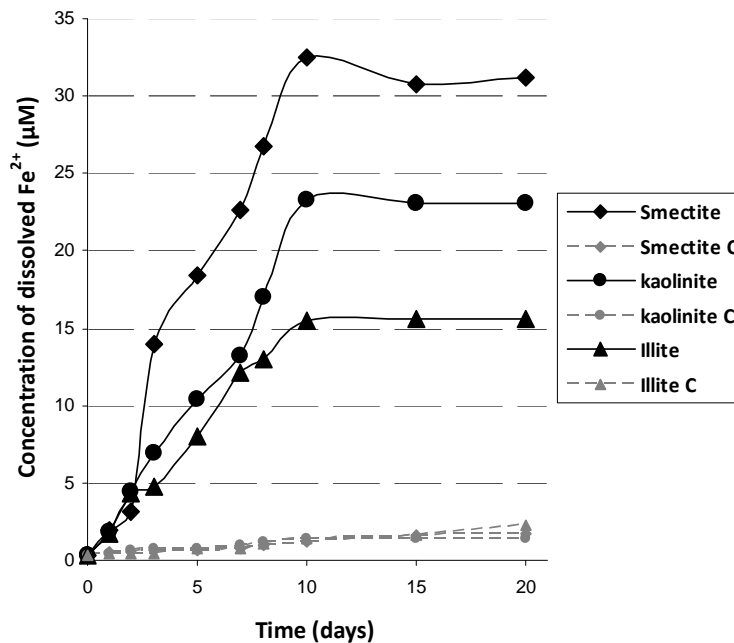


Figure 1. Evolution of concentration of dissolved Fe after bio-alteration of clay mineral (average of 3 replicates; C = abiotic experiments).

In abiotic conditions, the experiments showed a weak dissolution of the clay minerals with Fe concentration  $< 2 \mu\text{M}$ . At the opposite, the dissolution of clay mineral in the presence of bacteria was found to be linear between 0 and 10 days, with a significant increase of Fe concentration. This stage was followed by a stationary state until the final 20 days of experiments. Dissolution was higher for smectite than kaolinite and illite with  $33 \mu\text{M}$ ,  $22 \mu\text{M}$  and  $15 \mu\text{M}$  of Fe in solution respectively.

In order to determine the contribution of IRB to the dissolved Fe, a specific analysis using acidification of bio-altered clays residues was performed to quantify  $\text{Fe}^{2+}$  (structural and adsorbed) in an anaerobic chamber (Kotska et al. 1996).

The amount of biotic-mediated dissolved Fe was then normalized to the specific surface area for each clay mineral in order to compare the alteration rate attributed to structural Fe(III) bio-reduction (Figure 2):

$$[\text{Fe}_{\text{reduction}}]_{\text{Clay}} = [\text{Fe}_{\text{total}}]_{\text{reduced}} / S_{\text{clay}}$$

$$[\text{Fe}_{\text{total}}]_{\text{reduced}} = [\text{Fe}^{2+}]_{\text{dissolved}} + [\text{Fe}^{2+}]_{\text{solid}}$$

where  $[\text{Fe}_{\text{reduction}}]_{\text{Clay}}$  ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) is the aqueous reduced iron normalized to the clay surface,  $[\text{Fe}_{\text{total}}]_{\text{reduced}}$  normalized to the amount of mineral ( $\mu\text{mol}/\text{g}$  of clay) and  $S_{\text{clay}}$  is the specific area clay ( $\text{m}^2/\text{g}$ ).

The adjustment of modeling parameters to fit with the experiments showed that bacterial activity induces (1) an increase in the solubility of the mineral (due to changes in pH and redox conditions) and (2) an increase in the alteration rate (Fig. 3).

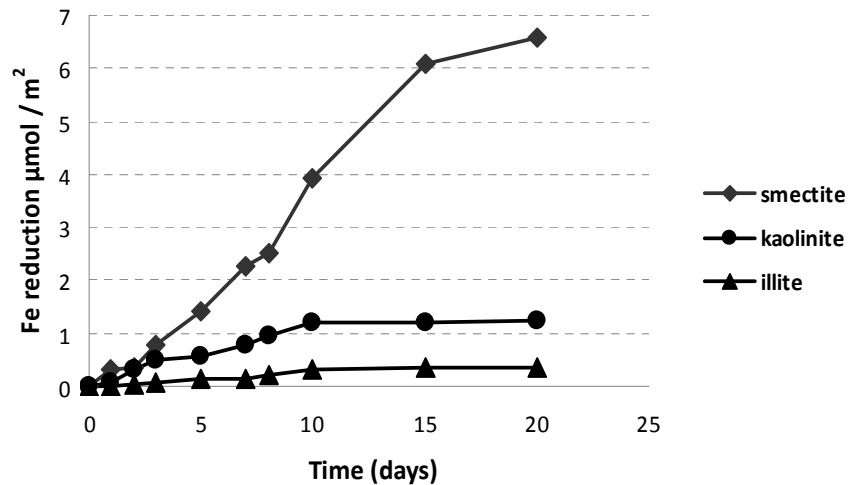


Figure 2. Evolution of Fe bio-reduction of clay mineral normalized by specific area.

The reduction of structural Fe(III) was higher for smectite (22.0%) than kaolinite (19.6%) and illite (5.1%). An alterability hierarchy was determined which can be correlated to the availability of structural Fe(III) clay: smectite > kaolinite > illite.

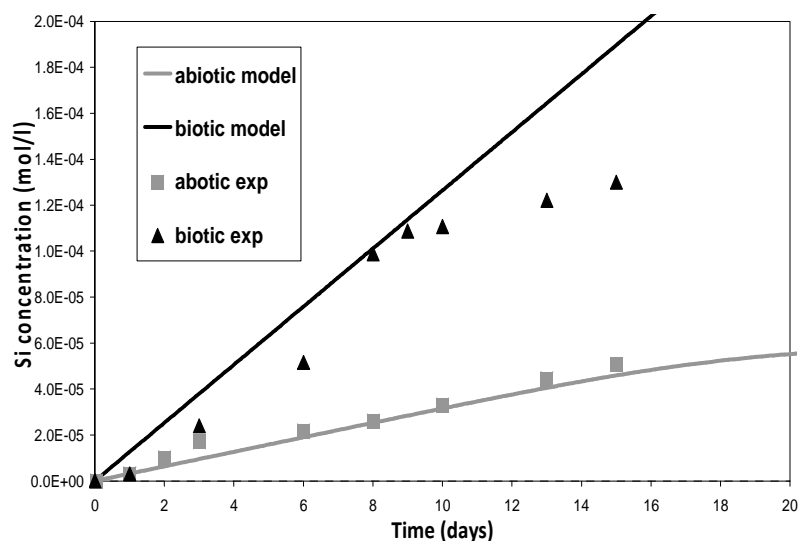


Figure 3. Evolution of Si concentration as a result of smectite dissolution in the abiotic and biotic experiment, and modeling.

## 4 CONCLUSION

In deep clayey environment, IRB play a determinant role on clay mineral alteration and more precisely on smectite phases which is the main reactive phase in argillite. The experiments show that the bacteria are capable of using Fe(III) from the structure of the clay minerals in order to perform the respiration process. This mechanism destabilizes the clay mineral and enhances the dissolution rate. The modeling of clay-bacteria interactions is crucial to the understanding of long term microbial processes in deep geological disposal of nuclear waste. It shows that in the presence of bacteria both the solubility and the alteration rate of the mineral are increased.

## Acknowledgment

We wish to thank IRSN for helpful discussion and financial support

## REFERENCES

- Andra 2005 Dossier argile 2005. *Andra scientific report*. Available at : [www.andra.fr](http://www.andra.fr).
- Beaucaire, C., Michelot, J.L., Savoye, S. & Cabrera, C. 2008. Groundwater characterisation and modelling of water rock equilibria in the Tournemire argillaceous formation (Aveyron, France). *Applied Geochemistry* 23: 2182-2197.
- Esnault, L., Libert, M., Mustin, C. & Jullien, M. 2009a. Role of structural Fe (III) in the bacterial development in extreme conditions in deep clayey environments. *XIV International Clay Conference*. June 14-20, Castellanetta, Italy.
- Esnault, L., Libert, M., Mustin, C. & Jullien, M. 2009b. Availability of nutrients sources for bacterial development in deep clayed environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73-13S.
- Jullien, M., Kohler, E., Raynal, J. & Bildstein, O. 2005. Physicochemical Reactivity in Clay-Rich Materials: Tools for Safety Assessment. *Oil & Gas Science and Technology* 60(1): 107-120.
- Kostka, J. E., Stucki, J. W., Nealon, K. H., & Wu, J. 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.
- Masurat, P. S., Eriksson, S. & Pedersen, K. 2008. Evidence of indigenous sulphate-reducing bacteria in commercial Wyoming bentonite MX-80. *Applied Clay Science* 47(1-2): 51-57.

- Mauclaire, L., Mckenzie, J. A., Schwyn, B. & Bossart, P. 2007. Detection and cultivation of indigenous microorganisms in Mesozoic claystone core samples from the Opalinus Clay Formation (Mont Terri Rock Laboratory). *Physics and Chemistry of the Earth* 32(1-7): 232-240.
- Meunier, A. 2003. *Argiles*. Geosciences. Gordon Breach/Archives, Contemporaines Editions.
- Motamedi, M., Karnland, O. & Pedersen, K. 1996. Survival of sulphate reducing bacteria at different water activities in compacted bentonite. *FEMS Microbiology Letters* 141: 83-87.
- Myers, C.R. & Nealson, K.H. 1988. Microbial reduction of manganese oxides: Interaction with iron and sulfure. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52 (11), 2727-2732.
- Pedersen, K., Motamedi, M., Karnland, O. & Sandén, T. 2000. Cultivability of microorganisms introduced into a compacted bentonite clay buffer under high-level radioactive waste repository conditions. *Engineering Geology* 58(2): 149-161.
- Venkateswaran, K., Moser, D. P., Dollhopf, M. E., Lies, D. P., Saffarini, D. A., MacGregor, B. J., Ringelberg, D. B., White, D. C., Nishijima, M., Sano, H., Burghardt, J., Stackebrandt, E., & Nealson, K. H., 1999. Polyphasic taxon- omy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 Pt. 2: 705–724.

### 3. REACTIVITE SPECIFIQUE DES SMECTITES EN PRESENCE DE BACTERIES FERRIREDUCTRICES

Les smectites ont été clairement décrites comme étant les phases argileuses les plus réactives dans les matériaux argileux comme les argilites (Jullien, 2006). Cette forte réactivité est liée à la fois à la présence de Fe(III) structural parfois en grande quantité dans les couches octaédriques mais aussi à la nature même des smectites, c'est-à-dire, leur physique spécifique liée à leur charge hétérogène, à leur pouvoir de gonflement et à leur capacité d'échange ionique. Ainsi ces phases minérales entraînent une forte augmentation de la réactivité globale, comparées aux autres minéraux argileux.

La réactivité de ces minéraux argileux de type smectites est très différente car les propriétés des smectites sont notamment dépendantes de la charge globale du feuillet argileux et de la présence de lacunes dans le remplissage octaédrique, c'est le cas des smectites dioctaédriques décrites comme étant les plus réactives (Lantenois et al., 2005 ; Perronnet et al., 2004). Lors de la réduction du Fe(III) structural, une réorganisation complète des équilibres de charges octaédriques est attendue et peut entraîner des transformations minéralogiques multiples voire une altération complète de ces minéraux.

La réduction du Fe(III) structural par les bactéries entraîne donc une altération de l'édifice cristallin par déstabilisation de la charge globale des feuillets argileux. Cette altération est de plus accentuée par des processus liés à l'activité microbologique tels que la libération de protons. L'acidolyse induite engendre principalement la libération dans le milieu d'éléments structuraux : Si, Al et Fe. Ces modifications sont susceptibles d'entraîner des transformations significatives des conditions géochimiques locales et pourraient conduire à la formation de phases secondaires comme les alumino-silicates tels que des illites et des phases à 7Å de type Fe-serpentine.

Afin de déterminer l'implication des activités microbiennes ferriréductrices dans les mécanismes d'altération des smectites, deux types de matériaux argileux ont été choisis : la beidellite de Ward's et la montmorillonite de Wyoming MX80. La MX80 est par ailleurs identifiée comme une bentonite et est envisagée de par le monde comme matériau de base des barrières ouvragées impliquées en tant que barrière de confinement dans certains concepts de stockage géologique des déchets radioactifs.

L'activité microbienne est étudiée ici en tant qu'agent catalyseur biologique dans les transformations minéralogiques impliquant les smectites dans les environnements à basse température (<80°C). Deux principaux effets de l'activité microbologique sont caractérisés : la réduction du Fe(III) structural et la production de métabolite bactérien d'H<sup>+</sup> et d'acides organiques, qui peuvent impacter les conditions physicochimiques du milieu géologique profond.

## ARTICLE III

### Reaction parameters for smectites alteration induced by IRB at low temperature.

Esnault. L, Jullien. M, Libert. M.

*CEA, DEN, DTN, LMTE, CE Cadarache, St Paul lez Durance, 13108, France*

Mustin. C.

*LIMOS UMR 7137 CNRS-UHP Nancy I, Science Faculty, Vandoeuvre les Nancy cedex, 54506 France*

Bornschnock. D.

*CEREGE, Aix-Marseille University, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix en Provence., France, CNRS,*

Not yet Submitted

Analytical characterisations by TEM are in process before to finish this paper

Résumé : Les smectites sont omniprésentes dans les sols et les sédiments, mais leur réactivité dépend de différents paramètres tels que la température, la pression, le pH et la solution saline. L'activité bactérienne pourrait également influencer sur ces paramètres dans les environnements anaérobies à travers la réactivité bactéries/smectite. L'objectif de cette étude est de déterminer les paramètres réactionnels contrôlant l'altération des smectites, catalysée par l'activité microbienne ferriréductrice impliquant la réaction de réduction du Fe(III) structural des smectites. Les résultats démontrent que le processus d'altération des smectites est contrôlé par la réduction du Fe(III) structural. Dans ce mécanisme, la teneur en Fe(III) octaédrique des smectites ainsi que sa distribution sont les paramètres clés de la réactivité. De même l'acidification induite par les produits des activités bactériennes augmente la vitesse de la réaction d'altération des smectites. La combinaison des processus de réduction de Fe(III) et des conditions acides permet la cristallisation de nouvelles phases :

- *La formation de phase à 7Å du groupe serpentine lorsque la teneur est élevée en Fe(III) dans la structure octaédrique des smectites.*
- *La formation d'illite lorsque le processus de réduction de Fe (III) est combiné à des conditions acides bio-induites.*

Ces résultats montrent la forte influence des processus biologiques sur la transformation des minéraux argileux dans les environnements à basse température.



## Reaction parameters for smectites alteration induced by IRB at low temperature

Esnault. L, Jullien. M, Mustin. C, Bornschneck. D, Libert. M.

*CEA, DEN, DTN, LMTE, CE Cadarache, St Paul lez Durance, 13108, France*

*LIMOS UMR 7137 CNRS-UHP Nancy I, Science Faculty, Vandoeuvre les Nancy cedex, 54506 France*

*CEREGE, Aix-Marseille University, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix en P., France, CNRS,*

### **ABSTRACT:**

Smectite phyllosilicates are ubiquity in soils and sediments but their reactivity depend on different parameter such as temperature, pressure, pH, saline solution. Bacterial activity could also influence their presence in anaerobic environment through the possible reactivity of the bacteria/smectite interaction. The objective of this study is to determine the reaction parameters able to control the smectite alteration, catalyzed by microbial activity involving Fe(III) reduction.

This study shows, the smectite alteration process is driven by Fe(III) microbial attack which reduce structural Fe(III). In this mechanism, Fe(III) content and its structural distribution are the key parameter of clay dissolution. Moreover, the acidic condition induced by bacteria activity increases the global reaction occurs in the Fe(III) octahedral bio-reduction. Combinaison of Fe(III) reduction process and acidic condition by releasing of protons during bio-induced reactivity allow such new crystallization process. This study has highlighted two new crystallisations process:

- The formation of serpentine group 7Å phase when Fe in the octahedral structure of smectite is in high content.
- The formation of illite phase when Fe(III) reduction process is combined by acidic condition bio-induced.

Theses results showed the strong dependence of biolocal processes on the transformation of clay minerals in the low-temperature environments

### **INTRODUCTION**

Smectite phyllosilicates are common in soils and shallow sediments. They are considered as one of the most reactive clay mineral. Indeed, many of physical and chemical properties of the smectite group of clay minerals are related to the expandable interlayer region. These properties, which include swelling, cation exchange capacity, and catalytic activity, are sometimes diminished or lost during natural diagenetic or hydrothermal events as the smectite reacts to form mixed-layer clay (illite-smectite or kaolinite-smectite) or pure illite, berthierine or chlorite. Therefore, from both geologic and industrial point of view, smectite was described as clayey barrier for geological disposal (waste or gas) and supporting confining or sealing functions (Jullien et al, 2005). The key question remains to determine the conditions under which smectites are likely to react, in order to assess their long-term stability. Dioctahedral smectites are known to be more reactive than tri-octahedral smectites (Eberl, 1978; Lantenois et al., 2005). According to their structural properties, the reactivity of smectite is not equivalent. The effects of chemical composition, metal iron, temperature, and pressure are often related on the alteration of smectite to mixed-layer clay or non expandable phyllosilicates (Eberl,

1978; Hower, 1981, Perronnet et al., 2007). Temperature is considered as an important parameter able favor or to control the reactivity of smectite (Eslinger and Peaver, 1988). Moreover, pH conditions have a great influence on transformation kinetics of smectite.

However, the discovery of the availability of structural Fe(III) from smectite structure for bacterial activity supposes that other parameters as biological activity could impact smectite phase stability in geological environments (Stucki et al., 1987; Kotska et al., 1996). Indeed, since ten years, studies have demonstrated that a wide variety of dissimilatory iron reducing bacteria (DIRB) can reduce Fe(III) inside clay minerals crystalline structure (smectite, nontronite, illite, chlorite...). That includes mesophilic, thermophilic prokaryotes. More precisely, reactivity of DIRB affects directly the smectites' clay minerals (Kostka et al., 1999; Dong et al., 2003, Stucki and Bergaya, 2006 ; Stucki and Kostka 2006). Among all of these minerals, expendable smectites (montmorillonite or nontronite) are the most reducible by bacteria (Esnault et al., 2010; Dong et al., 2009). The change of oxidation state of the structural iron in clay mineral modify the initial expendability properties of smectite with a decrease of both specific surface area and swelling and in some cases, an increase of cation exchange capacity (CEC) (Stucki and Bergaya 2006; Stucki and Kotska, 2006).

We treat about reaction parameters for smectites' alteration induced by IRB at low temperature through two examples: the smectite to illite transition and the smectite to 1:1 phyllosilicates transformation.

### **Processes of illitization of smectite**

The smectite to illite reaction is closely related to diagenetic process and depends on temperature, time, pressure and chemistry composition of deep underground waters and rocks. It was often correlated with hydrocarbon maturation during sediments diagenesis (Pevear, 1999), and changes in pore water chemistry (Brown et al., 2001). This reaction typically requires conditions of 140-250°C, 100MPa, and 4-5 months in absence of microbial activity (Eslinger and Peaver, 1988; Ehrenberg, and Nadeau, 1989). However, S-I reaction could be impacted by pH conditions.

Indeed, smectite illitization is promoted at basic pH (Eberl, 1993). The effect of alkaline solution entails alteration of smectite properties (Lee and Tank, 1985) and the formation of Illite phase (Bauer and Velde, 1999). Illitization reaction occurs along a series of dissolution and recrystallization processes.

Moreover, in acid condition, Smectite to Illite reaction has been also observed. Eberl,(1993) has shown that organic acid can promote illitisation. In this diagenetic environment where high amount of organic matter and smectite were found, microbial activity is highlighted to support the smectite to illite transformation. Contrary to alkaline fluide which have a high potential of smectite alteration by dissolution, at low pH, transformation processes are different. Smectites are considered as stable phases in acidic conditions (Bauer et al., 2001). The transformation of primary phase was exceptionally observed. This stability supposes another process for illitisation. Recent study has shown that smectite illitization processes could be activated by acidic conditions at low temperature (Credoz et al 2010). For pH condition around 4, the mechanism is explained by two main processes. These acidic conditions and the high H<sup>+</sup> availability in the system induce exfoliation processes of the montmorillonite stacking sequences. That promotes H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> cation exchange and coalescence of individual layers to form new K-rich 2:1 layer as illite.

Studies reporte the microbial impact on smectite (nontronite) to illite reaction (Kim et al., 2004; Zhang et al., 2007a and b). Authors explains that the new crystallization of illite results from microbial dissolution through the reduction of Fe(III) inside the smectite structure with high K content (10mM) in solution. In diagenesis conditions, microbial activity could promoted smectite to illite reaction and is described to be responsible of illite occurrences in young sediments like mudstone from Nankai Trough, Japan, (Masuda, 2001). Although the smectite to illite conversion mechanism by bacteria is not yet well determined, the Fe reduction in octahedral site seems lead to increased layer charge and alteration of initial structure coupled with K fixation (Huggett and Cuadros 2005).

### **Smectite to 1:1 phyllosilicate phase**

Smectite / kaolinite mixed-layer are described in various environments as soil and sedimentary systems (Karathanasis and Hajek 1983; Yongue-Fouateuet al. 2009). The smectite clay minerals belongs essentially to a Fe-beidellite group (Gaboriau, 1991; Yongue-Fouateuet al., 2009). The smectite to kaolinite reaction is promoted by Fe-beidellite alteration (Karathanasis and Hajek, 1983) and transformation appears to be a combination of dissolution-precipitation and global structural reorganization processes.

Experiences of interaction between metal iron and smectite (Fe-rich beidellite or nontronite) phases have shown the presence of new crystallized 1:1 phyllosilicate as cronstedtite or berthierine (Lantenois et al., 2005, Perronnet et al., 2007). One more time, the Fe(III) reduction into smectite lead to dissolution-precipitation of minerals. In addition, smectite reactivity is enhanced with increasing octahedral Fe<sup>3+</sup> content, the dioctaheral forms and metal iron amount.

The objective of this study is to determine the reaction parameters able to control the smectite alteration, catalyzed by microbial activity involving Fe(III) reduction.

We have investigated two smectites clay minerals, MX80 montmorillonite (low Fe<sup>3+</sup> content) and Ward's beidellite (high Fe<sup>3+</sup> content), in order to determine the role of Fe<sup>3+</sup> content on smectite alteration. Moreover, pH conditions on this microbial alteration will be investigated in order to determine the effect of H<sup>+</sup> induced by bacteria activity on new crystallization processes.

## **MATERIEL AND METHOD**

### **Bacteria:**

Two anaerobic bacteria have been chosen for the clay-bacteria experiment: the iron-reducing bacteria (IRB) *Shewanella oneidensis* strain MR-1 (CIP\* 106686) and *Clostridium aurantibutyricum* (793T DSMZ). *S. oneidensis* strain MR-1 has been isolated from anoxic sediments in Lake Oneida, NY (Myers and Nealson 1988) and has been the subject of many physiological and genetic studies on *S. oneidensis* (Nealson and Saffarini 1994). MR-1 is an obligate-respiratory bacterium incapable of fermentation (Scott and Nealson 1994). The second, *Clostridium aurantibutyricum* is a fermentative bacterium with a efficient metabolism which can produce a high proportion of organic acid (acetic acid, butyric acid) and is involved in iron(III) reduction in sol (Stemmler et al., 2004), as well as in the reduction of goethite (Dominik et al., 2002).

*Shewanella oneidensis* MR-1 and *Clostridium aurantibutyricum*, were grown in the Mclay culture medium with 50mM Fe(III) citrate as the electron acceptor prior to transfer into the experimental reactor lactate for *Shewanella* sp. or glucose for *Clostridium* sp. as only electron donors in the system.

### **Experiments:**

Two types of experiments (abiotic and biotic) were performed in anaerobic sterile Teflon reactors. A synthetic medium, Mclay (Esnault et al., 2010), was prepared using 18 MΩ-0.2 micron-filtered water and sterilized by heating. Cultures were washed 3 times with the medium and then transferred to the anaerobic sterile Teflon reactors containing 100 mL of the culture medium (Mclay). A total of 2.0 mg/ml of sterile smectite (Beidellite or montmorillonite) with "no altered fraction" (irradiated with a cobalt irradiator at 35 kGy) was added with 10 mM of glucose or 10mM of lactate for the *Clostridium* and *Shewanella* species experiments respectively. Third experiment in anaerobic sterile Teflon reactor in presence of clostridium species and beideillite mineral was performed in order to determine the role of bioinduced acidic condition during Fe(III) microbial reduction. Experiment with organic tampon (hepes) was added (8g/l) in order to control pH evolution.

Anaerobic conditions were obtained by bubbling a gas mixture: 90% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>. These batch reactors were incubated at 40°C in the dark. Three replicates were performed for each biotic or abiotic

experiment. Control experiments were conducted in the same conditions without bacteria. All the samples were taken under strict anoxic conditions in an anaerobic glove box (90% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

The initial cell density of all cultures,  $1 \times 10^7$  cell.ml<sup>-1</sup>, was estimated by the relationship between the optical density (absorbance at 500 nm) and the direct cell count (microscopy).

### **Analysis:**

Clay samples were characterized initially and after reaction by X-Ray Diffraction (XRD). 1 month after the beginning of each experiment, the crushed clay samples were collected and washed carefully twice with 50 mL ultrapure water. Slurry of the final suspension was deposited on XRD-dedicated glass slides and air-dried to enable a favourable orientation of the particles for an efficient diffraction. XRD scans were recorded between 2 and 40°2θ (counting time of 2s per 0.02°2θ step size) with a Bruker D8 diffractometer (Cu radiation at 40 kV and 40 mA) equipped with a Göbel mirror and a Sol-X detector.

Scanning Electron Microscopy (SEM) were performed using Philips® XL 30 and EDX analyses were performed with a large window Si-Li detector (Oxford Instrument). Semi-quantitative analyses were calculated with INCA®-Oxford Instrument software providing total atomic percentage for each analysis.

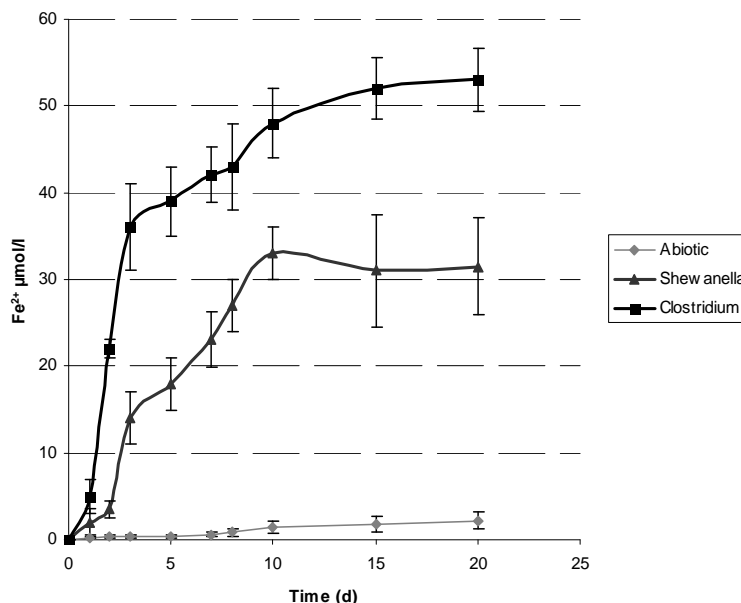
Transmission Electron Microscopy (TEM) to identify evolution of initial composition after interaction with bacteria. The structural and chemical evolution of rocks and some primary and secondary mineral phases was observed and analyzed by TEM. Slurry of the final suspension was deposited on TEM-dedicated 200 mesh carbon slides and air-dried during 24 h. The observations were performed on a JEOL 2000 FX Transmission Electron Microscope at 200 kV with a point by point resolution of 2.7 Å. EDX analyses were performed with a large window Si-Li detector (Oxford Instrument) and a super atmospheric thin window (SATW) slit of 30 mm<sup>2</sup>. In convergent mode, spectra were acquired in one minute with a death time < 20% and a global count number of 500-2000. Semi-quantitative analyses were calculated with INCA®-Oxford Instrument software providing total atomic percentage for each analysis. Mean structural formulae have been built on set of selected crystallite analyses without any accessory mineral contamination.

Saline solutions were analyzed using Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES Jobin Yvon® ultra-trace) with an uncertainty of 5%, to determine cations concentrations initially existing in solutions and its concentrations after reaction.

## **RESULTS**

### **1. Microbiological reduction of structural Fe(III) from beidellite and montmorillonite**

The alteration of pure smectite minerals were observed either in biotic or abiotic conditions and monitored through the evolution of aqueous Fe in solution (Figure 1 and 2).



**Figure 1: Evolution of concentration of dissolved Fe after bio-alteration of Fe-rich beidellite by *Shewanella* sp. and *Clostridium* sp.**

Bio-alteration of beidellite clay minerals was reported in figure 1. In abiotic conditions, the experiments showed low dissolution of the clay minerals with Fe concentration  $<3 \mu\text{M}$ . At the opposite, the dissolution of clay mineral in the presence of bacteria increases significantly. Dissolution of beidellite mineral was higher in presence of *Clostridium* species than *Shewanella* strain MR1. For experiment in presence of *Shewanella* strain MR1, it was found to be linear between 0 and 10 days, with a significant increase of Fe concentration (roughly  $32\mu\text{M}$ ). This stage was followed by a stationary step until the final 20 days of experiments.

For experiment in presence of *Clostridium*, it was observed an important alteration with increasing of dissolved Fe concentration between 0 and 3 days followed by a slower Fe dissolution (curve slope divided per 14) to reach aqueous Fe concentration roughly to  $53\mu\text{M}$ .

Bio-alteration of Montmorillonite clays mineral was reported in figure 2. As showed in presence of beidellite, dissolution of montmorillonite mineral was higher in presence of *Clostridium* species ( $23\mu\text{M}$ ) than *Shewanella* strain MR1 ( $13\mu\text{M}$ ) and Fe dissolution of abiotic is no significant to biotic experience.

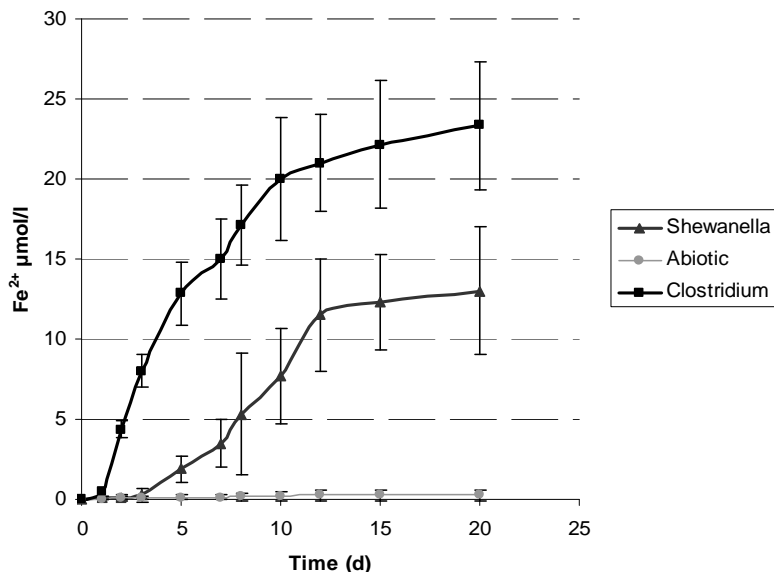


Figure 2: Evolution of concentration of dissolved Fe after bio-alteration of MX80 Montmorillonite by *Shewanella oneidensis* MRI and *Clostridium aurantibutyricum*.

Fe dissolution is less high than in beidellite experience. The amount of Fe from minerals could explain these results: octahedral Fe content in beidellite is higher than montmorillonite. Moreover, analyses of iron speciation in both experiments are only in  $Fe^{2+}$  form (Results not showed).

We confirm that both bacteria used in this study can access to structural Fe(III) of smectites. This process support iron reduction and dissolution of smectites. Indeed, in order to precise dissolution processes, the dissolution kinetics of smectites minerals can be followed by Si releasing from beidellite mineral during the time (figure 3). Si is often used such as a tracer of weathering of phyllosilicate minerals. In addition to being the most represented in the structure, it is the least reactive element of smectite and therefore often used to determine dissolution rates of clay materials.

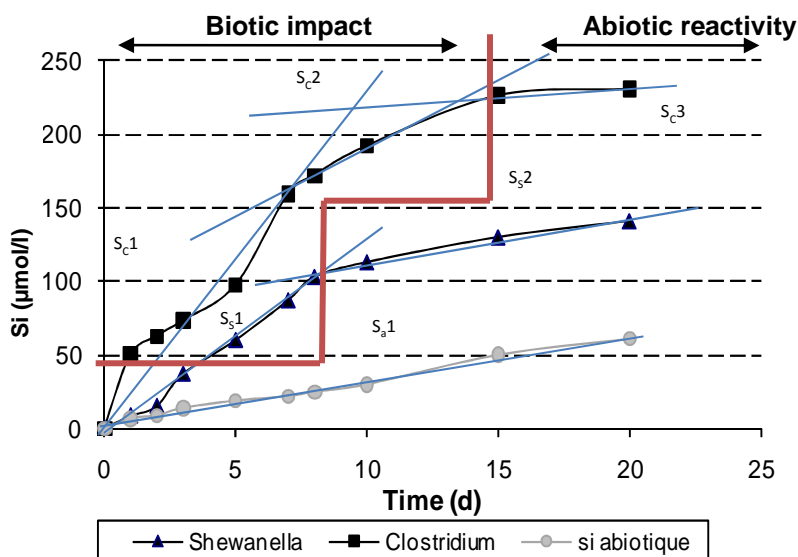


Figure 3: Kinetic dissolution of beidellite mineral in abiotic and biotic conditions. Dissolution slopes represent biotic or abiotic activity.

Results show an increase of dissolution kinetics depending on species activity. We observed an increasing of dissolved Si for *Clostridium* experiments higher than *Shewanella* experiments and higher than abiotic experiment. Between 0 to 8 days, the biological impact on dissolution's kinetics of beidellite is observed through the slopes of curves (figure 3). Dissolution kinetics is roughly 7 times and 4 times higher than abiotic dissolution for *Clostridium* and *Shewanella* experiments respectively. Moreover, the end of microbial contribution on beidellite dissolution can be observed on the figure 3 where kinetics dissolution seems to match abiotic kinetics dissolution (slope  $S_{S2}$  for *Shewanella* sp. and slope  $S_{C3}$  for *Clostridium* sp. are close to abiotic slope  $S_{a1}$ ). Indeed, at this step, organic compounds identified as metabolites are close to complete consumption by bacterial activity (figure 4). These results could explain the decrease of alteration process of beidellite by bacteria (figure 3).

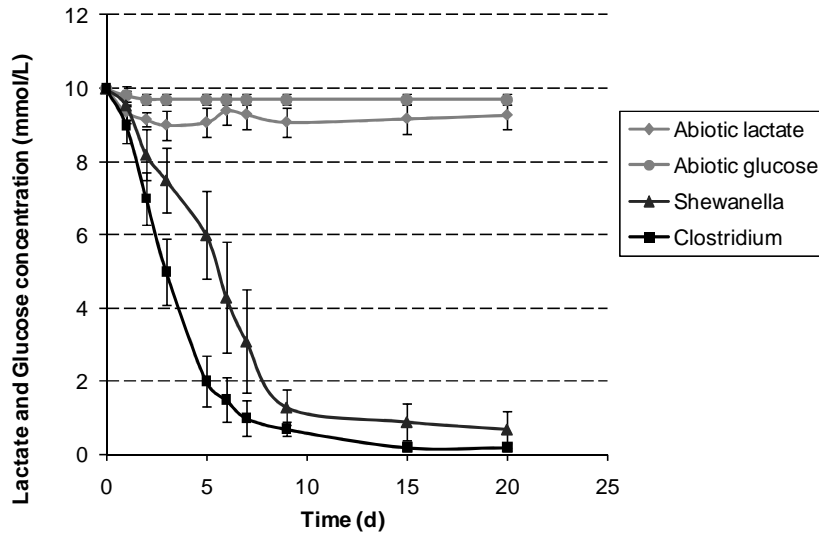


Figure 4: Evolution of electron donor concentration (lactate and glucose) in abiotic and biotic experiments

We have to check if the reactivity process involves an homogeneous dissolution or if initial alteration occurs in the structure.

The dissolution of beidellite appears clearly as an incongruent reaction in our batch system (Figure 5). A theoretical result corresponds to Fe/Si molar ratio of structural beidellite. In abiotic experiments, a low amount of structural iron is released in solution compared to silicium. The iron specific reactivity can explain the results. Contrary to Si, Fe react strongly and immediately with other chemical elements in solution to precipitate new phases or by sorption phenomenon on smectite particles during alteration.

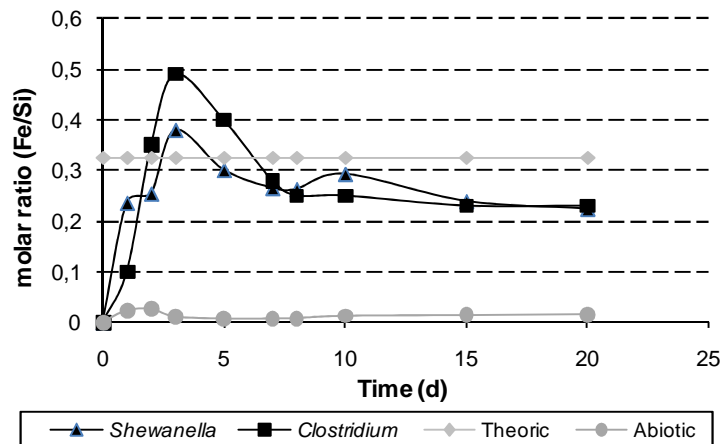


Figure 5 : Evolution of structural elements of Beidellite during Fe(III) reduction : Ratio Fe/Si

In biotic conditions, Fe/Si molar ratio increases during bacterial activity (0 to 5 days) and is higher than theoretical Fe/Si value. Although Fe is more reactive than Si, Fe dissolution kinetic is higher. When bacterial activity decreases between 7 and 20 days, Fe/Si molar ratio decreases also below theoretical curve and becomes stable. The same phenomenon is found in montmorillonite experiments. We suppose that the alteration of beidellite mineral is held by Fe(III) octahedral microbial attack which reduced Fe(III) in solid state. This process could cause disequilibrium of structural charge in mineral, followed by development of clay dissolution.

These results demonstrate the high sensitivity of microbial activity to Fe(III). Its reduction process impacts clearly on stability of smectite through a direct effect of layer charges. So, in order to check directly this impact of bioreduction of Fe(III) on layer charges, we investigate the cationic exchange evolution for beidellite.

## 2. Cations evolution as a tracer of DIRB impact on reactivity of Beidellite

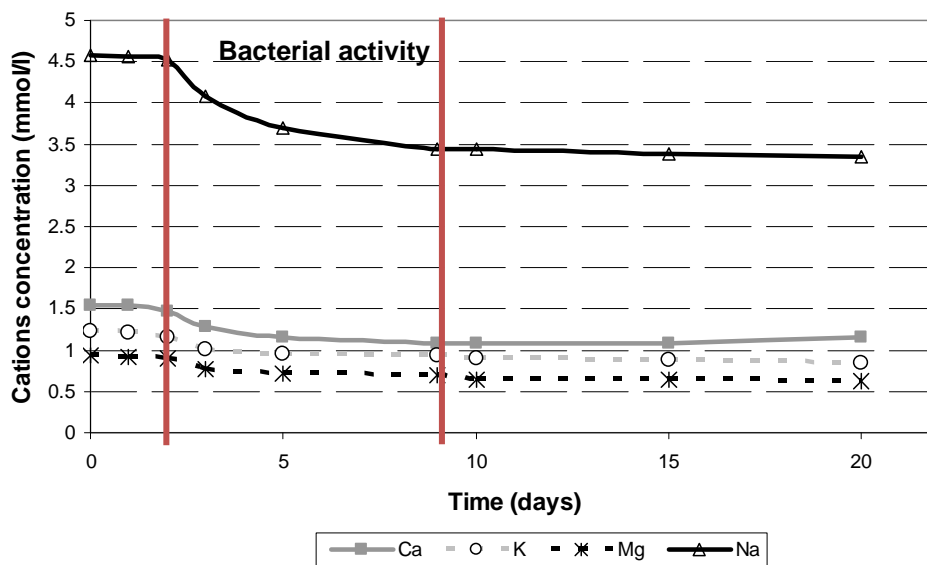


Figure 5: Evolution of cations' concentrations during Fe(III) reduction of beidellite by *Shewanella oneidensis* MRI.

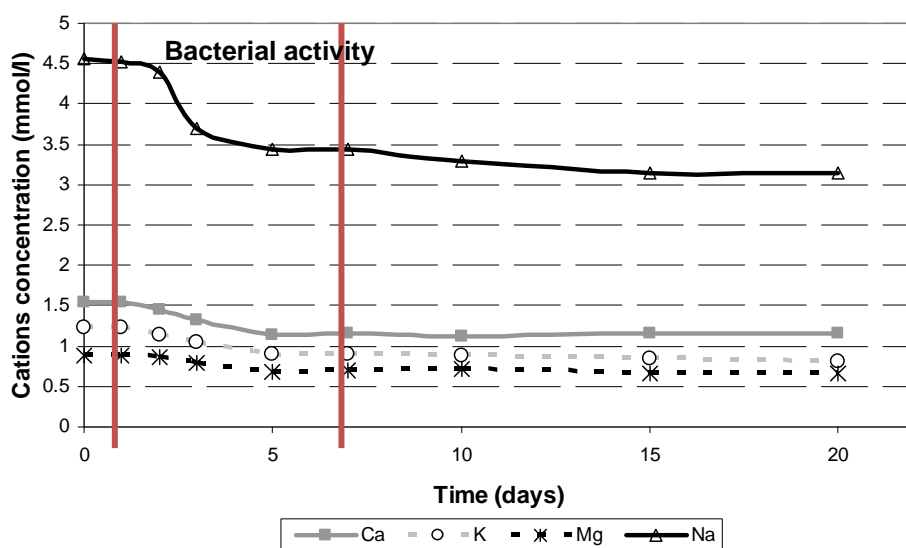


Figure 6: Evolution of cations' concentrations during Fe(III) reduction of beidellite by *Clostridium aurantitubricum*.



The cations in solution evolve during Fe(III) reduction (Figure 6 and 7). Cation variation already occurs between the reduced smectite and the free cations in solution when the bacterial reduction begins. It is dependent on the bacterial activity. The tendency observed is a decrease of the cation concentration in solution.

The decreasing is more important in presence of *Clostridium* species than *Shewanella* species (Table 1). The cation evolution could be explained by different chemical equilibrium such as: Distribution coefficient of elements between gel phases, precipitation of new phases, minerals exchange and solution.

Cations exchanged	Ca (mmol/l)	K (mmol/l)	Mg (mmol/l)	Na (mmol/l)
<i>Shewanella</i>	0.36	0.41	0.31	1.4
<i>Clostridium</i>	0.37	0.44	0.25	1.52
Abiotic	0.02	0.05	0.02	0.12

Table 1: Amount of cations exchanged during biological reduction or for abiotic reaction.

In these experiments, chemical analyses did not detect a significant concentration of aluminum in the solution of batch experiments. Al seems to be only in solide form in the experimental system. Even if dissolution processes are promoted by bacterial activity, Al is complexed by other elements of experiment

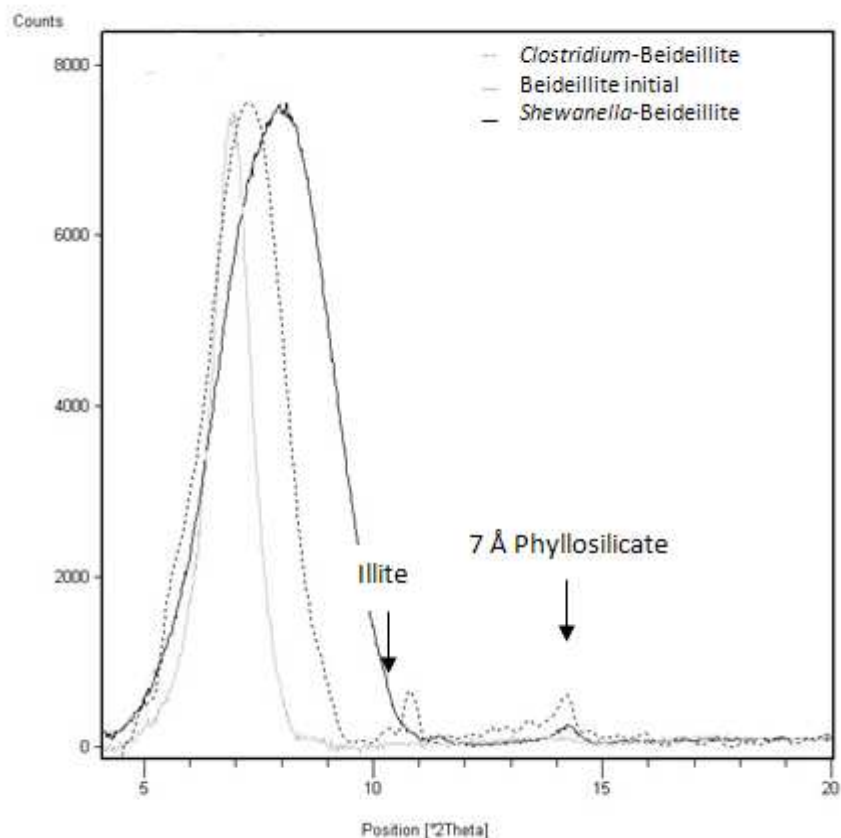
### 3. Bio-alteration of smectites phases

#### Beidellite : Cristallisation of 7 Å minerals

For Fe-rich beidellite, the initial alteration step directly associated to structural iron bioreduction is very important. Microscopic observations (SEM or TEM) have shown a high density of “gel” formed in bioaltered samples. These gels are composed of initial clay elements Si and Al but also an enrichment of cation elements such as Fe, Na, K Ca and Mg from initial solution.

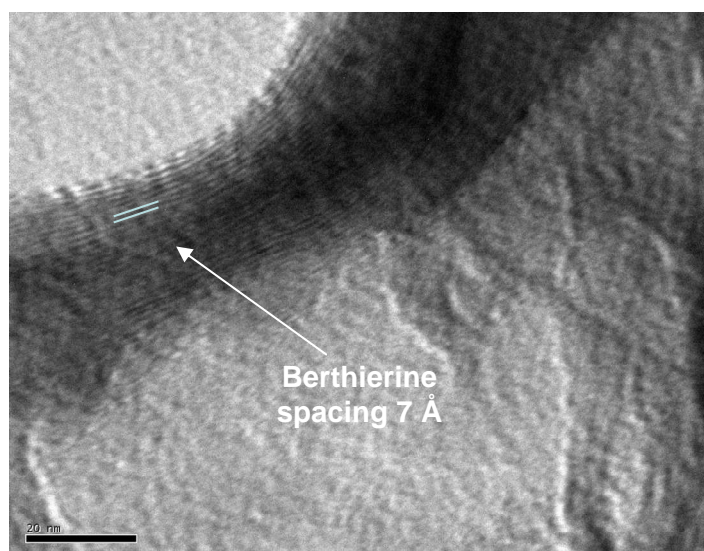
Moreover, XRD and TEM analysis have shown new cristalization of mineral:

The characteristic peak at 7 Å allows us to identify iron-rich member of the serpentine group. In order to precise clearly the type of serpentine new crystallized (Figure 8). Under the TEM, some thin crystals were identified showing dark area of high electron density facies typical thin crystals of Fe-rich phyllosilicates (Figure 9). Such phases have not been observed previously inside the initial samples. Nevertheless, even if there are clearly visible under the TEM, these new crystallites appear in very low quantities. The low temperatures experiments do not allow a large development of crystallization process. Moreover, iron oxides have been observed inside gel by TEM.

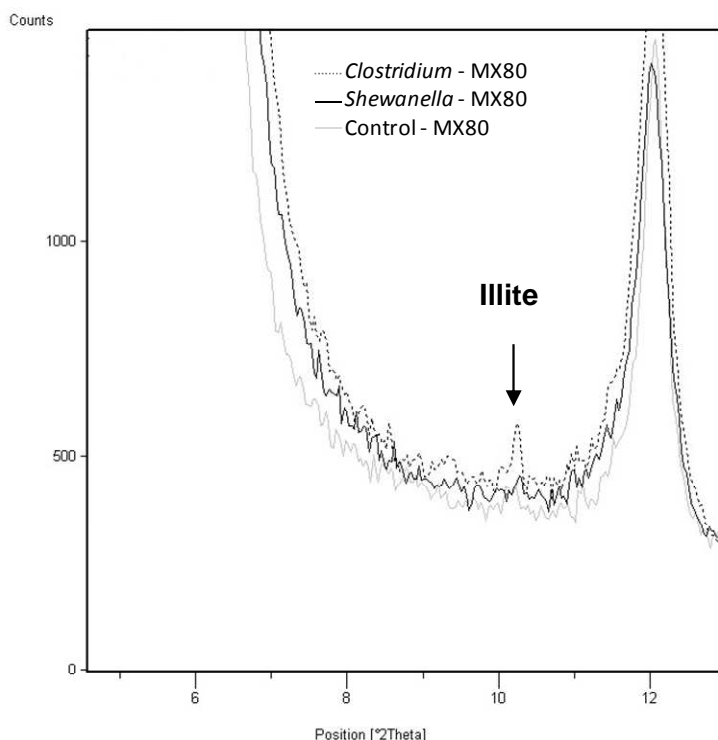


**Figure 8:** Detection of the new crystallized 7 Å phase from bio-alteration of Fe-rich beidellite by XRD. Abiotic experiment is in grey line, *Shewanella* sp. experiment (black line) and *Clostridium* sp. experiment (black colour). A very weak peak of illite mineral occurs also in *C. clostridium* experiment.

Besides, formation of a weak illite crystallization is also observed only on XRD spectra of *Clostridium* experiments. Activity of *Shewanella* sp. doesn't seem allow the illite formation (no characteristic peak of illite is observed in bio-altered samples).



**Figure 9:** TEM micrograph of bio-reduced beidellite sample by *Clostridium aurantibutyricum*. A berthierine-like mineral phase is observed: An approximately 50-nm-thick packet of 7 Å Berthierine layer occurred in smectite matrix. The chemical structural formulale was under treatment from TEM microanalyses.

**Montmorillonite: transition to illite (10 Å)**

**Figure 10 :** Detection of the new crystallized illite phase from bio-alteration of low Fe-content of MX80 montmorillonite by XRD. Abiotic experiment is in grey line, *Shewanella sp.* experiment is in black line and *Clostridium sp.* experiment is plotted in black colour.

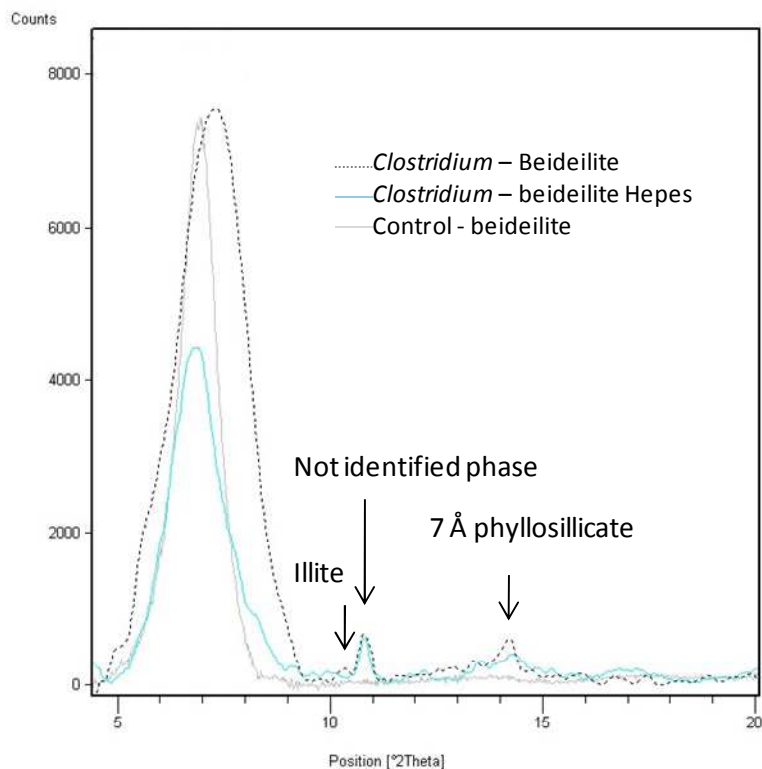
For low Fe-content mineral phases such MX80 montmorillonite, if the alteration process promoted by bacteria activity is evident, the new-crystallized phase is this case illite-like mineral (Figure 10). This illitisation process is observed only in few proportions. This result highlights that the mechanism of smectite to illite is dependant of the initial smectite composition including Fe(III) and Al(III) proportion in octahedral layer. Moreover, as we have observed in formation of 7 Å phase, illitisation formation is more intense in *clostridium* experiments, when pH is acid. So acidic conditions seem favor the biotransformation of smectite.

**Bio-induced processes in beidellite: effects of Fe(III) and H<sup>+</sup>**

In order to check this hypothesis, influence of H<sup>+</sup> was studied in presence of beidellite mineral in two conditions:

- In conditions where pH can decrease by production of organic acids from bacterial metabolism. pH decreases : 7 to 5.2
- In controlled pH conditions, where a Hapes tampon was added in excess in the solution to stabilized the pH. pH is stable : variation between 7 to 6.9 .

If the pH and thus the concentration in H<sup>+</sup> in the medium are controlled by the addition of organic buffer (Hepes), we observe a global reduction of the reactivity and in particular without formation of illite but the presence of newly crystallised 7Å phase is confirmed underlining the strong reactivity of structural iron (Figure 11).



**Figure 11:** Influence of acidic conditions in mechanism of smectite biotransformation. Here, beideillite was biotransformed in presence of *Clostridium aurantibutyricum*. The “Not identified phase” could be a  $\text{CaPO}_4$  mineral which has been crystallized after bioalteration.

These results show that the amount of structural Fe(III) in octahedral layer of smectite and the acidic conditions are two essential parameters to favour the biotransformation of smectite minerals. Besides, a high production of  $\text{H}^+$  and organic acid from bacterial activity seem to be necessary to perform the smectite to illite transformation.

## Discussion

Availability of Fe(III) from smectites for IRB promotes the destabilization of structural charge of octahedral layer and the followed increasing of clay dissolution. The smectite alteration process is driven by Fe(III) microbial attack which reduce Fe(III). In this mechanism, Fe(III) content and its structural distribution are the key parameter of clay dissolution.

The destabilization of smectite by bacteria activity promotes an increase of the cation evolution between altered smectite phase or new precipitate phase and cation in solution. Cations were found hardly in the gel as alteration product of smectite and especially in acidic conditions (case of *Clostridium* experiments).

Indeed, protons activity could entail an exfoliation of smectite layer and to facilitate the access of other cations to the reactional site of mineral surface. The cations fixation process will be increase when clay structure is altered. So, proton could favour adsorption of cations as  $\text{K}^+$  at the surface of altered smectite.

In these experiments, the bio-reaction products depend on two parameters:

- The initial Fe concentration of smectite.
- The acidic condition induced by bacterial activity.

Indded, more the structural iron's content is important, more the mineral phase is altered during bacterial activity. Two cases could explain the iron reactivity by bacterial reduction:

- High content of Al in the octahedral structure: smectite is few destabilized because the bond between Al and O is enough strong to keep a stable octahedral layer. If acidic condition occurs in this bioreduction process, formation of illite is possible by  $K^+$  adsorption.
- Low content of Al in the octahedral structure: smectite is highly destabilized during Fe(III) reduction and dissolution process of octahedral layer occurs in the smectite. This process forms 2 TO structure (serpentine group 7Å phase) which are stabilized by cations and Fe(II) bioreduced.

Nevertheless, even at low temperature, bacterial activity have a great influence on geochemical kinetics and allows the reactivity to produce new crystallization process and the appearance of illite or Fe-serpentine. Such processes were previously reported at temperature higher than 80°C for serpentine and higher than 150°C for illite (Mosser-Ruck et al., 2010 and Eslinger and Peaver, 1988).

In conclusion, combinaison of Fe(III) reduction process and acidic condition by releasing of protons during bio-induced reactivity allow such new crystallization process. One of the most significant result is the confirmation at low temperature of the illitisation process in acidic conditions firstly reported by Credoz et al., 2010., or in biologicaly condition by Kim et al., 2004. The combining of these two parameters could explain the low-temperature smectite to illite transition observed in natural environment like Hampshire basin, U.K, (Huggett and Cuadros, 2005) where reducing (wetting) and oxidizing (drying) cycles in gley soil allow irreversible  $Fe^{3+}$  reduction unduced by bacterial activities coupled with K fixation in clay mineral. In consequence, theses results showed the strong dependence of biolocal processes on the transformation of clay minerals in the low-temperature environments.

### Acknowledgment

We thank IRSN for helpful discussion and financial support

### References

- Bauer, A., and Velde, B. 1999. Smectite transformation in high molar KOH solutions: Clay Minerals. 34, 259-273.
- Bauer, A., Schäfer, T., Dohrmann, R., Hoffmann, H. and Kim, J.I. 2001. Smectite stability in acid salt solutions and the fate of Eu, Th and U in solution. Clay Miner. 36 (1), 93–103
- Brown, K. M., Saffer, D. M and Bekins, B. A. 2001. Smectite diagenesis, pore-water freshening, and fluid flow at the toe of the Nankai wedge. *Earth Planet. Sci. Lett.* 194, 97
- Creoz, A., Bildstein, O., Jullien, M., Raynal, J., Trotignon, L and Pokrovsky, O. 2010. Mixed-layer illite-smectite reactivity in acidified solution. Implications for clayey caprock stability in CO2 geological storage. Accepted in Applied Clay Science.
- Dominik, P., Pohl, H.N., Bousserhine, N., Berthelin, J and Kaupenjohann, M. 2002. Limitations to the reductive dissolution of Al-substituted goethites by *Clostridium butyricum*. Soil Biology Biochemistry. 34, 1147-1155.
- Dong, H., Kostka, J.E and Kim, J.W. 2003. Microscopic evidence for microbial dissolution of smectite. Clays Clay Miner. 51, 502–512.
- Eberl, D. 1978. The reaction of montmorillonite to mixed-layer clay: the effect of interlayer alkali and alkaline earth cations. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 42(1), 1-7.
- Eberl, D. 1993. Three zones for illite formation during burial diagenesis and metamorphism. Clays Clay Miner. 41:26- 37.
- Ehrenberg, S. N., and P. H. Nadeau. 1989. Formation of diagenetic illite in sandstones of the Garn Formation, Haltenbanken area, mid-Norwegian Continental Shelf: Clay Minerals. 24, 233–253
- Eslinger and Peaver. 1988. Clay Minerals for Petroleum Geologists and Engineers. SEPM Short course 22, Soc. Economic Paleontologists, Tulsa, USA.

- Esnault, L., Libert, M., Bildstein, O and Jullien, M. 2010. Clay-iron reducing bacteria interaction in deep geological environment: Experimental and modelling approach. P. Birkle & I.S. Torres-Alvarado (eds.) WATER-ROCK INTERACTION – Proceedings of the 13th International Conference on Water-Rock Interaction, Guanajuato, Mexico, 16–20 August 2010, CRC Press, Taylor & Francis Group, 939-942.
- Gaboriau H. 1991. Interstratifiés smectite-kaolinite de l'eure. Relations entre la structure, la texture et les propriétés en fonderie [Ph.D. thesis]. Orlans, France: Univ of Orlans. 273 p.
- Hower, J. 1981. Shale diagenesis. In Short course in clays and the resource geologist, Longstaff F. J. ed., Miner. Assoc. Canada, 60-80
- Huggett, J.M., and Cuadros, J. 2005. Low-temperature illitization of smectite in the late Eocene and early Oligocene of the Isle of Wight (Hampshire basin), UK. *American Mineralogist*. 90, 1192-1202.
- Jullien, M. (2006). Les smectites, vecteur de la réactivité physicochimique dans les systèmes argileux de confinement. Thèse d'Habilitation à diriger les recherches. INPL Nancy.
- Jullien, M., Kohler, E., Raynal, J. and Bildstein, O. 2005. Physicochemical Reactivity in Clay-Rich Materials: Tools for Safety Assessment. *Oil & Gas Science and Technology*. 60(1): 107-120.
- Karathanasis, D and Hajek B. F. 1983. Transformation of Smectite to Kaolinite in Naturally Acid Soil Systems: Structural and Thermodynamic Considerations
- Kostka, J. E., Stucki, J. W., Nealson, K. H., and Wu, J. 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.
- Kostka, J.E., Wu, J., Nealson, K.H and Stucki, J. W. 1999. The impact of structural Fe(III) reduction by bacteria on the surface chemistry of smectite clay minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 63, 3705-3713.
- Kim, J.W., Dong, H., Seabaugh, J., Newell, S.W., and Eberl, D.D. 2004. Role of microbes in the smectite-to-illite reaction. *Science*. 303, 830–832.
- Lantenois, S., Lanson, B., Muller, F., Bauer, A., Jullien, M and Plançon, A. 2005. Experimental study of smectite interaction with metal Fe at low temperature 1: smectite destabilization. *Clays and Clay Minerals*. 53, 597-612.
- Lee, S.Y. and Tank, R. W. 1985. Role of Clays in the disposal of nuclear waste: a review. *App. Clay Sci*. 1, 154-162.
- Masuda, H., Peacor, D. R and Dong, H. 2001. Transmission electron microscopy study of conversion of smectite to illite in mudstones of the nankai trough: contrast with coeval bentonites. *Clays Clay Miner.* 49, 109
- Mosser-Ruck, R., Cathelineau, M., Guillaume, D., Charpentier, D., Rousset, D., Barres and Michau, N. 2010. Effects of temperature, pH, and iron/clay and liquid/clay ratios on experimental conversion of dioctahedral smectite to berthierine, chlorite, vermiculite, or saponite. *Clays and Clay Minerals*. 58(2): 280-291.
- Motellier, S., Ly, J., Gorgeon, L., Charles, Y., Hainos, D., Meier, P and Page, J. 2003. Proposed indirect determination of the interstitial water composition of an argillaceous rock using the ionexchangers theory. Application to the callovo-oxfordian lowwater - content formation. *Appl. Geochem*. 18 (10), 1517– 1530.
- Myers, C.R. and Nealson, K.H. 1988. Microbial reduction of manganese oxides: Interaction with iron and sulfure. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 52 (11), 2727-2732.
- Perronnet, M., Villieras, F., Jullien, M., Razafitianamaharavo, A., Raynal, J and Bonnin, D. 2007. Towards a link between the energetic heterogeneities of the edge faces of smectites and their stability in the context of metallic corrosion. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 71, 1463-1479.
- Pevear, D.R. 1999. Illite and hydrocarbon exploration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96 (7): 3440-3446.
- Saffarini, D.A., Dichristina, T.J., Bermudes, D and Nealson, K. H. 1994. Anaerobic respiration of *Shewanella-Putrefaciens* requires both chromosomal and plasmid-borne genes. *Fems Microbiol. Letters*. 119, 271-277.
- Scott, J.H and Nealson, K. H. 1994. A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *J. Bacteriol*. 176, 3408-3411.

- Stemmler, S.J., Loyaux-Lawniczak, S and Berthelin, J. 2004. Effect of soil water content on the microbial reduction of iron oxides. *Comptes Rendus Geoscience*. 336, 1171-1179.
- Stucki, JW, Komadel P and Wilkinson HT. 1987. Microbial reduction of structural Fe<sup>3+</sup> in smectites. *Soil Sci Soc Am J*. 51:1663-1665.
- Stucki, J.W and Faiza Bergaya, G. L. 2006. Properties and Behaviour of Iron in Clay Minerals. *Developments in Clay Scienc*. Elsevier Chap. 8, 423-475.
- Stucki, J.W and Kostka, J. E. 2006. Microbial reduction of iron in smectite. *Comptes Rendus Geoscience*. 338, 468-475.
- Zhang, G., Dong, H., Kim, J and Eberl, D.D. 2007. Microbial reduction of structural Fe<sup>3+</sup> in nontronite by a thermophilic bacterium and its role in promoting the smectite to illite reaction. *American Mineralogist*. 92(8-9): 1411 – 1419
- Zhang, G., Kim, J., Dong, H and Sommer, A. H., 2007. Microbial effects in promoting the smectite to illite reaction: Role of organic matter intercalated in the interlayer. *American Mineralogist*. 92(8-9): 1401-1410
- Yongue-Fouateu, R., Yemefack, M., Wouatong, A. S. L. P., Ndjigui, D. and Bilong, P. 2009. Contrasted mineralogical composition of the laterite cover on serpentinites of Nkamouna-Kongo, southeast Cameroon. *Clay Minerals*. 44(2): 221 - 237

## 4. COMPLEMENTS ET SYNTHÈSE

Cette partie sera intégrée dans la version finale de l'article précédent.

### 4.1. MÉCANISMES DE RÉDUCTION ET D'ALTERATION

Les résultats montrent que l'attaque initiatrice de la bio-altération argileuse est située directement sur le Fe(III) octaédrique, où le phénomène de réduction se produit. Plusieurs mécanismes de réduction bactérienne sont possibles, soit par contact membranaire, soit par l'utilisation de molécules transporteurs d'électrons ou encore par la libération de molécules chélatantes. Cette attaque entraîne par la suite une déstabilisation du feuillet argileux avec une diminution de sa charge, ensuite compensée par l'entrée de cations en interfoliaire. Complétée par l'acidolyse microbienne, cette déstabilisation est dans certains cas, très importante et les éléments structuraux : Si, Al et Fe sont libérés en solution. Ces éléments constitutifs des argiles et les cations/anions en solutions interagissent et forment des « gels » en grandes quantités (Figure 40 et tableau 16) ou des cristallisations/néoformations de phases minérales argileuses tel que des phases à 7Å de type berthierine ou des phases à 10 Å de type illite (voir article IV).

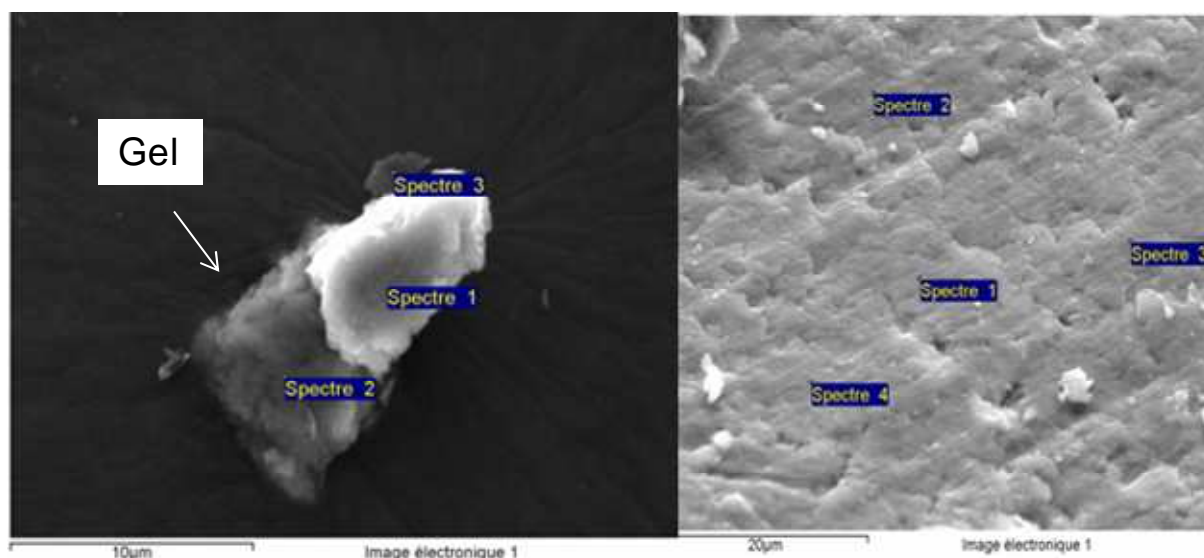


Figure 40 : Photos de la beidellite bio altérée (gauche) avec ses gels associés par *Clostridium aurantibutyricum* et de la beidellite témoin (droite)

	Éléments	Na	K	Mg	Al	Si	Ti	Fe	O	Total	Si/Al
<b>SmectiteTémoin</b>	Spectre (moyenne)	0,66	-	2,04	6,39	22,03	0,23	7,09	61,38	99,82	3,45
<b>Smectite altérée</b>	Spectre 1	0,77	0,47	1,10	8,20	32,75	-	16,90	39,79	99,98	3,99
	Spectre 2	-	1,68	-	5,01	27,08	-	59,93	5,98	99,68	5,41

Tableau 56: tableau d'analyses chimiques (% atomique) de la beidellite témoin non altérée et la beidellite altérée par analyses EDS

La formation de ces « gels » lors de la réduction bactérienne du Fe(III) structural des smectites entraîne une légère augmentation de la capacité d'échange cationique globale des solides (Tableau 17).

Cependant, bien que l'altération des smectites engendrée par la bactérie *Clostridium* soit plus importante que celle par la bactérie *Shewanella*, notamment avec la formation de gel, la CEC des smectites altérées est plus importante en présence de l'espèce *Shewanella* que de l'espèce *Clostridium* (Tableau 17). L'explication proposée est celle de l'activité bactérienne



qui produit des  $H^+$  ainsi que des acides organiques. En effet, ces acides peuvent entraîner une exfoliation des feuillets et favoriser l'accessibilité aux sites réactionnels de surface aux autres cations, dont le  $K^+$  (Credoz et al., 2010). Une des conséquences, serait le piégeage de ce cation à fort rayon ionique entre les feuillets argileux déstabilisés par l'activité de réduction des bactéries. Ce mécanisme pourrait aussi expliquer la formation d'illite retrouvée dans les expériences où le pH de la solution était le plus acide (en fin d'expérience le pH = 5,3 dans les « batchs » avec *Clostridium* alors qu'il est de 6,2 pour les « batch » avec *Shewanella*).

CEC (meq/100g)	Control	Shewanella	Clostridium
Beidellite	91,4 ± 0,5	99,6 ± 1,1	94,2 ± 1,5

**Tableau 67 : Mesure de la capacité d'échange cationique (CEC) avant et après altération microbienne.**

### Hypothèse de la bio-transformation des smectites à basse température

Les résultats obtenus concernant l'altération des smectites induites par les activités bactériennes ferriréductrices ont mis en évidence deux processus :

- **une formation de phases à 7Å, uniquement lorsque la teneur en Fe(III) structural est élevée (cas de la beidellite ferrifère).**
- **une formation d'illite, lorsque la teneur en Fe(III) structural est faible et que concentration en  $H^+$  dans le milieu est élevée.**

La formation de phase à 7Å peut être expliquée par la cristalochimie de la beidellite ferrifère. En effet, cette beidellite possède une teneur importante en Fe(III) dans l'octaèdre comparée à celle de Al(III). Le ratio Fe(III) / Al(III) dans les octaèdres vaut 1,2 / 0,7 (d'après Lantenois, 2003). Ce qui suppose l'existence de clusters de Fe(III) au sein des octaèdres, c'est à dire de liaisons Fe(III)-O-Fe(III) disséminées dans un ensemble de liaisons Fe(III)-O-Al. Ces hétérogénéités structurales contrôlent la réactivité des particules argileuses et les processus de réduction :

- Plus la structure contient du Fe(III) octaédrique plus la réduction bactérienne du Fe(III) va engendrer une déstabilisation importante du feuillet par une diminution de la charge de la couche octaédrique, fragilisant ainsi les liaisons Fe(III)-O.
- La présence de clusters de Fe(III) ne fait qu'accroître la fragilité du réseau octaédrique lors de la réduction du fer: les liaisons Fe(III)-O sont fortement affaiblies
- A l'inverse, dans la conformation di-octaédrique « habituelle » Fe(III)-O-Al, la liaison O-Al maintient la structure après réduction du Fe(III). L'aluminium (III) n'est pas réductible par voie microbienne.
- Plus la concentration en  $H^+$  est importante, plus la liaison Fe(II)-O est fragilisée, du fait des processus de réduction et peut être rompue et entraîner une dissolution du Fe(II) structural.

#### Mécanisme proposé pour la formation des phases à 7Å (Figure 41) :

Dans le cas de la beidellite, qui comporte une grande quantité de cluster de Fe(III), l'action conjointe et localisée des processus de réduction bactérien (Fe(III) → Fe(II)) et d'acidolyse résultant de l'activité des  $H^+$  du métabolisme bactérien va engendrer une déstabilisation importante de la couche octaédrique. Celle-ci favorise l'ouverture du feuillet octaédrique par rupture des liaisons Fe(II)-O et l'apparition de deux structures TO, reconstituant des briques phyllosilicatées élémentaires. Ces dernières peuvent alors refixer le  $Fe^{2+}$  en solution pour former des phases à 7 Å riches en fer, de type berthierine. En effet,

la dissolution bactérienne de la couche tétraédrique est difficilement réalisable en raison de l'absence de Fe(III) tétraédrique et d'une production de protons ou de chélatants insuffisante pour favoriser une dissolution efficace à pH acide. Par conséquent, la néoformation de phase à 7 Å par la réaction microbiologique est :

- dépendante de la teneur en Fe(III) octaédrique (rapport Fe(III)/Al(III) élevé),
- favorisée lorsque l'activité des H<sup>+</sup> est élevée dans le milieu

Séquences réactionnelles, adaptées et développées de Jullien (2006) :

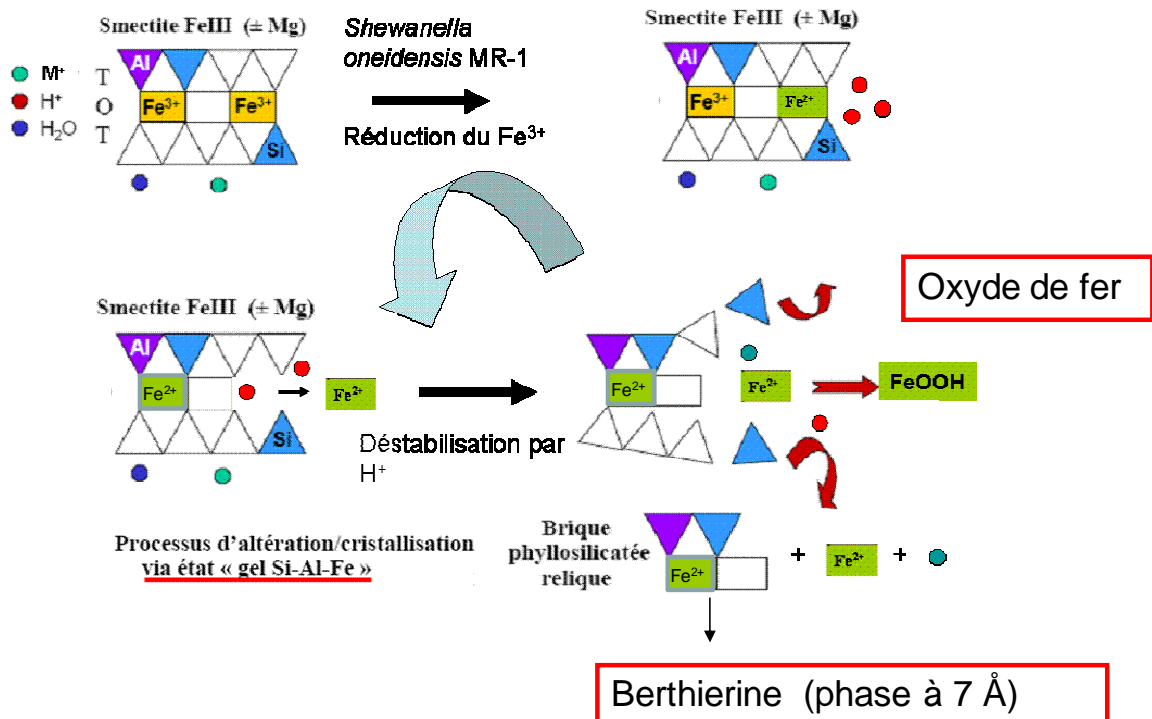


Figure 41: Représentation schématique d'une séquence réactionnelle de formation de phase à 7Å induite par la réduction bactérienne du fer(III) dans un système bactérie ferri-réductrice – smectite ferrifère.

Mécanisme proposé pour la formation des phases illitiques (Figure 42) :

Contrairement à la formation de phases ferrifères de type berthierine, la néoformation d'illite que l'on retrouve dans les expériences conduites avec la beidellite et la montmorillonite peut s'expliquer par :

- une plus faible teneur en Fe(III) structural dans les minéraux cibles, l'aluminium octaédrique étant majoritaire,
- le rôle prédominant des protons (acidification).

L'hypothèse proposée ici, est la diminution locale transitoire du pH qui pourrait conduire à l'exfoliation des feuillets argileux et ainsi augmenter l'accessibilité aux sites de surfaces et permettre *in fine* l'entrée de K<sup>+</sup> dans l'espace interfoliaire. Le rayon ionique important du potassium entraînerait la fermeture de l'interfoliaire et le K<sup>+</sup> passerait en position non échangeable, ce qui expliquerait la diminution de la CEC mesurée dans les expériences réalisées en présence de *Clostridium aurantibutyricum*.

Ce processus d'illitisation à faible température en conditions acides a été déjà décrit par Credoz *et al.*, (2010). D'autre part, ce mécanisme d'exfoliation/illitisation, favorisé par la

présence de  $H^+$ , pourrait expliquer l'illitisation des smectites/nontronites catalysées par l'action de microorganismes ferri-réducteurs à 25°C, observée par Kim et al (2004). Dans cette étude, en plus d'une grande concentration de  $K^+$  dans le milieu réactionnel, des sources de carbone organique et de transporteur d'électrons (catéchols/quinones) ont été ajoutées dans le milieu, ce qui accroît significativement l'excrétion et les productions de métabolites microbiens dans le système (« overflow » d'acides organiques et protons). Malheureusement, dans cette étude le pH n'a pas été mesuré, ce qui limite la portée de l'explication.

Séquence réactionnelle adaptée et développée d'après Jullien (2006) et Credoz (2009).

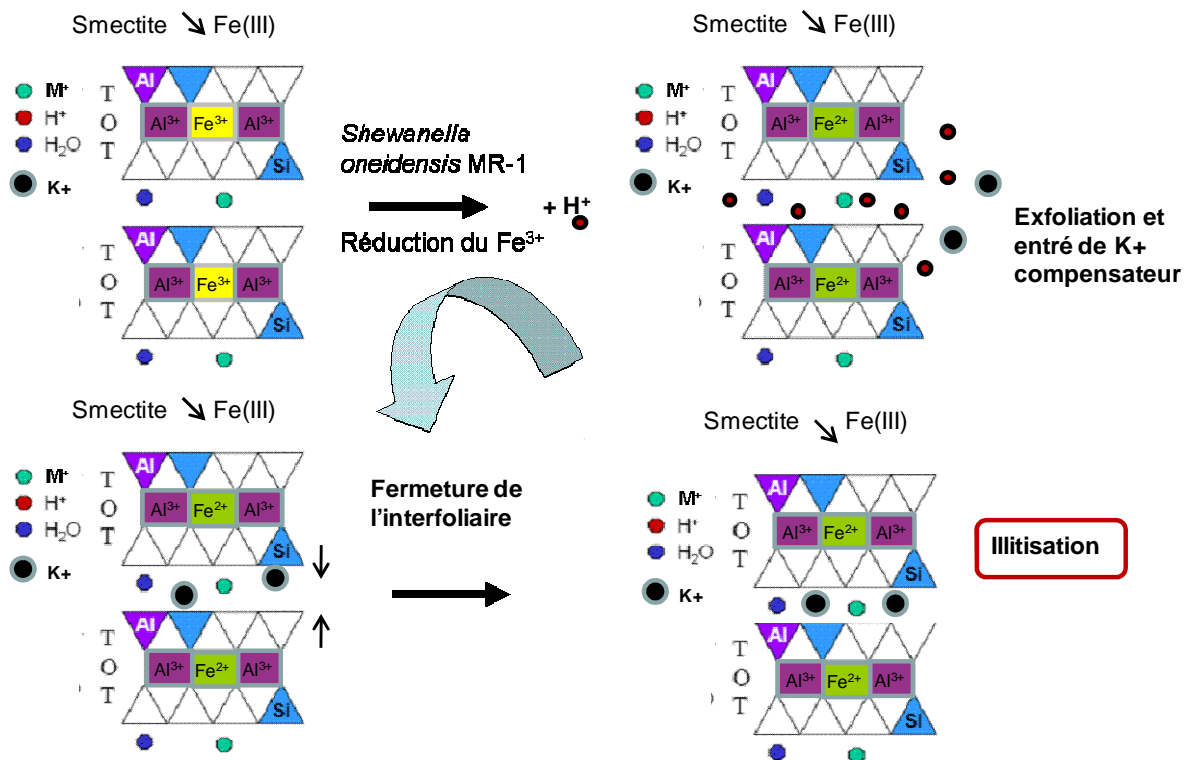


Figure 42: Représentation schématique d'une séquence réactionnelle d'illitisation induite par réduction dans un système bactérie ferri-réductrice – smectite ferrifère.

## 4.2. BILAN INTERMEDIAIRE

Dans cette partie, consacrée à l'étude de la biodisponibilité du fer, les résultats ont montré que le Fe(III) structural des matériaux argileux, qu'il soit dans des structures complexes tel que les argilites ou dans des phases purifiées de nature différentes (smectite, illite ou kaolinite), était disponible en tant qu'accepteur d'électrons et pouvait soutenir le développement bactérien. Ainsi, les matériaux argileux peuvent supporter une activité bactérienne ferri-réductrice en assurant une accessibilité et une disponibilité suffisante du Fe(III) pour les fonctions cellulaires des microorganismes. Ces résultats sont suffisamment significatifs pour être transposables dans les environnements profonds en regard de la proportion d'argile et de la teneur en Fe(III) significatif dans les argilites (chapitre II).

D'autre part, les smectites ont été clairement identifiées comme les phases minérales argileuses les plus réactives vis-à-vis de l'activité ferri-réductrice ou altérante des bactéries. Par ordre décroissant de réactivité, on peut classer de la manière suivante les trois minéraux étudiés :

*Smectite > Kaolinite > Illite*

Cette hiérarchisation est aussi présente dans la réactivité Fer/argile, (Lantenois 2003).

Ces résultats démontrent que la réactivité du système bactérie-argile dépend bien de deux paramètres clefs :

- La nature des phases minérales,
- la teneur en Fe(III) structural.

Ces paramètres déterminent la tenue du matériau initial. En effet, la smectite peut être déstabilisée jusqu'à destruction complète de sa structure cristalline et formation d'une phase gel.

Dans le cas de l'argilite, l'interstratifié Illite/Smectite (I/S) est altéré sous l'action des bactéries ferriréductrices pour former des phases illitiques et siliceuses aux dépens de la fraction smectite de l'I/S (article I). Ce comportement concorde avec le processus d'illitisation proposé lorsque les phases de type smectite initialement présentes dans l'argilite sont préférentiellement des montmorillonites à faible teneur en fer structural. Ce processus est favorisé par la présence de métabolites microbiens secondaires comme les protons ou les acides organiques.

Dans le cas des argiles purifiées, la dissolution d'éléments structuraux (Fe, Si) est parfaitement observable. L'activité bactérienne augmente significativement la solubilité ainsi que la vitesse d'altération de la smectite initiale (article II).

Cette altération bio-induite entraîne la néoformation de phases secondaires argileuses qui est dépendante :

- de la nature de la smectite,
- de composition en Fe(III) structural et de sa distribution cristalochimique,
- de la quantité en produit acidifiant ( $H^+$  et acides organiques) résultant du métabolisme bactérien.

La formation de phase à 7 Å de type berthierine est identifiée en tant que produit secondaire de la beidellite ferrifère.

La formation de phase à 10 Å de type illite est observée uniquement comme produit secondaire de la montmorillonite MX80. La formation de phase à 7 Å ferrifère n'est pas observée en raison de la faible teneur en fer du matériau initial.

Le résultat le plus marquant est que cette cristallisation a lieu à des températures très basses (inférieures à 40°C). La limite inférieure connue pour les processus de serpentinitisation (environ 70-80°C), est abaissée en présence de microorganismes ferriréducteurs anaérobies. Elle témoigne de l'influence considérable de l'activité microbienne anaérobie dans les transformations minéralogiques des minéraux argileux présents dans des systèmes complexes de stockage en milieu géologique profond.

# CHAPITRE V : BIOCORROSION DES MATERIAUX METALLIQUES

---

## 1. FER ET CORROSION EN MILIEU PROFOND

Dans l'évolution du stockage, les processus de corrosion des colis de déchets métalliques sont inévitables. Vis-à-vis de la sûreté du stockage, la pérennité des enveloppes métalliques assurant le confinement des déchets radioactifs est un enjeu primordial dans lequel la stabilité mécanique et chimique des conteneurs métalliques a un rôle essentiel. Quel que soit le processus de corrosion du fer des colis impliqués (aqueux ou argileux), la formation d'oxydes de Fe(III) cristallisés (goethite, magnétite, hématite) est toujours décrite dans la littérature (Andra, 2005 ; Papillon et al., 2003 ; Jullien et al., 2005 ; Féron, 2010 ; McDonald et al., 1992). Dans les environnements sédimentaires, ces minéraux sont très réactifs et participent à de nombreux processus biogéochimiques et diagénétiques : formation de dépôts de fer sédimentaire (Walker, 1984) ou transport colloïdal d'éléments métalliques (métaux lourds) dans les eaux douces (Hilton 1986 ; Thouveny 1994) ou piégeage particulière dans les environnements marins (Karlin et Levi, 1983 ; Chau et al., 1993).

Ainsi, les oxydes de fer peuvent avoir un rôle significatif dans les processus chimiques lors du stockage des déchets radioactifs en raison de leur forte affinité vis à vis des radionucléides. En effet, les radionucléides sont souvent sorbés à la surface des oxydes et hydroxydes de fer et manganèse dans les sols et les environnements de subsurfaces (Nealson et Little, 1997 ; Lovley 1995).

D'autre part, dans les processus biogéochimiques, le Fe(III) est identifié comme étant un des premiers accepteurs d'électrons externes significatifs pour la respiration microbienne (Walker, 1987 ; Cairns-Smith et al., 1992 ; de Durve, 1995). Ces processus de réduction du Fe(III) par voie microbienne ont été proposés pour expliquer la persistance des organismes vivants dans différents environnements extrêmes tels que : les dépôts archéens associés à des tapis microbiens (Vargas et al., 1998), la vie sur Mars (McKay et al., 1996) ou dans la biosphère profonde (Gold 1992).

Les oxydes de fer amorphes (HFO) et les oxydes de fer cristallisés constituent en général de bons accepteurs d'électrons disponibles pour les bactéries ferriréductrices (Lovley et Philips, 1987 ; Kotska et Nealson, 1995 ; Roden et Zachara, 1996 ; Zachara et al. 1998 et Fredrickson et al., 1998 ; Bonneville et al., 2004 ; 2006 ; 2009).

La réduction bactérienne de la magnétite est un processus commun et important dans les environnements de subsurface où la masse des oxydes de fer peut constituer un important réservoir d'accepteurs d'électrons (Dong et al., 2000). Dans un contexte de stockage des déchets radioactifs, la dissolution des oxydes de Fe par les bactéries ferriréductrices, peut remobiliser les radionucléides piégés sur les oxydes et les libérer dans les aquifères proches (Francis et Dodge, 1990), d'où l'importance de contraindre le phénomène.

## 2. DISSOLUTION BACTERIENNE DES OXYDES DE FER

Des expériences en présence de bactéries ferriréductrices et d'oxydes de Fe(III) (hématite – magnétite) ont été réalisées afin de vérifier l'efficacité des processus respiration/réduction des oxydes de Fe(III) cristallisés et de déterminer les transformations minéralogiques bio-induites.

Quatre expériences sont réalisées en réacteur batch en verre, sous agitation, à l'obscurité dans une étuve à 40°C :

- Deux expériences biotiques de réduction bactérienne en présence de *Shewanella oneidensis MR1* mise en contact avec 200mg de magnétite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ou d'hématite (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) suspendus dans 70ml de solution organique MClay. L'inoculation est réalisée à 4% v/v à partir d'une suspension de cellules bactériennes (~10<sup>7</sup> cellules/mL).
- Deux expériences abiotiques témoins non inoculées.

Dans toutes les expériences, 10mM de lactate sont ajoutées à la solution que ce soit comme donneur d'électrons pour les expériences biotiques ou comme condition témoin dans les expériences abiotiques. Les réacteurs sont hermétiquement scellés, dégazés par balayage avec un mélange de gaz (N<sub>2</sub> 90% CO<sub>2</sub> 10%). Une légère surpression est imposée en début d'expérience 1.5 bars), afin de maintenir des conditions d'anaérobiose pour le développement bactérien tout au long de l'expérience.

L'interaction entre la bactérie ferriréductrice *Shewanella oneidensis MR1* et les oxydes montre la biodisponibilité du Fe(III) structural des oxydes pour la respiration microbienne. Ceci entraîne une dissolution de fer dans le milieu expérimental qui a pour conséquence une dissolution du fer structural dans le milieu expérimental (Figure 45 et 46).

L'accessibilité du Fe(III) des oxydes est déterminée par la fraction molaire dissoute.

Le pourcentage de fer dissous de la magnétite :

$$\rightarrow [\text{Mol Fe dissous}] / [\text{Mol de Fe magnétite}] * 100 = 128.10^{-6} / 4,97. 10^{-3} = 2, 88\%$$

Le pourcentage de fer dissous de l'hématite :

$$\rightarrow [\text{Mol Fe dissous}] / [\text{Mol de Fe magnétite}] * 100 = 34.10^{-6} / 6,25. 10^{-3} = 0, 55\%$$

Les résultats montrent une altération bactérienne plus importante par dissolution du Fe de la magnétite que de l'hématite.

Ainsi, l'accessibilité biologique au Fe(III) est plus importante pour la magnétite que l'hématite, pour les matériaux synthétiques utilisés. (Figure 43 et 44).

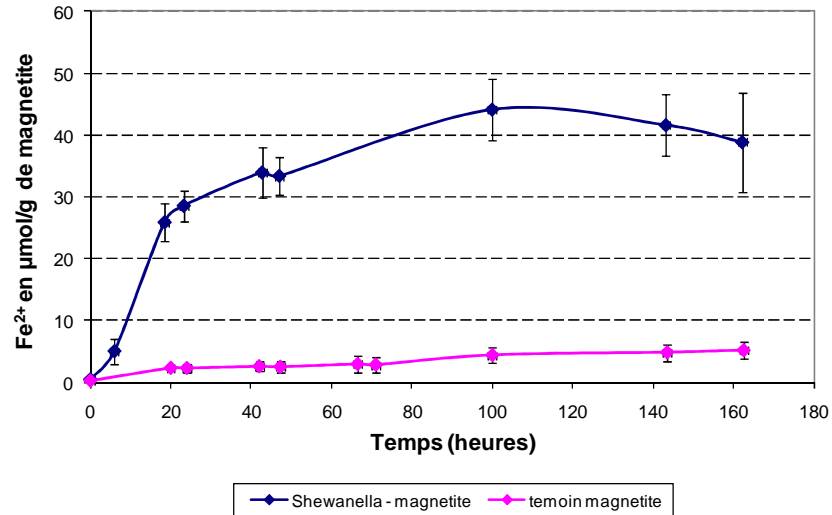


Figure 43 : Dissolution de la magnétite après réduction du Fe(III) par *Shewanella oneidensis* MR1.

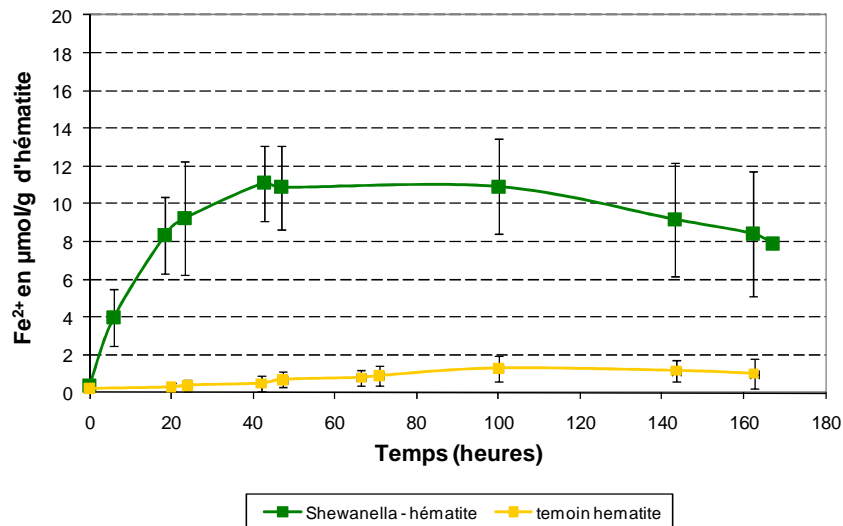


Figure 44 : Dissolution de l'hématite après réduction du Fe(III) par *Shewanella oneidensis* MR1.

Cette dissolution réductive du fer est corrélée à la consommation du substrat organique (lactate) et à la production de  $H^+$  (Figure 45 et 46). Toutefois, la consommation plus importante de lactate en présence de magnétite que d'hématite est accompagnée d'une diminution plus importante du pH (6,2 au lieu de 6,5 respectivement)



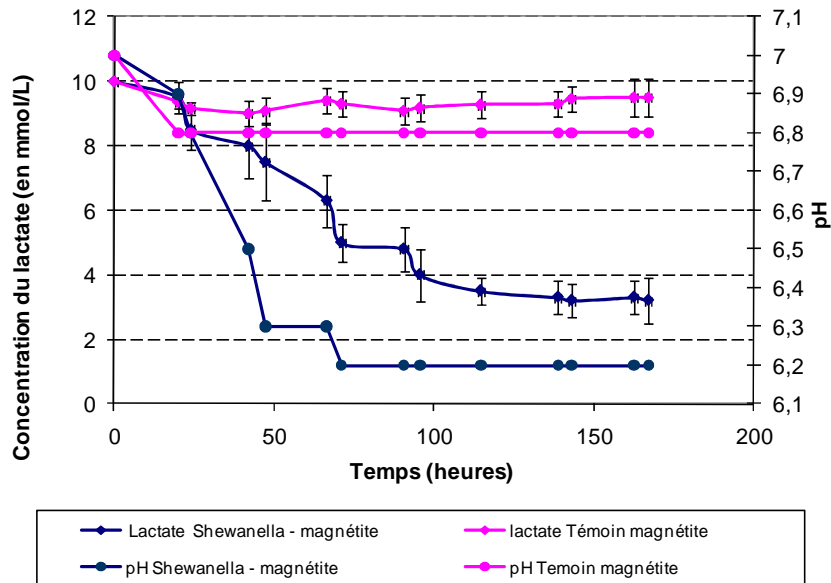


Figure 45 : Evolution des substrats (lactate) et des produits réactionnels lors de la réduction du Fe(III) de la magnétite par *Shewanella oneidensis* MR1.

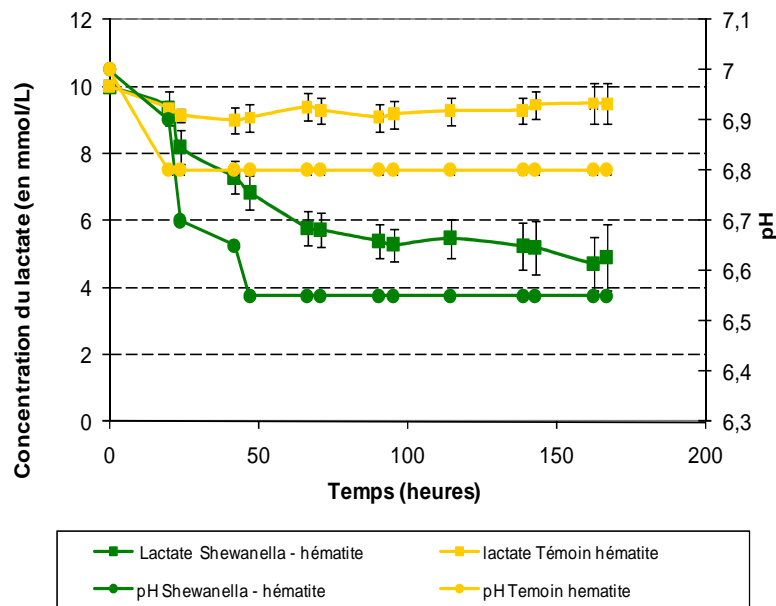


Figure 46 : Evolution des substrats (lactate) et des produits réactionnels lors de la réduction du Fe(III) de l'hématite par *Shewanella oneidensis* MR1.

Les phases néoformées durant ces expériences de réduction n'ont cependant pas pu être déterminées. Les caractérisations standards par Diffraction des Rayons X effectuées n'ont pas pu mettre en évidence de variations significatives dans les phases minérales. En effet la dissolution des oxydes n'est pas totale. Ainsi, dans le cas spécifique des oxydes de fer et en l'absence de phases secondaires, de type rouilles vertes (Berthelin et al., 2006), on peut dire que la dissolution des oxydes reste limitée et localisée à la surface des matériaux.

En conclusion, dans les systèmes expérimentaux testés, la bactérie *Shewanella oneidensis* MR 1, peut accéder au Fe(III) des oxydes de fer (hématite - magnétite) et les réduire. Comme ces minéraux sont susceptibles d'être produits lors des processus de corrosion des métaux, les bactéries ferriréductrices peuvent avoir un rôle important sur la dynamique de corrosion des colis de déchets radioactifs. La stabilité de ces composés

ferriques et métalliques au cours de l'évolution du stockage est un paramètre crucial pour prédire la sureté du stockage. L'équilibre dynamique entre les processus de corrosion des colis et ceux de réduction bactérienne des phases oxydes est donc déterminant, car ces produits de corrosion peuvent constituer des couches de passivation remobilisables par l'activité des bactéries.

Différentes questions se posent concernant l'impact bactérien sur la stabilité de ces phases minérales et plus directement sur les processus de corrosion :

- Quels sont les minéraux secondaires formés par les processus de corrosion métallique ?
- Quelle est la viabilité des bactéries ferriréductrices dans un contexte de corrosion métallique ?
- Quel est l'impact des processus de ferriréduction bactérienne dans les processus de biocorrosion ?

### 3. FER METAL : REACTION ABIOTIQUE / BIOTIQUE, ROLE SUR LES VITESSES DE CORROSION

#### Article IV

## Metallic corrosion processes reactivation supported by Iron Reducing Bacteria: implication on long term stability of protective layers

L. Esnault<sup>1-2\*</sup>, M. Jullien, O. Bildstein M. Libert

<sup>1</sup>CEA DTN/SMTM/LMTE, CE Cadarache, St Paul lez Durance, 13108, France

C. Mustin

<sup>2</sup>LIMOS UMR 7137 CNRS-UHP Nancy I - Science Faculty - Vandoeuvre les Nancy cedex – 54506, France

\*Corresponding author: loic.esnault@cea.fr, Tel+33 4 42254832, , Fax +33 4 42256272

Submitted and in correction process to Physics and Chemistry of the Earth, 2010.

Résumé : Dans les environnements géologiques profonds envisagés pour le stockage des déchets radioactifs, des conteneurs métalliques feront l'objet de processus de corrosion anaérobie. Dans ce contexte, la formation de produits de corrosion tels que la magnétite peut réduire la vitesse de corrosion par la formation d'une couche protectrice, dite couche de passivation. Cette étude vise à déterminer l'impact direct de l'activité des bactéries réductrices (IRB) du Fe(III) structural sur la stabilité des couches protectrices formées lors de la corrosion métallique. Des expériences en milieu fermé et à pression contrôlée ont été conduites pour caractériser les processus de corrosion du fer incluant la formation de magnétite secondaire et leurs modifications ultérieures suite à l'activité des bactéries réduisant le Fe(III) pour la respiration microbienne. Ces expériences tentent aussi de quantifier l'influence biologique sur le maintien d'un taux élevé de corrosion. Dans ces conditions d'expérimentation, les produits de corrosion formés comme la magnétite et l'hydrogène sont étudiés comme étant les seuls donneurs et accepteurs d'électrons efficaces pour les activités bactériennes ferriréductrices. Les résultats montrent que les bactéries ferriréductrices peuvent promouvoir la réactivation du processus de corrosion dans des environnements corrosifs en altérant la couche de passivation constituée d'oxydes de fer néoformés, stabilisée en conditions abiotiques. Ce phénomène pourrait avoir un impact majeur sur la stabilité à long terme des composés métalliques, matériaux impliqués dans le confinement des déchets radioactifs à vie longue.

# Reactivation of metallic corrosion processes sustained by Iron-Reducing Bacteria: implication on long-term stability of protective layers

L. Esnault<sup>1-2\*</sup>, M. Jullien<sup>1</sup>, C. Mustin<sup>2</sup>, O. Bildstein<sup>1</sup>, M. Libert<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CEA DTN/SMTM/LMTE, CE Cadarache, St Paul lez Durance, 13108, France

<sup>2</sup> LIMOS UMR 7137 CNRS-UHP Nancy I - Science Faculty - Vandoeuvre les Nancy cedex – 54506, France

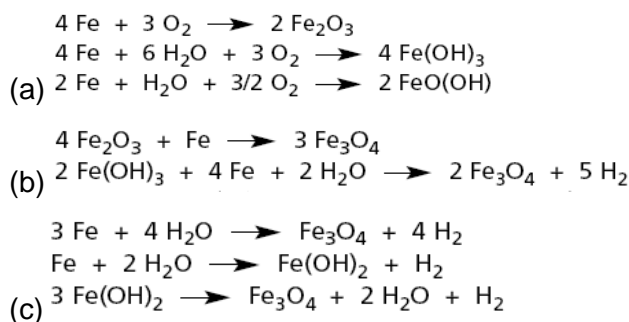
\*Corresponding author: loic.esnault@cea.fr, Tel+33 4 42254832, Fax +33 4 42256272

## ABSTRACT

In deep geological environments foreseen for the disposal of radioactive waste, metallic containers will undergo anaerobic corrosion. In this context, the formation of corrosion products such as magnetite may reduce the rate of these corrosion processes through the formation of a protective layer. This study aims at determining the direct impact of Iron-Reducing Bacteria (IRB) activity on the stability of corrosion protective layers. Batch experiments investigating iron corrosion processes including the formation of secondary magnetite and its subsequent alteration in the presence of IRB shows the bacteria ability to use structural Fe(III) for respiration which leads to the sustainment of a high corrosion rate. With the bio-reduction of corrosion products such as magnetite, and H<sub>2</sub> as electron donor, IRB promote the reactivation of corrosion processes in corrosive environments by altering the protective layer. This phenomenon could have a major impact on the long-term stability of metallic compounds involved in multi-barrier system for high-level nuclear waste containment.

## INTRODUCTION

The French concept for deep geological radioactive waste disposal is based on a multi-barrier system involving metallic containers placed in a thick clayey host rock in order to ensure radionuclide confinement. One of the most important criteria for the safety assessment of these geological repositories concerns the lifespan of the metal containers. In such deep geological environments (elevated pressure and temperature, low water content, presence of metallic components, and microbial activity), many factors may alter the expected containment properties of metal containers. In nuclear waste disposal conditions, many corrosion reaction processes are liable to occur: (a) aerobic aqueous corrosion during the operational phase, (b) transformation of minerals during the transition to anaerobic conditions, and (c) anaerobic corrosion (Andra, 2005):



These classical aqueous corrosion processes form thermodynamically stable phases such as Fe-oxides (mainly magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) and produce significant quantities of H<sub>2</sub>. Nevertheless, the stability of these oxide compounds may be affected by the action of biological agents sustaining the bio-catalysed

mechanisms which are known to consume them (Kukkadapu *et al.*, 2010). It is thus crucial to determine the quantitative impact of such bio-activated processes for the overall safety assessment and the long-term prediction of changes in radioactive waste disposal.

The activity of microorganisms has recently been evidenced in deep clayey environments: in Callovo-oxfordian argillite (Poulain, 2008); Opalinus clay (Mauclaire *et al.*, 2007; Stroes Gascoyne *et al.*, 2007) and in bentonite swelling clay used as an engineered barrier (Pedersen and Motamedi, 2000). These observations raise the question of the impact of microorganisms on corrosion parameters due to processes such as “biologically induced corrosion” (Stroes-Gascoyne, S. and J. M. West, 1997). As a first step, an inventory of the nutrients capable of supporting such bacterial activity was performed, taking into account energetic compounds and fluxes in the specific case of the French geological radioactive waste disposal concept (Esnault *et al.*, 2009). Different sources of energetic compounds and nutrients were identified: organic matter and H<sub>2</sub> being among the most important. H<sub>2</sub> is known as one of the most efficient energetic substrates for deep terrestrial subsurface environments (Lin *et al.*, 2005). Large amounts of H<sub>2</sub> gas are expected to be produced inside radioactive waste repositories, originating from the corrosion of metallic components in anoxic conditions and water radiolysis. Such conditions will consequently facilitate microbial activity in this specific environment (Libert *et al.*, this issue, Galès *et al.*, 2005). Fe(III) from minerals present in this environment could prove to be the main electron acceptor for microbial reduction. Corrosion products containing Fe(III), such as magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), also sustain the development of iron-reducing bacteria (IRB) in these environments and could have impact on the geochemical conditions of deep geological environments. New research was investigated on the impact of iron-reducing bacteria (IRB) on metallic corrosion processes in order to determine the biological parameters necessary to predict geochemical variations and the sustainability of metallic components in geological disposals. Biocorrosion processes triggered by IRB species have been less investigated in connection with sulphate-reducing bacteria (Castaneda and Benetton, 2008; Rainha and Fonseca, 1997; Féron *et al.*, 1997; Stott, 1993). However, it has already been seen that the reduction of insoluble ferric ion compounds into soluble ferrous ion compounds facilitates the removal of protective corrosion products formed on exposed iron alloy surfaces (Videla, 1996a). It has also been reported that IRB are involved in the formation of biofilms which promote corrosion (Geesey, 1991). Nevertheless, the role of IRB in biocorrosion is still under debate: while IRB is thought to enhance corrosion processes, other studies suggest that IRB may constitute a protection for carbon steel by the formation of a protective biofilm (Dubiel *et al.*, 2002; Lee and Newman, 2003; Herrera and Videla, 2009).

The objective of this research is to determine the impact of IRB activity on corrosion processes under geochemical conditions in a deep geological repository. To support these investigations, physicochemical studies were performed in the presence of a model microbe species: the ferric-reducing bacterium "*Shewanella oneidensis strain MR-1*". This paper particularly investigates the capacity of this bacterium to reduce Fe(III) from magnetite using hydrogen according to the following reaction:  $H_2 + Fe^{3+}_{magnetite} \rightarrow Fe^{2+}_{solution} + 2H^+$  in metallic corrosion processes.

## MATERIAL AND METHODS

### Batch experiments:

Two types of experiments – abiotic (without bacteria) and biotic (viable or no viable bacteria) – were performed in sterile anaerobic Teflon reactors (Table 1) containing 100mL of a synthetic medium (Mclay) and a base medium with the following composition: 9.0 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.33 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.33 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.01 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.485 mM CaCl<sub>2</sub>, 56.6 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10.0 μM NaCl, 1.0 μM FeSO<sub>4</sub>, 5.0 μM CoSO<sub>4</sub>, 5.0 μM Ni(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 3.87 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1.5 μM Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, 1.26 μM MnSO<sub>4</sub>, 1.04 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.2 μM CuSO<sub>4</sub>, 0.115μM arginine, 0.118μM glutamate, and 0.190μM serine. This Mclay medium was prepared by making minor changes to the medium's composition according to Kostka (1996) in order to resemble the chemical composition of natural argillite interstitial water as much as possible (Beaucaire *et al.*, 2008). In a second step, 1 g of

metallic iron powder (Merck,  $\varnothing$  10  $\mu\text{m}$ ) or synthetic magnetite mineral powder (Aldrich 31,006-9,  $<5\mu\text{m}$ ), sterilised in an irradiator at the CEA/Cadarache Centre (Cobalt radioactive source ( $^{60}\text{Co}$ ) delivering a total dose of 35 kGy to kill live bacteria), was added to the reactor. After introducing the bacteria samples (biotic experiments only), these batches were incubated at 40°C in the dark under permanent stirring. Control experiments (biotic experiments) were conducted in the same conditions with no viable bacteria obtained by heating at 120°C for 1 hour. Biotic experiments were performed at pH 7 (pH of Mclay medium) and abiotic experiments were conducted with 3 different pH levels (pH 6, pH 7 and pH 8) by adding the appropriate volume of HCl or NaOH (0,1N). Three replicates for each abiotic or biotic experiment were performed. A graph of the results shows the average of these three replicates. Anaerobic conditions were obtained during incubation by bubbling a gas mixture: 90%  $\text{N}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$  for metallic iron experiments and 60%  $\text{H}_2$ , 30%  $\text{N}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$  for magnetite experiments.

Experimental conditions	Medium	Minerals	Initial pH	Gas mixture	Replicates
<b>Abiotic</b>					
<b>No bacteria</b>	Mclay	Fe	6	$\text{N}_2(90\%) \text{CO}_2(10\%)$	3
	Mclay	Fe	7	$\text{N}_2(90\%) \text{CO}_2(10\%)$	3
	Mclay	Fe	8	$\text{N}_2(90\%) \text{CO}_2(10\%)$	3
<b>Biotic</b>					
<b>Dead bacteria</b>	Mclay	Fe	7	$\text{N}_2(90\%) \text{CO}_2(10\%)$	3
	Mclay	Magnetite	7	$\text{H}_2(60\%) \text{N}_2(30\%) \text{CO}_2(10\%)$	3
<b>Live bacteria</b>	Mclay	Fe	7	$\text{N}_2(90\%) \text{CO}_2(10\%)$	3
	Mclay	Magnetite	7	$\text{H}_2(60\%) \text{N}_2(30\%) \text{CO}_2(10\%)$	3

Table 1. Initial conditions for abiotic and biotic experiments.

### Bacteria:

The facultative anaerobic bacterium *Shewanella oneidensis* strain MR-1 was used as the iron-reducing bacteria (IRB). This bacterium is an obligate-respiratory bacterium, incapable of fermentation (Scott and Nealson 1994). *Shewanella oneidensis* MR-1 was grown in the Mclay culture medium with 50 mM of Fe(III) citrate as the electron acceptor prior to transfer to the experimental reactor. The initial cell density of all cultures was  $2.10^6 \text{ mL}^{-1}$ , as estimated by the relationship between optical density and direct cell counts (Francois et al., 2005). Optical density was measured at 600 nm using Cary 5G, UV-Vis-NIR spectrophotometer (Varian). Measurements were corrected by a blank containing only pure Mclay medium. The viability of the *Shewanella oneidensis* MR1 cells was checked using a combination staining of Syto® 9 green fluorescent nucleic acid (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and propidium iodide (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Cells with an intact cell membrane, considered as living, will stain green, while cells with a damaged cell membrane, which are here considered as dead, will stain red. The protocol is based on the LIVE/DEATH® BacLight™ Bacterial Viability Kits (Molecular Probes).

### Geochemical analyses

#### Aqueous iron:

A 4 mL reactor sample was taken to monitor any chemical changes in the trace element (i.e. iron) and filtered at 0.22  $\mu\text{m}$  (millipore® filter). The batch solution was monitored for total Fe (dissolved FeII+FeIII) using coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES Jobin Yvon® ultra-trace). The sample was acidified with Merck Suprapur nitric acid (4%, final volume).

The Fe(II)/Fe(III) ratio in solution was monitored using Ferrozine colorimetric methods adapted from Viollier *et al.* (2000), which utilises dissolved Fe(III) solutions and their reduced products after the addition of hydroxylamine hydrochloride as standards, and interpreted according to the updated procedure described by Washington *et al.* (2004).

## H<sub>2</sub> produced:

An optimised method of H<sub>2</sub> measurement at low pressure was carried out using gas chromatography (Varian® GC 4900) coupled with a sensitive pressure sensor (Baumer®; 0 to 2\*10<sup>5</sup>Pa ±10<sup>-2</sup> Pa). To perform gas analysis, thermostatic reactors were linked to gas chromatography by a sterile syringe. Gas was pumped and mixed with a vector gas (nitrogen) and analysed through a molecular sieve packed column in order to identify the H<sub>2</sub> proportion in each reactor by catharometric detection.

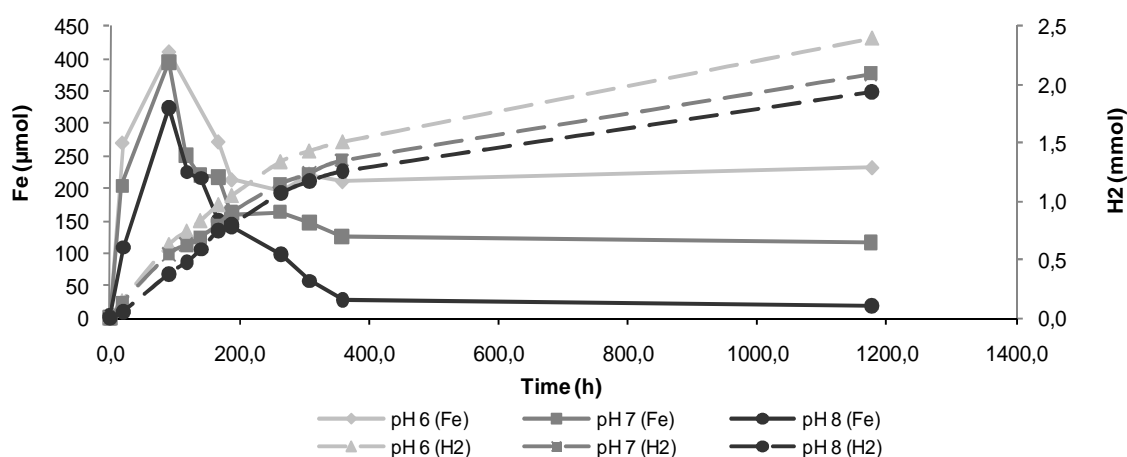
## Corrosion products:

Samples were characterised before and after biotic and abiotic alteration by X-Ray Diffraction (Bruker®). At the end of each experiment, the sample was collected and washed carefully twice with 50 mL ultrapure water. Slurry of the final suspension was deposited on XRD-dedicated glass slides and air-dried to enable a favourable orientation of the particles for efficient diffraction. XRD scans were recorded between 2 and 40°2θ (counting time of 2s per 0.02°2θ step size) with a Bruker D8 diffractometer (Cu radiation at 40 kV and 40 mA) equipped with a Göbel mirror and a Sol-X detector.

## RESULTS

### 1 Abiotic corrosion processes

H<sub>2</sub> is produced during the aqueous anaerobic corrosion experiments (Figure 1); its concentration increases in a non-linear fashion with time (the corrosion kinetics increase during the first step from 0 to 300 h, before decreasing from 300 to 1200 h during the second step). In parallel, the iron concentration increased during the first stage and peaked at 100 h, then decreased during the second stage from 100 to 200 h, before finally stabilising after 200 h. This is interpreted as a decrease in the corrosion kinetics (H<sub>2</sub> production curve) while a significant proportion of the iron, initially released, precipitates in solid form in the system. This phenomenon is more obvious in the experiment with pH 6 than in the experiment with pH 8, as can be expected due to the well known dependency of corrosion processes on pH (decreasing corrosion rate from pH 6 to pH 8). An increase in pH was observed at the end of the experiments (7.72 for the pH 6 experiments, 8.05 for the pH 7 experiments and 8.56 for the pH 8 experiments).

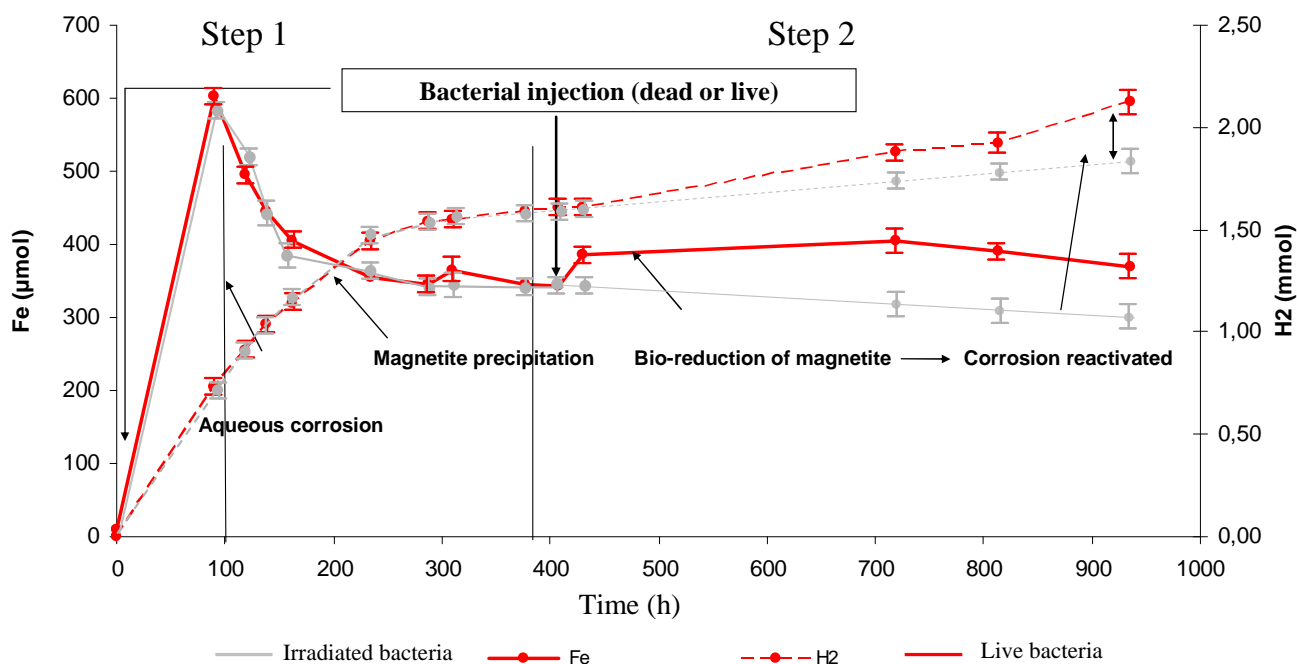


**Figure 1: Anaerobic aqueous corrosion of iron powder at different pH: variation in total dissolved iron (solid lines) and H<sub>2</sub> (dashed lines) concentration in batch reactor. (Dashed lines = H<sub>2</sub>, solid lines= dissolved Fe)**

The fact that the precipitation of iron mineral is followed by a decrease in the  $H_2$  produced suggests that a protective layer may have formed on the surface of the metallic iron (Papillon *et al*, 2003). XRD analysis does show the formation of magnetite in a large proportion and siderite in a smaller proportion for abiotic corrosion experiments (Figure 4).

## 2 Biocorrosion processes (with or without viable bacteria)

These experiments (see Step One, Figure 2) were started in the same conditions as the abiotic experiments for up to 400 h. Bacteria samples (dead for the control experiment and alive for the biotic experiment) were added to the reactor with iron powder in the MClay solution media at pH 7. No differences were observed in the corrosion process between both biotic experiments - dead (grey line) or live bacteria (red line). The same corrosion profile was obtained for both the abiotic and abiotic experiments (Figure 1), i.e., increased  $H_2$  production and iron concentration in solution (up to 100 h) followed by a decrease in both the dissolved iron concentration and the  $H_2$  production kinetics (from 100 h to 300 h). Nevertheless, the corrosion rate is higher in the presence of organic biomass, live bacteria or dead bacteria (Figure 2, Step One) in comparison with the abiotic experiment at pH 7 (Figure 1). Metallic corrosion is therefore accelerated when the ionic strength of the solution is high:  $1.0 \pm 0.05$  mmol of  $H_2$  is produced in the abiotic experiment (Figure 1 at 200h) compared with  $1.3 \pm 0.08$  mmol of  $H_2$  in the biotic organic experiments (Figure 2 at 200h). Moreover, no bacteria are alive at 380 h, which can be explained by the lack of Fe(III) mineral at the beginning of the experiment which entails dead cells.

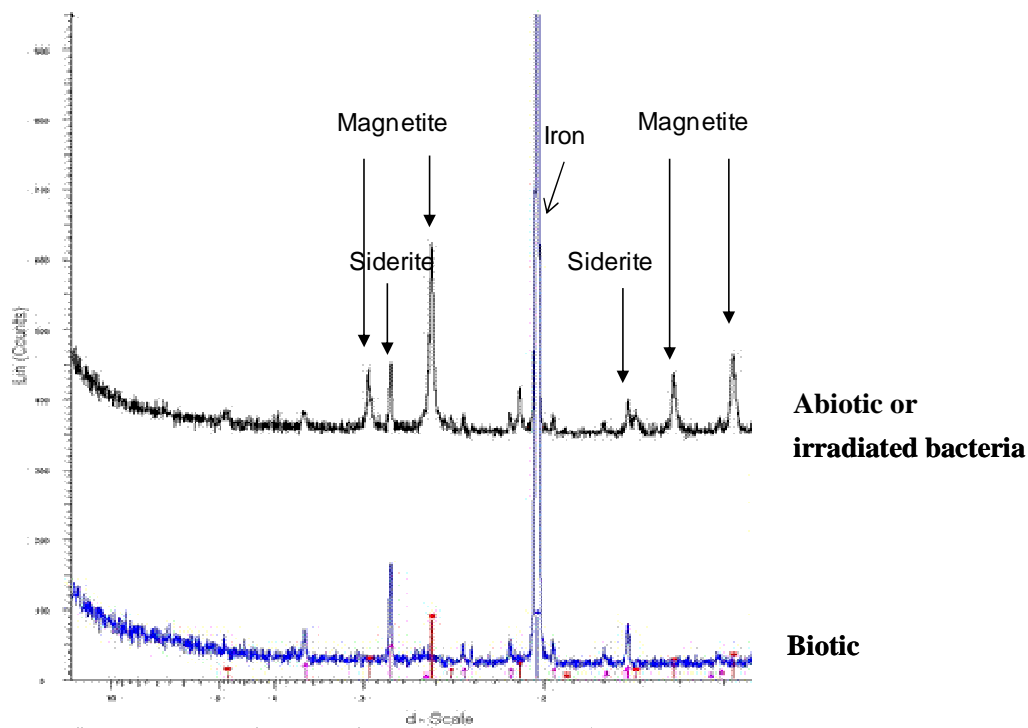


**Figure 2: Influence of IRB on metal corrosion: bioreduction of corrosion products (grey curve: experiment with dead bacteria; red curve: experiment with live bacteria; iron (solid lines) and  $H_2$  (dashed lines) concentration.**

In the second step (Figure 2, Step Two) at 400 h, bacteria samples (irradiated or alive) were once again added to both the control experiment (irradiated bacteria) and the live experiment. Irradiated bacteria were added in order to compare results at the same ionic strength for both biological experiments with pH 7. This was also necessary to determine the influence of living bacterial activity from the corrosion process when corrosion products are present in the system. No differences were observed between the abiotic corrosion experiment with pH 7 (Figure 1) and the experiment with additional irradiated bacteria (Figure 2, grey curve) in terms of the  $H_2$  production and iron in solution (decrease in both



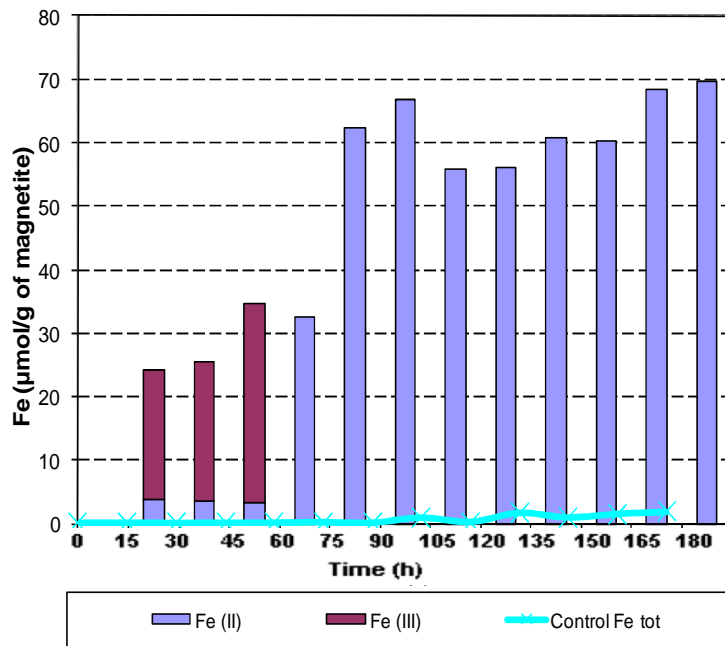
parameters). This indicates that the change in the ionic strength does not affect the alteration of corrosion products in these experimental conditions (Figure 4). In living bacteria experiment, bacteria are still alive at the end of experiment ( $1.10^7 \text{ mL}^{-1}$ ). Moreover, a significant increase in the iron concentration in solution and an increase in the  $\text{H}_2$  production were observed in the presence of living bacteria (Figure 2, red curve), i.e. the activity of living bacteria governs the reactivation corrosion processes. XRD analyses confirm this observation; they reveal the complete dissolution of magnetite in favour of siderite in the presence of bacterial activity, whereas magnetite is still present in the case of iron corrosion with irradiated bacteria (Figure 4). The formation of Fe (II)-phosphate mineral such as vivianite was not observed due to the low concentration of phosphate in solution (simulating the composition of deep water). In the context of corrosion of radioactive waste containers, IRB development is sustained by the consumption ( $\text{H}_2$ ) and the reduction of corrosion products (iron oxides such as magnetite). The IRB activity could therefore decrease the effect of the “protective” magnetite layer and consequently increases or activates the corrosion rate. The bacterial activity therefore has an indirect influence on the corrosion processes.



**Figure 4: X-Ray Diffraction Analysis: Biotic impact on corrosion process: Magnetite disappears in presence of IRB and the siderite peak increases in intensity.**

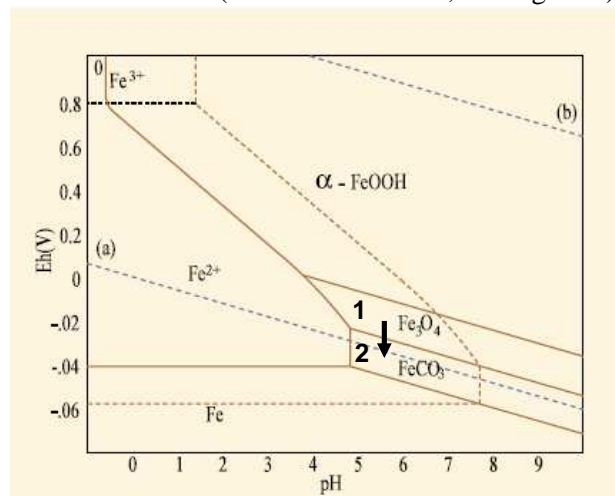
### 3 Bio-reduction mechanisms of corrosion products in deep geological environments

In order to validate magnetite reduction by hydrogenotrophic metabolism, several new experiments containing pure magnetite were performed in the same conditions, but with an anaerobic atmosphere ( $\text{H}_2/\text{N}_2/\text{CO}_2$  gas, 60/30/10% respectively). These experiments showed an increase of Fe(III) and Fe(II) in solution in presence of IRB species compared with the same experiment in abiotic conditions (see the total Fe in the control experiment in Figure 3). The microbial alteration of magnetite is only possible due to the bioavailability of structural Fe(III) and  $\text{H}_2$  consumption (results not shown) in a process involving live metabolism. The biocorrosion hypothesis is therefore validated through the respiration of Fe(III) contained in magnetite, and supported by  $\text{H}_2$  as single electron donor.



**Figure 3: Bio-alteration of magnetite by *Shewanella oneidensis* MR1 in the presence of  $H_2$  as electron donor. Fe speciation is plotted in the graph: purple bars ( $Fe^{3+}$ ) and blue bars ( $Fe^{2+}$ ), black curve represents polynomial fit for total aqueous Fe).**

Previous experiments have shown that the presence of corrosion products such as magnetite may decrease the iron corrosion rate. It is thought that magnetite forms a protective layer on the metallic iron surface and that  $H^+$  from the water can not access the metal: this phenomenon is a well-known corrosion process which includes the formation of passivation layer which protects metal frames (Sanchez-Lopez, 1998). Nevertheless, IRB activity promotes the Fe(III) reduction of magnetite with a decrease in the redox potential (-200 to -350mV) compared with the abiotic experiments (-100 to -250mV), together with the alteration of the magnetite protective layer. Moreover, Fe(III) respiration results in  $H^+$  production which may significantly affect the stability of others minerals (carbonate and clay minerals), e.g. promoting the formation of siderite at the expense of calcite (Figure 5). Therefore, chemical equilibrium tends to favour the formation of siderite in the disposal environment when carbonate is found in the interstitial water (around  $10^{-2} mol.L^{-1}$ , see Figure 5).



**Figure 5: Pourbaix diagram for  $Fe-H_2O-CO_2$  ( $pCO_2 = 10^{-2} atm$  and  $a(Fe^{2+})=1$ ). A level of  $10^{-2}$  atmosphere of carbon dioxide is used in this model. This partial pressure is representative in the groundwater environment. Influence of bacteria reduction on Fe(III) oxides to promote the formation of iron carbonate ( $FeCO_3$ ); transition from stage 1 to stage 2 in the graph.**

## DISCUSSION AND CONCLUSION

The activity of iron-reducing bacteria has been investigated under conditions close to those expected in radioactive waste repositories in order to assess its impact on the containment properties and any long-term changes in the system.

This study does not demonstrate the corrosive protective phenomenon of IRB in terms of metal behaviour as discussed in a previous study by Videla and Herrera (2009). These authors explain that corrosion inhibition is developed on biofilmed metal surfaces when the exopolysaccharide (EPS) impede the dissolution of  $\text{Fe}^{2+}$  corrosion products. EPS behaves as a barrier between the metal and the environment. However, this is still a matter of debate as shown by previous studies (Myers and Nealson, 1998; Ottow and Munch, 1980) showing that physical contact between bacteria and the iron oxide is necessary to achieve iron reduction. However, other experiments have shown that the iron reduction of Fe(III) hydroxide was possible at a distance through a biosynthesized electron shuttle (Lies *et al.* 2005; Ramasamy *et al.*, 2009). In our study, the magnetite was destabilised and the production of  $\text{H}_2$  increased significantly in the biotic experiments, while no reactivated corrosion was observed in the abiotic experiment. Even if a biofilm is formed, the  $\text{H}_2$  production nevertheless increases significantly after bio-reduction, which indicates that the metal surface is not protected against the corrosive environment.  $\text{Fe}^{2+}$  corrosion products are released into the solution and may react with carbonates to promote the formation of siderite.

Potential impacts include the geochemical equilibrium in the interstitial water and its effect on the stability of the corrosion products. Previous studies stressed the role of IRB, which can surpass SRB and methanogenic bacteria in the use of  $\text{H}_2$  as an energy source (Fredrickson, 1996). In clayey sedimentary and diagenetic environments, the geochemical control of the iron cycle is the result of competition between reactions involving sulphur, carbonate and clay mineral. Experimental and modelling studies of iron-clay interactions (Lantenois, 2003; Jullien *et al.* 2005; Bildstein *et al.* 2006; De Combarieu *et al.* 2007) have revealed the presence of iron oxide (magnetite essentially) and Fe-rich silicate from the serpentine group as corrosion products. The formation of magnetite or other Fe(III)-bearing minerals and molecular  $\text{H}_2$  may promote the selection of hydrogenotrophe IRB species for bacterial activity. This study demonstrates the possibility of using Fe(III) produced from magnetite (anaerobic corrosion of metallic iron) as an electron acceptor for bacterial development with the presence of  $\text{H}_2$  in the context of active metallic corrosion. Consequences of this Fe(III) bacterial respiration include the alteration of the magnetite protective layer and the possible reactivation of iron corrosion (with further  $\text{H}_2$  production), considering that the metal surface will be exposed to the corrosive solution. The IRB species therefore promote indirect corrosion by the respiration of Fe(III) contained in corrosion products.

In conclusion, the role of IRB activity could be a key parameter in the safety assessment of deep geological disposal. Corrosion products, the mixed valence of Fe oxides (e.g. magnetite) and  $\text{H}_2$  gas will all favour the hydrogen-oxidising IRB development in the context of active corrosion of metallic radioactive waste containers. This bacterial activity may alter the corrosion products acting as a protective layer on the metal surface. In the geochemical conditions of a deep geological repository, IRB activity could be favoured in environments of active corrosion. This could support the reactivation of corrosion processes and consequently have an impact on the sustainability of metallic compounds involved in safety functions of underground disposal components.

### Acknowledgements

We thanks IRSN, D. Pellegrini and F. Marsal for helpful discussion and financial support

### REFERENCES

Andra., 2005. Analogue archéologiques et corrosion, Collection Sciences et Techniques. Andra scientific report available at [www.andra.fr](http://www.andra.fr).

- Bildstein, O., Trotignon, L., Perronnet, M., Jullien, M., 2006. Modelling iron-clay interactions in deep geological disposal conditions. *Physics and Chemistry of the Earth*. 31, 618-625.
- Beaucaire, C., Michelot, J.L., Savoye, S., Cabrera, C., 2008 Groundwater characterisation and modelling of water rock equilibria in the Tournemire argillaceous formation (Aveyron, France). *Applied Geochem.* 23, 2182-2197.
- Castaneda, Homero., Benetton, Xochitl D., 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.
- De Combarieu, G., Barboux, P., Minet, Y., 2007. Iron corrosion in Callovo–Oxfordian argillite: From experiments to thermodynamic/kinetic modelling. *Physics and Chemistry of the Earth*. 32, 346–358.
- Dubiel, M., Hsu, C.H., Chien, C.C., Mansfield, F., Newman, D.K., 2002. Microbial iron respiration can protect steel from corrosion. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1440–1445.
- Esnault L., Libert M., Mustin C., Jullien M 2009. Availability of nutrient sources for bacterial development in deep clayed environments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 73-13S.
- Féron, D., Dupont, I., Novel, G., 1997. Influence of microorganisms on the free corrosion potentials of stainless steels in natural seawaters. In aspect of Microbially Induced Corrosion, ed D. Thierry, EFC Publication n°22, The institute of Material and technics, London, 103-112.
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Cools, I., Van Impe, J.F and J. Debevere., 2005. Environmental factors influencing the relationship between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. 99(6), 1365-2672.
- Fredrickson, J.K., Gorby, Y.A., 1996. Environmental processes mediated by ironreducing bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 7 (3), 287–294.
- Galès, G., Libert. M., Sellier, R., Cournac, L., Chapon, V., Heulin, T., 2004. Molecular hydrogen from water radiolysis as an energy source for bacterial growth in a basin containing irradiating waste. *FEMS Microbiology Letters* Vol 240(2), 155–162.
- Geesey, G., 1991. What is biocorrosion? Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. In: Flemming, H.C., Geesey, G.G. (Eds.), *Proceedings of the International Workshop on Industrial Biofouling and Biocorrosion*. Springer- Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Herrera, L. K., Videla, H. A. 2009. Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63(7), 891-895.
- Jullien, M., Kohler, E., Raynal, J., Bildstein, O., 2005. Physicochemical reactivity in clay-rich materials: tools for safety assessment. *Oil Gas Sci. Technol. Rev. IFP* 60 (1), 107–120.
- Kostka, J. E. Stucki., J. W. Nealon, K. H., WU, J., 1996. Reduction of structural Fe(III) in smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* strain MR-1. *Clays and Clay Minerals* 44(4), 522-529.
- Kukkadapu, R. K., N. P. Qafoku, B. W. Arey, C. T. Resch, and P. E. Long. 2010. Effect of extent of natural subsurface bioreduction on Fe-mineralogy of subsurface sediments, *J. Phys. Conf. Ser.* 217 012047
- Lantenois, S., Lanson, B., Muller, F., Bauer, A., Jullien, M., Plançon, A., 2005. Experimental study of smectite interaction with metal iron at low temperature: 1. Smectite destabilization. *Clays and Clay Minerals* 53 (6), 597–612.
- Lee, K., Newman, D.K., 2003. Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. *Applied Microbiology Biotechnology* 62, 134–139.
- Libert, M., Esnault L., Jullien M., Bildstein O. - Molecular hydrogen: an abundant energy source for bacterial activity in nuclear waste disposal. *Physic and Chemistry of the earth*, this issue.
- Lies, Douglas P., Hernandez, M. E., Kappler, A., Mielke, R. E., Gralnick, J A., Newman, D. K., 2005. *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 4414–4426.
- Lin, L. H., Slater, G. F., Lollar, B. S., Lacrampe-Couloume, G., Onstott, T. C., 2005. The yield and isotopic composition of radiolytic H<sub>2</sub>, a potential energy source for the deep subsurface biosphere. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69(4), 893-903.

- Mauclaire, L., Mckenzie, J. A., Schwyn, B., Bossart, P., 2007. Detection and cultivation of indigenous microorganisms in Mesozoic claystone core samples from the Opalinus Clay Formation (Mont Terri Rock Laboratory). *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 32(1-7), 232-240.
- Myers, C.R., Nealson, K.H., 1998. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* 240, 1319–1321.
- Ottow, J.C.G., Munch, J.C., 1980. Preferential reduction of amorphous to crystalline iron oxides by bacterial activity. *Soil Science* 129, 15–21.
- Papillon, F., Jullien, M., Bataillon, C., 2003. Carbon steel behaviour in compacted clay: two long term tests for corrosion prediction. In: Féron, D., MacDonald, D.D. (Eds.), *Prediction of the long-term corrosion behaviour in nuclear waste systems*. European Federation of Corrosion Publications, 36. Maney Publishing, UK, pp. 439– 454.
- Pedersen, K., M. Motamedi., 2000. Cultivability of microorganisms introduced into a compacted bentonite clay buffer under high-level radioactive waste repository conditions. *Eng. Geol.* 58(2): 149-161.
- Poulain, S., 2006. Caractérisation microbiologique de l'argile à Opalinus du Mont Terri et de l'argilite du Callovo-Oxfordien de Meuse/Haute-Marne Thèse doctorat : Sciences chimiques. CNAB : Bordeaux 1. Sanchez-Lopez, J.C., 1998. The role of oxide passiation layers in nanocrystalline metal powders and consolidated materials. *Materials Science Forum Vols.* 269-272, pp 827-832.
- Rainha, V. L., Fonseca, I. T. E., 1997. Kinetic studies on the SRB influenced corrosion of steel: a first approach. *Corrosion science.* 39, 807-813.
- Scott, J., Nealson, K., 1994. A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *J Bacteriol* 176:3408-3411.
- Stott, I. F. D., 1993. What progress in the understanding of microbially induced corrosion has been made in the last 25 years? *A personal viewpoint corrosion science*, 35, 667~673.
- Stroes-Gascoyne, S., West. J. M., 1997. Microbial studies in the Canadian nuclear fuel waste management program. *FEMS Microbiology Reviews* 20(3-4): 573-590.
- Stroes-Gascoyne, S., Hamon, C. J., Dixon, D. A., Martino, J. B., 2007. Microbial analysis of samples from the tunnel sealing experiment at AECL's Underground Research Laboratory. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 32(1-7), 219-231.
- Videla, H. A., 1996a. Corrosion inhibition by bacteria. In: *Manual of Biocorrosion*. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 121–135.
- Videla, H. A., Herrera, L. K., 2009. Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63(7), 896-900. Viollier E., Inglett P.W., Hunter.K., Roychoudhury A.N., Van Capellen.P (2000). The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry* 15: 785-790.
- Washington. J.W., Endale Dinku M., Samarkina Lidia P., Chappell, Kari E (2004). Kinetic control of oxidation state at thermodynamically buffered potentials in subsurface waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol.68, No. 23, pp. 4831-4842.

Key words: Bio-corrosion, H<sub>2</sub>, Iron-Reducing Bacteria, Deep geological waste disposal

### **CONCLUSION INTERMEDIAIRE**

La capacité de réduction/dissolution des oxydes de fer tels que la magnétite ou l'hématite par les bactéries ferriréductrices, induit une altération des produits de corrosion. En termes d'impact sur les matériaux, cette respiration microbienne entraîne en plus un développement de biomasse bactérienne assorti d'une reprise de la corrosion métallique par dissolution de la couche passivante d'oxyde de Fe (magnétite préférentiellement) néoformée à la surface du métal lors de la corrosion.

La réduction des oxydes favorise la formation de minéraux secondaires carbonatés tels que la sidérite et ou phosphatés tel que la vivianite. La formation bio-induite de ces phases est dépendante de la composition chimique du milieu (pH et Eh) ainsi que des conditions physicochimiques imposées par l'activité bactérienne.

Dans les conditions de stockage, l'activité bactérienne ferriréductrice peut entraîner des phénomènes de bio-corrosion et accélérer l'altération des colis de stockage. D'après la composition chimique des eaux interstitielles des argilites en milieu profond ( $\sim 10^{-7}$  mol de  $\text{PO}_4^{2-}$  et  $10^{-2}$  mol de  $\text{CO}_3^{2-}$ ) et des conditions de pH élevé ( $\sim$ pH 8 à 9), la nature des produits secondaires sera préférentiellement carbonatée (sidérite). Ces phases sont considérées comme moins passivantes pour les métaux que les oxydes de fer (Papillon et al., 2003).



## CHAPITRE VI : MECANISMES DE (BIO)-REDUCTION DU Fe(III) EN MILIEU POREUX

---

Nous avons démontré que le Fe(III) contenu dans des milieux argileux complexes tels que l'argilite était accessible aux bactéries. Au sein des argilites, les smectites ont été décrites comme les plus réactives et la réduction du Fe(III) structural induit une altération de l'édifice cristallin des matériaux d'origine. D'autre part, il a été démontré que les bactéries pouvaient aussi respirer le Fe(III) des produits de corrosion avec pour conséquence une reprise du processus.

Dans ce chapitre VI, **la question posée est de savoir si le Fe(III) peut être accessible à la bio-réduction même lorsqu'il est contenu dans un matériau dont les propriétés de transport ne permettent pas un contact physique direct entre les microorganismes et le Fe(III).**

C'est notamment le cas de l'argilite qui présente une porosité de taille insuffisante (~20 - 50nm) pour permettre l'accessibilité aux bactéries (~1µm). La porosité du matériau est déterminante pour la réactivité du système fer-argile-bactérie. Elle conditionne fortement l'accessibilité des phases minérales ou des matériaux aux agents oxydants de corrosion et d'altération et donc indirectement à la disponibilité du Fe(III) dans le site de stockage. Toutefois, si la porosité peut être prise en compte au travers d'expérimentations sur des matériaux ferrifères structurés (i.e argilites), son effet ou son impact sur le processus de réduction n'est pas facilement identifiable.

Pour contourner ce problème, un dispositif expérimental basé sur des gels de silice hybride (GIH) développés au LIMOS (Nancy) a été utilisé. Ces gels inorganiques contiennent des particules colloïdales (100 à 700 nm) de nontronite calibrées en taille et en forme permettant de recréer un système volumique compartimenté à porosité fixe (taille de pores ~ 50 nm). L'intérêt de l'approche réside dans la possibilité de préparer des structures mixtes poreuses qui associent la conduction optique de la silice et la réactivité de colloïdes argileux riches en fer. Ce système de « suspension solide » permet de s'affranchir des problèmes liés à l'analyse de suspensions colloïdales : e.g. floculation des particules, ou adhésion des particules aux cellules. Dans le cas présent, il permet de simuler la porosité d'une barrière argileuse et d'étudier les processus de bio-réduction et les transformations minéralogiques associées, sans toutefois, prendre en compte l'induration et la densité des matériaux.

Le but est d'étudier le comportement de ce système poreux argileux très réactif en présence d'agents chimiques ou biologiques (bactéries). Parmi les paramètres importants qui caractérisent le comportement d'un milieu argileux de confinement, trois ont été retenus

1. Porosité
2. Gonflement
3. Stabilité des phases minérales.

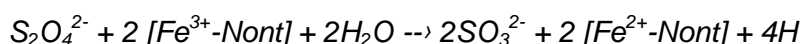
L'utilisation du Fe(III) structural des nontronites pour la respiration bactérienne sera étudiée dans des systèmes GIH enrichis avec une smectite ferrifère de type nontronite. La quantité de Fe dans chaque GIH-nontronite est égale à 45 µmol. Le choix des nontronites, comme un matériau expérimental dans cette étude, s'explique de par la disponibilité de particules de smectite ferrifère de type nontronite calibrées en taille et sous une forme colloïdale (Michot et al., 2006) nécessaires à la synthèse homogène d'un système argileux poreux. Les mécanismes associés à la réduction bactérienne du Fe(III) seront étudiés plus précisément.



## 1. DIFFUSION DE COMPOSES REDUCTEURS DANS LES SYSTEMES POREUX (REDUCTION INDIRECTE A DISTANCE)

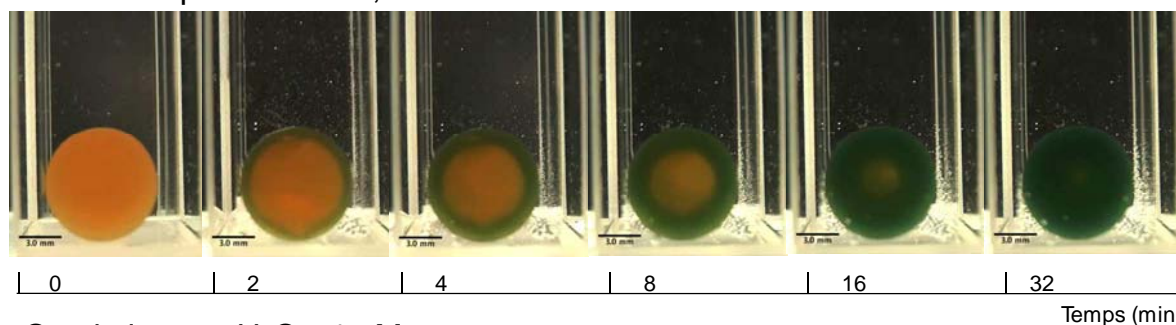
### 1.1. EXPERIENCES ABIOTIQUES

Afin de valider le mécanisme de réduction par diffusion d'agents réducteurs, des expériences abiotiques de réduction/oxydation du Fe<sup>3+</sup> structural des GIH-nontronite ont été réalisées par injection de réducteurs (Dithionite de sodium Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 1mM) ou d'oxydants (Peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1mM) dans des cuves de spectrophotomètre contenant le matériau GIH-nontronite et 6ml d'eau milli-Q (Figure 47). La réaction de réduction par le dithionite est décrite ci dessous :



Ainsi l'oxydation d'une mole de dithionite entraîne la réduction de deux moles de Fe<sup>3+</sup>

#### Réduction par Dithionite, 1mM



#### Oxydation par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1mM

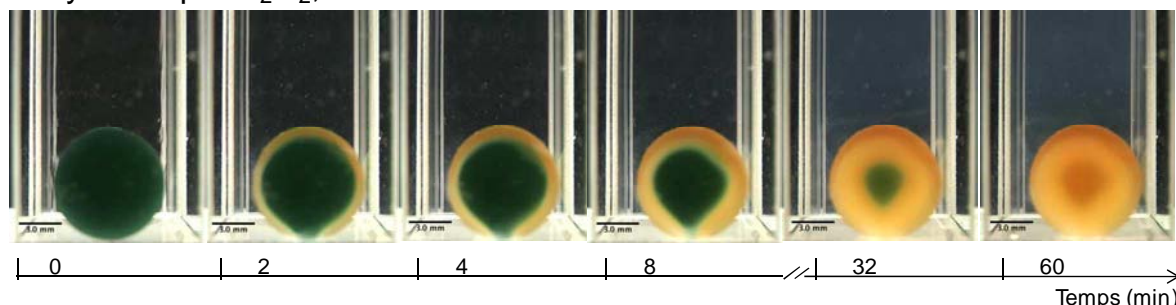
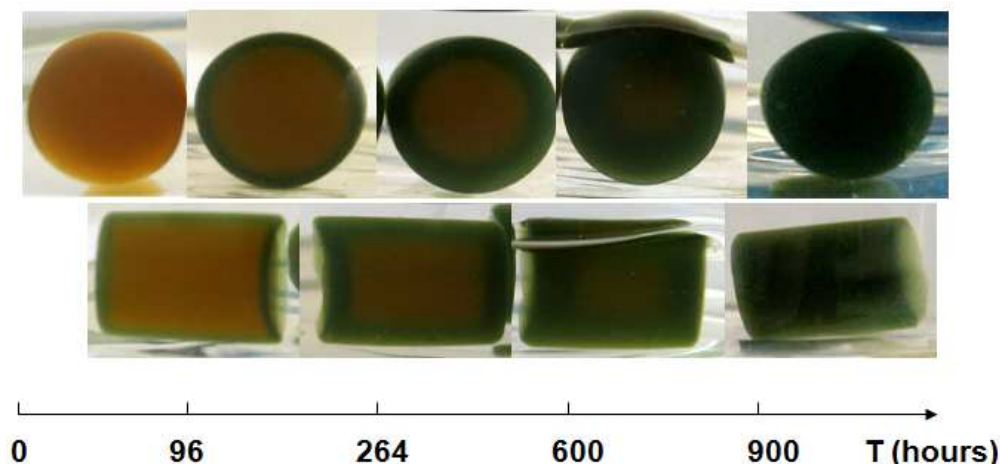


Figure 47 : Visualisation des processus de réduction/oxydation du Fe(III) dans des GIH dopés en -nontronite en présence de d'agents chimiques réducteurs ou oxydants dithionite ou de peroxyde d'hydrogène. Rayon = 4,07mm.

La visualisation de la progression du front de réduction/oxydation en condition abiotique des GIH-nontronites montre que le processus de réduction Fe(III) est contrôlé par **la diffusion des agents dans la porosité du gel** (réduction ou oxydation radiale au cours du temps). La progression isotrope du front démontre que la porosité du gel (taille de pore <100nm) est homogène au moins au niveau méso ou macroscopique. Aucun chemin préférentiel n'est observé lors de ces processus rédox.

**La réversibilité de la réduction du Fe(III) des nontronites est démontrée** (elle est confirmée par les études spectromètre UV-VIS, &3.1). Cependant, la réoxydation est plus lente. Les vitesses de réduction et de réoxydation sont estimées à 0,13 et 0,06 mm/min. Ainsi la réoxydation Fe<sup>2+</sup> → Fe<sup>3+</sup> ne semble pas suivre la même cinétique que la réduction.

## 1.2. EXPERIENCES BIOTIQUES



**Figure 48: Visualisation des processus de réduction/oxydation du Fe(III) dans des GIH dopés en nontronite en présence de la bactérie *Shewanella* sp.**

La réduction bactérienne des GIH\_nontronites est observée en présence de la bactérie *Shewanella* MR1 (Figure 48). Les cheminements des fronts de réduction abiotique sont similaires à ceux observés lors de la réduction bactérienne des GIH-nontronites (Figure 48).

D'autre part, il a été confirmé que les bactéries demeurent à l'extérieur du gel (Article V de ce mémoire). Ce résultat suppose l'existence et la circulation de métabolites bactériens réducteurs produits par la souche MR1 dans le gel. Par ailleurs, il a été démontré que cette réduction ne nécessitait pas de contact direct avec le GIH-nontronite (Article V). Ces résultats confortent l'hypothèse d'une diffusion d'agents réducteurs au sein de la porosité durant le processus de réduction.

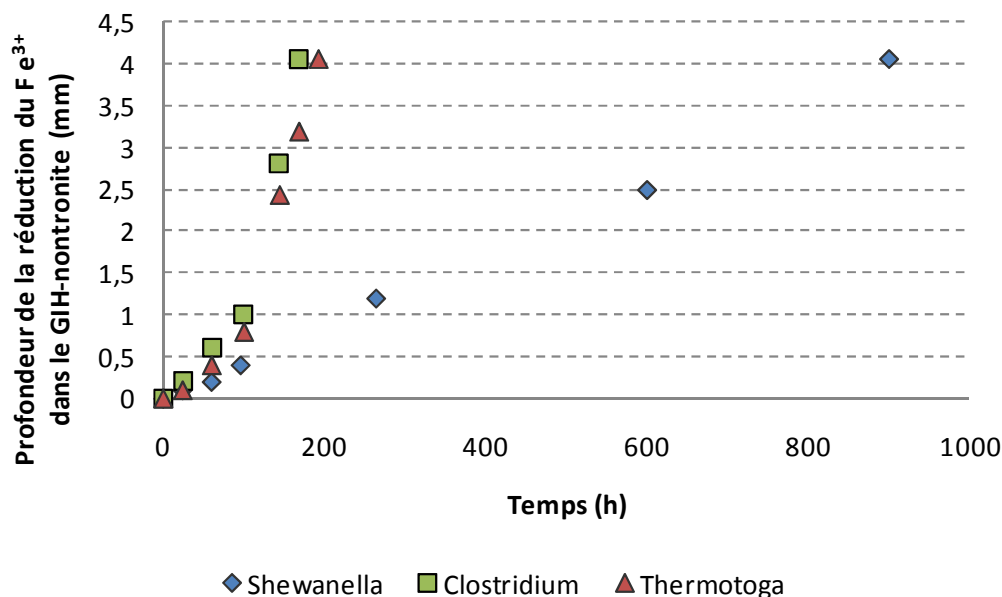
**Ainsi, ces premières expériences décrivent un processus de réduction bactérienne à distance, qui serait véhiculé par diffusion de molécules réductrices au sein de la porosité. De quelles molécules s'agit-il ?**

## 2. LES TRANSPORTEURS D'ELECTRONS BACTERIENS

L'action de deux bactéries fermentaires *Clostridium aurantibutyricum* et *Thermotoga subteranea* et de la souche *Shewanella oneidensis* MR1 sur les GIH a été étudiée. Ces bactéries ont été incubées en présence de différents donneurs d'électrons : glucose (10mM) et de peptone (10mM) comme substrat fermentescible pour *Clostridium* sp et *Thermotoga* sp respectivement. Pour la bactérie hydrogénotrophe, *Shewanella*, le donneur d'électrons est inorganique. De l'hydrogène a été introduit par bullage dans les réacteurs à la concentration de 4,35mM.

**Il est à préciser que, dans les conditions abiotiques, ces donneurs d'électrons n'entraînent pas de réduction du Fe(III) structural des nontronites.**

Les résultats sont présentés sur la figure 49 :



**Figure 49 :** Solubilisation du Fe(III) dans les GIH-nontronite en présence des bactéries *Shewanella sp* (d.e : H<sub>2</sub>), *Clostridium sp.* (d.e : glucose), et *Thermotoga sp.* (d.e : peptone). d.e: donneur d'électrons.

Ces résultats montrent que les trois souches étudiées peuvent induire une réduction significative à distance du Fe(III) structural des GIH-nontronite. Ce processus est indépendant de la nature du substrat énergétique présent.

Une analyse à T=600h, des métabolites bactériens, a été réalisée afin d'identifier les molécules pouvant être à l'origine de la réduction à distance du Fe(III) des nontronites.

Cette analyse indique, en plus de la présence d'acides organiques, la présence de dérivés aromatiques de type quinone (Q) ou catéchol (diol H<sub>2</sub>Q) (Tableau 18). Ces derniers sont en cours d'identification et peuvent correspondre à des formes ortho- ou para- de quinones et hydroxyquinones plus ou moins substituées (chaîne alkyl, groupement méthoxy-, méthyl...)

	Gluconate	Lactate	Acétate	Formate	Butyrate	pH
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	
<i>Shewanella</i>	7	n.d	17	n.d	n.d	6,2
<i>Thermotoga</i>	115	n.d	229	0,3	0.0.	6
<i>Clostridium</i>	4	42	185	5,8	976	4,7
	Succinate	oxalate	citrate	Catéchol (H <sub>2</sub> Q)	Quinone (Q)	Réduction du Fe(III) %
	ppm	ppm	ppm	µM	µM	
<i>Shewanella</i>	n.d	1,8	n.d	260	43	60
<i>Thermotoga</i>	41	1,9	n.d	200	n.d	100
<i>Clostridium</i>	n.d	1,1	n.d	100	n.d	100

**Tableau 78 :** Quantités de métabolites produites lors de la réduction bactérienne des GIH-nontronite. (T=600h).nd : non détectable.

On peut classer par ordre d'importance les métabolites les plus significatifs (> 4ppm) pour chaque espèce bactérienne :

- *S. odeinensis* (MR1) : H<sub>2</sub>Q/Q > Acetate > Gluconate
- *T. subterranea* : Acetate > Gluconate > succinate > H<sub>2</sub>Q/Q
- *C. aurantibutyricum* : Butyrate > Acetate > Lactate > H<sub>2</sub>Q/Q > Formate

Les formes quinones et catéchols sont des formes oxydées et réduites de dérivés aromatiques. Ces molécules sont souvent décrites dans la littérature comme des molécules pouvant intervenir dans les transferts d'électrons (Lovley et al., 1996).

L'hypothèse d'un mécanisme de réduction via des transporteurs d'électrons (navettes électroniques) de type catéchol/quinone peut s'expliquer par plusieurs indices (Tableau 18) :

- leur présence : les molécules, catéchol (forme réduite) ou quinone (forme oxydée), sont présentes dans le milieu quelles que soient les expériences biotiques.
- la persistance de la forme oxydée (quinone) dans la réduction incomplète du Fe(III) par *Shewanella* sp.

En effet, à 600h, la réduction du Fe(III) des nontronites n'est pas complète (60%). Les molécules réductrices (catéchols) produites par les bactéries peuvent se réoxyder au contact du Fe(III) et former un équilibre de molécules réduites et oxydées en solution.

Dans le cas des bactéries fermentaires, la réduction est complète à 600h. Les quinones (forme oxydée) ne sont pas retrouvées dans le milieu et seule la forme réduite (catéchol) est mesurée en solution. Ceci peut s'expliquer par la régénération complète des formes oxydées par l'activité intense des hydrogénases présentes chez les bactéries fermentaires. La présence de ces navettes électroniques est fortement pressentie comme étant le processus de réduction à distance mis en jeu dans ces expériences.

Les vitesses de réduction mesurées pour les 3 souches bactériennes ne sont pas les mêmes (0,41mm/min pour *Clostridium* sp. 0, 36mm/min pour *Thermotoga* sp. et 0,07mm/min pour *Shewanella* sp.). Cette différence montre l'existence de deux systèmes de réduction bactériens : un système rapide pour les bactéries fermentaires, et un système plus lent pour la bactérie hydrogénéotrophe.

Comme le montrent les quantités totales de transporteurs d'électrons présents dans le milieu, l'efficacité de la réduction du fer(III) dépend plus de la vitesse de régénération des navettes via des hydrogénases membranaires que des quantités de navettes produites. Toutefois, il pourrait s'agir d'un métabolisme « fortuit », le processus de régénération des navettes par réduction bénéficiant de l'hyper-activité des hydrogénases utilisées pour la fermentation.

Ainsi, il a été démontré que les bactéries ferriréductrices pouvaient produire ou libérer dans le milieu un système d'oxydo-réduction réversible composé de molécules "transporteur d'électrons", de type quinone ou catéchol. Ces composés aromatiques constituent des agents réducteurs qui diffusent dans la porosité des matériaux durant l'incubation et qui provoquent la réduction des phases ferrifères nontronite. Cependant, l'origine de ces molécules reste à préciser. S'agit-il de métabolites produits par les bactéries actives ou de transporteurs d'électrons membranaires (e.g ubi-quinone) libérés accidentellement dans le milieu par la lyse d'une partie des cellules bactériennes présentes ?

Cette dernière hypothèse est d'autant plus pertinente, que les bactéries Gram+ (i.e. *Thermotoga*, *Clostridium*) sporulent assez facilement lorsque les conditions physico-chimiques ou nutritionnelles sont défavorables.

D'autre part, les concentrations élevées en acides organiques retrouvées en solution pourraient, elles aussi, contribuer significativement à l'altération des phases argileuses que ce soit par effet pH ou par effet ligand.

### 3. LE COUPLAGE REDUCTION/ACIDIFICATION : IMPACT SUR LES PROPRIETES CRISTALLOCHIMIQUES DES MINERAUX

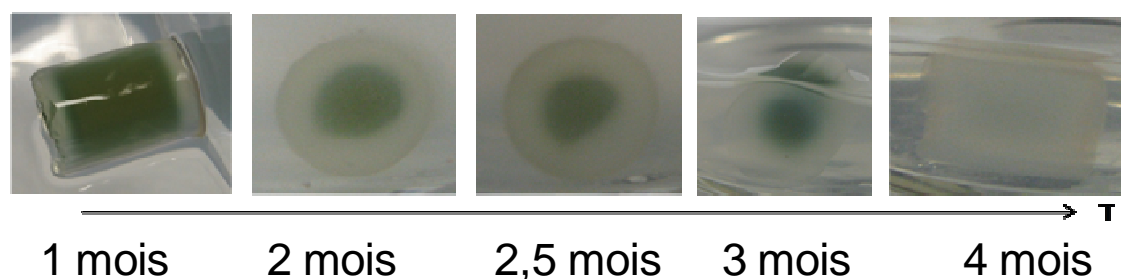
Dans les incubations anaérobies avec les GIH, la réduction du Fe(III) au sein de la structure poreuse est souvent accompagnée d'une acidification et d'une production d'acides organiques, pouvant favoriser l'altération de la structure argileuse. Ce processus bactérien d'altération des phyllosilicates par acidolyse est bien connu et décrit en condition aérobie (Balland et al., 2010 ; Grybos et al., 2010).

#### Effet pH

Cette combinaison des deux processus (réduction et acidification) a été observée très clairement dans les cultures de *Clostridium aurantibutyricum*.

En effet, lors de la réduction du GIH-nontronite, la consommation de substrats organiques par les bactéries fermentaires aboutit à une libération de protons ( $H^+$ ) et d'acides organiques dans le milieu (Cf tableau 18). Le pH atteint 4,7 après 600h d'incubation. Si les conditions physico-chimiques se maintiennent pendant plusieurs semaines, on observe alors une forte altération du GIH-nontronite marquée par une décoloration progressive du GIH qui, après la phase de réduction, passe du vert à l'incolore (Figure 50). Parallèlement, une dissolution importante des éléments structuraux de la nontronite dans le milieu est constatée (65% du fer structural est dissous).

Une caractérisation des phases secondaires potentiellement formées à l'intérieur du GIH est en cours d'identification (Synchrotron et spectroscopie Mossbauer)



**Figure 50 : Altération par acidolyse du GIH-nontronite par la bactérie fermentaire *Clostridium aurantibutyricum*.**

Les molécules organiques produites peuvent aussi avoir un effet chélatant. La concentration élevée d'acides organiques produits par les bactéries fermentaires est décrite dans le tableau 17. Les molécules acetate/gluconate sont majoritaires pour *Thermotoga* sp. alors que les molécules butyrate/acétate sont majoritaires pour *Clostridium* Sp.

Toutefois, malgré la présence d'une forte concentration en acétate ( $pK_a=4,8$ ) et en gluconate ( $pK_a=3,5$ ) produit par le métabolisme de *Thermotoga*, on n'observe pas de décoloration du GIH. Ceci peut être expliqué par un pH peu acide ( $pH=6$ ).

Inversement, dans les expériences en présence de *Clostridium* sp., le pH est acide (pH=4,7). Les molécules organiques (acide acétique (pKa=4,8) et acide butyrique (pKa= 4,8)) sont sous la forme protonée.

Dans ce cas, le processus de dissolution de la nontronite et le blanchiment observé du GIH serait dû à l'action des protons sur la structure minérale (Grybos et al., 2010).

Le processus d'altération bactérienne des GIH est donc composé de deux étapes consécutives : une dissolution très partielle par réduction indirecte du fer(III) structural des nontronites par des transporteurs d'électrons spécifiques et une altération très prononcée par l'action des protons excrétés.

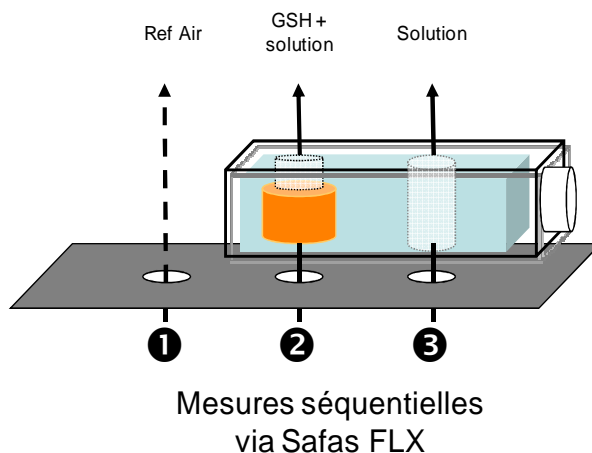
En milieu naturel, ce serait donc l'action combinée des protons et des agents réducteurs qui, non seulement provoque l'altération des matériaux ferrifères, mais pourra aussi affecter indirectement celle des ciments carbonatés présents dans les argilites.

### 3.1. LES MECANISMES DE REDUCTION ET D'ACIDOLYSE

Afin de caractériser les transformations minéralogiques correspondant aux changements de couleur observés dans les GIH et de les corrélés aux processus de réduction et d'acidolyse, les gels ont été étudiés par spectroscopie UV-VIS, à différents stades ou degrés de leur altération ou de réduction : initial (orange), réduit (vert) et altéré (incolore).

Puisque le gel est transparent et peu diffusant, la mesure en transmission est possible. Dans ce cas, les bandes d'absorption sont liées à des absorptions sélectives des photons, en fonction des caractéristiques chimiques des particules de nontronite. La spectroscopie UV-VIS est généralement utilisée en minéralogie, et dans l'industrie des matériaux, pour l'analyse des statuts du fer sur des échantillons avant et après traitement ou pour évaluer leur degré de blancheur (e.g. les k,échelle Lab), via des diagrammes trichromatiques (Villieras, 1993).

Les GIH sont analysés *in vitro* avant, pendant, et après réduction, par spectrométrie d'absorption UV-Vis (Spectromètre SAFAS FLX) dans le but de caractériser l'évolution de la valence du fer dans la structure des nontronites étudiées (Figure 51). L'excellente conduction optique des gels permet de travailler directement en absorbance *in vitro* sans être obligé de sécher et réduire en poudre l'échantillon. L'absorbance suit donc la loi de Beer-Lambert.



**Figure 51 : Dispositif d'analyse simultanée *in vitro* en cuve quartz (scellé) du statut du fer structural des GIH en présence d'une solution réductrice composée d'agents chimiques ou de cellules bactériennes. L'acquisition est effectuée entre 200 et 900nm avec un pas de 2 nm.**



L'attribution des bandes d'absorption, définissant le statut du fer (II ou III) dans les sites octaédrique/tétraédrique (Figure 52), a été déterminée et calibrée à partir des spectres UV-VIS obtenus sur des GIH contenant des particules de nontronite. Deux nontronites à l'état oxydé ou réduit ont été utilisées : la nontronite brune (Nau2), utilisée dans notre étude et qui contient du fer en position tétraédrique et une nontronite verte (Nau1), qui sert de référence où le fer tétraédrique est quasi-absent (Tableau 19). L'identification des bandes spectrales a été validée grâce aux études réalisées ultérieurement par Merola et Mc Guire (2009) et Sherman et Vergo (1988) en spectrométrie UV-Vis et Mössbauer sur des nontronites similaires ou des smectites ferrifères.

Formules	Tétraèdre			Octaèdre		
	Si	Al	Fe	Al	Fe	Mg
<b>NB (NAU2)</b>	7,55	0,16	0,29	0,34	3,54	0,05
<b>NV (NAU1)</b>	6,98	0,95	0,07	0,36	3,61	0,04

**Tableau 89 : Formule structurale des nontronites Nau1 et Nau2 à maille complète.**

Dans le domaine spectral considéré (200-800nm), les bandes d'absorption dépendent directement des transitions électroniques des orbitales 4d des ions  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ . Ce sont ces transitions qui confèrent des couleurs caractéristiques, allant du vert au brun, pour les nontronites.

L'attribution des bandes qui caractérisent, dans ce domaine d'énergie, les transitions électroniques de l'orbitale 4d du fer est la suivante :

#### Dans les Fer(III)-nontronites (état initial oxydé)

- pour le **Fe(III) - Octaèdre**
  - correspondant aux transitions cristallines  $Fe(III) [{}^6A_{1g} \rightarrow {}^4T_2]$
- - ❶ une bande d'absorption intense à 370- 380 nm (résolue pour Nau1)
- - ❷ une bande plus faible 540-570 nm (Nau2)
  - correspondant aux transitions entre octaèdres voisins [ $2\bullet{}^6A_{1g} \rightarrow 2\bullet{}^4T_2$ ] (*excitation par paires des sites cis- ou trans-dihydroxyl occupés par Fe(III)*)
- - ❸ une bande à 450 nm (bien visible sur Nau1)
  - pour le **Fe(III) - Tétraèdre** (Nau2 uniquement)
- - ❹ 525 nm Transition cristalline  $Fe(III) [{}^6A_1 \rightarrow {}^4T_2]$
- - ❺ 650 nm Transition cristalline  $Fe(III) [{}^6A_1 \rightarrow {}^4T_1]$

On peut aussi noter qu'il n'y a pas d'absorption spécifique au-delà de 350 nm dans un gel de silice simple GIH (sinon une absorption progressive en deçà de 300 nm) ou dans un gel qui serait enrichi avec une smectite non ferrifère de type montmorillonite (GIH). Ce continuum d'absorption (GIH) de faible intensité est dû à des phénomènes complexes de réflexion, ou de diffusion du rayonnement au sein du gel, dépendant principalement de la tortuosité du gel et de l'arrangement des particules. Comme il a été montré par Grybos et al. , (2010), les GIH utilisés sont peu diffusifs et homogènes.

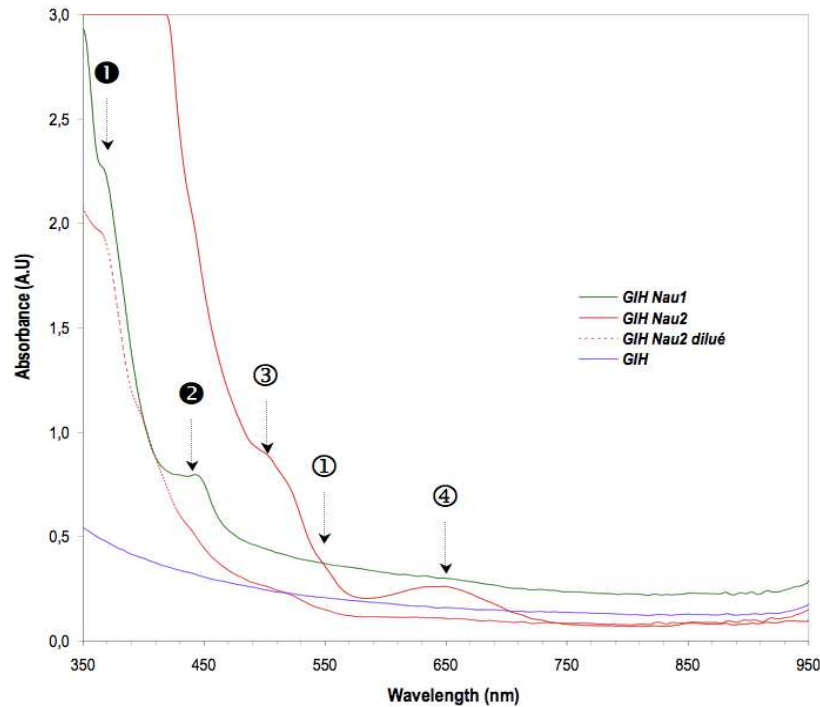
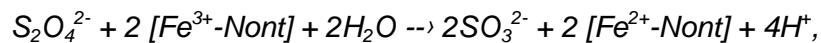


Figure 52 : Identification des bandes spectrales du fer dans les nontronites. Comparaison entre GIH Nau1 et Nau2 (oxydé et réduit) et un gel de silice pur ou dopé en montmorillonite(GIH).

### 3.2. REDUCTION REVERSIBLE DES NONTRONITES

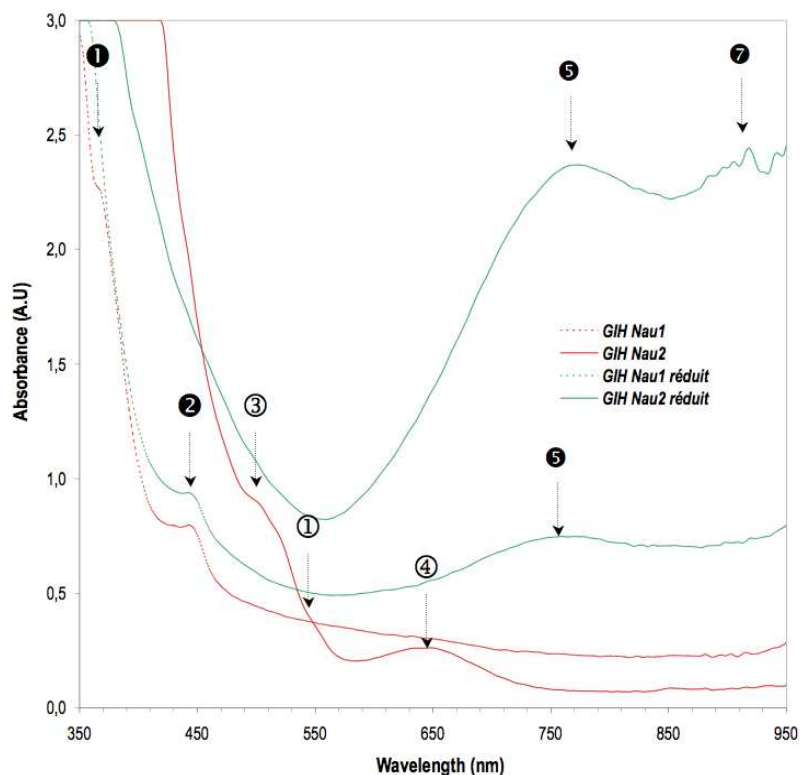
Après réduction avec du dithionite selon la réaction :



les évolutions spectrales (Figure 53) les plus notables sont les suivantes

- **Fe(III) - Octaèdre :**
  - Modification des transitions cristalline Fe(III)
- - d'une diminution nette de la bande ❶ à 380 nm (Nau1, Nau2)
- **Fe(II) - Octaèdre :**
  - Apparition de transfert de charge Fe(II) → Fe(III) (Nau1, Nau2)
- - ❷ 750 nm : Fe(II) et Fe(III) occupent des sites adjacents.
- - ❸ 900 nm : Fe(II) en coordination 6
- **Fe(III) - Tétraèdre :**
  - Variations non détectables



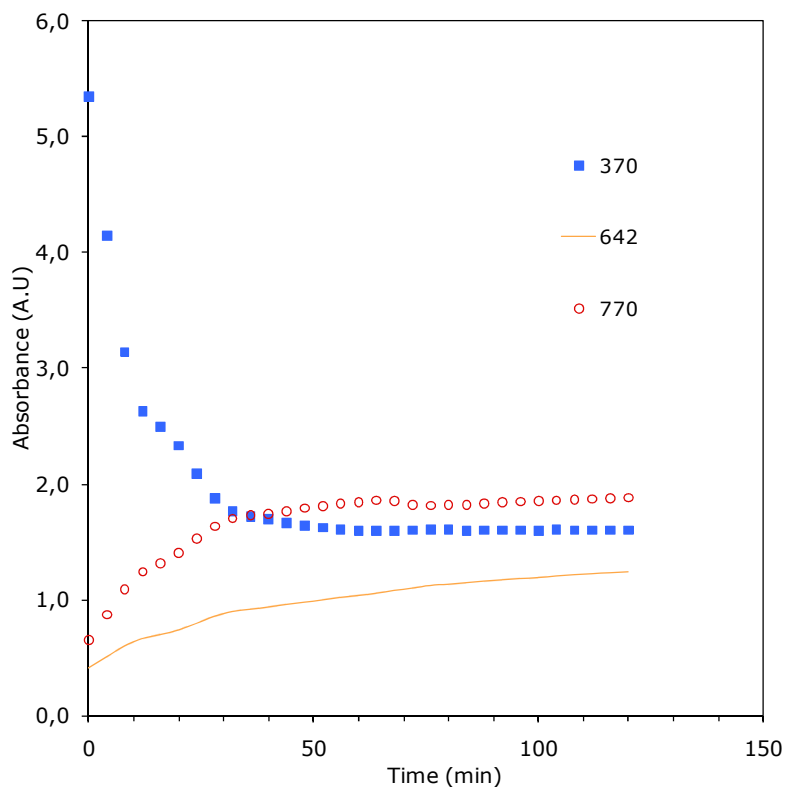


**Figure 53 : Identification des bandes spectrales du fer dans les nontronites après réduction avec du dithionite de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ).**

En revanche, les variations d'intensité des bandes ① (540-570 nm) et ② (450 nm) sont difficiles à évaluer (Nau2) ou demeurent inchangées (Nau1). De même, la simple comparaison des spectres avant et après réduction ne permet pas de déterminer si le statut du Fer(III) contenu dans les tétraèdres est affecté ou non par le processus de réduction (bandes ③ et ④ situées à 525nm et 650 nm)

Les fluctuations enregistrées entre 870 et 950 nm correspondent à l'apparition des elongations OH dans le proche IR. Deux autres bandes spectrales (218nm et 400nm) ont été identifiées sur des GIH contenant des particules de nontronite de taille plus petite et n'ont pas pu être attribuées.

La Figure 54 montre l'évolution des bandes spectrales caractéristiques au cours de la réduction abiotique de la nontronite Nau2 en présence de dithionite (2mM à pH 7). La réduction est visible par une variation franche de la diminution de la bande spectrale à 370nm et l'augmentation de la bande de la bande à 770nm.

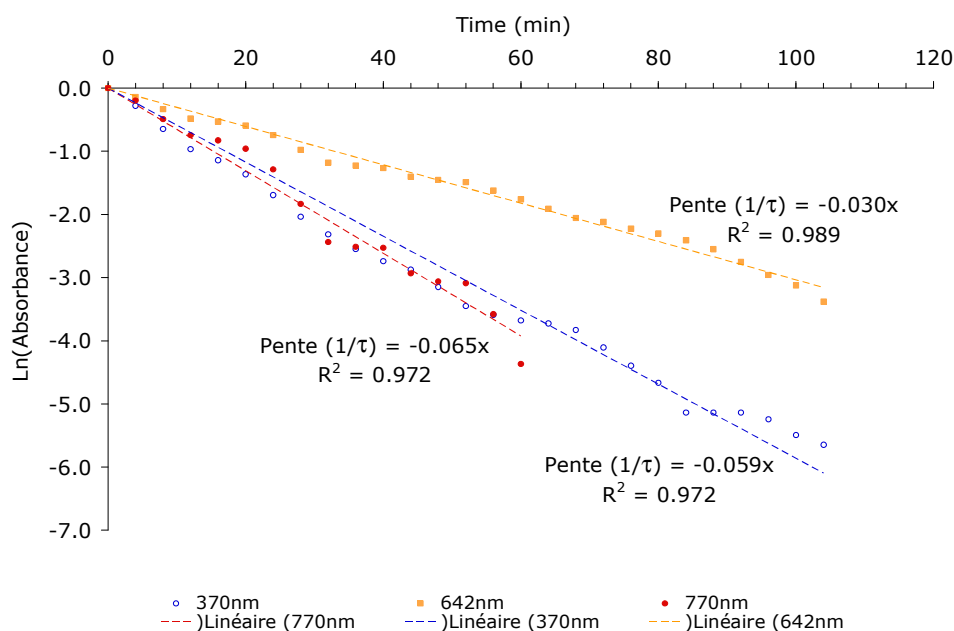


**Figure 54 : Evolution de l'intensité normalisée (Ref à 460 nm) des bandes spectrales caractéristiques du statut du fer dans la nontronite au cours de sa réduction par du dithionite de sodium (2mM à pH7).**

Les variations de l'intensité des bandes au cours du temps (Figure 54 et 55) indiquent la présence d'au moins deux sites de réduction dont les constantes de temps sont sensiblement différentes ( $\tau_1 = 15$  min,  $\tau_2 = 30$  min). La transition Fe(III)/Fe(II) est marquée :

- par l'évolution inverse des bandes à 370 et 770 nm correspondant à l'apparition de transfert de charge Fe(III)  $\rightarrow$  Fe(II) dans les sites octaédriques caractérisés par une constante de temps  $\tau_1$ ,
- par une augmentation de l'intensité des bandes spectrales à 642nm caractérisée par la constante de temps  $\tau_2$ .

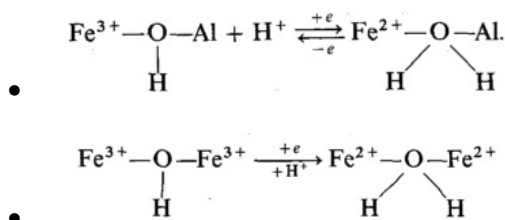
Ces deux constantes de temps pourraient, en première approximation, caractériser la vitesse de réduction de deux sites de réduction du Fe(III) octaédrique ou de deux mécanismes de réduction. Il n'est pas exclu qu'il puisse y avoir aussi une contribution du fer tétraédrique. Toutefois, les changements éventuels dans le statut du Fe(III) tétraédrique sont masqués par l'augmentation générale de l'intensité du spectre.



**Figure 55 : Estimation selon un modèle d'ordre 1 des constantes de temps de réduction des différents sites fer(III) dans la nontronite.**

### 3.3. ALTERATION IRREVERSIBLE DES NONTRONITES PAR ACIDOLYSE

Si elle se poursuit, l'action du dithionite de sodium à pH 4 sur le GIH-nontronite (Nau2) provoque, après le verdissement observé lors de la réduction, une décoloration complète du gel (cf équation), accompagnée d'une dissolution importante des particules de nontronite sous l'action des protons (90% du fer initial est en solution). Cette altération intense est confirmée au niveau spectral par une disparition totale des bandes caractéristiques du Fe(II) ou du Fe(III) dans les sites octaédriques de Fe(III) et Fe(II), mais aussi dans les sites tétraédriques (Figure 56). Dans ce cas, l'ajout d'un oxydant comme ( $H_2O_2$ ) ne fait pas réapparaître de bandes d'absorption. Les transformations minéralogiques résultant de l'action de l'agent réducteur et des protons sont donc bien irréversibles et le spectre UV-VIS des GIH altérés ressemble à celui d'un gel de silice pur ou contenant une phase minérale non chromogène, comme la montmorillonite. L'acidolyse ne peut pas provoquer une altération aussi intense des GIH-nontronite dans cette gamme de pH (Grybos et al., 2010). En fait, le processus d'altération est favorisé par la présence de nombreux doublets fer-fer dans les sites octaédriques voisins de la nontronite Nau2. Les doublets Fe-Fe s'avèrent plus sensibles à l'action des protons que des doublets Fe-Al (Rozenson et Heller-Kallai, 1976) :



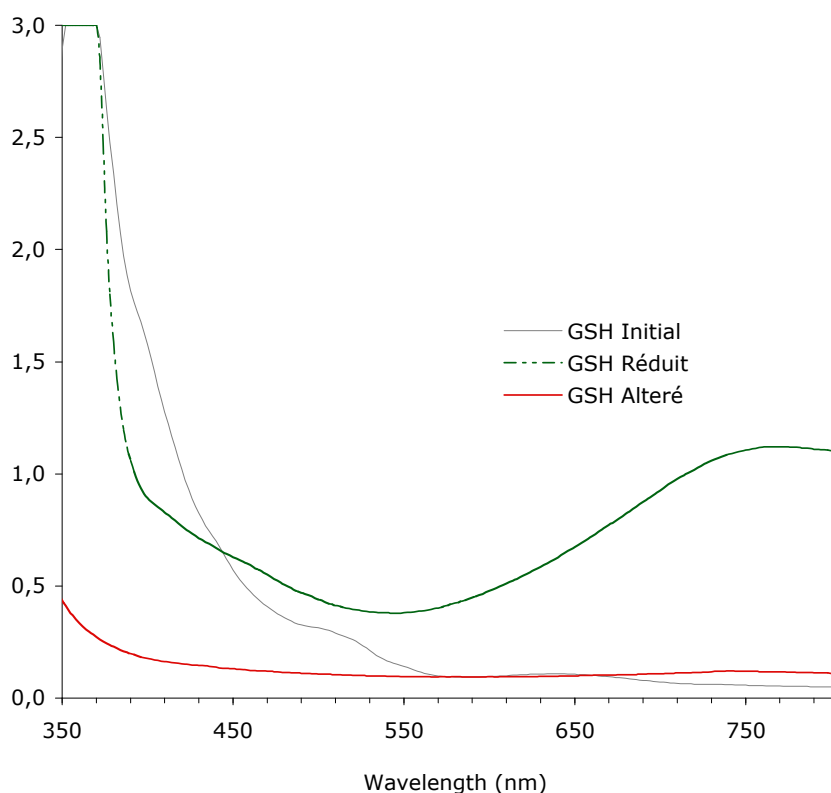
Pour ces auteurs, l'action de réduction du Fe(III) sur un site octaédrique est renforcée par la protonation sur les groupements OH adjacents. Les  $Fe^{2+}$  formés peuvent être rapidement ré-oxydés, mais les changements structuraux provoqués par la réduction sont

seulement réversibles pour les sites  $\text{Fe}^{2+} - \text{OH} - \text{Al}^{3+}$ , et non pour les sites :  $\text{Fe}^{2+} - \text{OH} - \text{Fe}^{2+}$ . Ces deux sites, différents vis-à-vis de leurs stabilités face à la réduction, sont certainement associés aux deux constantes de temps déterminées auparavant. Cependant cette hypothèse reste à confirmer.

Enfin, l'action des protons peut entraîner, à terme, une déstabilisation de la liaison  $\text{Fe}^{2+} - \text{OH}$ , au sein de la couche octaédrique provoquant la ruine du feuillet.

Par conséquent, la présence d'une quantité suffisante d'Al dans les octaèdres peut stabiliser l'édifice cristallin.

En résumé, plus la quantité d'aluminium octaédrique sera faible plus l'altération par réduction/acidolyse sera importante, ce qui est le cas pour la nontronite Nau2.



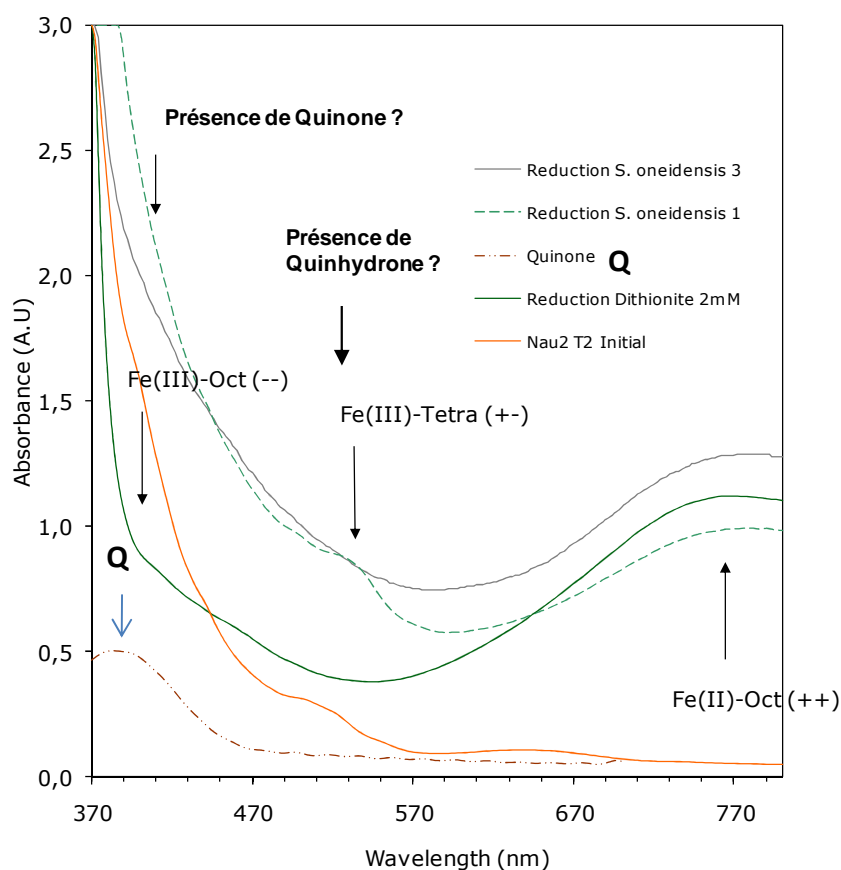
**Figure 56 : Evolution du fer structural des nontronites au cours de processus de réduction/altération (Initial =couleur orange ; réduit =couleur verte ; altéré =couleur blanche).**

#### 4. LES MECANISMES BACTERIENS

Comme il a été démontré précédemment, l'activité biologique (*S. oneidensis* MR1) peut réduire le Fe(III) structural des nontronites à distance. Dans ce mécanisme extracellulaire interviendrait des molécules organiques réductrices (catéchol/quinone), diffusant dans la porosité des milieux argileux. Ces molécules provoqueraient la réduction du Fe(III) structural, qui peut être suivie par spectrométrie UV-VIS (Figure 57).

#### 4.1. REDUCTION « REVERSIBLE » DU FER (III) PAR LES BACTERIES.

L'évolution générale des bandes spectrales caractéristiques du fer de la nontronite lors de la réduction biologique est similaire à celle observée en conditions abiotiques. En effet, on observe une augmentation des bandes caractéristiques du Fe(II) octaédrique à 770nm ainsi qu'une disparition des pics à 370 nm (Fe(III) octaédrique). En revanche, les cinétiques sont plus lentes et les constantes de temps sont de l'ordre de 100h. Les variations spectrales ne sont observées que si le processus de réduction est avancée (spectres 1&3 à 1 et 3 semaines). Cependant, contrairement au spectre en abiotique où on observe une diminution importante de l'absorbance à 400nm, la réduction biologique entraîne une augmentation de l'intensité à ce niveau masquant la variation des bandes de Fe(III) tétraédrique. Cette variation spectrale pourrait être due à la présence de quinones dans le GIH-nontronite. En effet, le spectre d'absorbance des **quinones** est marqué par une bande large caractéristique à 390-400nm (couleur jaune). La présence de **quinhydrone** (complexe équimolaire hydroquinone/quinone) est aussi suspectée. En effet la quinhydrone est caractérisée par une bande caractéristique située entre 450 et 550nm (couleur vert à violet) (Figure 57) (Reigeimbal et al., 2003).



**Figure 57 : Spectres UV-VIS des GIH-nontronite après réduction biotique (*S. oneidensis* MR1) et abiotique (dithionite 2mM). Le spectre d'absorbance des quinones est aussi indiqué en comparaison.**

L'oxydation du catéchol par les ions  $Fe^{3+}$  a été réalisée et suivie au spectromètre UV-VIS. Les spectres obtenus sont reportés sur la figure 58.

Les expériences de titrage montrent que l'ajout progressif de  $Fe^{3+}$  en solution transforme le catéchol (1,2-Dihydroxybenzene) en ortho-quinone et provoque l'apparition d'une bande large caractéristique des quinones à 390nm (jaune-brun). Corrélativement, la bande spectrale

caractéristique du catéchol à 275nm (forme réduite, fonction C-O) diminue. La présence de quinones dans le GIH-nontronite pourrait donc expliquer l'augmentation générale de l'absorbance du spectre dans la zone 360 à 600nm et la plus faible diminution de la bande à 370nm observée lors de la réduction bactérienne de la nontronite.

Toutefois, après chaque ajout de  $Fe^{3+}$ , une couleur verte très intense apparaît transitoirement dans la solution. Elle correspond à la formation d'un complexe équimolaire entre les formes hydroxylées du catéchol et les quinones. Ce complexe équimolaire  $Q/H_2Q$  est appelé quinhydrone.

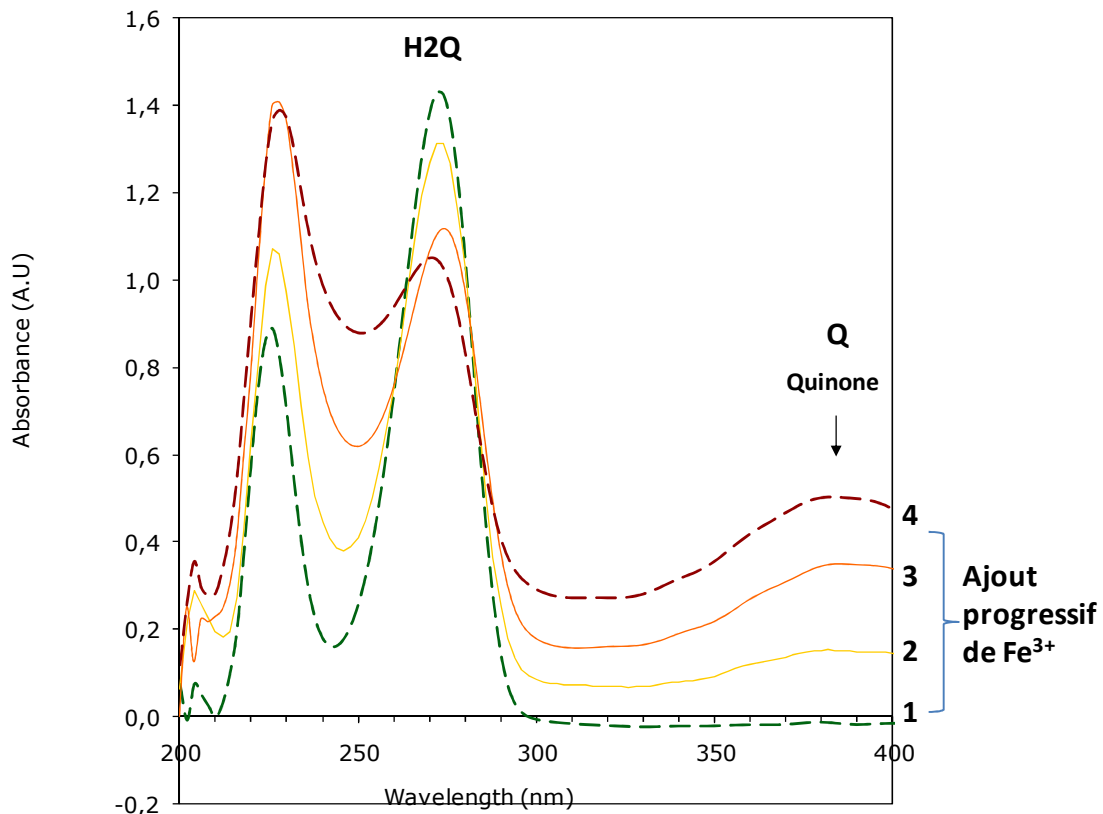


Figure 58 : Oxydation du pyrocatechol par les ions  $Fe^{3+}$ .

La formation du complexe correspond à une phase permettant un transfert de charge transitoire dans lequel la forme hydroxylée joue le rôle de donneur d'électrons et la forme quinone celui d'accepteur. La bande spectrale de la quinhydrone se situe vers 500nm (Figure 59).

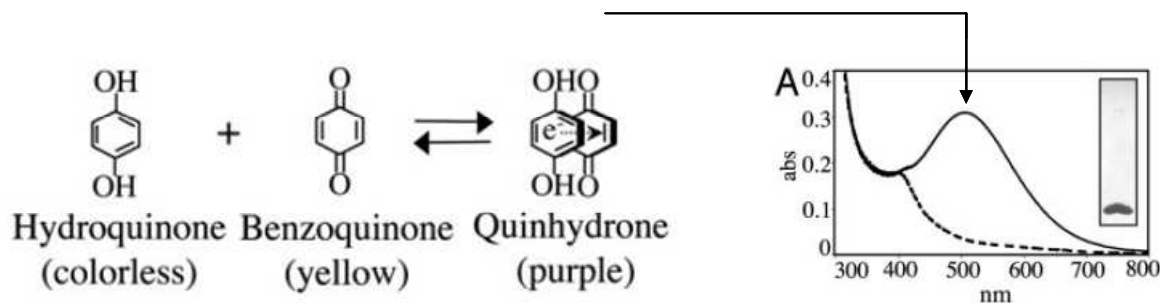
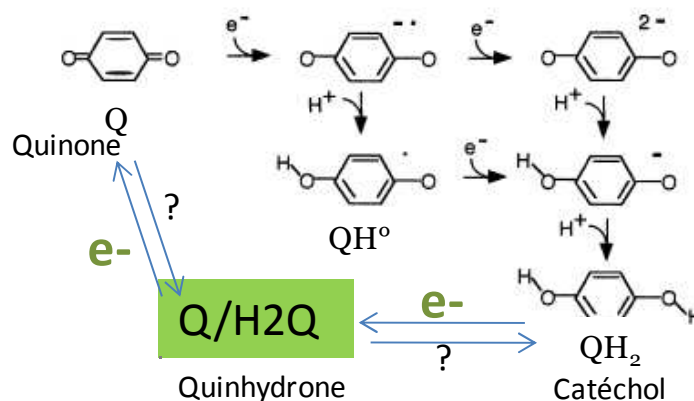


Figure 59 : Formation schématique du complexe quinhydrone et son spectre d'absorbance (Regeimbal et al., 2003).

Ainsi, au cours de la réduction bactérienne, le profil du spectre du gel entre 450-600nm pourrait dépendre de la présence de quinhydrone dans le GIH-nontronite. Ceci pourrait

expliquer la coloration très soutenue du GIH durant la réduction bactérienne. D'autre part, ce complexe équimolaire serait stable dans le GIH et pourrait servir de complexe de transfert de charges temporaires entre l'extérieur et l'intérieur du gel. Il peut ainsi favoriser les transferts rapides d'électrons entre les bactéries et les particules incluses au sein du gel (Figure 60).

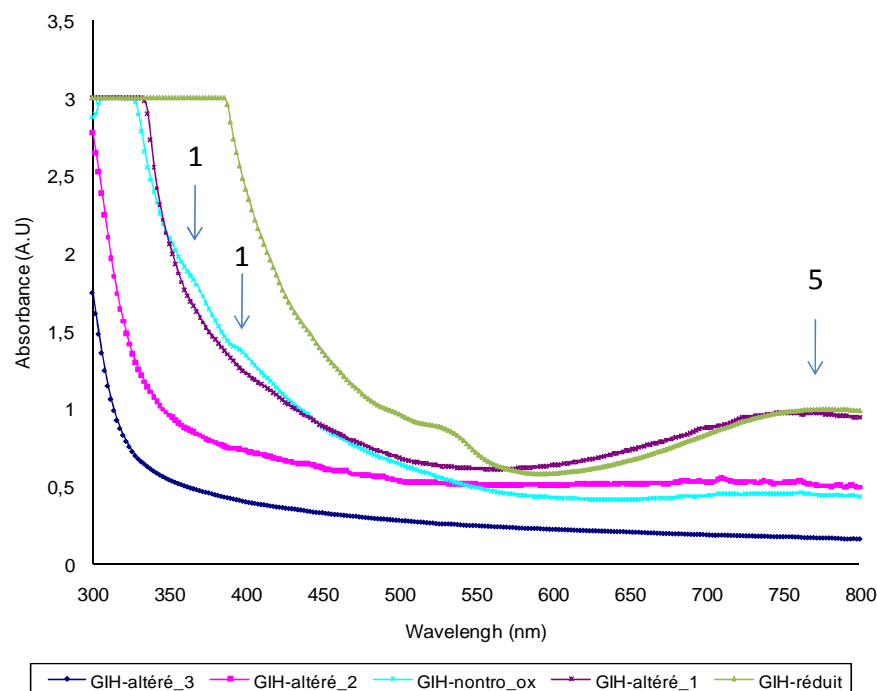


**Figure 60 : Schéma proposé du transfert d'électrons catéchol – quinone via un complexe stable équimolaire : la quinhydrone.**

#### 4.2. L'ALTERATION BACTERIENNE PAR ACIDOLYSE

L'activité bactérienne peut aussi engendrer au cours de la réduction du Fe(III) structural une altération par acidolyse. Ce processus est prépondérant avec les souches fermentaires, comme *Clostridium aurantibutyricum*, qui acidifie fortement le milieu (pH = 4,7, Tableau 17). Comme dans les expériences conduites avec la bactérie *Shewanella oneidensis*, on observe, lors de la réduction du Fe(III), une augmentation de l'absorbance du spectre entre 350nm et 500 nm correspondant à la présence de quinone ou de quinhydrone dans le GIH, ainsi que l'apparition d'une bande spectrale large vers 770nm signant la présence de Fe(II) octaédrique. En revanche, l'action concomitante des protons provoque un blanchiment, i.e une décoloration du GIH réduit (vert → incolore) que l'on peut observer sur la figure 61 (GIH-altéré (1, 2 et 3)).

Ce processus d'acidolyse succède au processus de réduction du Fe(III) structural. La décoloration interviendrait après que le GIH-nontronite soit complètement réduit.



**Figure 61 : Evolution des bandes spectrales des sites de fer structural de la nontronite Nau2 après altération (réduction, acidolyse) bactérienne (*Clostridium aurantibutyricum*). GIH-nontro\_ox= initial ; GIH-réduit=après réduction du Fe(III) ; GIH-altéré (1, 2 et 3)= évolution du blanchiment du gel. Les bandes 1 correspondent au Fe(III) octaédrique et la bande 5 correspond au Fe(II) octaédrique.**

Ce processus de réduction/acidolyse semble générique et il semble intéressant de le généraliser et d'en extraire un modèle.

## 5. PROPOSITION D'UN MODELE REACTIONNEL POUR LA REDUCTION BACTERIENNE DU FER DANS LES SYSTEMES ARGILEUX

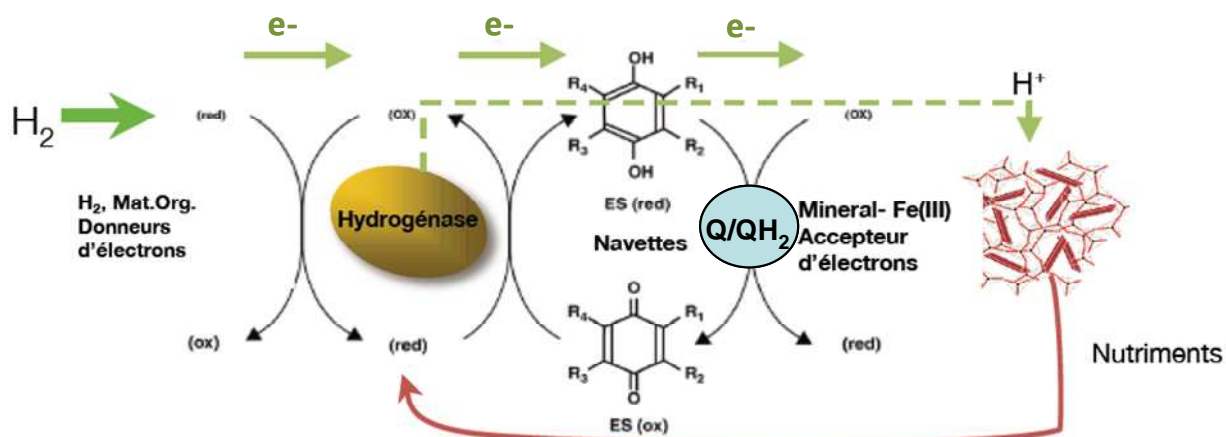
Les études réalisées sur la biodisponibilité du Fe(III) structural dans un système argileux poreux, ont mis en évidence un mécanisme de réduction externalisé. En effet, toutes les expériences conduisent à proposer l'existence de navettes électroniques sous la forme de complexes de transfert d'électrons au sein du système poreux (le GIH dans notre étude).

Le processus de production de ces navettes électroniques (catéchols/quinones) dans le milieu par les bactéries n'est actuellement pas bien clarifié. Cependant, suite à l'apport de sources d'énergies (molécule organique ou inorganique), l'activité enzymatique bactérienne peut à la fois :

- réduire des molécules transporteurs d'électrons (quinone) ou bien transférer des électrons directement à des complexes équimolaires, quinhydrone, qui pourraient favoriser le transfert des électrons au sein de la porosité,
- libérer des protons dans le milieu.



Un mécanisme probable de transfert d'électrons extracellulaire sur une cible Fe(III)-nontronite dans un milieu poreux est décrit sur la figure 62.



**Figure 62 : Mécanisme de réduction / altération des Fe(III)-nontronite à distance via des transporteurs d'électrons extracellulaires bio-induits. La formation à l'état équimolaire de Quinhydrone (Q/QH<sub>2</sub>) au sein des milieux poreux favorise le transfert des électrons entre les transporteurs et la réduction du Fe(III) structural.**

Lorsque ces molécules réductrices peuvent diffuser dans la porosité du milieu argileux, et parvenir au contact de phases argileuses ou d'oxydes ferriques, elles transfèrent leurs électrons à ces phases et les réduisent. Le complexe quinhydrone pourrait permettre de favoriser le transfert des électrons directement entre la paroi des bactéries et le minéral. Le complexe H<sub>2</sub>Q/Q serait un « conducteur électrique organique au sein d'une structure poreuse » entre les bactéries et les particules minérales dispersées dans un environnement poreux. Dans cette hypothèse, la navette seule ne semble pas être le principal agent de la réduction, d'autant qu'elle sera moins efficace car elle est contrôlée par un processus diffusionnel.

D'autre part, l'action supplémentaire des protons favoriserait la dissolution des structures argileuses déstabilisées par la réduction bactérienne et la mise en solution des éléments. Ceux-ci pourraient en retour fournir un apport de nutriments nécessaires au développement des bactéries (fer, magnésium...).

Le processus de réduction du Fe(III) structural des nontronites, dispersées dans un GIH, à distance par des bactéries ferriréductrices (MR1) via des navettes électroniques est décrit dans l'article suivant (en préparation).

## Article V

### « Electron Shuttle transport: efficient mechanism at distance for IRB respiration »

Esnault, L<sup>1-2</sup>., Libert, M and Jullien, M.

<sup>1</sup> CEA DTN/SMTM/LMTE, CE Cadarache, St Paul lez. Durance, 13108, France

Mustin, C.

<sup>2</sup> LIMOS UMR 7137 CNRS-UHP Nancy I - Science Faculty - Vandoeuvre les Nancy cedex – 54506, France

Grybos, M.

<sup>3</sup> GRESE (Groupe de Recherche Eau-Sol-Environnement), Université de Limoges - FST, 123 avenue A. Thomas, Limoges, 87060, France

En préparation

Résumé : Le but de cette étude est de démontrer le processus de respiration externe des bactéries ferriréductrices pris en charge par des transports de navettes électroniques (ES) en tant que médiateur de la réaction de réduction du Fe(III) des minéraux. Un matériau original a été développé sous la forme d'un gel hybride inorganique (HIG), dans lequel, différents minéraux sous forme colloïdale tels que des nontronites riches en Fe<sup>3+</sup> peuvent être inclus. L'avantage d'un tel matériau est de pouvoir permettre l'observation optique du processus de réduction du Fe(III) se produisant à plus ou moins longue distance. Ces processus de réduction du Fe (III) structural des nontronites à distance ont été démontrés avec l'espèce modèle *Shewanella oneidensis* MR1. Les résultats décrivent l'existence de navettes électroniques, comme étant des molécules bio-produites (catéchols) par les bactéries et pouvant diffuser dans la porosité du matériau. Ces molécules induisent une réduction du Fe(III) des minéraux à l'intérieur de la structure poreuse. En dépit d'aucun contact entre les bactéries et les minéraux, la réduction microbienne conduit à des réductions du Fe(III) à distance (> 4 mm dans cette étude). Ces résultats soulignent la possibilité d'un tel mécanisme de respiration externe des organismes procaryotes qui pourrait être analogue aux premières respirations biologiques sur Terre avant l'internalisation des chaînes respiratoires des organismes primitifs (théorie de l'endosymbiose).

## Electron Shuttle transport: efficient mechanism occurring at a distance for IRB respiration

Esnault, L<sup>1-2</sup>., Mustin, C<sup>2</sup>., Grybos, M<sup>3</sup>., Libert, M<sup>1</sup> and Jullien, M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> CEA DTN/SMTM/LMTE, CE Cadarache, St Paul lez Durance, 13108, France

<sup>2</sup> LIMOS UMR 7137 CNRS-UHP Nancy I - Science Faculty - Vandoeuvre les Nancy cedex – 54506, France

<sup>3</sup> GRESE (Groupe de Recherche Eau-Sol-Environnement), Université de Limoges - FST, 123 avenue A. Thomas, Limoges, 87060, France

### Abstract:

The aim of this study is to demonstrate the external respiration of iron-reducing bacteria (IRB) supported by electron shuttle (ES) transport as the reaction mediator. An original material was developed in the form of a hybrid inorganic gel (HIG), in which different colloidal minerals such as Fe-rich nontronite can be included to allow the optical observation of the Fe(III) reduction processes occurring at a distance. These reduction processes of structural Fe(III) from colloidal nontronite inside HIG were obtained with *Shewanella oneidensis* MR1 as the bacterium model. The results demonstrate the existence of ES, as hydroquinone molecules produced by bacteria diffuse in the porosity of the material and may cause the reduction of Fe(III) element (>4 mm in this study) at a distance. In spite of “no contact” between bacteria and minerals, the microbial reduction is validated, highlighting the possibility that the external respiration mechanism of prokaryote organisms might be analogous to the first biological respiration on Earth.

### Introduction

Changes in the redox state of iron have a major impact on the biogeochemical cycling of carbon, sulphur, nitrogen, phosphorus and (trace) metals (Haese *et al.*, 1998). The Fe speciation has a real influence on the reactivity of iron particulate. Due to its low solubility, Fe(III) tends to accumulate in particulate form, mostly as ferric (hydr)oxides (Murray, 1979), Fe(III) bound in alumino-silicates (Raiswell and Canfield, 1998), and ferric phosphate phases (Buffle *et al.*, 1989; Hyacinthe and Van Cappellen, 2004). Because of this Fe(III) trapping, bacteria appear to develop several different strategies to access the mineral form of structural Fe(III) as chelating mechanisms (Lovley, 1996; Braun *et al.*, 1998; Holmen *et al.*, 1999). Microorganisms such as iron-reducing bacteria (IRB) play a major role on the dissolution of iron mineral through the dissimilatory Fe(III) reduction process in soil (Munch and Ottow, 1983; Lu *et al.*, 2002) and sediment ( Lovley *et al.*, 1986, 1991; Hyacinthe *et al.*, 2006). In order to obtain efficient energy for growth, their metabolisms can reduce Fe(III) in many minerals such as iron oxide, goethite (Roden and Zachara, 1996; Kotska, 1999), hematite, magnetite, (Lovley *et al.*, 1987; Crespo *et al.*, 2007) and clay mineral such as nontronite (Stucki and Kotska, 2006; O'Reilly *et al.*, 2006), illite (Dong *et al.*, 2003), chlorite (Jaisy *et al.*, 2007) and kaolinite (Esnault *et al.*, 2010).

However, to better predict the activity of IRB in the environment, it is essential to understand the mechanisms by which any given microbial community catalyzes iron reduction. Electron transfers between protein and mineral are often cited (Kappler *et al.*, 2004) but few are really demonstrated. Quinone molecules are currently described as the electron transfer mediator in essential biogeochemical processes such as iron bioreduction and contaminant degradation. The particularity of quinones is supported by reversible redox chemistry (Uchimiya and Stone, 2009). The role of

quinones as redox catalysts in iron bioreduction by pure cultures of anaerobic bacteria (Royer *et al.*, 2002; Jiang and Kappler, 2008) as well as indigenous soil (Rakshit *et al.*, 2009) and sediment (Nevin and Lovley, 2000) has received considerable attention over the past 10 years. However, other soluble organic compounds can act in a similar way as quinones: pyocyanin, a pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* (Rabaey *et al.*, 2005), melanin (Turick *et al.*, 2002), riboflavin (Dos Santos *et al.*, 2004), flavin and sulphur compounds such as the cysteine-cystine shuttle, and the sulphide-sulphur shuttle (Kaden *et al.*, 2002; Straub and Schink, 2003-2004).

In order to prove the mechanism of Fe(III) reduction at distance and elucidate the “indirect” or “direct” reduction, several studies were performed. Previous studies employing Fe(III) (hydro)oxides sequestered in alginate beads provided evidence which suggested that iron can be reduced at distance by *Shewanella* and *Geothrix* species (Nevin and Lovley, 2002a,b). A recent study demonstrated that *S. oneidensis* is capable of reducing iron at distance using the Fe-bead system. (Lies *et al.*, 2005). These authors explain that iron reduction could be controlled by an external mediator (extracellular electron shuttle) between cells to Fe(III) inside the beads. However, measuring Fe(III) reduction inside an Fe-bead system requires secondary analysis and according to the authors, the mediator molecules described have not been identified.

Although many IRB species such as *S. oneidensis* strain MR-1 are supposed to reduce iron oxide at distance, in this study, we developed a new, original alteration method to optically follow Fe(III) reduction processes at distance through the synthesis of a hybrid gel, where different minerals can be included in a system in which porosity is controlled. Here we show the capacity of this technique to determine mechanisms used by bacteria to reduce a more generally altered ferric mineral.

## Material and method

### Bacteria

An anaerobic bacterium, “*Shewanella oneidensis* strain MR-1” (Pasteur Institut Collection, Paris, France, 106686), was used in the experiments. It was isolated from the anoxic sediments of Lake Oneida, NY (Myers & Neilson 1988; Venkateswaran *et al.* 1999), and has been the subject of many physiological and genetic studies. MR-1 is an obligate-respiratory bacterium, incapable of fermentation. This bacterium may have the capacity to use electron shuttle molecule to perform iron reduction. *Shewanella oneidensis* MR-1 was initially grown in a culture medium containing 20 mM Fe(III)-citrate and lactate as the electron acceptor.

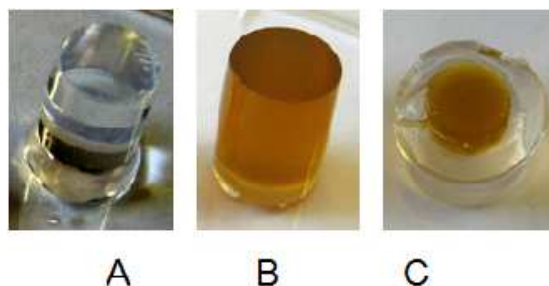
### Hybrid Inorganic Gel – Nontronite (HIG-nontronite):

The nontronite samples (NAu2) used in the present study were purchased from the Source Clays Minerals repository at Purdue University and prepared according to Michot *et al.* (2006). The mineralogical composition of NAu2 is pure (purity >99.9%) and is in colloidal form (the thickness of individual nontronite particles is around 1.5nm on the basis of crystallographic data. The structural formula is:



The immobilization of nontronite in a silica gel was described by Grybos *et al.* (2010). In our study, nontronite suspension was mixed with a silica solution in the volume ratio 4.35:10 in order to have a concentration of 4.35 g/l of nontronite particles in each millilitre of HIG. The homogenous coloration proves that nontronite particles are well dispersed in the gel. Microscopic observation of the gels (not shown) did not reveal any aggregate of nontronite particles. The HIG-nontronite characteristic gives it excellent optical properties and a homogeneous porosity (40 to 100nm) preventing all possible migration of bacteria into HIG.

Two conditions were performed in order to determine microbial Fe(III) reduction by contact or “no contact”:



**Figure 1:** Picture of hybrid inorganic gel (HIG) before incorporation of nontronite (a) after (b) and in “contactless” conditions (c), where HIG is synthesized around HIG-nontronite. Here, only a cross section was presented of HIG-nontronite sandwich form.

### Batch reactor

Two types of experiments (abiotic and biotic) have been performed in anaerobic sterile glass reactors. A synthetic medium (Mclay) (Esnault et al, 2010) was prepared using 18 M $\Omega$ -0.2 micron-filtered water and was sterilized by heating.

Biotic experiences: Bacteria in contact or “no contact” with HIG-nontronite

Cultures were washed 3 times with the medium and then transferred to anaerobic sterile glass reactors containing 30mL of culture medium (Mclay) in a total of 140mL. Sterile HIG-nontronite was added with 4.35mM of H<sub>2</sub> (gaseous and liquid H<sub>2</sub>) for *Shewanella* species experiment. Anaerobic conditions were obtained by bubbling a gas mixture: 60% H<sub>2</sub>, 30% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> at 1.56  $\times 10^5$  Pa. Three replicates were performed in order to validate the process. These batch reactors were incubated at 40°C in the dark. Control experiments were conducted in the same conditions without bacteria or without electron donor. All the samplings were carried out under strict anoxic conditions within an anaerobic glove box (90% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). The initial cell density of all cultures, roughly 1 $\times 10^7$  cell.mL<sup>-1</sup>, was estimated by the relationship between optical density (absorbance at 500 nm) and direct cell counts (microscopy).

### Biochemical analysis

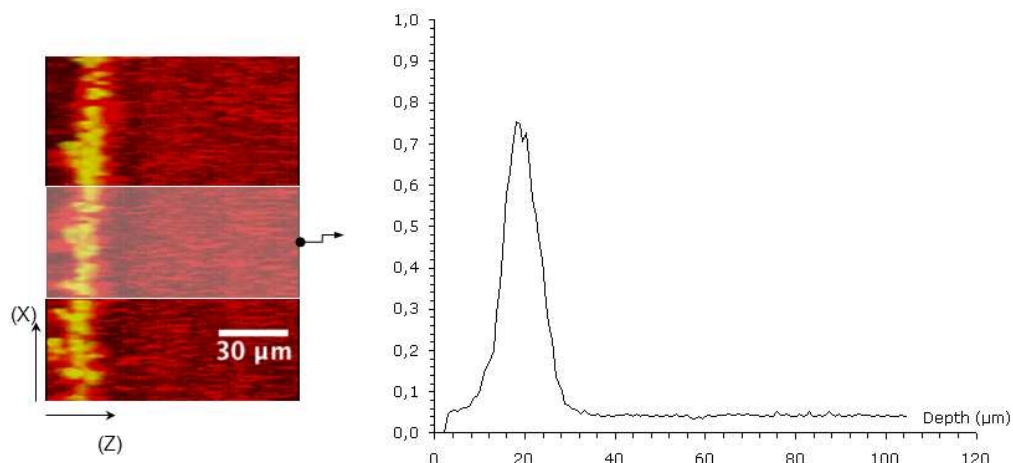
- Bacterial growth was followed by direct cell counts (backlight kit) by optical microscopy.
- Bio-molecules (organic acid or aromatic compounds) were measured by HPLC (REF..)
- The experimental solution was monitored over the time for total Fe (dissolved Fe(II)+Fe(III)) by inductively coupled plasma–atomic emission spectroscopy (Ultra-trace ICP-AES, Jobin Yvon®).
- Electron donor concentration was measured by gas chromatography during consumption of H<sub>2</sub> by *Shewanella oneidensis* MR1. (Description of GC ).
- The Fe(III) reduction of nontronite into HIG, was monitored through ferrozine assay (Viollier et al., 2000). Some drops (100 $\mu$ l) were deposited above HIG sample in order to localize iron reduction inside the HIG.

### Confocal microscopy

Fluorescent analysis of Gfp-tagged bacteria was observed with confocal microscopy in order to determine the bacterial distribution on the HIG.

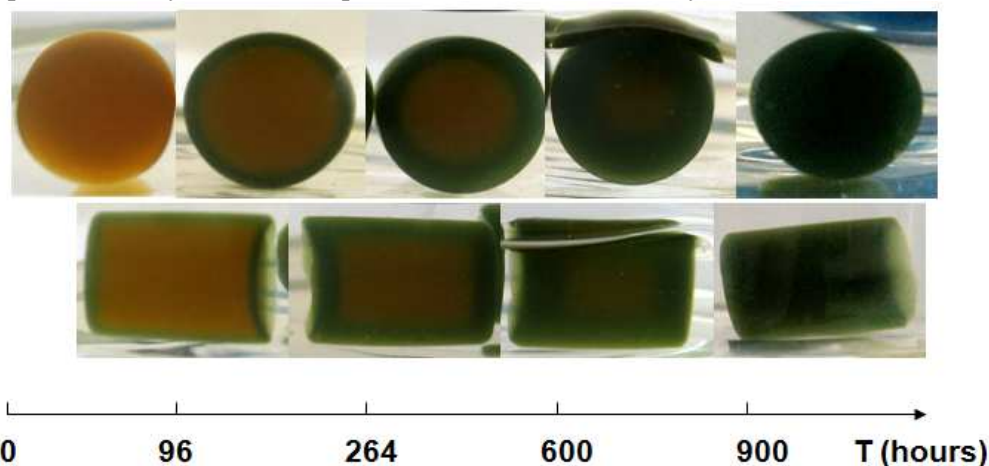
## Results

Microscopic evidence of bacteria is shown through the distribution of bacteria cells supporting a high fluorescence around HIG (Figure 2). This result validates the fact that there is no possible migration of bacteria inside HIG, thus avoiding the contact with colloidal nontronite.



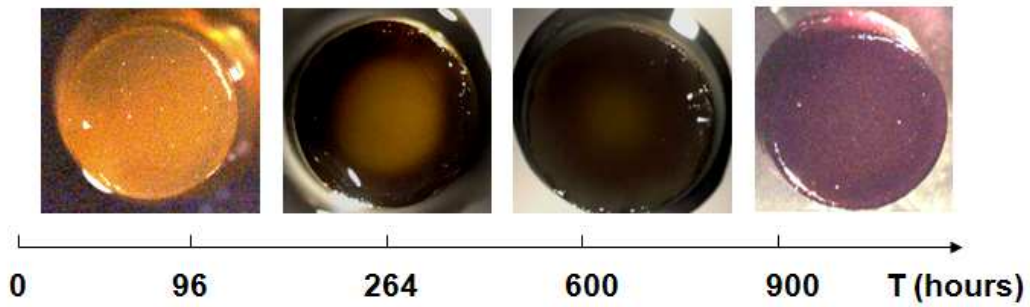
**Figure 2:** Cross section of HIG (red) showing distribution of bacterial cells. Depth profile (XZ) of Gfp-tagged bacteria fluorescence. Reference volume (white area):  $50 \times 300 \times 110 \mu\text{m}^3$

As shown in Figure 3, *Shewanella oneidensis* MR1 can reduce  $\text{Fe}^{3+}$  into HIG-nontronite during the given time. First, a simple reduction beginning at the surface of the HIG sample is observed, with the sample colour changing from orange to green. Then, the reduction occurs deeper within the sample until the  $\text{Fe}^{3+}$  is entirely reduced into HIG-nontronite and the sample is entirely green. This  $\text{Fe}^{3+}$  reduction process is very slow, as complete reduction is reached only at 900 hours.



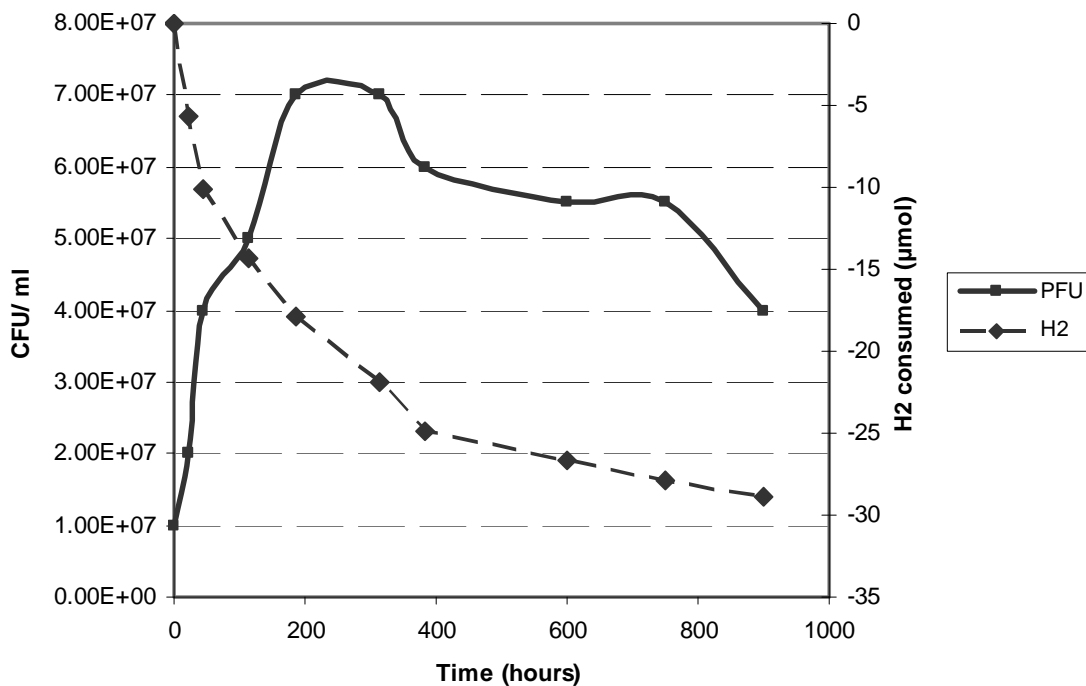
**Figure 2:** Evolution of Fe(III) reduction of HIG-nontronite by *Shewanella MRI* during the given time. The reduction process penetrates deeper into the sample.

That the change of colours is a part of the reduction process is confirmed through ferrozine assay, involving a complexing agent for  $\text{Fe}^{2+}$  that turns purple as the  $\text{Fe}^{2+}$  - ferrozine complex forms. Figure 4 focuses on the progression of the Fe(III) reduction process as this complex forms, until the HIG-nontronite turns completely purple (all Fe is in the form of  $\text{Fe}^{2+}$ ).



**Figure 4: Localisation of Fe reduced into GIH-nontronite after addition of ferrozine agent during Fe(III) reduction of *Shewanella MRI*.**

The reduction of structural Fe(III) from nontronite by *Shewanella* is supported by the consumption of H<sub>2</sub>, which is the sole electron donor in the system. Without H<sub>2</sub> or bacteria (and sometimes even in presence of H<sub>2</sub>), no reduction phenomenon is observed during the same experimental period (results not shown). This consumption of H<sub>2</sub> / reduction of Fe(III) is also correlated with the growth of bacteria (Fig. 5).



**Figure 5: Bacterial activity during Fe(III) reduction: H<sub>2</sub> consumed and bacterial growth.**

Moreover, in the second experiment, HIG was synthesized around HIG-nontronite to prevent all possible contact of bacteria on nontronite. The result shows the Fe(III) from colloidal nontronite is available for reduction by *Shewanella* sp. unless it comes in contact with HIG-nontronite. As shown in Figure 6, the colour of HIG-nontronite changes in presence of *Shewanella* sp, even though the bacteria are, relatively speaking, far from the HIG-nontronite (roughly 5 mm). The total reduction was observed at 980 hours.



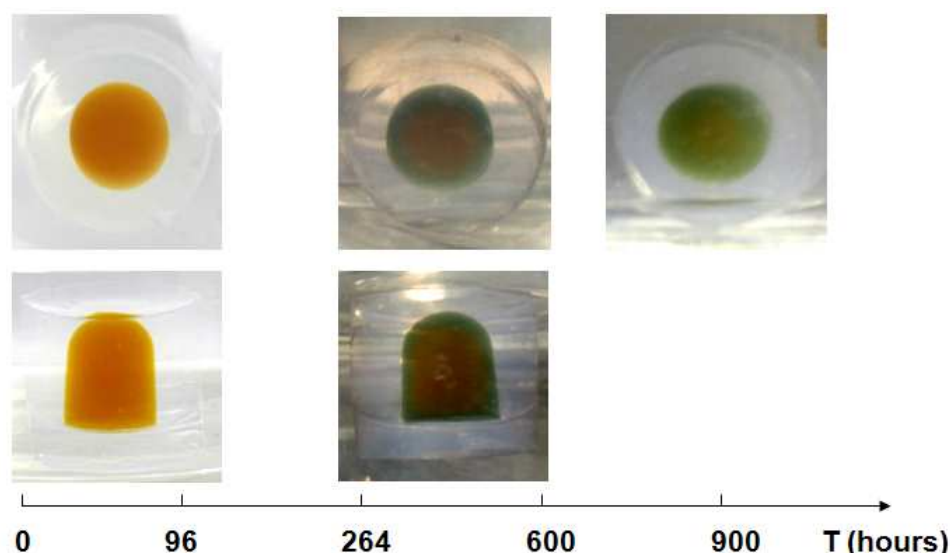


Figure 6: Fe(III) reduction at distance (HIG-nontronite sandwich) by *Shewanella MRI*.

Furthermore, in the same experimental conditions, no relevant differences concerning the Fe(III) reduction kinetics are observed between the reduction of HIG-nontronite and that of HIG-nontronite sandwich (Figure 5). The diffusion of reducing molecules through HIG material supports the Fe(III) reduction at a greater distance (>4 mm).

During the Fe(III) reduction process, microbial activity produced bio-molecules, pyrocatechols and phenanthroquinones (Figure 7). The quinones belong to a family of molecules known to act as mediator in reduction processes, so could be the mediator in the Fe(III) reduction at distance for dissimilatory iron reduction bacteria here.

Name	Gluconate	Lactate	Acetate	oxalate	Catechol (H <sub>2</sub> Q)	Quinone (Q)
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
<i>Shewanella</i>	7	0.0.	17	1,8	29	9

Figure 7: Identification of bio-molecules produced during Fe(III) reduction of HIG-nontronite. Presence of catechol and quinone could be used as ES for reduction at distance.

## Discussion

This study shows how microbes can promote the Fe(III) reduction of colloidal nontronite at a great distance – relatively speaking – via the production of catechol and quinone, which act as the mediator molecules, diffusing in the material porosity until they reach the Fe(III) particulate and reduce it.

In natural environment, quinones are often implicated in electron shuttling during Fe(III) reduction processes (Lovley, *et al.* 1996). Quinones (Q) are frequently found in humic substances (Hs), which enhance the microbial reduction process of insoluble Fe(III), whatever the anoxic environment e.g. the sediment zone (Kappler, 2004). The role of excreted quinone in extracellular electron transfer has been identified through mutant bacteria which are depleted by menaquinone biosynthesis and are unable to respire on humic substances (Newman and Kolter, 2000).

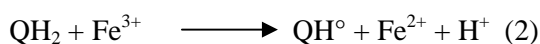
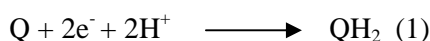
In our study, we demonstrate that, the efficiency of the Fe(III) reduction, induced by redox bacterial mediator, is dependent on two specific features of HIG-nontronite:



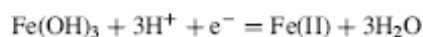
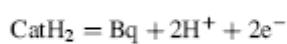
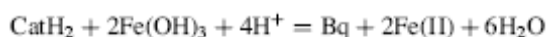
- Migration of quinone/ catechol molecules in the HIG porosity by the diffusion process; catechol size, dependent on an aromatic core around 1nm, is smaller than HIG porosity (around 40 nm).
- The high availability of Fe(III) nontronite which is found in a colloidal nontronite suspension on a pore-size scale

Particle size is very small (see material and methods section). Particles are found in a completely dispersed state and no aggregation was observed (Michot *et al.*, 2006). Moreover, when quinones access the HIG porosity, they can reduce Fe(III) nontronite by direct electron transfer. The electron transfer that occurs when two complexes (redox mediator and Fe(III) nontronite) are in close proximity and which is estimated to be from 10Å (Marcus and Sutin, 1985; Tsuchida *et al.*, 1986) to 40Å (Medvedev *et al.*, 2004) can be easily achieved with Fe(III) nontronite (particle size is estimated at 15Å).

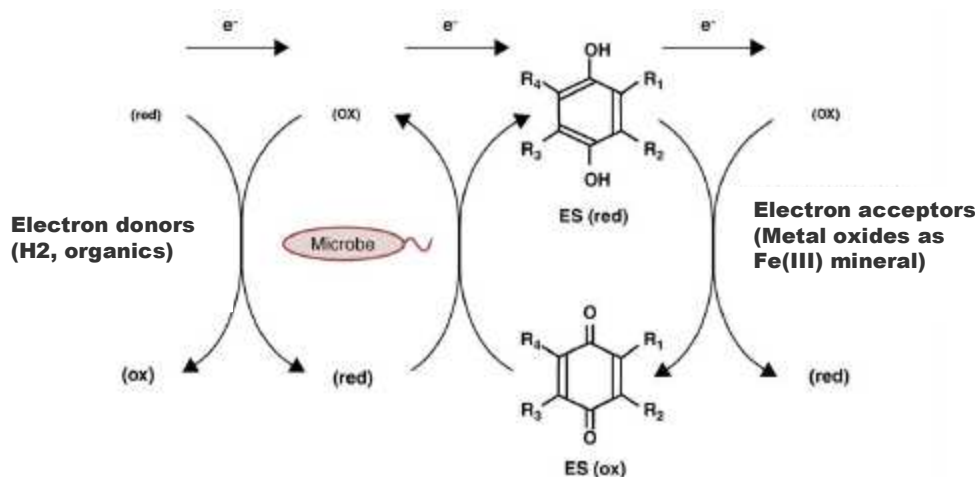
Quinones (Q) from Hs or bio-produced by microbes can be bio-reduced to a hydroquinone (QH<sub>2</sub>) form (1) which can subsequently react chemically with Fe(III) (2).



Moreover, abiotic experiments in laboratory show that catechol (CatH<sub>2</sub>) can act as an important organic for Fe(III) reduction (Magdalena Santana-Casiano *et al.*, 2010). Oxidation of catechol involves reduction of Fe(III) in producing quinone (benzoquinone, Bq). This is explained through the equation:



A schematic reaction as described below explains the extracellular mechanism of Fe(III) reduction at distance:



**Figure 8 : Schematic reaction of Fe(III) reduction at distance by quinone bio-produced as electron shuttle for extracellular bacterial respiration (adapted to Watanabe *et al.*, 2009).**

So, electron shuttle appears an intermediary to the bacterial reduction of Fe(III) clay minerals. In our study, it's only catechol which can reduce Fe(III). In this case, energetic reaction for bacteria development is supported mainly by the reaction couple H<sub>2</sub>/Quinone.

Other studies support our conclusion that reduction of Fe(III) to Fe(II) can be performed by endogenously produced diffusible redox mediators acting as electron shuttles for bacteria respiration (Gralnick and Newman, 2007). For example, investigation of microbial fuel cell behaviour using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) shows the transfer of extracellular mediator produced by microorganisms from anode to cathode through a simple carbonate membrane under open-circuit conditions and, therefore, their participation in extracellular electron shuttling (Ramasamy *et al.*, 2009). According to the authors, electron transfer from the mediator to anode will be up to 15 times faster than the electron transfer from bacteria to mediator. Moreover, a recent study (Hartshorne *et al.*, 2009) shows the capacity of redox protein (trans-OM icosaheme complex, MtrCAB), localized on the outer membrane (OM), to mediate electron transfer to extracellular substrates by spectropotentiometric characterization. The authors explain that the redox protein has been identified in a range of bacteria phyla involving electron exchange and is widely found in an extracellular environment.

It has been demonstrated that *S. oneidensis* is able to grow with Fe(III) in smectite structure as the sole electron acceptor (Kotska *et al.*, 2002). An extracellular mediator could be an adaptive strategy for bacterial survival in a clay environment, whether at the surface, in diagenetic conditions, for example at high temperature 100°C (Kashefi *et al.*, 2002), or at great depths within sedimentary rock (Boone *et al.*, 1995).

The biotic process of Fe(III) reduction via catechol and quinone shows the adaptive strategy adopted by IRB to access Fe(III) mineral for their respiration. This biological phenomenon opens a new area for investigation to understand the biological accessibility of energetic elements in low concentrations where life conditions are hostile. However, life is definitely present, e.g.: i) the discovery of bacterial diversity in argillite environments (~160 million years, Poulain *et al.*, 2008), or ii) the large fraction of the sub-seafloor prokaryotes, which were identified as being alive in very old (16 million yr) and deep (> 400 m) sediments (Schippers *et al.*, 2005).

Although the energetic efficiency of external respiration is less effective than internal respiration, this external respiration mechanism in prokaryote organisms may have been one of the possible mechanisms resembling biological respiration on Earth before the endosymbiotic theory.

### Acknowledgements

Thanks to Michot Laurent for the purification of Nau2 nontronite in colloidal suspension

### Reference

- Boone, DR., Liu, Y., Zhao, ZJ., Balkwill, DL., Drake, GR., Stevens, TO and Aldrich, HC. (1995). *Bacillus infernus* sp. Nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int J Syst Bacteriol* 45:441-448.
- Braun, V., Hantke K. and Koster W. (1998) Bacterial iron transport: Mechanism, genetics and regulation. In *Physical Bioinorganic Chemistry Series: Iron Carriers and Iron Proteins* (ed. T. M. Loehr), pp. 67–145.
- Buffle, J., de Vitre, R.R., Perret, D and Leppard, G.G. (1989). Physicochemical characteristics of a colloidal iron phosphate species formed at the oxic-anoxic interface of a eutrophic lake. *Geochim. Cosmochim. Acta* 53, 399–408.
- Crespo, J., Munoz, J.A., Gonzalez, F., Blazquez, M.L. and Ballester, A. (2007). Comparative bioreduction of Fe(III) with geobacter metallireducens and *Bacillus infernus*. *Advanced Materials Research*. 2à-21, 561-564
- Dos Santos, A.B., Bisschop, I.A., Cervantes, F.J., and van Lier, J.B. (2004) Effect of different redox mediators during thermophilic azo dye reduction by anaerobic granular sludge and comparative study between mesophilic (30°C) and thermophilic (55°C) treatments for decolorisation of textile wastewater. *Chemosphere* 55: 1149–1157.
- Dong, H., Kostka, J.E and Kim, J.W. (2003). Microscopic evidence for microbial dissolution of smectite. *Clays Clay Miner.* 51, 502–512.

- Esnault, L., Libert, M., Bildstein, O and Jullien, M. (2010). Clay-iron reducing bacteria interaction in deep geological environment: Experimental and modelling approach. P. Birkle & I.S. Torres-Alvarado (eds.) WATER-ROCK INTERACTION – Proceedings of the 13th International Conference on Water-Rock Interaction, Guanajuato, Mexico, 16–20 August 2010, CRC Press, Taylor & Francis Group, 939-942.
- Grybos, M., Michot, L.J., Skiba, M., Billard, P. and Mustin, C. (2010) Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles: Evidence for basal surface reactivity of nontronite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 343(2): 433-438.
- Haese R.R., Petermann, H. Dittert, L and Schulz, H.D. (1998). The early diagenesis of iron in pelagic sediments: a multidisciplinary approach, *Earth Planet. Sci. Lett.* 157: 233-248.
- Hyacinthe, C. and Van Cappellen, P. (2004) An authigenic iron phosphate phase in estuarine sediments: composition, formation and chemical reactivity. *Mar. Chem.* 91, 227-251.
- Hartshorne, R.S., Reardon, C.L., Ross, D., Nueter, J., Clarke, T.A., Gates, A.J., Mills, P.C., Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Shi, L., Bellaev, A.S., Marshall, M.J., Tien, M., Brantley, S., Butt, J.N and Richardson, D.J. ., 2009
- Holmen, B. A., Sison, J. D., Nelson, D.C and Casey, W.H. (1999). Hydroxamate siderophores, cell growth and Fe(III) cycling in two anaerobic iron oxide media containing *Geobacter metallireducens* *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 63, (2), 227–239.
- Hyacinthe, C. Bonneville, S and Van Cappellen, P (2006) Reactive iron(III) in sediments: Chemical versus microbial extractions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70 4166–4180
- Lovley, D. R and Phillips E. J. P. (1986) Availability of trivalent iron for microbial reduction in bottom sediments of the freshwater tidal Potomac River. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 751-757.
- Lovley, D. R., Stolz J. F., Nord G. L., Jr., and Phillips E. J. P. (1987) Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature (London)* 330, 252-254.
- Lovley, D. R., Phillips E. J. P., and Lonergan D. J. (1991b) Enzymic versus nonenzymic mechanisms for iron(III)reduction in aquatic sediments. *Environ. Sci. Technol.* 25, 1062-1067.
- Lovley, D.R WJ and Chapelle, F. H. (1996). Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 228-291
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Bluntharris, E.L., Phillips, E.J., Woodward, J. C., (1996). Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382, 445-448.
- Jaisi, D.P., Dong, H. L., Liu, C. X. (2007). Influence of biogenic Fe(II) on the extent of microbial reduction of Fe(III) in clay minerals nontronite, illite, and chlorite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 1145-1158.
- Jiang, J and Kappler, A. (2008). Kinetics of microbial and chemical reduction of humic substances: implications for electron shuttling. *Environ Sci Technol* 2008, 42:3563-3569.
- Kostka, J.E., Dalton, D.D., Skelton, H., Dollhopf, S., Stucki, J. W., (2002). Growth of iron(III)-reducing bacteria on clay minerals as the sole electron acceptor and comparison of growth yields on a variety of oxidized iron forms. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6256-6262.
- Kashefi, K., D. E. Holmes, D. R. Lovley, and J. M. Tor. (2004). Potential importance of dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms in hot sedimentary environments, p. 199–211. In W. S. D. Wilcock, E. F. DeLong, D. S. Kelley, J. A. Baross, and S. C. Cary (ed.), *The seafloor biosphere at mid-ocean ridges*, vol. 144. American Geophysical Union, Washington, DC.
- Kappler A., Benz M., Schink B., and Brune A. (2004) Electron shuttling via humic acids in microbial iron(III) reduction in a freshwater sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 85-92.
- Kaden, J., Galushko, A and Schink, B. (2002) Cysteine mediated electron transfer in syntrophic acetate oxidation by cocultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Wolinella succinogenes*. *Arch Microbiol* 178: 53–58.
- Kostka, J. E. WU, J. Nealson, K. H. and Stucki, J. W. (1999). The impact of structural Fe(III) reduction by bacteria on the surface chemistry of smectite clay minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63(22), 3705-3713.
- Lies, D. P., Hernandez, M. E., Kappler, A., Mielke, R. E., Gralnick, J. A and Newman, D. K., (2005). *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. *Applied and Environmental*

- Microbiology. 71, 4414–4426 Murray J. W. (1979) Iron oxides. In Marine minerals (ed. R. G. Burns), pp. 47-98. Mineralogical Society of America.
- Munch, J.C. and Ottow, J.C.G. (1983). Reductive transformation mechanism of ferric oxides in hydromorphic soils. *Environmental Biogeochemistry Ecology Bulletin* 35: 383-394.; Lu et al., 2002)
- Medvedev, E.S and Stuchebrukhov, A.A.(2004). Breakdown of the born-oppenheimer-condon-marcus approximation in the long distance electron transfer. *Chemical Physics*. 296, 181-192.
- Michot, L. J., Bihannic, I., Maddi, S., Funari, S S., Baravian, C., Levitz, P and Davidson, P. (2006). Liquid–crystalline aqueous clay suspensions. *PNAS*, 103 (44), 16101-16104.
- Myers, C.R., Nealson, K.H., (1998). Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* 240, 1319–1321
- Magdalena Santana-Casiano, J., Gonzalez-Davilla, M., Gonzalez, A.G and Millero, J. (2010). Fe(III) reduction in the presence of catechol in seawater. *Aquatic Geochemistry*. 1-(3):467-482.
- Marcus, R.A and Sutin, N. (1985). *Biochim. Biophys. Acta* 811 265-322.
- Newman, D.K and Kolter, R. (2000). A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature*, 405:94-97.
- Nevin, K.P., Lovley, D.R. (2000). Potential for nonenzymatic reduction of Fe(III) via electron shuttling in subsurface sediments. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2472– 2478.
- O'Reilly, S. E., Furukawa, Y and Newell, S. (2006). "Dissolution and microbial Fe(III) reduction of nontronite (NAu-1)." *Chemical Geology* 235(1-2): 1-11.
- Poulain, S., Sergeant, C., Simonoff, M., Le Marrec, C and Altmann, S. (2008). Microbial investigation of Opalinus Clay, an argillaceous formation as the potential host rock under evaluation for a radioactive waste repository. *Geomicrobiology Journal*, 25(5), 240-249.
- Roden, E. E. and Zachara, J. M. (1996) Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1618-28.
- Rakshit, S., Uchimya, M. and Sposito, G. (2009). Iron(III) bioreduction in soil in the presence added humic substances. *Soil Science Society of America Journal*. 73(1), 65-71.
- Royer, R. A., Burgos, W. D., Fisher, A. S., Unz, R. F., and Dempsey, B. A. (2002) Enhancement of biological reduction of hematite by electron shuttling and Fe(II) complexation. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1939–1946.
- Rabaey, I., Boon, N., Höfte, M., and Verstraete, W. (2005) Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environ Sci Technol* 39: 3401–3408.
- Ramasamy, R.P., Gadhamshetty, V., Nadeau, L.J. and Johnson, G.R. (2009). Impedance spectroscopy as a tool for non-intrusive detection of extracellular mediators in microbial fuel cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 104(5): 882-891.
- Raiswell, R and Canfield, D.E., (1998). Sources of iron for pyrite formation in marine sediments. *Am. J. Sci.* 298, 219–245.
- Schippers, A., Neretin, L.N., Kallmeyer, J., Ferdelman, T.G., Cragg, B.A., Parkes, R.J and Jorgensen, B.B.(2005) Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature*. 433, 861-864.
- Straub, K.Land Schink, B. (2003).Evaluation of electron-shuttling compounds in microbial ferric iron reduction. *FEMS Microbial Lett.* 220: 229-233.
- Straub, K.Land Schink, B. (2004). Ferrihydrite-dependent growth of *Sulfurospirillum deleyianum* through electron transfer via sulphur cycling. *Appl Environ Microbiol* 70: 5744-5749.
- Stams, A. J. M., Bok, F.A.M., Plugge, C.M., Van Eekert, M.H.A., Dolfijn, J and Schraa, G. (2006). Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. *Environmental Microbiology*, 8, 371–382
- Stucki, J.W., Kkostka, J. E., 2006. Microbial reduction of iron in smectite. *Comptes Rendus Geoscience* 338, 468-475.
- Tsuchida, E., Kaneko, M., Nishide, H and Hoshino, M.(1986). Distance dependence of electron transfer from liposome embedded (Alkanephosphocholine-porphinato)zinc. *Journal of Physical Chemistry*. 90(11). 2283-2286.
- Turick, C.E., Tisa, L.S., and Caccavo, F. (2002) Melanin production and use as soluble electron shuttle for Fe(III) oxide reduction and terminal electron acceptor by *Shewanella* algae BrY. *Appl Environ Microbiol* 68: 2436– 2444.

- Uchimiya, M and Stone, A.T. (2009). Reversible redox chemistry of quinines: Impact on biogeochemical cycles. *Chemosphere* 77: 451-458.
- Venkateswaran, K., Moser, D. P., Dollhopf, M. E., Lies, D. P., Saffarini, D. A., MacGregor, B. J., Ringelberg, D. B., White, D. C., Nishijima, M., Sano, H., Burghardt, J., Stackebrandt, E., & Nealson, K. H., (1999). Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 Pt. 2: 705–724.
- Viollier, E., Inglett P. W., Hunter K., Roychoudhury A. N., and Van Cappellen P. (2000) The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Appl. Geochem.* 15, 785-790.
- Watanabe, K., Manefield, M., Lee, Matthew and Kouzuma, A. (2009). Electron shuttles in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology.* 20: 633-641.
- Wahid, P. A. and Kamalam, N. V. (1993). Reductive dissolution of crystalline and amorphous Fe(III) oxides by microorganisms in submerged soil. *Biology and Fertility of Soils* Volume 15, Number 2, 144-148

## 6. CONCLUSION INTERMEDIAIRE

Dans les milieux argileux poreux, tel que les barrières ouvragés, l'accessibilité au Fe(III) structural est essentiel pour la viabilité bactérienne. Cette étude a mis en évidence un mécanisme de réduction du Fe(III) structural externalisé. En effet, toutes les expériences en présence de microorganismes ferriréducteurs permettent de proposer l'hypothèse de l'existence de navettes électroniques sous la forme de complexes de transfert d'électrons au sein du système poreux (le GIH dans le cas de notre étude). Ces résultats démontrent la biodisponibilité du Fe(III) structural dans les systèmes argileux poreux. Le processus de réduction du Fe(III) est contrôlé par la diffusion d'agents réducteurs, tels que des catéchols, comme navettes électroniques dans la porosité du gel. Le processus de production de ces navettes électroniques (catéchols/quinones) dans le milieu par les bactéries n'est actuellement pas établi.

**Ce mécanisme de réduction externalisé permettrait aux microorganismes ferriréducteurs d'accéder au Fe(III) structural à distance pour leur développement.**

L'activité enzymatique bactérienne peut à la fois favoriser la production de ces molécules réductrices et libérer des protons dans le milieu. Comme il a été décrit dans le chapitre IV, la combinaison de ces deux processus (oxydoréduction et acidolyse) peut avoir des conséquences importantes sur la stabilité des phases minérales argileuses. En effet, une réduction microbienne du Fe(III) couplée à une production de protons ou d'acides organiques peut conduire à:

- **une déstabilisation de la structure cristalline initiale des minéraux argileux,**
- **une modification des paramètres de transport, notamment de diffusion au sein de la porosité,**
- **un changement du comportement mécanique de la barrière argileuse avec des phénomènes de gonflement/rétraction du milieu argileux poreux (simulé et quantifié dans le cas du GIH-nontronite).**

Ces données, seulement qualitatives à ce jour, montrent la dynamique des processus bactériens ferriréducteurs à l'échelle d'un milieu poreux. Les résultats des paramètres de transport ou sur le gonflement/rétraction du GIH-nontronite sont décrits en annexe 1 et 2 de ce mémoire.

Dans le cas du stockage géologique profond, l'apport de sources d'énergies, comme l'hydrogène provenant du colis, au sein de la porosité argileuse, peut favoriser l'activité enzymatique bactérienne et entraîner des processus de réduction du Fe(III) structural des minéraux argileux ferrifères. Un schéma général décrit cette activité bactérienne hydrogènotrophe et ses possibles impacts (Figure 63). Dans un milieu poreux naturel, tel que dans les argilites, la représentativité de ces résultats dépend des quantités de phases réactives ferrifères présentes pour supporter une activité bactérienne ainsi que de l'accessibilité des éléments cibles dans un milieu argileux hétérogène. Dans une configuration plus réaliste que les GIH-nontronite, certaines phases ou conditions physiques pourraient ainsi contrôler ce mécanisme de réduction à distance et limiter ce processus microbien. Ainsi, il serait indispensable d'étudier la dynamique de ce système dans un milieu complexe, plus réaliste des phases présentes. De plus, il faudra tenir compte de l'important volume de minéraux carbonatés retrouvé dans les argilites, afin de déterminer l'influence microbienne sur la stabilité de ces phases et son impact sur le contrôle de la porosité du système.

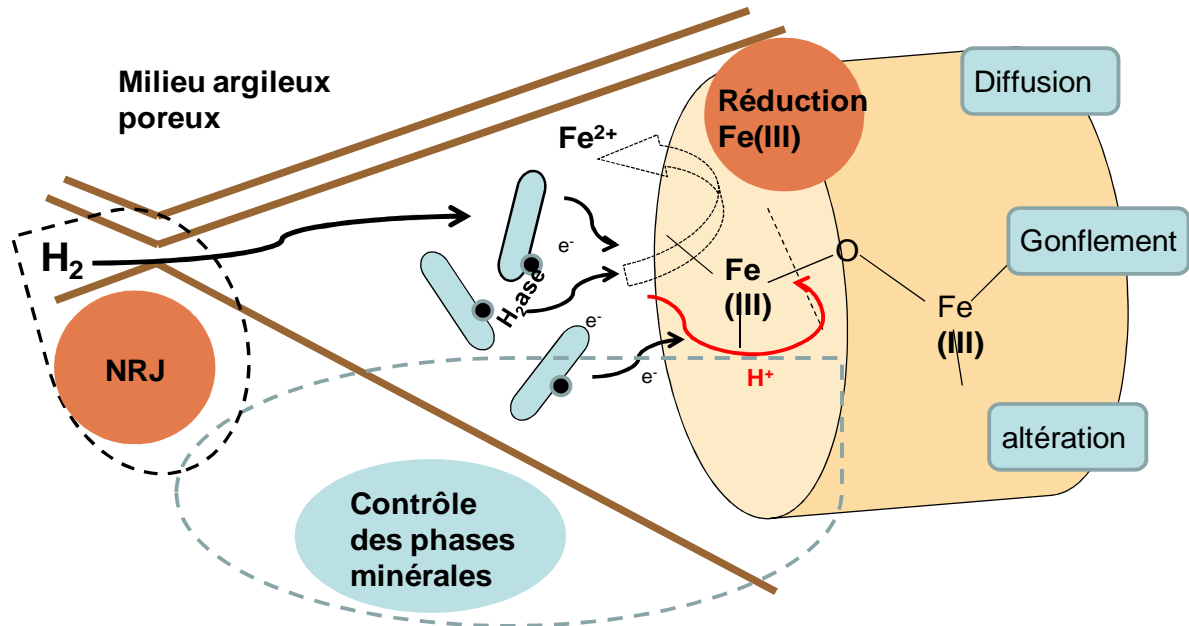


Figure 63: Schématisation du contrôle des phases minérales argileuses par les activités bactériennes hydrogénotrophes en milieu confiné poreux.

Afin de préciser les interactions microbiennes à l'échelle du stockage, la réactivité doit être caractérisée de façon globale. Le but étant de définir si les activités bactériennes sont viables en condition de stockage et de caractériser les couplages réactionnels du système : Fer-argile-bactéries. Cette problématique est l'objectif de la partie III de ce mémoire.

## **PARTIE III :**

# **CAPACITE DE DEVELOPPEMENT DES BACTERIES FERRI- REDUCTRICES EN CONDITIONS DE STOCKAGE GEOLOGIQUE**

---





# CHAPITRE VII : CONTROLE DE L'ACTIVITE FERRI-REDUCTRICE PAR LES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX

---

## 1. INFLUENCE DE L'ACTIVITE BACTERIENNE SUR LE SYSTEME COUPLE FER METAL - ARGILE

### 1.1. ROLE DE L'HYDROGENE SUR LE METABOLISME BACTERIEN

#### 1.1.1. *Hydrogène dans le stockage : Source énergétique pour la vie microbienne*

Que le concept de stockage prévoit l'emploi ou non d'une barrière ouvragée, la perturbation anthropique due au stockage des déchets radioactifs au sein des couches argileuses entraînera notamment, en phase réductrice saturée, une production importante d'hydrogène (corrosion du fer ou radiolyse de l'eau). En effet, une production significative d'H<sub>2</sub> est attendue par la dissociation radiolytique de l'eau au cours de la décroissance radioactive des radionucléides naturels U, Th, K (Lin et al., 2005a, Lin et al. 2005b). De même, des études ont estimé la production d'H<sub>2</sub> (principalement en raison de la corrosion anaérobie des colis et armatures métalliques) à environ 10<sup>6</sup> moles d'H<sub>2</sub> / alvéole pour le cas des colis HAVL (Andra, 2005).

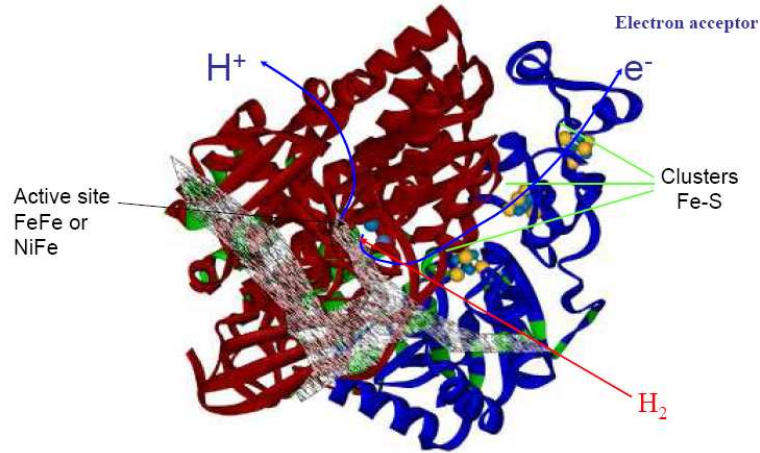
Du point de vue du vivant, l'hydrogène est reconnu comme l'un des substrats le plus énergétique pour les écosystèmes profonds, formant un lien entre le monde de la géologie et le monde biologique (Nealson et al., 2005). Une meilleure compréhension des sources d'énergies inorganiques utilisées par les systèmes microbiens dans les milieux géologiques profonds sera un analogue de la vie possible dans un stockage de déchets radioactifs. La plupart de ces environnements sont pauvres et/ou dépourvus de matière organique et par conséquent les bactéries ont mis en place des stratégies afin de récupérer de l'énergie aux travers de la fixation de carbone et d'H<sub>2</sub>, fournis par les processus géochimiques.

#### 1.1.2. *Métabolisme bactérien : Hydrogénase*

Les enzymes bactériennes hydrogénases catalysent la réaction réversible de l'oxydation de l'hydrogène moléculaire et jouent un rôle central dans le métabolisme énergétique des bactéries (Vignais et al., 2001). L'hydrogène intervient à la fois dans la synthèse de métabolites essentiels à la cellule (anabolisme) à travers la fixation du carbone et de l'azote et dans les réactions énergétiques du métabolisme par le transfert d'électrons lors de l'oxydation de l'hydrogène:  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ . La plupart des microorganismes capables de métaboliser l'H<sub>2</sub> appartiennent au groupe des procaryotes. En effet, au sein du monde des procaryotes, un grand nombre d'espèces ont la capacité, via l'activité de ces enzymes d'utiliser ou de produire de l'H<sub>2</sub> directement sans dépendre de carbone organique (Nealson et al., 2005).

La plupart des enzymes hydrogénases connues sont les protéines fer-soufre, avec deux atomes métalliques situés dans leur site actif, soit un Ni et un atome de Fe, hydrogénases

[NiFe] ou de deux atomes de fer, hydrogénases [FeFe] (Vignais and Billoud, 2007). Une chaîne hydrophobe est suggérée comme canal facilitant l'accès au gaz ( $H_2$ ) de la surface de la molécule jusqu'au site actif. Après oxydation de l' $H_2$ , et la formation d' $H^+$ , des clusters Fe-S permettent ensuite le transfert des électrons du site actif vers l'accepteur terminal d'électrons (Figure 64).



**Figure 64: Structure d'une hydrogénase indiquant les clusters Fe-S, le site actif de l' $H_2$  et la chaîne hydrophobe facilitant l'accès à l' $H_2$  (Volbeda et al. 1995).**

Dans la nature, l' $H_2$  est considéré pour plusieurs espèces bactériennes comme une source d'énergie dont le plus grand potentiel énergétique est fourni par l'oxydation de l' $H_2$  par l' $O_2$  en conditions extrêmes. Une application biologique à cette réaction a été observée dans les bassins d'entreposage de colis de déchets radioactifs, « piscines », où des communautés bactériennes autotrophes (*Ralstonia sp.* et *Burkholderia sp.*) étaient capables de se développer et de former des biofilms en présence  $H_2$  comme source énergétique (donneur d'électrons), d' $O_2$  comme accepteur terminal d'électrons et de  $CO_2$  comme source de carbone (Galès et al., 2004). L'oxydation de l' $H_2$  peut être réalisée dans les environnements oxydants aussi bien que dans les conditions réductrices. En effet, différentes réactions réductrices catalysées par les communautés bactériennes sont capables de consommer ou de produire de l' $H_2$ . Dans les environnements réducteurs composés de matière organique, les bactéries fermentaires, du genre *Clostridium*, sont capables de produire de l' $H_2$  et du  $CO_2$  par dégradation de molécules organiques résiduelles. La réduction de protons en hydrogène est une manière d'évacuer un excès d'équivalents réducteurs (Adams et al., 1980). D'autre part, de nombreux microorganismes utilisent l' $H_2$  comme donneurs d'électrons, de manière aérobie ou anaérobie. Ainsi, l' $H_2$  intervient dans la formation de méthane par les archéobactéries méthanogènes dans les sols et sédiments anoxiques (Conrad et al., 2006). Selon les conditions redox du milieu, une cascade de réactions microbiennes utilisant d'autres accepteurs d'électrons, tels que les sulfates, le  $Fe^{3+}$  et les nitrates, interviennent dans la consommation d' $H_2$  (Libert et al. 2010). La contribution de ces groupes variés dépend de la quantité des nutriments disponibles ainsi que de la présence des accepteurs d'électrons (Vignais and Billoud., 2007 ; Caumette 1992).

### 1.1.3. Réduction des matériaux du stockage profond : Couplage $H_2$ / Fe(III)

Comme démontré dans le chapitre précédent, les bactéries ferriréductrices sont capables d'accéder au Fe(III) structural des matériaux (argileux ou oxydes) à plus ou moins longue distance afin de pouvoir réaliser leur métabolisme de respiration par transfert d'électrons excédentaires au Fe(III).

Cependant, afin de se retrouver dans les conditions les plus proches possible d'un stockage géologique de déchets radioactifs, deux expériences (une en contexte de corrosion métallique et la seconde en condition volumique compartimentée) ont permis de mettre en évidence l'utilisation de l' $H_2$  (donneur d'électrons) comme substrat énergétique efficace pour la réduction du Fe(III) structural des matériaux représentatifs du stockage (magnétite et smectite). Le couplage  $H_2$ / Fe(III) sera le moteur potentiel du développement bactérien ferriréducteur au sein du stockage de part les propriétés énergétiques de la réaction d'oxydation de l' $H_2$  qui a un rendement plus favorable qu'en présence de matière organique (Libert et al., 2010) et d'accessibilité via la diffusion de l' $H_2$  dans la roche hôte argileuse (Tallandier, 2005). En plus d'un effet énergétique sur la biomasse microbienne, l'activité enzymatique de réduction du Fe(III) structural des matériaux entraîne une altération (réduction /dissolution) des phases minérales initiales ainsi que la néoformation de minéraux secondaires. Dans le cas des phases argileuses, nous avons vu au chapitre précédent, la disparition des phases minérales de type smectite en faveur de la formation de phase illitique ou de type serpentine (1 :1 phyllosilicate) qui ont des propriétés de confinement moins efficace. Dans le cas de la corrosion métallique l'apport d' $H_2$  permet aux activités des IRB d'altérer les couches de passivation formées par les oxydes de fer de type magnétite (chapitre 5) qui ont tendance à diminuer les vitesses de corrosion. On observe alors une reprise de la corrosion (mécanisme indirect) et la formation de sidérite comme minéral ferreux secondaire et majoritaire qui est connu pour avoir des propriétés moins passivantes (Papillon et al., 2003). Ainsi dans les milieux pauvres énergétiquement tels que les milieux argileux profonds, l' $H_2$  permet de fournir l'énergie nécessaire aux microorganismes, dans notre cas ferriréducteurs, pour permettre une activité de réduction du Fe(III) des matériaux.

Cependant au sein du stockage en profondeur des colis de déchets radioactifs en milieu argileux, la réactivité globale du système sera la résultante d'une somme de réactions entre le fer métallique - l'eau du site - l'argilite et l'activité microbiologique sous un gradient thermique et de pression. Bien que l'activité microbiologique des espèces modèles étudiées (IRB) sur l'altération des matériaux du stockage (corrosion du fer ou altération des phases argileuses) soit démontrée, il est nécessaire de caractériser le potentiel catalyseur microbiologique dans un système intégré. En effet, au sein du système fer-argile, la réactivité est portée soit sur la corrosion aqueuse ( $Fe^0 + 2H^+ \rightarrow Fe^{2+} + H_2$ ) soit sur la corrosion argileuse ( $Fe^0 + 2Fe^{3+} \rightarrow 3Fe^{2+}$ ) via le Fe(III) structural des matériaux argileux, principalement de type smectite.

**Le contrôle biologique sur la réactivité fer-argile n'est pas connu et une hiérarchisation des phénomènes doit être précisée.**

Plusieurs conséquences sont à déterminer :

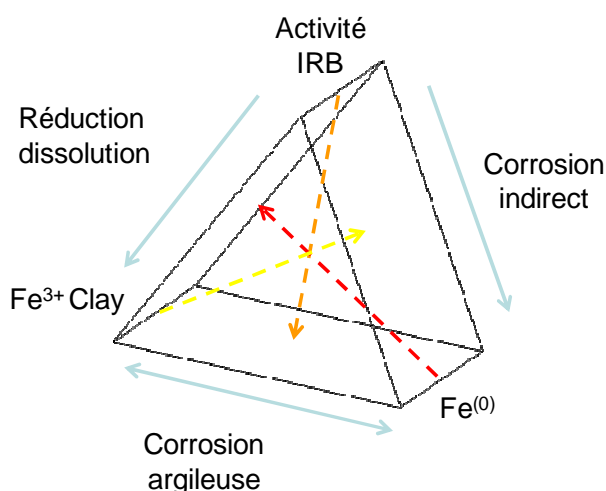
- **Impact positif ou négatif sur les cinétiques réactionnelles**
- **Inhibition possible des processus réactionnels.**

## 1.2. DETERMINATION DES PARAMETRES D'INFLUENCE

Afin de comprendre l'influence bactérienne sur la réactivité globale du stockage, il est nécessaire dans un premier temps de discrétiser la réaction globale en réaction simplifiée :



La réactivité des éléments présents  $\text{Fe}^{(0)}$ ,  $\text{Fe}^{3+}\text{Argile}$  ainsi que l'équilibre des phases telles que  $\text{Fe}^{(0)}$  par rapport à la magnétite,  $\text{Fe}^{3+}\text{Argile}$  par rapport au  $\text{Fe}^{2+}\text{Argile}$  contrôlera la réactivité microbiologique dans le système. Ainsi, l'activité bactérienne sera dépendante des conditions physico-chimiques du milieu réactionnel (pH et redox), des éléments nutritifs et toxiques disponibles ainsi que de la présence ou non de substrat pour son métabolisme (donneur d'électrons et accepteur d'électrons). La réactivité globale sera donc la résultante d'un équilibre entre chaque réactivité indépendante des constituants Organo - Minéral - Métallique, contrôlée par des activations et des inhibitions réactionnelles. La figure 65 représente de façon schématique le système étudié.



**Figure 65: Réaction dans un contexte Organo - Minéral - Métallique: activation/inhibition**

La difficulté de ce système est de pouvoir identifier les paramètres pouvant différencier chaque système réactionnel les uns par rapport aux autres et de comprendre les contrôles induits par chaque pôle.

Le Fer est un élément central de la réactivité mais est un mauvais traceur pour distinguer la part intégrante de chaque réaction. En effet, les propriétés du  $\text{Fe}^{2+}$  qui, mis en solution, réagit très vite avec les espèces chimiques présentes (mise à l'équilibre avec les phases minérales) à ces gammes de pH (entre 7 et 9) et dans des conditions favorisant les équilibres (pas de transport), masque d'autant plus l'altération globale et donc l'influence biologique sur le système fer – argile.

A l'inverse, la mesure de la production d' $\text{H}_2$  lors de la corrosion (aqueuse, argileuse et biologique) peut être suffisamment précise (analyse  $\text{H}_2$  gaz à faible pression ( $10^{-2}$  Pa) et significative (consommation d' $\text{H}_2$  bactérienne faible par rapport à l' $\text{H}_2$  de corrosion produit et non réactif avec les espèces en solution) pour distinguer la part altérante de chaque pôle

réactionnel. Ainsi la réactivité globale de ce système va être déterminée à travers ces 2 traceurs :  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{H}_2$  au cours d'expérimentations.

Afin de déterminer l'influence microbienne sur la réactivité couplée fer métal – argile, 3 types de processus seront investigués via une approche expérimentale. :

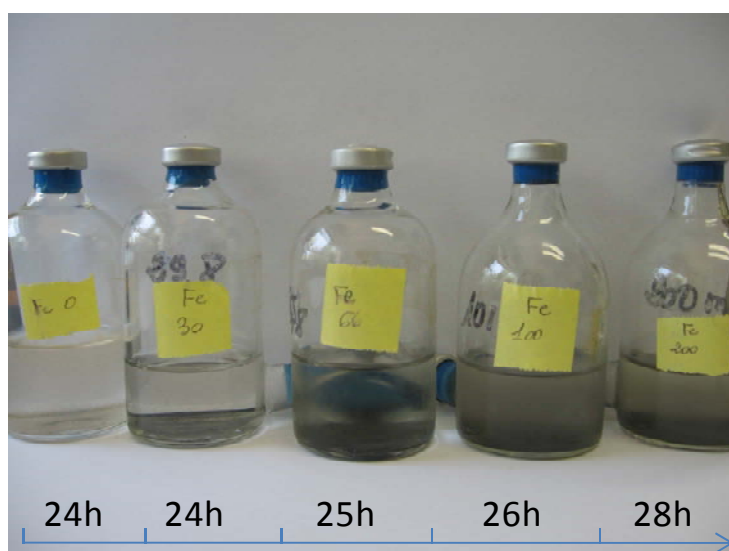
- **Détermination de l'effet du fer métal dans la bio-réduction d'un sel ferrique**
- **Impact du fer métal dans la bio-réduction du Fe(III) structural des smectites**
- **Validation de l'impact de l'activité ferri-réductrice sur la réaction couplée fer métal -argile**

Par souci de clarté les conditions expérimentales sont ici détaillées pour chacune des expériences.

### 1.2.1. Respiration du $\text{Fe}^{3+}$ en solution en présence de fer métallique

Le but de cette 1<sup>ère</sup> expérience est de déterminer l'effet du fer métal dans la bio-réduction d'un sel ferrique d'un point de vue purement qualitatif.

**Protocole :** 20 mM de citrate de Fe(III) sont ajoutés au milieu MClay (40ml volume final) et introduit dans des réacteurs, en présence d'une quantité croissante en Fe(0) (0mg, 30mg, 66mg, 100mg et 200mg) dans les réacteurs. Un inoculum bactérien de *Shewanella* sp (4% V/V) est ajouté au milieu d'expérience en présence de 10mM de lactate comme donneur d'électrons. Les réacteurs sont balayés par un mélange de gaz ( $\text{N}_2$  90%,  $\text{CO}_2$  10%) et placés à 37°C à l'obscurité dans une étuve. Les expériences ont été répliquées trois fois. Les échantillons sont observés au cours du temps afin de déterminer l'évolution de la réduction du Fe(III) citrate.



**Figure 66 : Réduction du Fe(III)-citrate en présence de  $\text{Fe}^{(0)}$  par *Shewanella* sp. Les valeurs de temps de réduction décrites sont des moyennes des 3 répliquas réalisés.**

Dans les réacteurs (Figure 66), la réduction du Fe(III)-citrate est observée par un phénomène de décoloration du milieu : orange ( $\text{Fe}^{3+}$ ) à incolore ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en passant par un stade intermédiaire vert (mélange  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ). On observe quelque soit la concentration en  $\text{Fe}^{(0)}$  présent, la bio-réduction du Fe(III)-citrate. Des expériences témoins sans bactéries, ne montrent pas de réduction du Fe(III)-citrate, le milieu reste orangé en fin d'expérience (30h). Au temps plus long le  $\text{Fe}^{(0)}$  va tamponner le rédox du système aqueux et une réduction chimique pourrait intervenir. Cependant, la réduction du Fe(III) citrate semble plus lente

lorsque la concentration en  $Fe^{(0)}$  augmente. Bien que la corrosion aqueuse du  $Fe^{(0)}$  semble ralentir la réduction du  $Fe(III)$ -citrate, les écarts mesurés sont très faibles.

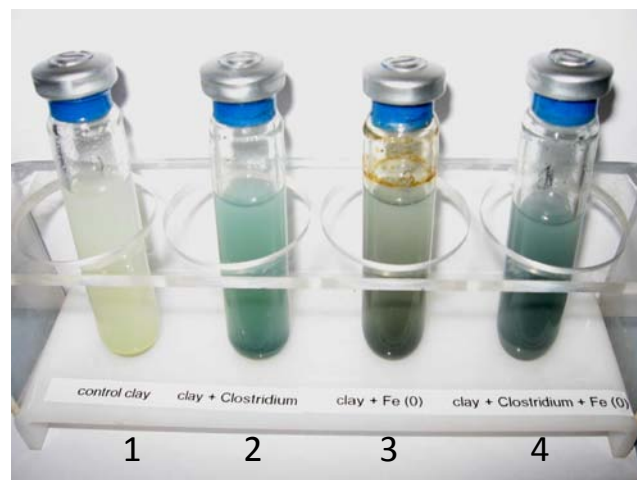
En conclusion, les bactéries ferriréductrices peuvent réduire le  $Fe(III)$  en solution en contexte de corrosion aqueuse (présence de  $Fe^{(0)}$ ). Cependant peuvent-elles accéder au  $Fe(III)$  structural d'un minéral lorsqu'il est en présence de  $Fe^{(0)}$  (état dispersé, mélangé favorisant la réactivité  $Fe^{(0)}$  – argile) ?

### 1.2.2. Impact du fer métal dans la bio-réduction du $Fe(III)$ structural des smectites

**Protocole :** Le milieu d'expérience MClay est composé d'un milieu minimum et de 5g/l de glucose. Quatre expériences ont été réalisées

- 1. une expérience témoin abiotique contenant 100mg de smectite dans 15ml de solution MClay,
- 2. une expérience biotique contenant 100mg de smectite dans 15ml de solution MClay en présence de 4% V/V d'inoculum bactérien de l'espèce *Clostridium aurantibutyricum*,
- 3. une expérience abiotique contenant 100mg de smectite et 100mg de  $Fe^{(0)}$  dans 15ml de solution MClay et
- 4. une expérience biotique contenant 100mg de smectite et 100mg de  $Fe^{(0)}$  dans 15ml de solution MClay en présence de 4% V/V d'inoculum bactérien de l'espèce *Clostridium aurantibutyricum*.

### Résultats :



**Figure 67 : Batch représentant l'activité microbienne de réduction du  $Fe(III)$  en contexte fer-argile.**

Les résultats (Figure 67) montrent le changement de couleur de jaune (smectite  $Fe^{3+}$ ) à vert (smectite  $Fe^{2+}$ ) que l'on observe dans les deux expériences biotiques (2 et 4) que ce soit en présence ou en absence de  $Fe^{(0)}$ . Ainsi le  $Fe(III)$  structural des matériaux argileux, ici la beidellite de Ward's, en présence de fer métallique est accessible pour les bactéries ferri-

réductrices. Dans l'expérience 3 abiotique en présence de Fe<sup>(0)</sup>, la couleur verte de réduction de la smectite n'est pas visible.

Il est important par ailleurs de décrire, l'activité métabolique associée au processus de bioréduction pour démontrer l'impact microbiologique direct sur la réduction du Fe(III) structural.

Pour ce faire on suit la fermentation bactérienne via la consommation de glucose (Figure 68) :

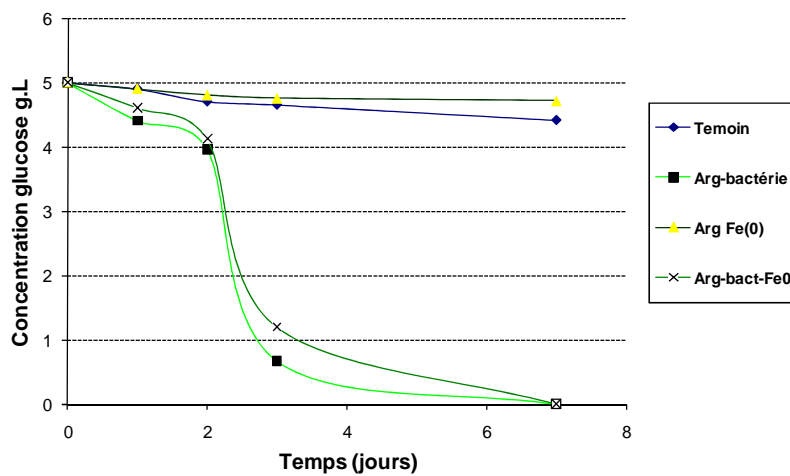


Figure 68 : Consommation de glucose au cours de la réduction du Fe(III) de la smectite.

Dans les expériences biotiques en présence de Fe(0), la consommation du glucose est équivalente à celle des expériences sans Fe(0). Nous confirmons donc, qu'il n'y a pas d'inhibition de l'activité microbienne par le fer métal.

Echantillons	Concentrations des métaux en solution (ppm).		
	Si	Al	Fe
1	8,1	0,05	0,90
2	44,2	1,19	35,80
3	5,3	0,59	11,39
4	4,7	1,99	664,18
Milieu	0,0	0,0	0,0

Figure 69 : Suivi de la concentration chimique en solution des éléments structuraux de la smectite au cours des altérations bactériennes en condition de réactivité Fe/argile.

L'activité bactérienne, visualisée par les échantillons 2 et 4, entraîne une réduction du Fe(III) structural qui entraîne une altération (échantillon 2) de la smectite qui peut être tracée par la mise en solution d'éléments structuraux tels que le Si, l'Al et le Fe dont les concentrations sont supérieures aux concentrations retrouvées chez les témoins abiotiques, en présence de Fe(0) ou non (échantillons 1 et 3)(Figure 69). D'autre part, la présence de bactéries ferriréductrices dans le système fer métal / argile entraîne une altération importante



des phases présentes notamment une forte dissolution du fer. L'activité bactérienne semble avoir un impact direct à la fois sur la smectite que sur le fer métallique.

**Grâce à ces expériences, du point de vue chimique ou métabolique, nous démontrons que la présence de fer métal n'inhibe pas la bio-réduction du Fe(III) structural des smectites. L'activité bactérienne pourrait aussi avoir un impact sur la réactivité globale du système fer / Argile.**

### 1.2.3. Validation de l'impact de l'activité ferri-réductrice sur la réaction couplée fer métal - argile

Le but de cette 3<sup>ème</sup> expérience est de distinguer indépendamment les processus réactionnels des oxydants (aqueux, argileux et bactérien) sur la corrosion des métaux : Analyse **du traceur H<sub>2</sub>** de corrosion.

**Protocole :** Trois expériences sont réalisées en réacteur batch, sous agitation, dans un bain marie à 40°C :

- - Une expérience de corrosion aqueuse (1) contenant 200mg Fe(0) dans 40ml de solution MClay.
- - Une expérience de corrosion argileuse (2) contenant 200mg de montmorillonite MX80, et introduit en présence de 200mg Fe(0) dans 40ml de solution MClay (pH 7).
- - Une expérience de corrosion biotique en milieu argileux contenant 200mg de montmorillonite MX80, 200mg Fe(0) dans 40ml de solution MClay en présence de 4% (V/V) d'un inoculum bactérien : *Shewanella oneidensis* MR1.

### Résultats

Les résultats représentés en figure 70, correspondent aux 3 expériences de corrosion.

- La courbe bleue correspond à la courbe de production d'H<sub>2</sub> durant la corrosion aqueuse.
- La courbe verte correspond à la somme corrosion aqueuse + corrosion argileuse pour la production d'H<sub>2</sub>.
- La courbe rose correspond à la production d'H<sub>2</sub> (somme de la corrosion aqueuse + argileuse + influence biologique).

On observe une hiérarchie entre les expériences dans la quantité d'H<sub>2</sub> produite. Elle semble être proportionnelle au nombre d'oxydants dans le système aqueux suivant:

Classements des expériences les plus corrodantes vis-à-vis du Fe(0):

**Expérience bactérie/Fer/argile > Expérience Fer/argile > Expérience Fer,**

Au départ, la corrosion aqueuse (courbe bleue) est la réaction dominante pour les 3 expériences (entre 0 et 150h), puis on observe une rupture de pente pour les deux autres expériences en présence d'argile où la production d'H<sub>2</sub> augmente, cela correspond à la partie corrosion argileuse. En effet lors de la 1<sup>ère</sup> partie de corrosion, le pH augmente et les produits secondaires se forment vers 150-200h (voir expérience 2 et partie biocorrosion) ce

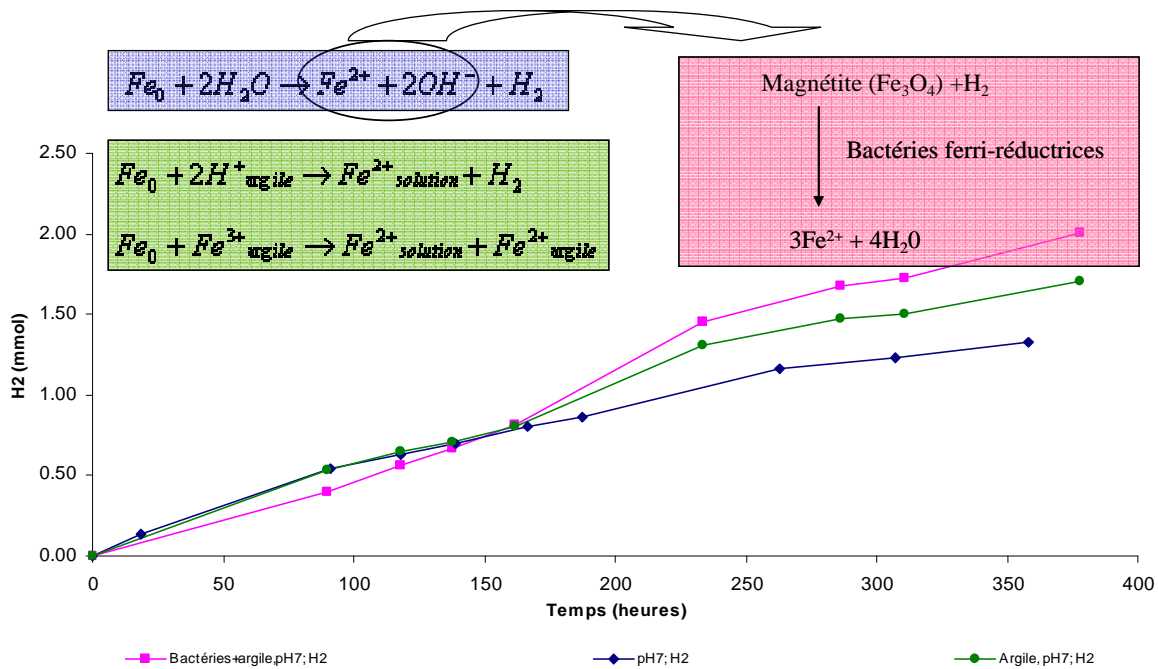
qui diminue la quantité d'oxydant ( $H^+$ ) de l'eau ainsi que la surface minérale attaquable par ces oxydants.

Cependant, en présence d'argile la corrosion semble augmenter au moment où la concentration d'oxydants aqueux diminue. La corrosion argileuse via le  $Fe^{3+}$  devient ainsi significative et poursuit l'augmentation de la corrosion du métal.

De même, en présence de bactéries, on observe une augmentation plus forte de la concentration en  $H_2$  dans le ciel gazeux. L'impact bactérien de biocorrosion indirecte observé dans le chapitre 4 (partie 1.2), est retrouvé ici. Contrairement à l'étude précédente de biocorrosion, aucun ajout d'un nouveau inoculum bactérien au cours de l'expérience n'a été réalisé, et pourtant en fin d'expérience, on observe des bactéries vivantes et une activité ferri-réductrice viable (observation d'une activité bactérienne ferri-réductrice après réensemencement dans un milieu contenant du citrate de  $Fe^{3+}$ )

Ainsi on peut émettre l'hypothèse que les bactéries ferriréductrices ont pu survivre en milieu argileux via le  $Fe^{3+}$  de la smectite et ensuite entrainer une altération des produits secondaires de la corrosion du fer métallique (magnétite) et favoriser la corrosion de façon indirecte.

**En milieu Organo - Minéral - Métallique, on observe une synergie des réactions : aqueuse, argileuse et microbienne, sur la corrosion métallique.**



**Figure 70: Influence des oxydants (biologique, chimique et argileux) sur les processus de corrosion métallique.**

En conclusion, l'activité bactérienne a été observée et mesurée en milieu fer/argile et semble significative au regard des autres réactions. L'argile sert à la fois de substrat, niche écologique nutritif et énergétique, au monde microbien. Ceci a pour conséquence de permettre aux activités ferriréductrices de se développer et d'altérer les phases minérales contrôlant la corrosion des métaux. Un effet synergique réactionnel apparaît dans le système, augmentant ainsi la réactivité globale du système fer/argile et donc sa vulnérabilité et son altérabilité.

Bien que l'influence bactérienne sur la réactivité des matériaux ait été démontrée en conditions Fe/argile, la complexité de ce système ne permet pas de déterminer l'influence des réactions sur les processus de contrôle microbiologique.

Afin de valider le modèle bactérien IRB hydrogénotrophe dans les environnements profonds réducteurs tel que le stockage géologique de déchets radioactifs, il est nécessaire de déterminer les limites fonctionnelles des activités bactériennes au travers d'études de sensibilité que ce soit sur les paramètres : Fe, H<sub>2</sub>, Température et Pression.

## 2. INFLUENCE DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LA BIOREDUCTION DU FE(III) STRUCTURAL

### 2.1. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Au sein du stockage, les colis de déchets radioactifs seront au contact de la barrière argileuse naturelle, l'argilite. Une importante source de rayonnements ionisants avec dégagement de chaleur va être émise par la radioactivité des colis de déchets dans le champ proche du stockage entraînant une élévation de la température moyenne avec un maximum de 90°C (pic thermique) à l'interface chemisage/argilite (exigence de sûreté retenue dans le stockage, ANDRA, 2005). Les modèles actuels sur l'évolution thermique des conditions du stockage prédisent une baisse de la température avec une stabilisation autour de 45-50°C obtenue après 1000 ans au sein du module des déchets C. Ces conditions de température doivent être prises en compte concernant le potentiel d'activité du modèle bactérien ferriréducteur utilisé dans notre étude. La réduction bactérienne du Fe(III) structural des matériaux ferrifères (argiles et oxydes) par des bactéries hydrogénotrophes mésophiles (20-40°C), *Shewanella oneidensis* MR1 a été démontrée au cours de cette étude (chapitre 3). Afin de déterminer la viabilité de l'activité bactérienne de réduction du Fe(III) structural des matériaux à haute température, des expériences en présence de bactéries hydrogénotrophes thermophiles (50-80°C), *Thermotoga subterranea*, ont été investiguées en présence d'argile de type smectite (beidellite ferrifère) et en présence d'argilite de Tournemire.

Les conditions d'expérimentation sont les mêmes que pour les expériences avec la bactérie mésophile *Shewanella oneidensis* MR1.

**Protocole :** Dans les réacteurs sont introduits : 200mg d'argile (smectite ou argilite de Tournemire), 100ml de solution MClay supplémenté en peptone (1g/l) comme substrat carboné (pas d'utilisation de carbone inorganique CO<sub>2</sub> pour la synthèse bactérienne pour *Thermotoga sp*), inoculum bactérien (4%V/V), atmosphère du réacteur conditionné par un barbotage d'un mélange de gaz : N<sub>2</sub> 30% CO<sub>2</sub> 10% H<sub>2</sub> 60%. Les réacteurs sont ensuite placés dans une étuve à la température d'expérience de 60°C et à l'obscurité. Des témoins abiotiques en présence ou en absence d'H<sub>2</sub> ont été réalisés.

### Résultats :

a) Réduction du Fe(III) de la smectite par *Thermotoga subterranea*



Figure 71: Bio-réduction du Fe(III) de la smectite à 60°C par *Thermotoga subterranea*

La réduction du Fe(III) structural de la smectite est clairement observée après 10 jours d'expérience sur les photos présentées ci-dessus (Figure 71).

b) Réduction/dissolution du Fe de l'argilite de Tournemire

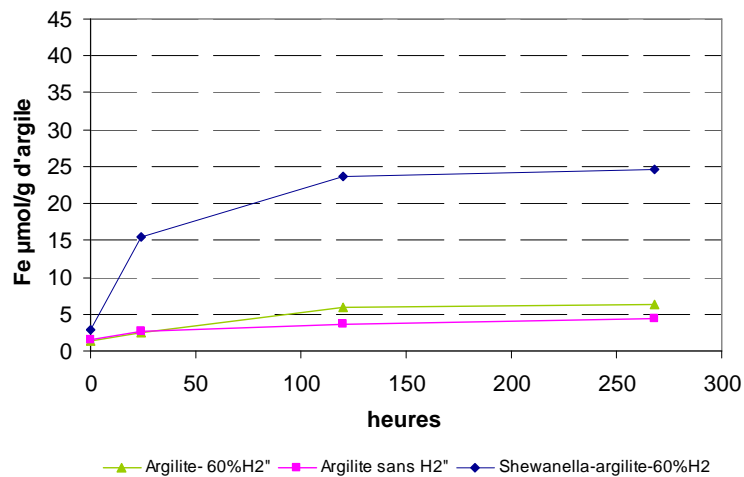


Figure 72 : Augmentation de la dissolution du Fe structural de l'argilite en présence de bactéries ferriréductrices thermophiles.

Ces résultats montrent l'accessibilité du Fe(III) structural des nontronites et des argilites pour les réductions bactériennes à plus haute température (60°C) (Figure 72).

**La température (60°C) ne sera donc pas un facteur limitant pour ce processus fonctionnel et par conséquent pour le développement bactérien de souche en stockage profond.**

## 2.2. INFLUENCE DE LA PRESSION

L'H<sub>2</sub> produit lors de la corrosion des colis peut entraîner une augmentation de la pression au sein des alvéoles de stockage (voir chapitre 2, partie 2). A partir des mesures de perméabilité au gaz (de 10<sup>-22</sup> m<sup>2</sup> à 10<sup>-20</sup> m<sup>2</sup>), la pression maximale atteinte au sein d'une alvéole de stockage serait de 83 bars (Talandier, 2005). Une expérience sous pression

croissance de gaz (N<sub>2</sub> 90% CO<sub>2</sub> 10%), en présence de la bactérie thermophile *Thermotoga subterranea* dans un milieu minimum standard (milieu DSMZ, numéro) à 60°C a été réalisée dans des réacteurs à pression contrôlée (Figure 73).



**Figure 73: Réacteur à haute pression : dispositif pour la mesure de la croissance bactérienne sous pression croissante (1 à 45 bars)**

Dans cette expérience, la viabilité bactérienne sous l'influence d'une pression de gaz croissante a été déterminée par des comptages bactériens (épi fluorescence, kit back-light) au cours du temps à des seuils de pression déterminés : 15bars, 30bars, 35bars, 40bars et 45bars. Après chaque prélèvement du milieu de culture, la pression du réacteur est à nouveau augmentée jusqu'au prochain palier de pression et les milieux expérimentaux sont à nouveau supplémentés en milieu de culture initial afin de ne pas atteindre un effet de carence nutritive sur la biomasse bactérienne. Un nouveau prélèvement est effectué après 3 heures à pression stabilisée pour déterminer la biomasse initiale à ce palier puis un second prélèvement est effectué quelques jours après afin de déterminer l'augmentation ou non de la biomasse. Une croissance bactérienne ( $\Delta$ croissance) en fonction de la pression est ainsi mesurée. Le tableau 20 récapitule les résultats.

Temps (jours)	0	19	32	56	72
Pression (bars)	15	30	35	40	45
$\Delta$ croissance Germes /ml	4,4E+06	2,1E+06	8,7E+06	5,8E+06	1,05E+06

**Tableau 20 : Détermination de la croissance bactérienne ( $\Delta$ croissance) au cours d'une augmentation des conditions de pression (15bars à 45 bars).**

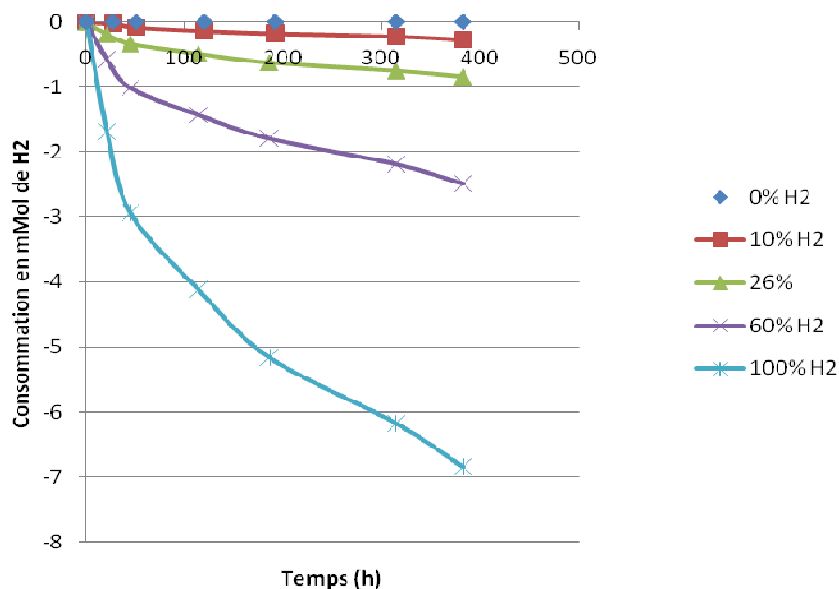
Ces résultats d'expériences à pression variable de gaz (1- 45 bars) n'ont montré aucune limite fonctionnelle pour le développement bactérien dans la gamme de pression étudiée. Le seuil d'activité de viabilité microbienne à forte pression n'a pas pu être déterminé. Cependant de nombreuses bactéries dites « barophiles » peuvent supporter des pressions très

importantes allant jusqu'à 100bars (yayanos, 1981, 2009). D'autre part, les bactéries ferriréductrices du genre *Shewanella* ont été identifiées dans des environnements marins profonds vivant dans des conditions de pression supérieures à 40bars (Kato et al., 1995 ; Ikegami et al., 2000).

**La pression dans les limites étudiées n'inhibe pas le processus de bio-réduction**

### 2.3. INFLUENCE DE $P_{H_2}$

Dans les environnements du stockage, l' $H_2$  sera le gaz dominant par rapport à l' $N_2$  et le  $CO_2$  qui seront des gaz résiduels dans les macroporosités (vide entre les matériaux du stockage) provenant de l'excavation des galeries du site argileux profond. Bien qu'utilisé comme substrat pour les bactéries hydrogénotrophes, l'hydrogène pourrait à forte concentration être inhibiteur des activités bactériennes. Des expériences à concentration croissante d' $H_2$  (différents mélanges de gaz utilisés : 0%, 10% 26% 60% et 100% d' $H_2$ ) en présence de la bactérie *Shewanella oneidensis* MR1 et d'argile de type smectite (beidellite ferrifère) ont été réalisées.



**Figure 74: Bio-consommation d' $H_2$  lors de la réduction du Fe(III) des smectites en fonction du temps**

Les résultats (Figure 74) montrent que la consommation d' $H_2$  par les bactéries est corrélée avec la quantité d' $H_2$  présent, c'est-à-dire que l' $H_2$  est considéré seulement comme un substrat et donc que l'activité bactérienne est dépendante de la concentration en  $H_2$ , jusqu'à la saturation de l'activité enzymatique. D'autre part l'altération de la smectite par réduction du Fe(III) est aussi plus importante lorsque la concentration en  $H_2$  est élevée. Les témoins (sans  $H_2$  ou avec  $H_2$ -sans bactéries) ne montrent pas de réduction de la smectite (Figure). Les résultats indiquent que plus la concentration en  $H_2$  augmente (1,17, 3,08, 7,48 et 21,11mM), plus la réduction est importante (verdissement très prononcé de la couleur de la smectite), avec respectivement 0.11, 0.84, 1.74 et 6.16 mmol/L de Fe réduit (Tableau 21). En présence de 100% d'hydrogène, le pourcentage de réduction de la smectite est très élevé (64.98%) comparé aux autres concentrations en hydrogène.

	Biotique (400h)					Abiotique
Concentration Hydrogène mmol/l	0,00	1,17	3,08	7,48	21,63	22,11
Concentration en fer réduit totale en mmol/L	0,083	0,111	0,843	1,744	6,163	0,07
% de réduction de la smectite	0.87 %	1.18 %	8.90 %	25.36 %	64.98 %	0.74 %

**Tableau 21 : Bilan de l'activité bactérienne ferri-réductrice : consommation d'H<sub>2</sub> disponible et réduction du Fe<sup>3+</sup> de la smectite. La concentration d'H<sub>2</sub> correspond à la fraction d'H<sub>2</sub> présent dans les réacteurs à la pression de l'expérience (~1,6bars).**

Ainsi, la vitesse de réduction du Fe(III) croît avec la concentration d'H<sub>2</sub>. En milieu profond, l'activité ferri-réductrice sera corrélée à la production et à la disponibilité de l'hydrogène (radiolyse de l'eau, corrosion et diffusion dans le milieu poreux).

Dans un écosystème anoxique, la consommation de l'H<sub>2</sub> peut être décrite selon le formalisme de Michaelis-Menten (Lovley and Goodwin, 1988)

$$V = V_{\max} \cdot [H_2] \cdot B / (K_m + [H_2])$$

Avec: V la vitesse de consommation de l'hydrogène

V<sub>max</sub> la vitesse de consommation de l'H<sub>2</sub> par unité de biomasse à saturation

[H<sub>2</sub>] la concentration en hydrogène dissous

K<sub>m</sub> la constante de Michaelis

Dans notre système la vitesse de consommation d'hydrogène est croissante plus sa concentration est élevée. Ceci s'explique par le fait que la concentration initiale d'hydrogène (substrat de l'enzyme hydrogénase) n'est pas assez élevée pour saturer tout les sites enzymatiques des hydrogénases bactériennes présentes dans le milieu.

Les bactéries, qui peuvent utiliser l'hydrogène comme donneurs d'électrons avec différents accepteurs d'électrons, contrôlent donc les teneurs en hydrogène dans les milieux anoxiques (Hoehler et al., 1998 ; 2001).

**En présence de bactéries hydrogénotrophes et indépendamment du substrat minéral ferrique présent (smectite ou Fe(III) citrate), la réduction bactérienne du Fe(III) est corrélée à la concentration en hydrogène présent.**

**Nous avons ainsi démontré que l'hydrogène joue un rôle moteur pour le développement bactérien en milieu réducteur profond et permet les activités biologiques altérantes sur les matériaux du stockage.**



### 3. IMPACT DU $Fe^{2+}$ SUR L'ACTIVITE MICROBIOLOGIQUE

Durant les processus de corrosion des matériaux métalliques, le fer sera l'élément majoritaire du stockage. En effet, selon les conditions physicochimiques et géochimiques du système, le fer sera soit sous forme aqueuse soit précipité sous forme de solide. Le  $Fe^{2+}$  est un ressource nutritive essentielle au développement bactérien. Sa concentration dans le stockage est un paramètre crucial pour la viabilité bactérienne. Il est ainsi capital de déterminer la disponibilité ainsi que la toxicité en  $Fe^{2+}$  pour définir les limites de viabilité du métabolisme bactérien.

#### 3.1. ACTIVITE BACTERIENNE SELON LA CONCENTRATION EN $Fe^{2+}$

##### 3.1.1. Notion de carence et de toxicité

Des expériences, utilisant des gènes rapporteurs (biosenseurs), ont été réalisées afin de déterminer les seuils de carence du fer pour l'activité cellulaire des bactéries.

##### Limite d'accessibilité au fer : Utilisation de biosenseurs bactériens

Les biosenseurs bactériens sont des bactéries modifiées génétiquement de manière à émettre un signal facilement mesurable (souvent de la bioluminescence) lors d'une exposition à un composé spécifique ou à de nouvelles conditions environnementales (Billard et DuBow, 1998; Riether et al., 2000). Lors de précédents travaux, différents biosenseurs bactériens luminescents ont été construits pour détecter des polluants métalliques tels le cadmium, le plomb, le cuivre (Riether et al., 2001) ou le phosphate (Dollard et Billard, 2003) dans des échantillons aqueux. L'intérêt de l'approche par rapport aux techniques physico-chimiques de quantification réside dans le fait que seule la fraction du polluant « absorbé » par la bactérie (biodisponible) est détectée (Fig. 75), le signal émis reflétant de façon directe l'effet du composé sur la cellule. Notamment, la réponse spécifique des bactéries à la carence en fer par production de sidérophores a récemment été mise à profit pour construire des biosenseurs bactériens fluorescents et caractériser la biodisponibilité du fer au niveau de la phyllosphère (Joyner et Lindow, 2000). L'observation *in situ* de bactéries marquées par des protéines fluorescentes (GFP, DsRed) constitue également une approche expérimentale prometteuse en écologie microbienne, déjà appliquée à l'étude de processus tels que la formation de biofilms, les interactions symbiotiques microorganismes-végétaux ou animaux. Il est désormais possible de suivre simultanément et en temps réel, divers aspects de la physiologie bactérienne par microscopie confocale et visualiser ainsi la perception qu'ont les cellules marquées de leur microenvironnement (Larrainzar, 2005).

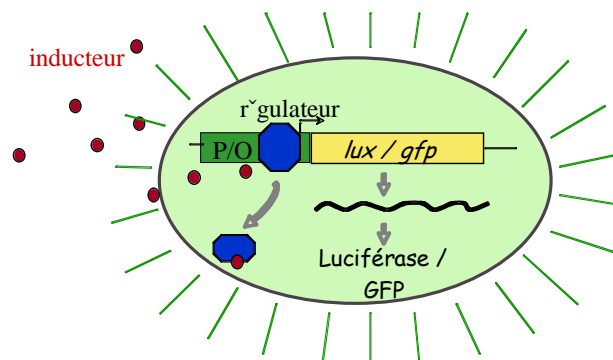
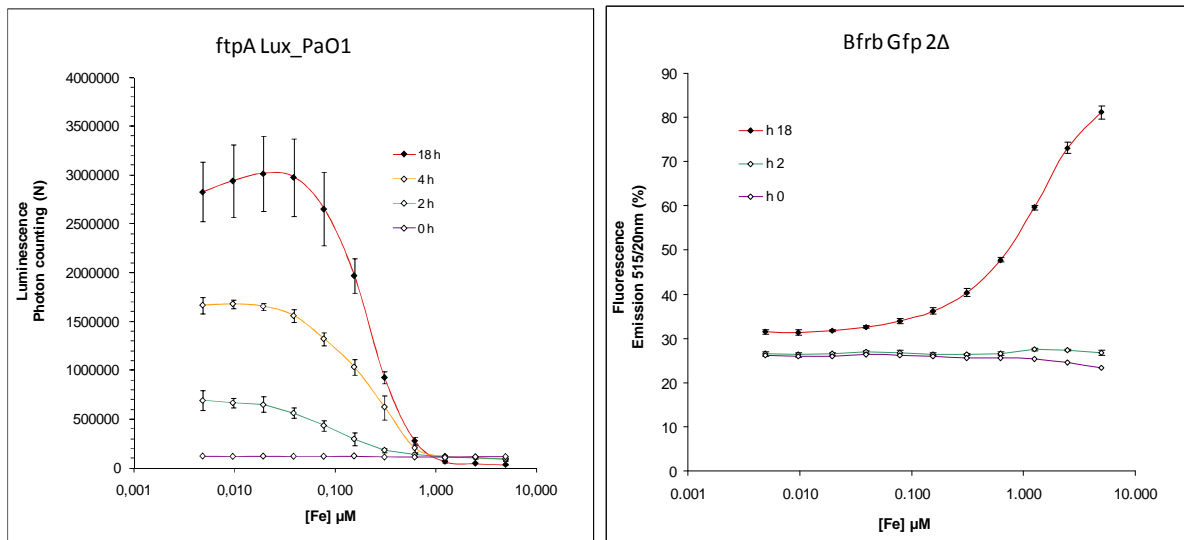


Figure 75: Principe de fonctionnement d'un biosenseur.



Le promoteur (P/O) d'un gène régulé par un composé spécifique (inducteur) est fusionné à un gène rapporteur (*lux/gfp*) codant une protéine facilement détectable (luciférase/GFP). La pénétration de l'inducteur dans la cellule déclenche l'expression de la fusion et aboutit à l'émission de lumière.

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi d'utiliser la souche *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 comme hôte pour le développement des biosenseurs bactériens. Cette bactérie ubiquiste est un saprophyte typique du sol. Le génome de cette souche modèle est totalement séquencé (Nelson et al., 2002), de nombreux gènes impliqués dans l'acquisition et le métabolisme des nutriments et les systèmes de détection et d'adaptation aux modifications environnementales ont été décrits (Dos Santos et al, 2003). Nous nous sommes focalisés sur la construction de biosenseurs bactériens du fer et avons testé leur capacité à décrire les seuils de biodisponibilité en fer pour la viabilité bactérienne. Ceci dans un but ultérieur de pouvoir comparer la biodisponibilité de cet élément métallique dans les argilites.



**Figure 76 : Mesure par luminométrie (*ftpA\_Lux*) et par fluométrie (*Bfrb Gfp 2Δ*) de l'expression des gènes rapporteurs résultant de la concentration en fer disponible pour les bactéries : limite biologique des milieux carencés en Fe.**

Ces résultats indiquent clairement que l'expression de *bfrB* est induite par une concentration en fer, tandis que celle de *ftpA* est induite en condition de carence en fer. Le contexte génétique (sauvage ou double mutant) n'influe pas l'expression de *bfrB* ou de *ftpA* (Figure 76). L'expression du gène *ftpA* permet d'indiquer une limite fonctionnelle selon la concentration en fer de la viabilité bactérienne, ici de PAO1.

Ainsi, l'état de carence bactérienne en Fe est observée lorsque la concentration en Fe est inférieure ou égale à 0.1  $\mu\text{M}$ . D'autre part le niveau de lever de carence (disparition d'un stade carencé) observé par l'expression du gène *ftpA* est observé entre 0,5 et 1 $\mu\text{M}$ . On retrouve la même gamme de concentration en fer pour l'expression du gène *Bfrb* mais l'induction du fer entraîne un signal moins sensible.

**Ces résultats permettent de déterminer un seuil de carence en Fe de 0.1 $\mu\text{M}$ .**

En extrapolant, cette valeur peut être généralisée à notre étude concernant le niveau de viabilité bactérienne en fer dans les environnements naturels. En effet, une concentration en fer de l'ordre de 0.5 à 1 $\mu$ M est une valeur facilement atteinte dans les eaux percolantes ou dès les premières étapes de réduction du Fe(III) structural des argiles (dissolution du fer dans le milieu). Ces conditions ne devraient pas favoriser un état de carence pour le monde microbien.

Limite d'activité réductrice du Fe(III) à forte concentration en Fe<sup>2+</sup>

Différents processus biogéochimiques peuvent entraîner une augmentation de la concentration en Fe<sup>2+</sup> en solution dans la configuration d'un système de stockage géologique des déchets radioactifs, tels que les processus de corrosion des matériaux métalliques, la dissolution des phases ferrifères de l'argilite ou encore la réduction du Fe(III) structural. L'évolution de l'état physique du Fe<sup>2+</sup> libéré en solution, c'est-à-dire de rester ou non en un état soluble, dépendra de son équilibre chimique avec les phases minérales du système. L'influence de la concentration en Fe<sup>2+</sup> sur la viabilité bactérienne peut jouer un rôle important dans les processus de contrôle de l'activité bactériologique en milieu de stockage profond.

Des expériences biotiques de réduction du Fe<sup>3+</sup>-citrate en présence de Fe<sup>2+</sup> à différentes concentrations (1, 10, 50, 100mM) ont été effectuées pendant 24 heures (temps nécessaire à la réduction totale du Fe<sup>3+</sup>-citrate dans l'expérience biotique témoin sans Fe<sup>2+</sup>) en présence H<sub>2</sub>, (60% V/V) à la pression de 1.6 MPa, comme seul donneur d'électrons pour les bactéries « *Shewanella oneidensis* MR1 » afin de déterminer le caractère toxique du Fe<sup>2+</sup> sur le développement de biomasse bactérienne. Le tableau 22, ci-dessous récapitule les résultats obtenus.

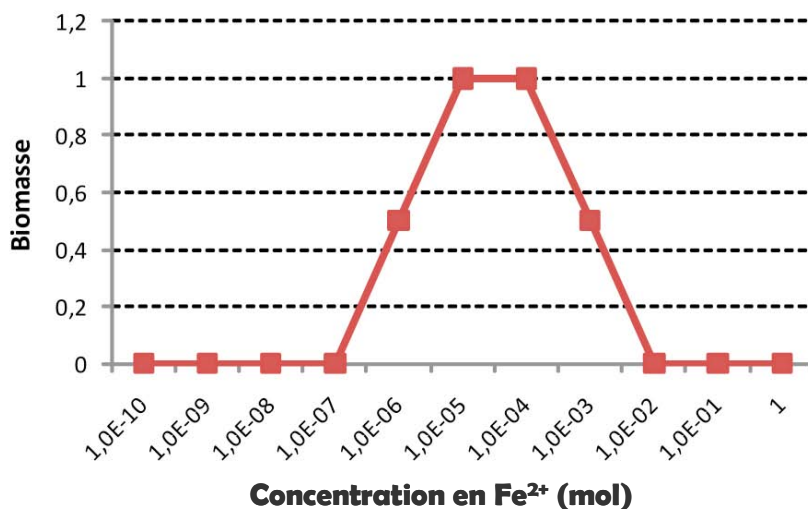
Concentration Fe (mM)	0	1	10	50	100
Fe <sup>3+</sup> réduit total	oui	oui	non	non	non
Consommation H <sub>2</sub> (mmol)	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Biomasse (cellules/ ml)	2.20E+08	1.80E+08	5.00E+07	non quantifiable	non quantifiable

**Tableau 22: Effet de la concentration en Fe<sup>2+</sup> sur l'activité et le développement des bactéries ferri-réductrices après 24h d'expérience. La consommation d'H<sub>2</sub> indiquée correspond à la moyenne de trois répliques. L'indication « non quantifiable » exprime le fait qu'aucune bactérie n'était viable.**

Ces expériences à concentration variable en Fe<sup>2+</sup> dans les réacteurs en présence de Fe(III)-citrate et de bactéries « IRB » ont montrées une baisse de la consommation de l'H<sub>2</sub> en fonction de la concentration en Fe<sup>2+</sup> croissante en solution. Ceci pouvant amener jusqu'à l'inhibition de la réduction biologique du Fe(III)-citrate ainsi que la viabilité cellulaire dans le système pour des concentrations en Fe<sup>2+</sup> supérieur à 10mM.

**Au vue de ces résultats, on peut proposer « une fenêtre d'activité bactérienne » en fonction de la concentration en Fe<sup>2+</sup> en solution (figure). Ainsi, l'activité ferriréductrice des bactéries est optimale entre 1 $\mu$ M et 500 $\mu$ M de fer disponible.**

La fenêtre de viabilité bactérienne peut être représentée en fonction de la concentration en Fe<sup>2+</sup> (Figure 77).

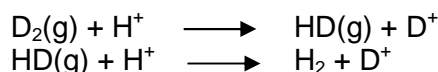


**Figure 77: Fenêtre d'activité microbiologique et de croissance bactérienne ferriréductrice hydrogénotrophe en fonction de la concentration en Fer en solution.**

Afin de comprendre l'influence du Fe<sup>2+</sup> sur les activités bactériennes et leurs consommations associées en H<sub>2</sub>, des expériences de mesure d'activité hydrogénase ont été réalisées en condition Fe(III)-citrate avec la bactérie *Shewanella oneidensis* MR1 en présence d'une concentration en Fe<sup>2+</sup> (mM) croissante.

### 3.1.2. Impact du Fe<sup>2+</sup> sur l'activité hydrogénase des bactéries ferriréductrices

Les expériences réalisées consistent à déterminer *in vivo* l'activité hydrogénase de *Shewanella oneidensis* MR1 par utilisation de deutérium, l'isotope lourd et stable de l'hydrogène en présence de Fe<sup>2+</sup> au cours de la réduction du Fe<sup>3+</sup>. En effet, la mesure de la consommation d'hydrogène par la bactérie est insuffisante pour déterminer une variation significative de l'activité bactérienne lorsque l'on veut déterminer les seuils limites d'une inhibition bactérienne. L'H<sub>2</sub> peut être fixé par différents produits réactionnels et réagir avec les phases présentes dans le système masquant ainsi les faibles variations de l'activité hydrogénase induite dans nos expériences. Contrairement, si on observe les produits de l'activité hydrogénase lors de l'utilisation de deutérium, l'isotope lourd et stable de l'hydrogène à travers l'échange isotopique proton-deutérium (H-D) dans lequel D<sub>2</sub> est quantitativement remplacé par HD puis H<sub>2</sub>, alors la sensibilité de la mesure d'activité de l'enzyme est améliorée. La signature de l'activité hydrogénase est portée par le coefficient de partage HD – H<sub>2</sub> selon les réactions :



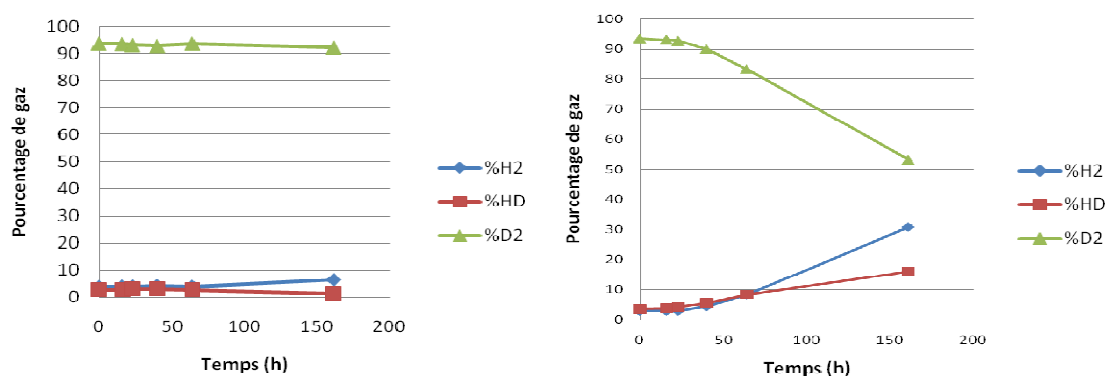
Cette méthode permet de déterminer le rôle porté par l'activité hydrogénase sur la consommation globale de l'hydrogène.

L'échange isotopique deutérium - hydrogène a été mesuré par spectrométrie de masse. Les calculs exprimant l'échange isotopique et la consommation des différents gaz ont été formalisés par Cournac et al., (2004), voir protocole (chapitre 1).

**Méthodes :** Les réacteurs expérimentaux comportent des expériences témoins abiotiques (Fe(III)-citrate 20mM + D<sub>2</sub>) ; des expériences biotiques (Fe(III)-citrate 20mM + D<sub>2</sub> + bactéries) ; des expériences biotiques à concentration croissante de Fe<sup>2+</sup> (Fe(III)-citrate 20mM + D<sub>2</sub> + bactéries + Fe<sup>2+</sup> 1, 2 et 3 mM). Trois réplicas de ces expériences ont été réalisés.

### Activité hydrogénase : biotique VS abiotique

L'échange est représenté par les % de H<sub>2</sub> et HD. L'échange a tendance à accélérer tout au long de l'expérience. L'exemple ci-dessous montre les pourcentages de gaz au cours du temps pour une expérience en présence de Fe(III)-citrate 20 mM (Figure 78). Dans le réacteur B, la diminution du pourcentage de D<sub>2</sub> ainsi que la production de H<sub>2</sub> et HD observable sur la figure 78 montrent bien qu'il y a eu un échange et donc une consommation par la bactérie de D<sub>2</sub>. Comparé au témoin (réacteur A), les résultats sont significatifs avec l'absence de consommation de D<sub>2</sub> et d'échange H<sub>2</sub> et HD.



**Figure 78: Représentation en pourcentage des échanges H<sub>2</sub>, HD et D<sub>2</sub> en fonction du temps lors de la consommation de D<sub>2</sub> dans les expériences de réduction du Fe(III) citrate. A) Réacteur Témoin ; B) En présence de la bactérie *Shewanella*.**

Les résultats de consommation de D<sub>2</sub> entre l'expérience biotique et abiotique sont significatifs et permettent d'observer la présence de l'activité l'hydrogénase tout au long de l'expérience. D'autre part, il ne semble pas y avoir de phénomènes d'inhibition de l'activité hydrogénase dans le cas présent : En effet, l'échange HD-H<sub>2</sub> augmente au cours de l'expérience avec une accélération visible de l'échange en fin de réaction. De même, la consommation du D<sub>2</sub> est linéaire, ce qui signifie que l'activité est linéaire.

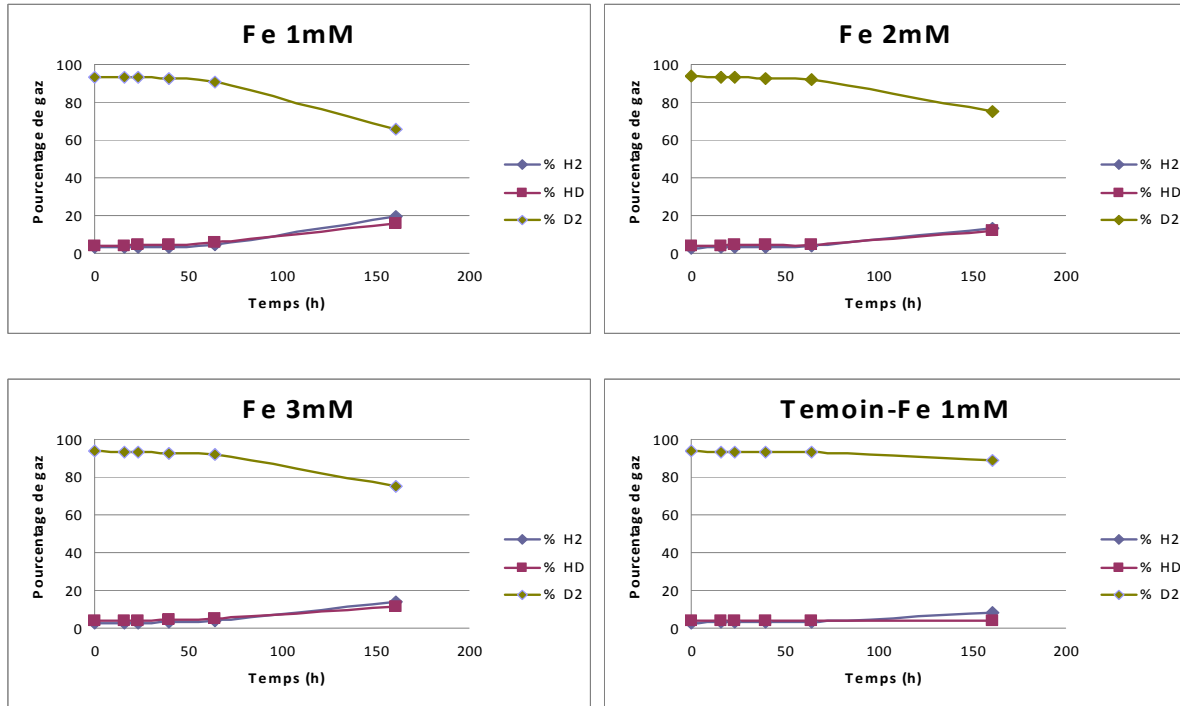
### Activité hydrogénase : Influence du Fe<sup>2+</sup> (mM)

Dans cette expérience de réduction du Fe(III) citrate par *Shewanella oneidensis* MR1, la présence de Fe<sup>2+</sup> (mM) montre une diminution de la consommation biologique de D<sub>2</sub> et de la production de l'échange HD-H<sub>2</sub> dans le réacteur comparé aux expériences biotiques précédentes sans Fe<sup>2+</sup> (Figure 79).

D'autre part, les témoins abiotiques contenant du Fe<sup>2+</sup> (Figure 79: Témoin 1mM de Fe<sup>2+</sup>) montrent une faible consommation de D<sub>2</sub> (~4%) comparée aux expériences biotiques (28%, 19% et 18,8% pour 1, 2 et 3mM de Fe<sup>2+</sup> respectivement), mais significative comparée au témoin abiotique sans Fe<sup>2+</sup> (consommation <1%). Ainsi, bien que le Fe<sup>2+</sup> en solution à une influence sur la consommation abiotique de D<sub>2</sub>, la mesure permet cependant de déterminer l'impact du Fe<sup>2+</sup> sur la consommation bactérienne.

Une hiérarchisation de la consommation de D<sub>2</sub> par l'activité microbienne et donc de l'activité hydrogénase peut être représentée selon la concentration en Fe<sup>2+</sup> :

**Fe (0mM) > Fe (1mM) > Fe (2mM) ≥ Fe (3mM).**



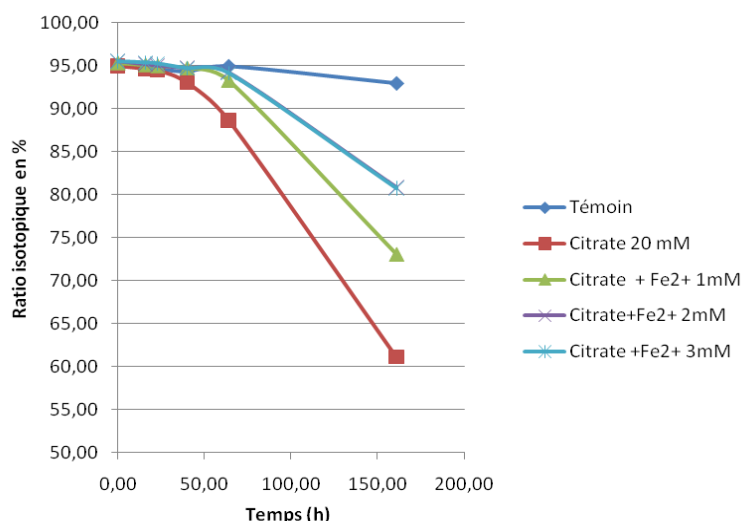
**Figure 79 : Représentation en pourcentage des échanges H<sub>2</sub>, HD et D<sub>2</sub> en fonction du temps lors de la consommation de D<sub>2</sub> dans les expériences de réduction du Fe(III) citrate en présence d'une concentration en Fe<sup>2+</sup> croissante. Un témoin abiotique en présence de 1mM de Fe<sup>2+</sup> est également représenté.**

Afin d'évaluer au mieux l'impact du Fe<sup>2+</sup> sur l'activité hydrogénase, l'utilisation de la variation du ratio isotopique ( $\tau$ ) de D dans le gaz en fonction du temps permet de quantifier l'activité de l'enzyme c'est-à-dire la transformation de D<sub>2</sub> en HD-H<sub>2</sub>.

Soit  $\tau$ , le ratio isotopique de D dans le gaz en pourcentage est calculé comme suit:

$$\tau = \frac{[D_2] + 0,5[HD]}{([D_2] + [HD] + [H_2])}$$

Le ratio isotopique de D dans le gaz en fonction du temps est exprimé dans la figure 80 ci-dessous.



**Figure 80 : Ratio isotopique ( $r$ ) de  $D_2$  en fonction du temps pour les différentes expériences biotiques de réduction du  $Fe(III)$ .**

Dans le cas d'un excès de  $Fe^{2+}$  (1, 2 ou 3 mM), une phase de retard de consommation de  $D_2$  est clairement observable par rapport aux conditions sans  $Fe^{2+}$ . Ensuite une adaptation des bactéries au milieu permet à la croissance bactérienne de démarrer en consommant du  $D_2$ .

La dérivée du ratio isotopique (la pente des courbes) est proportionnelle à la vitesse d'échange de l'enzyme et donc à l'activité hydrogénase. Cette valeur est utilisée afin de caractériser l'activité hydrogénase dans les expériences (Tableau 23).

Témoin	Citrate 20mM	Citrate+Fe <sup>2+</sup> 1mM	Citrate+Fe <sup>2+</sup> 2mM	Citrate+Fe <sup>2+</sup> 3mM
0.020	0.283	0.208	0,138	0,138

**Tableau 23: Vitesse d'échange de l'enzyme hydrogénase (quantité d'isotope de l'hydrogène /heure) en fonction de la quantité de  $Fe^{2+}$  présent : calculé via la pente des ratios isotopiques.**

Au vu des résultats, on observe une diminution de la vitesse d'échange  $D_2$ - $H_2$  et donc de l'activité hydrogénase, plus la concentration en  $Fe^{2+}$  augmente. Il est suggéré que la présence de  $Fe^{2+}$  de l'ordre de la mmol/l en solution entraîne une inhibition de l'activité hydrogénase bactérienne ferri-réductrice.

Ainsi, bien qu'il apporte une ressource nutritive pour favoriser la croissance bactérienne, la présence de  $Fe^{2+}$  à des concentrations élevées de l'ordre de 1-10 mM en solution, devient toxique pour l'activité bactérienne. Ce résultat indique une limitation fonctionnelle de l'activité altérante et réductrice des bactéries via une baisse de l'activité des hydrogénases.

**L'ajout de fer(II) dans le milieu semble donc modifier le mécanisme d'assimilation de l'hydrogène par la bactérie et l'activité hydrogénase. Il a donc un impact sur le développement microbien ainsi que le potentiel de bio-réduction des argiles.**

### **3.2. MECANISMES D'INHIBITION DES ACTIVITES BACTERIENNES FERRIREDUCTRICES DANS LE STOCKAGE**

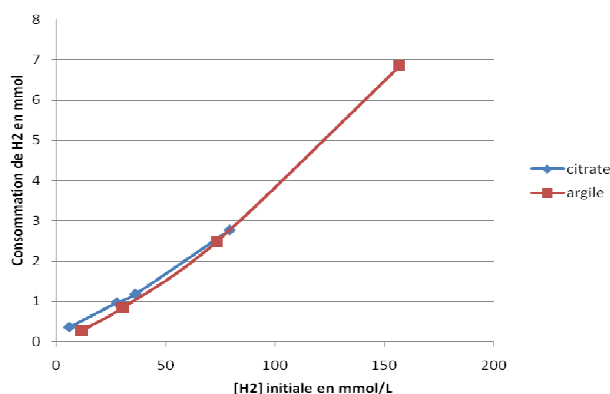
Ce paragraphe intègre les différents mécanismes d'inhibitions des activités bactériennes ferriréductrices lors de la réduction du Fe(III) structural des matériaux et discute de l'importance de ces contrôles géochimique/microbiologique sur l'impact des matériaux en conditions de stockage. En effet, lors de la réduction du Fe(III) structural des phases argileuses purifiées comme la smectite, un ralentissement de la réduction est observé jusqu'à la stopper sans que la réduction totale du Fe(III) soit effectuée. Ainsi différents processus inhibiteurs de l'activité bactérienne peuvent intervenir dans ce système tels que : la carence en substrat nutritif, l'accessibilité aux phases « accepteurs terminaux d'électrons » comme le Fe(III) et la toxicité des produits réactionnels ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou du métabolisme bactérien. Différents cas inhibiteurs sont discutés ci-dessous :

#### *Inhibition nutritive*

Contrairement à un milieu ouvert, où il y a un apport de nutriments constamment apportés par le fluide interstitiel, dans les expériences en batch au laboratoire, le système est fermé et les éléments nutritifs peuvent s'épuiser au cours du temps et entraîner des carences. Cependant cette hypothèse d'inhibition par épuisement des substrats n'est pas valable dans nos expériences, car tous les constituants principaux (C, P, S, N) sont en excès et encore présents en fin de réaction alors que la réduction du Fe(III) de la smectite n'est pas totale. Ainsi ce processus d'inhibition ne peut pas être retenu pour nos expériences réalisées en laboratoire.

#### *Limitation par la concentration en hydrogène*

D'après les résultats obtenus, l'hydrogène n'est pas inhibiteur de l'activité des bactéries ferriréductrices dans les concentrations étudiées, mais au contraire un catalyseur dépendant de sa concentration dans le milieu. La figure 81 montre clairement que la consommation d' $\text{H}_2$  est proportionnelle à la concentration en  $\text{H}_2$  dissous indépendamment des phases minérales ferrifères présentes. Pour des concentrations beaucoup plus élevées (cas attendu lors du stockage géologique des déchets radioactifs), une toxicité de l'hydrogène lui-même n'est pas encore décrite dans la littérature. L'hydrogène est considéré comme un substrat pour les microorganismes. A de plus forte concentration, l'hydrogène saturera les sites enzymatiques hydrogénase, ce qui fixera la vitesse maximale de la consommation bactérienne en hydrogène. Cependant une teneur élevée en hydrogène engendrera un rédox bas, ce qui dans ce cas, pourrait avoir des conséquences inhibitrices des activités bactériennes ferriréductrices.



**Figure 81: Consommation de l'hydrogène en fonction de sa concentration dans le milieu dans les expériences étudiées.**

### Le fer

Au cours de nos expériences bactéries-argile, différents phénomènes d'inhibition (physique et physiologique) dus à un excès de  $\text{Fe}^{2+}$  sont décrits :

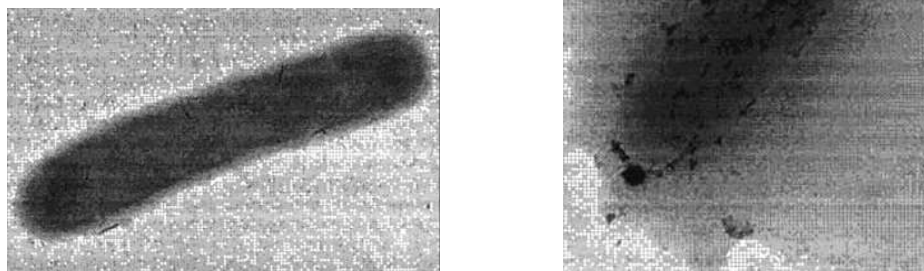
#### a. Inhibition physique : sorption du $\text{Fe}^{2+}$ sur l'argile

Une hypothèse de contrôle de l'activité ferri-réductrice est actuellement soutenue auprès de la communauté scientifique mettant en avant l'effet de sorption du  $\text{Fe}^{2+}$  sur les surfaces des matériaux bloquant ainsi les sites réactifs menant à l'accessibilité du  $\text{Fe(III)}$  structural ce qui expliquerait la diminution de la réduction du  $\text{Fe(III)}$  structural (Jaisy et al, 2007). Dans le cas des expériences sur argile, une réduction structurale partielle est observée avec une sorption de  $\text{Fe}^{2+}$  sur les surfaces des solides. La désorption par ajout d'acide faible permet de mesurer la part de  $\text{Fe}^{2+}$  fixée. Cette fixation est souvent relatée comme un paramètre inhibant l'activité de réduction bactérienne de part un manque d'accessibilité au  $\text{Fe(III)}$  structural. Cependant, nous avons pu mettre en évidence un mécanisme de réduction à distance du  $\text{Fe(III)}$  via des navettes transportant des électrons. Si ce processus existe, il reste limité, compte tenu de l'existence de navettes électroniques produites par certains métabolismes bactériens ferriréducteurs. Ainsi le phénomène de sorption du  $\text{Fe}^{2+}$  ne peut pas expliquer à lui tout seul, l'inhibition de l'activité de ferriréduction.

#### b. Inhibition physiologique : fixation membranaire du $\text{Fe}^{2+}$

Une inhibition bactérienne due à une accumulation des  $\text{Fe}^{2+}$  sur la membrane de la bactérie ou une pénétration du fer dans la bactérie est un paramètre possible et proposé par certains auteurs (Liu and Zachara, 2001). En effet, en présence de  $\text{Fe}^{2+}$  dans le milieu, des observations microscopiques (Figure 82) montrent la précipitation de fer (oxyde  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) aux niveaux des membranes bactériennes. La nature précise des composés fer n'est actuellement pas décrite dans la littérature.





**Figure 82: Images au microscope électronique d'une cellule en milieu citrate 20mM (photo à gauche) et d'une cellule en milieu citrate + préalablement mises en présence d'un excès de  $Fe^{2+}$  2mM (photo à droite), (Liu and Zachara, 2001)**

Le  $Fe^{2+}$  présent en solution de l'ordre millimolaire, dès le début de la réaction, peut se fixer sur les membranes, là où se trouvent les enzymes hydrogénases. D'après les résultats sur les activités hydrogénases, la présence de  $Fe^{2+}$  a un effet toxique immédiat visualisé par une inhibition de l'activité hydrogénase.

Ainsi, le mécanisme de fixation de ce  $Fe^{2+}$  sur les membranes pourrait partiellement bloquer le transfert des électrons membranaires et empêcher l'activité hydrogénase de fonctionner correctement.

Remarque : dans le cas des expériences en présence de Fe(III)-citrate, on ne retrouve pas d'effet d'inhibition des activités bactériennes. Le  $Fe^{2+}$  libéré en solution lors de la réduction bactérienne du Fe(III)-citrate est capté à son tour par le ligand citrate, ce qui atténue l'effet d'inhibition du  $Fe^{2+}$  attendu sur le métabolisme bactérien.

### c. Inhibition physiologique : Stress oxydant et homéostasie métallique

Le dernier mécanisme possible pourrait être la pénétration des ions  $Fe^{2+}$  dans le cytoplasme de la cellule à travers des canaux membranaires ou de l'internalisation de nanoparticules de Fe par les vésicules d'endocytose membranaires (Auffan, 2007). En effet, les oxydes métalliques ne sont pas stables en solution et vont subir des oxydations ou des réductions pouvant engendrer des mécanismes intrinsèques à la cellule en présence de ces composés oxydants et être responsables d'un stress oxydatif bactérien (Schoonen et al., 2006). Par définition, un stress oxydatif se produit lorsque les cellules ne contrôlent plus la présence excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Favier et al., 2003). Les ROS sont produits naturellement par des mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme, mais en présence d'agents toxiques, leur production devient excessive et les cellules vont devoir se protéger de cet excès par des systèmes antioxydants (Chaudière et al., 1999 ; Gardès-Albert et al., 2003). Les minéraux peuvent induire un stress oxydatif directement par la génération de ROS (relargage d'ions en solution, présence de défaut cristallin en surface, réactions redox se produisant à la surface...) ou indirectement (par l'oxydation de molécules organiques dans le milieu cellulaire) (Schoonen et al., 2006). La réaction de Fenton par exemple qui correspond à l'oxydation de l'ion ferreux ( $Fe^{2+}$ ) en ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et qui produit des radicaux libres impliqués dans le stress oxydant :  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^\bullet + OH^-$  pourrait être à l'origine d'une inhibition (Jaisi et al. 2007). D'autre part des auteurs émettent l'hypothèse de la génération de ROS lors de la réduction ou d'oxydation des atomes de surface à base de Fe qui peuvent générer le peroxyde d'hydrogène et du  $Fe^{2+}$  (Auffan, 2007). Par ailleurs, l'ion superoxyde et le peroxyde

d'hydrogène peuvent oxyder les clusters Fe-S et inactiver les enzymes dépendantes de ces groupes fonctionnels tels que les hydrogénases. Ainsi l'inhibition de l'activité hydrogénase serait due à une conséquence d'un effet physiologique, le stress oxydant lié à l'homéostasie métallique, ici le Fe.

d. Situation en stockage

Bien qu'en conditions de stockage les paramètres pouvant influencer le développement bactérien soient nombreux (pH, [H<sub>2</sub>], [fer]), la réduction du Fe(III) par les bactéries est démontrée ici comme étant possible en formations géologiques profondes. Cette réduction du Fe(III) entraîne inévitablement l'altération et la dégradation des matériaux ferrifères présents dans le stockage (corrosion des matériaux métalliques et altération des phases argileuses).

L'état de valence du Fe présent en solution est dépendant du milieu (oxydant ou réducteur), du pH et de la concentration initiale en fer. Le diagramme potentiel-pH ou diagramme de Pourbaix (figure 83) explique ses phénomènes.

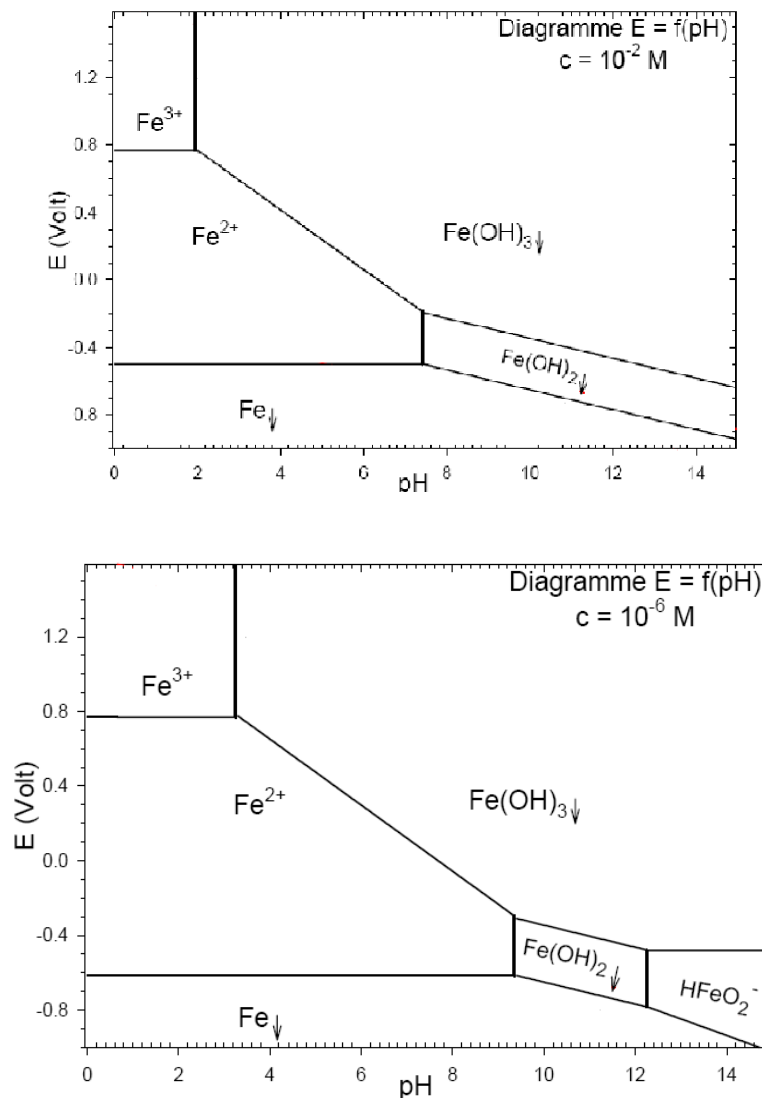


Figure 83: Diagrammes potentiel-pH du fer pour [10<sup>-2</sup> mol/L] et [10<sup>-6</sup> mol/L]

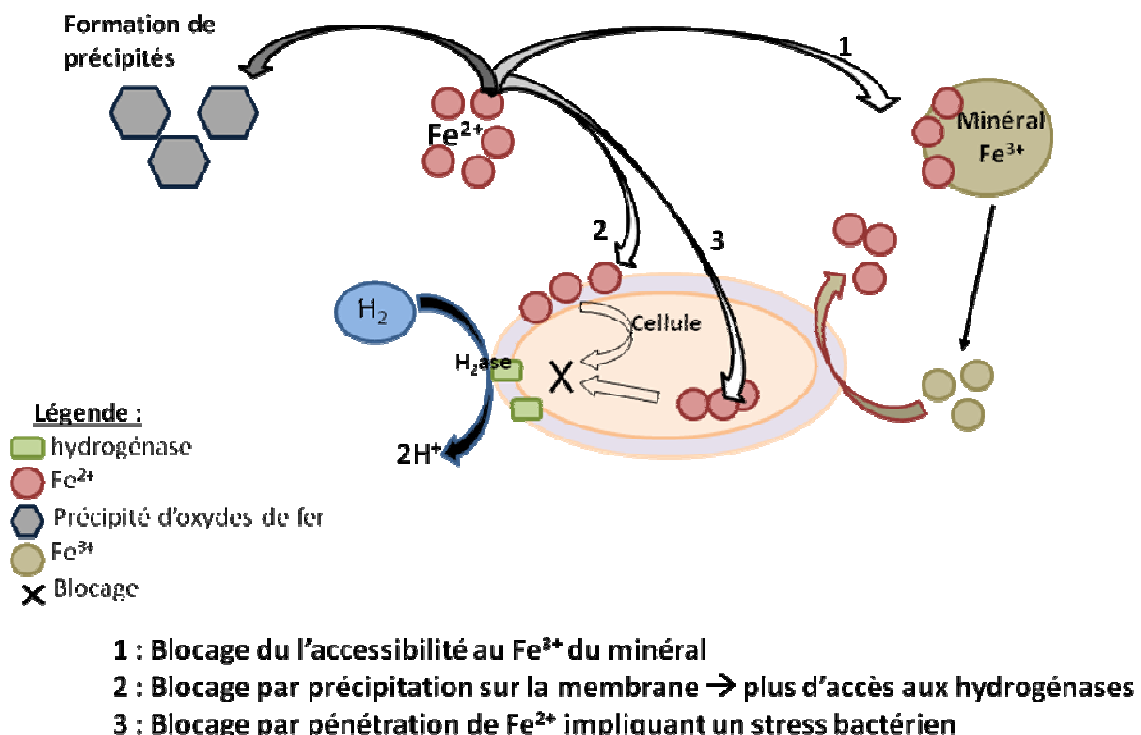
Ainsi, selon les conditions physico-chimiques, le fer peut soit, rester en solution, soit précipiter sous forme d'oxydes. En effet, pour des petites concentrations en Fe<sup>2+</sup> (µMolaire ;

limite de la carence bactérienne), le fer a tendance à rester sous la forme de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\mu\text{M}$ ). A ces concentrations ( $\mu\text{M}$ ) il y a peu de conséquences sur la toxicité cellulaire. Pour de plus fortes concentrations en  $\text{Fe}^{2+}$  de l'ordre de la dizaine de millimoles, le fer pourrait devenir toxique et inhiber les activités bactériennes. Cependant, à ces teneurs, et selon les conditions pH / Eh du milieu, des équilibres chimiques avec les phases minérales entraînant la formation d'oxydes et minéraux ferrifères interviennent, contrôlant ainsi par précipitation les concentrations en  $\text{Fe}^{2+}$  en solution ainsi que l'inhibition d'un développement bactérien.

La viabilité de l'activité bactérienne et la réduction du Fe(III) dans notre système est contrôlée tout d'abord par la présence ou non d'éléments nutritifs et énergétiques suffisant pour le développement microbien ainsi que des paramètres inhibiteurs des activités biologiques tel qu'ici la concentration en  $\text{Fe}^{2+}$  en solution. D'autre part, pour survivre face au stress oxydant, le monde microbien a mis en place de nombreux stratagèmes afin de détoxifier les espèces réactives par transformations chimiques, diminuer l'accumulation d'espèces toxiques intracellulaire et réparer les dommages génétiques tels que l'ADN et les gènes associés.

**Ainsi, la vie microbienne est contrôlée par différents équilibres chimiques environnementaux (aqueux et minéral) engendrant une réactivité globale non linéaire des équilibres organo-minéral.**

La figure 84 représente les différents contrôles de la réactivité Organo-Minéral-Métallique sur les activités bactériennes ferriréductrices..



**Figure 84: Mécanismes d'inhibition à l'échelle du pore de l'activité bactérienne ferri-réductrice.**

## DISCUSSION

---

L'objectif de ce travail était de déterminer l'influence des processus microbiologiques, notamment ferri-réducteurs, sur la réactivité des matériaux impliqués dans la conception d'un stockage géologique profond de déchets radioactifs.

Ces processus microbiologiques sont regardés principalement vis-à-vis de l'évolution des propriétés de confinement des matériaux métalliques et des barrières argileuses, naturelles comme ouvragées.

Les enjeux de cette thèse étaient donc de déterminer la potentialité d'une telle activité bactérienne en milieu géologique, d'en définir les critères de développement dans le cadre des concepts de stockage géologique de déchets radioactifs et d'en identifier les mécanismes qui soutiennent le développement bactérien, notamment en milieu argileux.

Dans les milieux argileux profonds, les données de la littérature mentionnant des analyses par géotypage ont permis d'identifier différentes espèces de microorganismes. Ces études ont mis en évidence une diversité importante d'espèces bactériennes, notamment la présence de bactéries Gram-négative et d'espèces sulfatoréductrices, ferriréductrices et dénitrifiantes. Ces études montrent, malgré une quantité suffisante d'éléments nutritifs pour soutenir la croissance des communautés autochtones comme allochtones dans ces environnements, que peu de communautés microbiennes viables ont été retrouvées. Il a été ainsi montré qu'un métabolisme, dit en « sommeil », limitait les activités en raison des restrictions d'espace et de teneur en eau ainsi que de la faible disponibilité des ressources énergétiques naturelles dans ces environnements profonds.

La question d'une activité bactérienne au sein d'une installation de stockage reste encore largement ouverte. Cependant, l'ensemble des perturbations physiques comme chimiques du milieu profond engendré par le creusement et l'exploitation, ainsi que l'apport, sous des formes multiples, de nutriments nouveaux (matériaux, produits chimiques) va considérablement modifier le système profond et notamment réactiver les bactéries indigènes. Par ailleurs, des souches microbiennes exogènes seront introduites et c'est l'ensemble de ces phénomènes qui décidera des activités microbiennes qui se développeront au cours de la vie du futur stockage.

**L'approche utilisée ici s'est portée sur l'activité des bactéries ferriréductrices spécifiques des conditions géochimiques du stockage. Ces bactéries, peu importe leur origine, sont susceptibles d'impacter la réactivité globale en milieu profond.**

Les résultats obtenus sont pour partie intégrés dans cinq articles acceptés, en cours de révision ou à soumettre.

### **1. ACTIVITE BACTERIENNE EN CONDITIONS DE STOCKAGE : APPLICATION AUX BACTERIES FERRI-REDUCTRICES**

Nous avons conduit deux types d'études de l'activité bactérienne : une axée sur le métabolisme et l'autre concernant les contrôles physiques et chimiques.

Les études de caractérisation géochimique ont permis de démontrer que les **principaux nutriments** nécessaires au développement bactérien (CHONPS) et les **sources énergétiques** (donneurs et accepteurs d'électrons) étaient bien présents dans les environnements profonds, considérés par le stockage géologique, que ce soient dans les eaux interstitielles du site argileux ou dans les matériaux naturels ou encore exogènes,

argileux et métalliques. La localisation de ces nutriments essentiels a été décrite de façon détaillée :

### Les nutriments

- **Le Carbone** : est présent sous forme de matière organique dissoute dans les fluides ou sous forme de minéraux de la roche (matière organique, carbonates).
- **L'hydrogène** : est ubiquiste dans ces environnements, notamment avec la source conséquente résultant de la corrosion.
- **L'oxygène** : est ubiquiste dans ces environnements (eau et matière organique). Les apports liés au creusement et à l'exploitation seront des sources conséquentes à prendre en compte au début de la vie du stockage.
- **L'azote** : est retrouvé sous forme ionique,  $\text{NH}_4^+$  dans les eaux interstitielles et à l'état de traces dans les composants métalliques, ainsi que sous forme d'azote gazeux apporté pendant les phases de creusement et d'exploitation.
- **Le phosphore** : est retrouvé sous forme solide dans les apatites / hydroxyapatites de façon hétérogène dans la roche hôte, sous forme dissoute dans les fluides, ainsi qu'à l'état de traces dans certains composants métalliques.
- **Le soufre** : est retrouvé sous forme de solide dans les minéraux de la barrière argileuse (pyrite, pyrrhotite, et encore gypse et anhydrite au sein de l'EDZ après oxydation notamment), et sous forme dissoute dans les fluides.

**Les donneurs d'électrons**, nécessaires aux réactions d'oxydoréduction du métabolisme bactérien sont retrouvés en quantité suffisante dans les environnements du stockage. En effet, malgré la présence d'une fraction faible de matière organique dans les environnements argileux profonds, l'apport de la corrosion métallique va engendrer une importante quantité d'hydrogène. L'hydrogène de corrosion va être produit tout au long de la durée de vie des composants métalliques et va diffuser dans la porosité de la barrière argileuse.

La présence de cet hydrogène, dans un environnement pauvre en matière organique, va indéniablement favoriser une sélection de bactéries pouvant utiliser l'hydrogène en tant que donneur d'électrons, bactéries dites hydrogénotrophes. Ces bactéries, qui peuvent utiliser l'hydrogène comme donneurs d'électrons avec différents accepteurs, ont la capacité d'influencer les teneurs en hydrogène dans les milieux anoxiques.

**Les accepteurs d'électrons** seront retrouvés en quantité importante notamment dans les matériaux ferrifères du stockage ayant une composante en Fe(III) structural importante (cas des argilites avec 15% du fer total sous forme de Fe(III) et des produits de corrosion tels que la magnétite). Ces matériaux sont susceptibles de sélectionner des espèces bactériennes ferriréductrices, comme une des espèces majoritaires pouvant se développer dans ces environnements, d'autant que la réaction thermodynamique de bioréduction du Fe(III) est énergétiquement plus favorable que celle de la réduction des sulfates.

La présence de  $\text{Fe}^{2+}$  à forte concentration a été décrite dans ce travail comme un inhibiteur des activités bactériennes. Par ailleurs, il a été démontré que des concentrations milli-molaires en solution engendrent une inhibition de l'activité enzymatique bactérienne hydrogénase. Cependant, nous avons pu démontrer que cette inhibition n'est plus active lorsque les concentrations de fer dissous sont inférieures à ce seuil. Dans les conditions de

stockage, le fer est à l'équilibre avec de nombreuses phases minérales et sa concentration calculée micro-molaire. Nous sommes donc, dans le cas du stockage profond, dans la gamme de concentration en fer favorable aux activités bactériennes.

**La présence de fer dissous lors de la corrosion métallique des conteneurs n'inhibera donc pas les activités bactériennes.**

La porosité du milieu argileux ainsi que sa teneur en eau sont des paramètres essentiels au développement d'une activité bactérienne. Les bactéries ont la capacité de survivre en milieu extrême, à la dessiccation, à de hautes températures et à une haute valeur de salinité. Dans les argilites, les mesures de teneur en eau ont mis en évidence des degrés de saturation hétérogènes. Les bactéries peuvent vivre dans ces microporosités insaturées seulement en étant proche des surfaces des solides. La rétention d'eau se localise sous forme de film à la surface des particules. L'adhésion des bactéries dans les milieux poreux dépend principalement de l'hydrophobicité de leur surface, engendrée par les protéines situées sur la membrane externe. Les bactéries hydrophobes sont retenues plus facilement dans la porosité que les bactéries hydrophiles. Ce phénomène est accentué lorsque la saturation en eau diminue.

En plus de pouvoir résister à la dessiccation, comme indiqué dans la littérature, il a été démontré dans ce mémoire que l'activité bactérienne pouvait accéder à des éléments à distance, ici le Fe(III) comme accepteur final d'électrons pour la respiration. Ainsi la présence de micro-niches, où les conditions sont favorables (porosité suffisante et présence d'eau, saturée ou insaturée) peut permettre le développement bactérien via des flux de molécules au sein de la porosité. Ces molécules sont des nutriments, des molécules d'H<sub>2</sub> ou encore des molécules bio-produites (catéchols quinones ou des chélatants) pouvant induire un apport d'éléments non accessibles à l'échelle de la porosité au monde microbien *via* ces films d'eau même en milieu insaturé.

Ces études de sensibilité de l'activité bactérienne en conditions simulant des environnements argileux profonds n'ont pas mis en évidence de critères limitant l'activité microbienne.

**Les premières estimations de biomasse bactérienne n'ont montré aucune limitation significative du développement microbien dans les environnements argileux profonds.**

**Le couple donneur/accepteur d'électrons H<sub>2</sub>/Fe(III), a été identifié comme un moteur significatif de l'activité microbiologique** en condition de corrosion métallique dans un environnement argileux.

**Les différents paramètres physiques et chimiques** tels que la température, la pression, l'H<sub>2</sub>, la porosité la concentration en fer dissous existant en profondeur, **n'entraînent pas d'inhibition irréversible de l'activité microbiologique.**

## **2. ACCESSIBILITE AU FE(III) STRUCTURAL ET REACTIVITE MICROBIOLOGIQUE EN MILIEU ARGILEUX**

Si elle était déjà connue dans les minéraux isolés ou purifiés, l'accessibilité au Fe(III) structural dans les matériaux argileux complexes tels que les argilites a été démontrée dans ce travail.

Les études sur l'interaction bactéries - smectites ferrifères ont montré que les bactéries pouvaient induire des modifications significatives sur les argiles, comme par exemple la dissolution partielle des particules, la diminution de la capacité d'hydratation des smectites ou leur transformation minéralogique en illite ou argiles ferrifères.

Dans le but de déterminer l'impact des microorganismes sur la réactivité des matériaux impliqués dans le stockage en environnement géologique profond, différents points ont été investigués.

Qu'il soit dans des structures complexes telles que les argilites ou dans des phases purifiées de nature différente (smectite, illite ou kaolinite), le Fer(III) est disponible en tant qu'accepteur d'électrons des activités bactériennes ferriréductrices et peut soutenir le développement bactérien.

**Les résultats de cette étude ont montré la biodisponibilité du Fe(III) structural des matériaux argileux pour le développement de l'activité microbiologique**

Ces résultats sont suffisamment significatifs pour être transposables dans les environnements profonds en regard de la proportion d'argile et de **la teneur en Fe(III) dans les argilites, ~14% du Fe total (correspondant à 0,8% de Fe(III) dans l'argilite de Tournemire).**

Les smectites ont été clairement identifiées comme les phases minérales argileuses les plus réactives vis-à-vis de l'activité bactérienne dans les environnements argileux profonds. Nous avons confirmé cette hiérarchie dans cette étude dans le cas de la réactivité bactérie/argile, l'ordre de réactivité peut se décliner ainsi : Smectite > Kaolinite > Illite

Cette hiérarchisation a déjà été décrite dans la littérature pour la réactivité fer/argile et nos travaux montrent une cohérence entre les processus de réduction biotique comme abiotique affectant notamment les structures octaédriques des argiles.

Dans les environnements argileux complexes, l'interstratifié Illite/Smectite (I/S) s'altère significativement au contact de bactéries ferriréductrices. Les smectites de l'interstratifié sont donc accessibles à la réduction bactérienne, même si leur contenu en Fe<sup>3+</sup> octaédrique est faible.

La réactivité bactérie – smectite, notamment la bioréduction du Fer(III) structural, a des conséquences fortes sur la tenue du matériau initial. En effet la smectite peut être déstabilisée jusqu'à atteindre une altération complète de sa structure cristalline. Dans le cas des argilites, l'interstratifié Illite/Smectite (I/S) disparaît au contact de bactéries ferriréductrices pour induire des phases illitiques et siliceuses (article I). Dans le cas des phases purifiées, l'activité bactérienne augmente significativement l'altération (dissolution d'éléments structuraux comme Si et Fe) ainsi que la vitesse d'altération de la smectite initiale (article II et III).

**La formation de phases ferrifères à 7Å de type Berthierine a été identifiée dans nos travaux en tant que produits résultant de l'altération biotique des beidellites ferrifères.**

Dans le cas de la montmorillonite, la faible teneur en fer initiale ne permet pas la formation de phases de ce type. Par contre, nous avons démontré que l'acidification bio-induite du système a conduit à la **crystallisation de phases riches en potassium de type illite.**

En système biotique, la réactivité de la smectite est dépendante des mêmes paramètres cristallographiques que dans le cas de processus abiotiques. Ceci montre qu'il existe bien des similitudes dans les processus biotiques ou abiotiques de réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  octaédrique.

Dans les deux cas, il est important de noter que de telles cristallisations se sont faites à 40°C, température largement plus basse que celles présentées dans la littérature en condition abiotique.

En effet, en condition abiotique, la formation de berthierine est décrite expérimentalement pour des températures de 150°C, voir 80°C en présence de fer métallique. De même l'illitisation en environnement profond est observée pour des températures avoisinant 200°C. L'activité bactérienne de ferri-réduction, couplée à une acidolyse, catalyse ces réactions minéralogiques à basse température de l'ordre de 25°C - 40°C dans nos expériences. Cette altération est d'autant plus forte que l'activité bactérienne et la production de métabolites sont élevées.

Ces résultats traduisent ainsi **une influence importante de l'activité microbiologique sur la réactivité globale des argiles** dans les conditions de stockage en milieu géologique profond.

Par ailleurs, la réactivité du système argileux est accentuée par l'apport de matériaux métalliques qui engendre des perturbations *via* des processus de corrosion aqueuse et argileuse, et de réactivité fer/argile. L'influence de la réactivité microbiologique sur ce système a été discutée et est résumée ci-après.

### 3. PROCESSUS GEOMICROBIOLOGIQUES EN CONDITION DE STOCKAGE

Dans l'évolution d'un stockage, les processus de corrosion des conteneurs métalliques de déchets sont inévitables. Vis-à-vis de la sûreté du stockage, l'intégrité des enveloppes métalliques de confinement des déchets radioactifs est essentielle pendant une durée de l'ordre du millénaire. Il s'agit donc d'évaluer au plus près la durabilité de ces conteneurs métalliques.

Le processus de corrosion métallique entraîne la formation de produits secondaires tels que le  $\text{Fe}^{2+}$ , l' $\text{H}_2$  et des phases minérales comme la magnétite. Certains de ces produits de corrosion, comme la magnétite, sont souvent retrouvés sous forme de couches superficielles à la surface des métaux. Dans certains cas bien précis, ces couches peuvent être protectrices vis-à-vis de la corrosion et appelées ainsi couches de passivation. Les études de réactivité bactéries - produits de corrosion, ont démontré **le caractère « réservoir énergétique » et « moteur » de ces produits pour le développement bactérien ferri-réducteur.**

**La réduction/dissolution des oxydes de Fe tels que la magnétite ou l'hématite est favorisée par l'activité des bactéries ferriréductrices.**

Cette activité se développe surtout aux dépens des phases minérales ferrifères présentes. Cette bio-altération libère des agents oxydants impliqués à leur tour dans la corrosion métallique. Dans un processus de corrosion actif, les fonctions bactériennes sont soutenues et l'activité microbiologique associée alimente à son tour le processus de corrosion. **Nous avons donc un système réactionnel inter-corrélé.**



L'activité microbiologique peut entraîner **une reprise de la corrosion métallique via la consommation des oxydes de fer de la couche passivante.**

La présence de bactéries dans ce système réactionnel a été étudiée en tant que **catalyseur réactionnel**. Les résultats obtenus montrent que l'activité bactérienne est présente dans ce système : elle a été mesurée en condition de réactivité fer/argile et est significative au regard des autres réactions abiotiques.

**L'argile sert à la fois de substrat physique, de niche écologique ainsi que de substrat nutritif et énergétique au monde microbien aux travers des processus de bio-réduction du Fe(III) structural.**

Ceci a pour conséquence de permettre aux activités ferri-réductrices de se développer en milieu argileux et d'altérer à posteriori les phases minérales contrôlant les processus de corrosion des métaux. **Un couplage réactionnel global apparaît dans le système, augmentant ainsi la réactivité et l'altération des argiles, ainsi que la corrosion du fer métallique.**

L'activité bactérienne intervient ici comme **un oxydant supplémentaire dans le système géologique profond**, au même titre que les smectites dans les processus de corrosion des matériaux métalliques. Néanmoins, contrairement aux smectites, le processus de corrosion est indirect. Ainsi la réactivité microbiologique est identifiée comme un paramètre déterminant pour comprendre et quantifier les processus réactionnels mis en jeu sur les matériaux d'un stockage.

#### **4. INFLUENCE MICROBIOLOGIQUE A L'ECHELLE D'UN STOCKAGE**

La présence et la disponibilité des éléments nécessaires au métabolisme bactérien ne montrent pas de limitation significative et n'entraînent pas d'inhibition importante de l'activité microbiologique, la dynamique des flux en milieu profond supporte cette biodisponibilité qui est un paramètre essentiel.

Cependant, l'accessibilité à des éléments nutritifs ou énergétiques au sein de structures poreuses par des organismes vivants nécessite de mettre en place différentes stratégies (physique et chimique) qui sont plus ou moins coûteuses en énergie selon la distance nécessaire pour y accéder. L'utilisation d'un gel inorganique hybride, pouvant inclure de façon homogène des particules colloïdales de nontronites et possédant une porosité fixe (~40 nM) a permis de simuler et de contrôler la réponse bactérienne dans un milieu poreux où l'accès aux nutriments est un point essentiel.

Ces expériences ont permis de mettre en évidence **un mécanisme de respiration bactérienne efficace à distance.**

En effet, il a été démontré que l'activité bactérienne ferri-réductrice était capable de produire des molécules réductrices (catéchols), qui peuvent diffuser dans la porosité des

matériaux tels que les milieux argileux et entraîner une réduction des phases ferrifères argileuses et des oxydes. Ce mécanisme d'adaptation permet d'assurer une activité bactérienne même avec un rendement énergétique de la respiration externalisée plus faible.

**Un mécanisme de réduction à distance** a pu être ainsi décrit pour la première fois de façon précise. La réduction des catéchols ou hydroquinones (navettes électroniques) au contact du Fe(III) structural entraîne la formation de quinones dans le milieu. Le phénomène de diffusion au sein de la porosité d'un complexe appelé quinhydrone, pourrait favoriser les échanges d'électrons entre les donneurs et les accepteurs. Sa progression dans la porosité du milieu argileux-Fe(III) pourrait être une explication de la diffusion / réduction rapide du processus.

Les conséquences d'une telle activité sur les matériaux ferrifères avec réduction/dissolution et néoformation de phases secondaires, sont telles qu'elles pourraient avoir **un impact sur les édifices poreux que ce soit en termes de réactivité chimique des matériaux ou de comportement physique de la barrière argileuse.**

En effet, les résultats de l'activité ferri-réductrice ont mis en évidence de nombreux impacts sur les paramètres de confinement des environnements argileux. Ainsi dans les expériences simulées dans le matériaux poreux « GIH-nontronite » :

**La réduction microbienne du Fe(III) structural peut modifier la structure cristalline initiale des minéraux argileux, les paramètres de transport, notamment de diffusion au sein de la porosité ainsi que le comportement mécanique de la barrière argileuse avec des phénomènes de gonflement/rétraction du milieu argileux poreux.**

Par ailleurs, l'influence microbienne sur la physicochimie du milieu, notamment *via* la libération de protons et d'acides organiques, est un paramètre à prendre en compte, du fait de l'important volume de minéraux carbonatés, très sensibles au pH, composant de la matrice des argilites et dont l'altération pourrait avoir un impact sur la porosité du système.

Contrairement au processus de corrosion abiotique, où les réactions ne se font que par contact direct entre le fer et l'argile, l'activité microbiologique dans le milieu poreux peut se développer à distance du fer métal, à travers la diffusion de molécules bio-induites.

**L'altération bactérienne peut avoir un impact significatif sur les propriétés de confinement hydraulique et de gonflement des barrières argileuses.**

En effet en plus de pouvoir favoriser les processus de corrosion *via* une augmentation des vitesses de corrosion des matériaux métalliques et donc de jouer directement un rôle sur la durée de vie de ces matériaux, elle peut altérer la fonction de confinement des argiles, **notamment du bouchon argileux, composé principalement de phases argileuses de type smectite.**

Ce bouchon qui est actuellement envisagé selon les concepts à l'étude dans différents scénarios de stockage par l'Andra, est composé de bentonite gonflante, principalement de la montmorillonite (MX80). Il supporte pour partie la fonction de confinement au sein des alvéoles par ses propriétés de rétention et de gonflement lors de la resaturation du site. Cependant, d'après les résultats décrits dans ce mémoire, les bactéries ferriréductrices peuvent accéder au Fe(III) de la smectite et peuvent entraîner des modifications structurales importantes du matériau argileux (illitisation) comme des modifications sur le gonflement de

la smectite. Ceci pourrait être accentué notamment par la présence initiale de microorganismes au sein de la bentonite et de la possible diffusion d' $H_2$  (source énergétique) lors de la corrosion des conteneurs métalliques.

Dans un milieu poreux naturel, tel que les argilites, la pertinence de ces résultats dépend des quantités de phases réactives ferrifères nécessaires pour supporter une activité bactérienne. Ainsi la présence de cible argileuse-Fe(III) en proportion significative dans l'environnement de stockage pourrait entraîner des modifications de confinement importantes dont la formation de chemins préférentiels de fluides dans la porosité de la matrice argileuse. Si la phénoménologie complexe que nous avons pu mettre en évidence, a permis de déterminer les paramètres réactionnels les plus influents, leur quantification reste indispensable pour prédire le comportement à long terme des systèmes de stockage.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

Cette étude a permis de démontrer le potentiel d'activité bactérienne et les conditions de son développement dans les environnements de stockage en formation argileuse profonde. Nous avons pu déterminer les paramètres influants, sans aucun effet inhibiteur significatif. Les résultats de cette thèse ont clairement montré la disponibilité du Fe(III) structural des matériaux argileux. Par ailleurs, les processus de biocorrosion investigués ont permis de valider l'extension de cette (bio)-disponibilité aux oxydes de fer. La réduction/dissolution des oxydes de fer tels que la magnétite ou l'hématite est ainsi favorisée par l'activité des bactéries ferriréductrices.

Dans le système étudié, la corrosion apparaît comme un facteur positif sur les activités bactériennes notamment en produisant une source énergétique, l'hydrogène, en grande quantité dans ce milieu quasi-fermé. De plus, cette source d'hydrogène efficace pour le métabolisme bactérien, peut être disponible à longue distance par diffusion dans la porosité.

Les activités bactériennes ferriréductrices, qui se développent notamment en contexte de corrosion métallique, engendrent des impacts significatifs sur les matériaux ferrifères du stockage. Ainsi, l'activité microbiologique peut entraîner une reprise de la corrosion métallique via la consommation des oxydes de fer de la couche passivante. La conséquence directe est une diminution de la durée de vie des enveloppes métalliques de colisage. Cependant il faut pondérer cette évaluation par une quantification précise de la reprise de corrosion avant de tirer une conclusion alarmante.

A l'échelle du milieu poreux de l'argilite, de nombreux processus impliquant les microorganismes ferri-réducteurs et les phases minérales ferriques ont été mis en évidence, notamment à travers des mécanismes d'activation/inhibition bactérienne qui sont corrélés à des processus de réduction/dissolution des phases argileuses ferriques. Les conséquences d'une telle activité sur les matériaux ferrifères sont telles qu'elles peuvent avoir un impact sur les édifices poreux que ce soit en termes de réactivité chimique des matériaux ou de comportement physique de la barrière argileuse. Il faut noter que nos expériences ont permis de visualiser pour la première fois un mécanisme de respiration bactérienne à distance totalement original qui repousse encore plus les limites de l'activité microbienne *via* une extension de la disponibilité d'éléments essentiels, ici le Fe(III).

Par ailleurs, il conviendra de développer les études traitant de la mise en œuvre par l'activité microbiologique de ce processus de respiration à distance. S'il est totalement original, il reste pour l'instant encore mal circonscrit et nécessitera des études complémentaires, notamment expérimentales, pour être validé et pour déterminer son influence réelle sur la dynamique du système.

De toute évidence, un développement de la simulation numérique *via* la mise en place d'un modèle géomicrobiologique sera une étape essentielle. Dans ce modèle, les aspects dynamiques seront à privilégier, notamment vis-à-vis de la connexion des réservoirs de nutriments et d'éléments énergétiques, que ce soient dans le cas du milieu géologique comme celui de la réactivité couplée de l'ensemble des matériaux exogènes.

La stratégie très transverse mise en place au début de la thèse, dans l'objectif de déterminer la dynamique de la réactivité géomicrobiologique à l'échelle d'un stockage géologique profond de déchets radioactifs, a été fructueuse. Ces résultats démontrent clairement l'impact du facteur microbiologique sur la réactivité des matériaux et la prédiction de leur comportement à long-terme. En effet, ces résultats phénoménologiques explorent les processus majeurs de la réactivité microbiologique sur les matériaux argileux et métalliques tout en s'appuyant sur des paramètres de contrôle de l'activité bactérienne. La pertinence de

la prise en compte de ce paramètre « activité bactérienne » dans le cas des évaluations de sûreté d'un stockage est ainsi établie.

Si cette stratégie a été efficace en termes d'acquisition de données, d'identification de processus et de paramètres de contrôle, elle a montré ses limites vis-à-vis de la quantification des phénomènes et des paramètres identifiés.

Cette thèse a mis en évidence de nombreuses pistes de recherche et de développement. Dans les environnements de stockage comme dans d'autres sites industriels, l'activité microbiologique telle que nous l'avons utilisée est un outil permettant de décrire la dynamique des échanges et processus réactionnels en tant que bio-indicateur.

Il est clair que pour aller plus loin dans la compréhension globale de la réactivité géomicrobiologique dans les environnements de stockage profond, une approche intégrée devient indispensable.

Pour ce faire, la conception de maquettes reproduisant en laboratoire différents éléments d'un stockage (argiles, argilites, éléments métalliques) dans une géométrie et à une échelle représentative des concepts pourrait s'avérer porteuse de résultats essentiels. L'homologue de l'Andra en Belgique, l'ONDRAF, a d'ailleurs déjà testé ce genre de maquette avec succès.

En France, l'outil exceptionnel que représente le laboratoire souterrain de l'Andra à Bure rend possible la réalisation d'expériences intégrées *in situ*. Ce genre d'expérimentations permettrait certainement de lever les doutes et d'apporter la confirmation de l'importance du paramètre microbiologique dans la réactivité globale en milieu profond comme le montre cette étude exploratoire. Le cas échéant, sa nécessaire prise en compte permettra de consolider l'évaluation du comportement à court et à long terme des systèmes de stockage et de réduire les incertitudes actuelles.

## RÉFÉRENCES

- Aagaard, P., Jahren, J. S., Harstad, A. O., Nilsen, O. and Ramm, M. (2000). Formation of grain coating chlorite in sandstones. Laboratory synthesized vs. natural occurrences. *Clay Minerals*. 35, 261-269.
- Abd El Wanees, S., Abd El Aal Mohamed, A., Abd El Azeem, M. and Abd El Fatah, A.N. (2008). Pitting Corrosion Currents of Tin in Relation to the Concentration of the Inhibitive and Corrosive Anions under Natural Corrosion Conditions. *Int. J. Electrochem. Sci.* 3, 1005–1015.
- Abdelouas, A., Lutze, W., Gong, W., Nuttal, E.H., Strietelmeler, B.A and Travis, B.J. (2000). *Sci.Total. Environ.* 250, 21p.
- Adams, M.W.W., Upchurch, R.G. and Mortenson, L.E. (1980) An evaluation of N<sub>2</sub> fixation and H<sub>2</sub> production in fermentative processes In: *Ann. Reports on Fermentation Processes* (Tsao, G.T., ed. Academic Press, New York). 4, 267-315.
- Amend, J.P. and Shock, E.L. (2001). Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archae and Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 25, 175-243.
- Andra, (2005). Dossier 2005 - Argile, Andra, France.
- Aouad, G., Crovisier, J. L., Geoffroy, V. A, Meyer, J. M and Stille, P. (2006). Microbially-mediated glass dissolution and sorption of metals by *Pseudomonas aeruginosa* cells and biofilm. *Journal of Hazardous Materials*. 136(3), 889-895.
- Appenzeller, B. M. R., Yañez, C., Jorand, F and Block, J. C. (2005). Advantage provided by iron for *Escherichia coli* growth and cultivability in drinking water. *Appl. Envir. Microbiol.* 71, 5621 - 5623.
- ASN, (2010). Plan National de Gestion des Matières et des Déchets Radioactifs, 2010-2012.
- Auffan, M. (2007). Nanoparticules d'oxydes métalliques : relations entre la réactivité de surface et des réponses biologiques. Thèse université Paul Cézanne Aix-Marseille III. 220p
- Blanc, P., Piantone, P., Lassin, A. and Burnol, A. (2006). Thermochimie: sélection de constantes thermodynamiques pour les éléments majeurs, le plomb et le cadmium. Rapport final: BRGM RP-54902-FR.
- Blanc, P. and Gailhanou, H. (2007). Thermochimie: estimation des entropies, capacités calorifiques et volumes molaires des phyllosilicates déshydratés et hydratés. Report BRGM/RP-55966-FR.
- Bhattacharyya, D. P. (1983). Origin of berthierine in ironstones. *Clays and Clay Minerals*. 31, 173-182.
- Bhattacharyya, D. P. (1986). Geochemistry of the Phanerozoic Oolitic Ironstones-Genetic Implication. *AAPG Bulletin*. 70, 565.
- Bailey, S. W. (1980). Structure of Layer Silicates. In: *Crystal Structures of Clay Minerals and their XRay Identification*. G.W. Brindley and G. Brown. London, Mineralogical Society. 5, 1-125.
- Bailey, S. W. (1988). Odinite, a new dioctahedral-trioctahedral Fe<sup>3+</sup>-rich 1:1 clay mineral. *Clay Minerals*. 23, 237-247.
- Balland, C., Poszwa, A., Leyval, C. and Mustin, C. (2010). Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 74(19), 5478-5493.
- Balland, C. (2010). Caractérisation expérimentale des relations entre les bactéries des sols, les phyllosilicates et les solutions : Modélisation et Rôle des Paramètres Environnementaux. Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré de Vandoeuvre-lès-Nancy.
- Barker, W.W., Welch, S.A. and Banfield, J.F. (1997). Geomicrobiology of silicate mineral weathering. In: Banfield & Neilson KH eds. *Geomicrobiology, Interaction between Microbes and Minerals*. Review in *Mineralogy* 35. The Mineral. Soc. Am. Washington. 391-428.
- Barker, W.W., Welch, S.A. and Chu, S. (1998). Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *J. Am. Mineral.* 83, 1551-1563.

- Beaucaire, C., Michelot, J.L., Savoye, S. and Cabrera, J. (2008). Groundwater characterisation and modelling of water-rock interaction in an argillaceous formation (Tournemire, France). *Applied Geochemistry*. 23(8), 2182-2197.
- Benali O., Abdelmoula M., Refait P. and Genin J.M. (2001). Effect of orthophosphate on the oxidation products of Fe(II)-Fe(III) hydroxycarbonate : the transformation of green rust to ferrihydrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 65 (11), 1715-1726.
- Bennett, P. C., Hiebert, F. K. and Choi, W. J. (1996). Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. *Chemical Geology*. 132(1-4), 45-53.
- Berger, J. (2008). Hydratation des argiles gonflantes et influence des bactéries. Etude expérimental de réaction in situ. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur, Strasbourg, 233 pages.
- Berthelin, J., Ona-Nguema, G., Stemmler, S., Quantin, C., Abdelmoula, M. and Jorand, F. (2006). Bioreduction of ferric and biogenesis of green rusts in soils. *Geomaterials (Mineralogy), Comptes Rendus Geosciences*. 338(6-7), 447-455.
- Bildstein, O., Trotignon, L., Perronnet, M. and Jullien, M. (2006). Modelling iron-clay interactions in deep geological disposal conditions. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*. 31(10-14), 618-625.
- Bildstein, O. and Trotignon, L. (2007). Integrated modelling of the glass-iron-clay system evolution: impact for RN migration. NF-PRO FI6W-CT-2003-02389.
- Boisson, J.Y. (1996). Caractérisation d'une formation argileuse. Rapport IPSN/DPEI/SERGD 96.11.
- Boisson, J.Y., Cabrera, J. and De Windt, L. (1997). Caractérisation d'une formation argileuse. Caractérisation des propriétés de transferts au laboratoire des argilites et marnes toarciennes de Tournemire, Aveyron, France. CCE report 5, SERGD 97/04.
- Bonneville, S., Van Cappellen, P. and Behrends, T. (2004). Microbial reduction of iron(III) oxyhydroxides: effects of mineral solubility and availability. *Chem. Geol.* 212, 255-268.
- Bonneville, S., Behrends, T., Van Cappellen, P., Hyacinthe, C. and Roling, W.F.M. (2006). Reduction of Fe(III) colloids by *Shewanella putrefaciens*: a kinetic model. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 5842-5854.
- Bonneville, S., Behrends, T. and Van Cappellen, P. (2009). Solubility and dissimilatory reduction kinetics of iron(III) oxyhydroxides: A linear free energy relationship. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 73(18), 5273-5282.
- Boulin, P. (2008). Expérimentation et Modélisation du Transfert d'hydrogène à travers des argiles de centre de stockage de déchets radioactifs. Thèse de doctorat de l'Institut polytechnique de Grenoble.
- Bridge, T.A.M. (2000). Reductive dissolution of ferric iron minerals by acidiphilium SJH. *Geomicrobiol J.* 17, 193-206
- Bruno, G. (1993). Etude expérimentale des mécanismes de réduction et oxydation du fer d'une argile naturelle. Evolution de ses propriétés physiques et chimiques. Thèse de docteur ès Matériaux-Minéraux, Université de Poitiers, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées, Poitiers, 169 pages.
- Buatier, M., Honnorez, J. and Ehret, G. (1989). Fe-Smectite-Glaucinite transition in hydrthermal green clays from the Galapagos spreading center. *Clays and Clay Minerals*. 37, 532-541.
- Burt, D. M. (1989). Iron rich clay minerals on Mars : potential sources of sinks for hydrogen and indicators of hydrogen loss over time. 19th Lunar. Planet Sci. Conf.
- Cabrera Nunez, J., Beaucaire, C., Bruno, G., De Windt, L., Genty, A., Ramambasoa, N., Rejeb, A., Savoye, S. and Volant, P. (2001). Projet Tournemire. Synthèse des programmes de recherche 1995-1999. Institut de Protection et de Sécurité Nucléaire, Département de Protection de l'Environnement, Service d'Etudes et de Recherches sur la Geosphère et l'Élimination des Déchets. Fontenay aux Roses, DPRE/SERGD 01-19, 202 202.
- Cairns-Smith, A.G., Hall, A.J. and Russell, M.J. (1992). Mineral theories of the origin of life and an iron sulfide example. *Orig. Life Evol. Biosphere*. 22, 161-180.
- Campaignolle, X. (1996). Etude des facteurs de risque de la corrosion bactérienne des aciers au carbone induite par les bactéries anaérobies sulfurogène. Thèse, Institut Polytechnique de Toulouse.

- Castaneda, H. and Benetton, X.D. (2008). SRB-biofilm influence in active corrosion sites formed at the steel-electrolyte interface when exposed to artificial seawater conditions. *Corrosion Science*. 50(4), 1169-1183.
- Caumette, P. (1992). Bacterial communities in coastal lagoons. An overview. *Vie Milieu*. 42, 11–24.
- Cefracor, (1999). Centre français de l'anti-corrosion. Congrès annuel.
- Chapelle, F. H., O'Neill, K., Bradley, P. M., Methe, B. A., Ciufo, S. A., Knobel, L. L. and Lovley, D. R. (2002). A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. *Nature*. 415(6869), 312-315.
- Charpentier, D., Cathelineau, M., Mosser-Ruck, R. and Bruno, G. (2001). Évolution minéralogique des argillites en zone sous-saturée oxydée : exemple des parois du tunnel de Tournemire (Aveyron, France) Mineralogical evolution of argillites in dehydrated-oxidised zones: the example of the argillitic walls from Tournemire tunnel. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science*. 332(10), 601-607.
- Chamley, H. (1989). *Clay sedimentology*. Springer-Verlag, Berlin, 623 p.
- Chicote, E., Moreno, D., Garcia, A., Sarro, I., Lorenzo, P. and Montero, F. (2004). *Biofouling* 20, 35.
- Choi, K.H and Schweizer, H.P. (2005). An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC Microbiol* 5, 30.
- Choi, K.H., Gayron, J.B., White, K.G, Lopez, C., Bosio, C.M., Karkhoff-Schweizer, R.R. and Schweizer, H.P. (2005). ATn7-Based broad range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods*. 2(6), 443-8.
- Choi, K.H. and Schweizer, H.P. (2006). Mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Protoc*. 1(1), 153-61.
- Choi, K.H., Kumar, A. and Schweizer, H.P. (2006). A 10 min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfers between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbial Methods*. 64(3), 391-7.
- Conrad, R., Erkel, C. and Liesack, W. (2006). Rice Cluster I methanogens, an important group of Archaea producing greenhouse gas in soil. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 262-267.
- Cornell, R.M. (2003). *The Iron Oxides: Structures, properties, reactions, occurrences and uses*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Credoz, A. (2009). Réactivité des couvertures argileuses en présence de CO<sub>2</sub> en conditions de stockage géologique profond: approche intégrée expérimentation / modélisation. Thèse de doctorat université Toulouse. 184 p.
- Crolet, J.L. (1998). La corrosion bactérienne dans l'industrie pétrolière. In *Biodétérioration des matériaux*, ed EDP Sciences.
- Dapples, E.C. (1979). Diagenesis of sandstones. In *Diagenesis in sediments and sedimentary rocks*. Development in Sedimentology. Elsevier, 25 A, 31-98.
- De Combarieu, G., Barboux, P. and Minet, Y. (2007). Iron corrosion in Callovo-Oxfordian argillite: From experiments to thermodynamic/kinetic modelling. *Physics and Chemistry of the Earth. Parts A/B/C*. 32(1-7), 346-358.
- De Durve, C. (1995). *Vital Dust: Life as a Cosmic Imperative*. Basic Books, New York, 362 p.
- Deniau, I., Devol-Brown, I., Derenne, S., Behar, F. and 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(2-3), 475-485.
- Diercks, M., Sand, W. and Bock, E. (1991). Microbial corrosion of concrete. *Experientia*. 47(6), 514–516.
- Dominik, P., Pohl, H.N., Bousserhine, N., Berthelin, J. and Kaupenjohann, M. (2002). Limitations to the reductive dissolution of Al-substituted goethites by *Clostridium butyricum*. *Soil Biology and Biochemistry*. 34, 1147-1155.
- Dong, H., Frederickson, J.K., Kennedy, D.W., Zachara, J.M., Kukkadapu, R.K. and Onstott, T.C. (2000). Mineral transformations associated with the microbial reduction of magnetite. *Chemical Geology*. 169(3-4), 299-318.
- Dubiel, M., Hsu, C.H., Chien, C.C., Mansfield, F. and Newman, D.K. (2002). Microbial iron respiration can protect steel from corrosion. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 440–1445.



- Ehrlich, H. L. (1996). *Geomicrobiology*. New York, Marcel Dekker.
- Ehrlich, H. L. (1999). Microbes as geologic agents: Their role in mineral formation. *Geomicrobiology Journal*. 16(2), 135-153.
- El Hajj, H., Abdelouas, A., Grambow, B., Martin, C. and Dion M. (2010). Microbial corrosion of P235GH steel under geological conditions. *Physics and Chemistry of the Earth*. 35, 248-253.
- Elshawesh, F., Abusowa, K., Mahfud, H., Abderraheem, A., Eljweli, F. and Zyada, K. (2008). Microbial-Influenced Corrosion (MIC) on an 18 in. API 5L X52 Trunkline. *J Fail. Anal. and Preven.* 8, 60–68.
- Elzea, J. and Murray, H.H. (1990). Variation in the mineralogical, chemical and physical properties of the Cretaceous Clay Spur bentonite in Wyoming and Montana (USA). *Applied Clay Science* 5(3), 229-248.
- Fairbridge, R. W. (1967). Phasis of diagenesis and authigenesis. *Diagenesis in sediments. Developments in Sedimentology, Elsevier*. 8, 19-98.
- Féron, D., Dupont, I. and Novel, G. (1997). Influence of microorganisms on the free corrosion potentials of stainless steels in natural seawaters. In aspect of Microbially Induced Corrosion. ed D. Thierry, EFC Publication n°22, The institute of Material and technics, London, 103-112.
- Féron, D., Crusset, D. and Gras, J.M. (2008). Corrosion issues in nuclear waste disposal. *Journal of Nuclear Materials*. 379(1-3), 16-23.
- Féron, D. (2010). Methodology of crevice corrosion testing for stainless steels in natural and treated seawaters” Ed. U. Kivisakk, B. Espelid, D. Féron, published by Maney, Leeds, UK.
- Fernandez, A., Chauvel, J.J. and Moro, M.C. (1998). Comparative study of the lower Ordovician ironstones of the Iberian massif (Zamoia, Spain) and of the Armorican massif (Central Brittany, France). *Journal of Sedimentary Research*. 68, 53-62.
- Flemming, H.C. and Griebel, T. (1996). Antifouling strategies in technical systems - a short review. *Water Science and Technology*. 34(5-6), 517-524.
- Force E.R. and Maynard, J.B. (1991). Manganèse: Syngenic deposits on the margins of anoxic basins. In *Sedimentary and Diagenetic Mineral Deposits: A Basin Analysis Approach to Exploration* (eds. E.R. Force, J.J. Eidel, and J.B. Maynard). Society of Econ. Geologists. El Paso, TX, 147-159.
- Francis, A.J. and Dodge, C.J. (1990). Anaerobic microbial remobilization of toxic metals co-precipitated with iron oxide. *Environ. Sci. Technol.* 24, 373-378.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Kennedy, D.W., Dong, H., Onstott, T.C., Hinman, N.W. and Li, S., (1998). Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 62, 3239–3257.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Kennedy, D.W., Duff, M.C., Gorby, Y.A., Li, S.W. and Krupka, K.M. (2000). *Geochim. Cosmochim. Acta*. 64, 3085.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Balkwill, D.L., Kennedy, D., Li, S.M.W., Kostandarithes, H.M., Daly, M.J., Romine, M.F. and Brockman, F.J. (2004). *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4230.
- Fripiat, J.J., Jelli, A., Poncelet, G. and André, J. (1965). Thermodynamic Properties of Adsorbed Water Molecules and Electrical Conduction in Montmorillonites and Silicas. *Thermodynamic Properties of Adsorbed Water Molecules*. 69, 2185-2196.
- Galès, G., Libert, M.F., Sellier, R., Cournac, L., Chapon, V. and Heulin, T. (2004). Molecular hydrogen from water radiolysis as an energy source for bacterial growth in a basin containing irradiating waste. *FEMS Microbiology Letters*. 240(2), 155-162.
- Gargiulo, G., Bradford, S., Simunek, J., Ustohal, P., Vereecken, H. and Klumpp, E. (2007). Bacteria transport and deposition under unsaturated conditions: The role of the matrix grain size and the bacteria surface protein. *Journal of Contaminant Hydrology*. 92(3-4), 255-273.
- Gargiulo, G., Bradford, S., Simunek, J., Ustohal, P., Vereecken, H. and Klumpp, E. (2008). Bacteria transport and deposition under unsaturated conditions: The role of water content and bacteria surface hydrophobicity. *Vadosezonejournal*. 4(2), 406-419.
- Garrels, R.M. and Thompson M.E. (1960). Oxidation of pyrite by iron sulfate solutions, *Am. J. Sci. A*. 258, 57–67.

- Garrels, R.M. and Christ, C.L. (1965). Equilibre des minéraux et de leurs solutions aqueuses. Gauthier-Villars Editions, Paris, 335 p.
- Gaucher, E. (1998). Interaction eaux-argiles: Etude expérimentale, Thèse, université Paris 7 Denis Diderot
- Gaucher, E., Blanc, P., Bardot, F., Braibant, G., Buschaert, S., Crouzet, C., Gautier, A., Girard, J.P., Jacquot, E., Lassin, A., Negrel, G., Tournassat, C., Vinsot, A. and Altmann, S. (2006). Modelling the porewater of the callovian-Oxfordian formation at a regional scale. C. R. Géoscience 338, 917-930.
- Gaucher, E. (2007). Caractérisation géochimique des forages PAC et nouvelles modélisations THERMOAR. Rapport BRGM/RP-54416-FR, 137 p.
- Gold, T. (1992). The deep, hot biosphere. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 6045–6049.
- Gorshkov, A.I., Drits, V.A., Dubinina, G.A., Bogdanova, O. A. and Sivtsov, A. V. (1992). The role of bacterial activity in the formation of hydrothermal Fe- Mn-formations in the northern part of the Lau Basin (south-western part of the Pacific Ocean). Izvestiya - Akademiya Nauk, Seriya Geologicheskaya. 9, 84-93.
- Geesey, G., (1991). What is biocorrosion? Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. In: Flemming, H.C., Geesey, G.G. (Eds.), Proceedings of the International Workshop on Industrial Biofouling and Biocorrosion. Springer- Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Grogan, H. A. and MC Kinley, I.G. (1989). An approach to microbial modelling. Nagra cedra cisra Technical Report 89-06.
- Grybos, M., Michot, L.J., Skiba, M., Billard, P. and Mustin, C. (2010) Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles: Evidence for basal surface reactivity of nontronite. Journal of Colloid and Interface Science. 343(2), 433-438.
- Guillaume, D., Neaman, A., Cathelineau, M., Mosser-Ruck, R., Peiffert, C., Abdelmoula, M., Dubessy, J., Villiéras, F., Baronnet, A. and Michau, N. (2003). Experimental synthesis of chlorite from smectite at 300°C in the presence of metallic Fe, Clay Minerals. 38, 281-302.
- Guillaume, D., Neaman, A., Cathelineau, M., Mosser-Ruck, R., Peiffert, C., Abdelmoula, M., Dubessy J., Villiéras, F. and Michau, N. (2004). Experimental study of the transformation of smectite at 80 and 300°C in the presence of Fe oxides, Clay Minerals. 39, 17-34.
- Haas, J.R. (2004). Effects of cultivation conditions on acid-base titration properties of *Shewanella putrefaciens*. Chemical Geology. 209(1-2), 67-81.
- Habert, B. (2001). Réactivité du fer dans les gels et les smectites. Thèse en Sciences des matériaux, Université Paris 6, Paris, 227 p.
- Habert, B., Jullien, M., Kohler, E. and Bonnin, D. (2006). Redox of iron in smectites. Clay Science. 12 (2), 149-153.
- Hanselmann, K.W. (1986). Microbially Mediated Processes in Environmental Chemistry (Lake-Sediments as Model Systems). Chimia 40(5), 146-159.
- Hecht, M.A., Dupont, M. and Ducros, P. (1966). Etude des phénomènes de transport de l'eau adsorbée dans certains minéraux argileux par la résonance magnétique nucléaire. Bulletin de la Société française de Minéralogie et Cristallographie. LXXXIX, 6-13.
- Heitz, E. (1996). Mechanistically based prevention strategies of flow-induced corrosion. Electrochimica Acta. 41(4), 503-509.
- Hernandez, M.E. and Newman, D.K. (2001). Extracellular electron transfer. Cell Mol. Life Sci. 58, 1562-1571.
- Herrera, L.K. and Videla, H.A. (2009). Role of iron-reducing bacteria in corrosion and protection of carbon steel. International Biodeterioration and Biodegradation. 63(7), 891-895.
- Hillier, S (1993). Origin, diagenesis and mineralogy of chlorite minerals in Devonian lacustrine mudrocks, Orcadian basin, Scotland. Clays clay Miner. 41, 240-259.
- Hillier, S. and Velde, B. (1992). Chlorite interstratified with a 7 Å mineral: an example from offshore Norway and possible implications for the interpretations of the composition of diagenetic chlorites. Clay Minerals. 27, 475-486.
- Hilton, J., Lishman, J.P. and Chapman, J.S. (1986). Magnetic and chemical characterization of a diagenetic magnetic mineral formed in the sediments of productive lakes. Chem. Geol. 56, 325–333.

- Hoehler, T.M., Alperin, M.J., Albert, D.B. and Martens, C.S. (1998). Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 62(10), 1745-1756.
- Hoehler, T.M., Alperin, M.J., Albert, D.B. and Martens, C.S. (2001). Apparent minimum free energy requirements for methanogenic Archaea and sulfate-reducing bacteria in anoxic marine sediment. *FEMS Microbiology Ecology.* 38(1), 33-41.
- Hofmann, B. A. (1999). *Geochemistry of Natural Redox Fronts A Review.* Natural History Museum National Cooperative for the Disposal of Radioactive Waste. Bern, 99-05, 156-156.
- Horikoshi, K. (1998). Barophiles : deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment. *Current Opinion in Microbiology.* 1, 291-295.
- Hornibrook, E.R.C. and Longstaffe, F.J. (1996). Berthierine from the lower cretaceous clearwater formation, Alberta, Canada. 44, 1-21.
- Hower, J. (1981). Shale diagenesis. In *Short course in clays and the resource geologist*, Longstaff F. J. ed., Miner. Assoc. Canada. 60-80.
- Huber, R., Kurr, M., Jannasch, H. W. and Stetter, K. O. (1989). A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110°C. *Nature.* 342(6251), 833-834.
- Ikegami, A., Nakasone, K., Kato, C., Nakamura, Y., Yoshikawa, I., Usami, R and Horikoshi, K. (2000). Glutamine synthetase gene expression at elevated hydrostatic pressure in a deep-sea piezophilic *Shewanella violacea*. *FEMS Microbiol Lett.* 192, 91-95.
- Iverson, W.P. (1986). The role of phosphorus and hydrogen sulfide in the anaerobic corrosion of iron and the possible detection of this corrosion by an electrochemical noise technique. In *biological Induced Corrosion*, ed. NACE, Houston.
- Jahn, M.K. and Haderlein, S.B. (2005). Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and O-xylène in sediment-free iron-reducing enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol.* 71, 3355-3358.
- Jaisi, D.P., Dong, H.L. and Liu, C.X. (2007). Influence of biogenic Fe(II) on the extent of microbial reduction of Fe(III) in clay minerals nontronite, illite, and chlorite. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 71, 1145-1158.
- Jeannings, S. and Thompson G.R. (1987). Diagenesis in the Plio-Pleistocene sediments of the Colorado River delta, southern California. *J. Sedim. Petrol.* 56, 89-98.
- Jeanthon, C., Reysenbach, A.L., L'Haridon, S., Gambacorta, A., Pace, N.R., Glenat, P. and Prieur, D. (1995). *Thermotoga subterranea* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir. *Arch Microbiol.* 164, 91-97.
- Jestin, A., Libert, M., Thouvenot, P., Sellier, R. and Bournazel, J.P. (2004). Biodégradation de matrices cimentaires. *Revue Européenne de Génie Civil.* 8(9-10), 1087-1104.
- Jullien, M., Raynal, J., Kohler, E. and Bildstein, O. (2005). Physicochemical Reactivity in Clay-Rich Materials: Tools for safety assessment. *Oil and Gas Science and Technology. Rev. IFP.* 60(1), 107-120.
- Jullien, M. (2006). Les smectites, vecteur de la réactivité physicochimique dans les systèmes argileux de confinement. Thèse Habilitation à diriger les recherches. INPL, Nancy.
- Kappler, A (2005). Deposition of banded iron formations by photoautotrophic Fe(II)-oxidizing bacteria. *Geology.* 33, 865-868.
- Karlin, R. and Levi, S. (1983). Diagenesis of magnetic minerals in recent haemipelagic sediments. *Nature* 303, 327-330.
- Kato, C., Sato, T. and Horikoshi, K. (1995). Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples. *Biodiv Conserv.* 4, 1-9
- Kawano, M. and Tomita, K. (2001). Microbial biomineralization in weathered volcanic ash deposit and formation of biogenic minerals by experimental incubation. *American Mineralogist.* 86(4), 400-410.
- Kim, J.W., Furukawa, Y., Daulton, T. L., Lavoie, D. and Newell, S. W. (2003). Characterization of microbially Fe(III)-reduced nontronite: Environmental cell-transmission electron microscopy study. *Clays and Clay Minerals.* 51(4), 382-389.
- Kim, J., Dong, H., Seabaugh, J., Newell, S.W. and Eberl, D. D. (2004). Role of Microbes in the Smectite-to-Illite Reaction. *Science.* 303(5659), 830-832.

- Kim, J.W., Furukawa, Y., Dong H. and Newell, S. W. (2005). The effect of microbial Fe(III) reduction on smectite flocculation. *Clays and Clay Minerals*. 53(6), 572-579.
- Kivisakk, U., Espelid, B. and Féron, D. (2010). Methodology of crevice corrosion testing for stainless steels in natural and treated seawaters. Published by Maney, Leeds, UK
- Kohler, B., A. Singer. and P. Stoffers. (1994). Biogenic nontronite from marine white smoker chimneys. *Clays and Clay Minerals*. 42(6), 689-701.
- Kohler, E. (2005). La réactivité des matériaux argileux sous gradient thermique. Ph.D. thesis. Physical chemistry Department, Evry Val d'Essonne University.
- Komadel, P and Stucki, J. W. (1988). Quantitative assay of minerals for Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> using 1,10-phenanthroline: iii. A rapid photochemical method. *Clays and Clay Minerals*. 36 (4), 379-381.
- Konhauser, K. (2007). Introduction to Geomicrobiology. Oxford, Blackwell Publishing.
- Kostka, J.E. and Nealson, K.H. (1995). Dissolution and reduction of magnetite by bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2535–2540.
- Kostka, J.E. (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.
- Kostka, J.E. and Nealson K.H. (1998). Isolation, cultivation, and characterization of iron- and manganese-reducing bacteria. In *Techniques in Microbial Ecology*. (ed. R. S. Burlage et al.), 3, 58–78. Oxford University Press.
- Kostka, J.E., WU, J., Nealson, K.H. and Stucki, J.W. (1999). The impact of structural Fe(III) reduction by bacteria on the surface chemistry of smectite clay minerals. *Geochim.Cosmochim. Acta*. 63(22), 3705-3713.
- Landa, E.R. (2004). Uranium mill tailings: nuclear waste and natural laboratory for geochemical and radioecological investigations. *Journal of Environmental Radioactivity*. 77(1), 1-27.
- Lanson, B. (1990). Mise en évidence des mécanismes de transformation des interstratifiés illite/smectite au cours de la diagenèse. Thèse Univ. Paris VI, 366 p.
- Lantenois, S. (2003). Réactivité fer métal/smectites en milieu hydraté à 80°C. Docteur es Physique et chimie des matériaux, Université d'Orléans, Ecole Doctorale Sciences et Technologie, Orléans, 188 p.
- Lantenois, S. and Lanson, B. (2005). Experimental study of smectite interaction with metal Fe at low temperature: 1. Smectite destabilisation. *Clays and Clay Minerals*. 53, 597-612.
- Latrille, C., Jullien, M. and Pozo, C. (2001). Elements transfers in compacted clayey materials under thermal gradient. *Water Rock Interaction Proceeding*. Sardaigne, Cidu, Swets & Zeitlinger.
- Lawrence, J.R. and Taylor, H.P. (1972). Hydrogen and oxygen isotop systematics in weathering profiles. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 36, 1377-1393.
- Lebon, P. (2007). Propriétés de transfert des géomatériaux pour le stockage des déchets radioactifs en formation géologique : concept de confinement et grands axes de recherche et développement. Transfer properties of geomaterials for the storage of radioactive waste in geological formation: Concept of containment and main lines of research and development. *Revue européenne de génie civil*. 11(6), 697-709.
- Lee, W. (1995). Role of sulfate reducing bacteria in corrosion of mild steel : a review. *Biofouling*. 8. 165-194
- Lee, K. and Newman, D.K. (2003). Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. *Applied Microbiology Biotechnology*. 62, 134–139.
- Li, F., An, M., Liu, G. and Duan, D. (2009). Effects of sulfidation of passive film in the presence of SRB on the pitting corrosion behaviors of stainless steels. *Materials Chemistry and Physics*. 113(2-3), 971-976.
- Libert, M., Esnault, L., Jullien, M. and Bildstein, O. (2011). Molecular hydrogen: an abundant energy source for bacterial activity in nuclear waste disposal. *Phys and Chem of the earth*. In press.
- Liermann, L.J., Barnes, A.S., Kalinowski, B.E., Zhou, X. and Brantley, S.L. (2000a). Microenvironments of pH in biofilms grown on dissolving silicate surfaces. *Chemical Geology*. 171(1-2), 1-16.

- Liermann, L.J., Kalinowski, B.E., Brantley, S.L. and Ferry, J.G. (2000b). Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64(4), 587- 602.
- Lin, L.H., Hall, J., Lippmann-Pipke, J., Ward, J.A., Lollar, B.S., DeFlaun, M., Rothmel, R., Moser, D., Gihring, T.M., Mislouack, B. and Onstott, T.C. (2005a). Radiolytic H<sub>2</sub> in continental crust: Nuclear power for deep subsurface microbial communities. *Geochemistry Geophysics Geosystems*. 6.
- Lin, L.H., Slater, G.F., Lollar, B.S., Lacrampe-Couloume, G. and Onstott, T.C. (2005b). The yield and isotopic composition of radiolytic H<sub>2</sub>, a potential energy source for the deep subsurface biosphere. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 69(4), 893-903.
- Lloyd, J.R. and Macaskie, L.E. (2000). Environmental Microbe-Metal Interactions, in: D.R. Lovley, American Society for Microbiology. Press, Washington, DC, p. 277.
- Lloyd, J.R. (2003). Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiology Reviews*. 27(2-3), 411-425.
- Lovley, D.R. and Phillips, E.J.P. (1987). Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1536–1540.
- Lovley, D.R. and Goodwin, S., (1988). Hydrogen concentrations as an indicator of the predominant terminal electron-accepting reactions in aquatic sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52(12), 2993-3003.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A and Landa, E.R. (1991). Microbial reduction of uranium. *Nature*. 350, 413-416.
- Lovley, D.R. (1995). Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *J. Ind. Microbiol.* 14, 85–93.
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Bluntharris, E.L., Phillips, E.J. and Woodward, J.C. (1996). Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*. 382, 445-448.
- Lovley, D.R. (1997). Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS. Microbiology Reviews*. 20(3-4), 305-313.
- Lovley, D.R., Holmes, D.E. and Nevin, K.P. (2004). Dissimilatory Fe(III) an Mn(IV) reduction. *Adv Microb Phys.* 49, 219-286.
- Ly, J. and Stammose, D. (1991). Description of actinides sorption onto clays by ion exchange mechanism. *Migration 91*, Jerez de la Frontera, Espagne.
- Macdonald, D.D., Biaggio, S.R. and Song, H. (1992). Steady-state passive films *J. Electrochem. Soc.* 139, 170- 177.
- McKay, D.S., Gibson, E.K., Thomas-Keprta, K.L., Vali, H., Romanek, C.S., Clement, S.J., Chillier, X.D.F., Maechling, C.R. and Zare, R.N. (1996). Search for past life on Mars: possible relic biogenic activity in Martian meteorite ALH84001. *Science* 273, 924–930.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2003). Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall.
- Marshall, K. C., Stout, R. and Mitchell R. (1971). Selective sorption of bacteria from seawater. *Canadian Journal of Microbiology*. 17(11), 1413-1416.
- Masurat, P. Eriksson, S. and Pedersen, K. (2008). Evidence of indigenous sulphate-reducing bacteria in commercial Wyoming bentonite MX-80. *Applied Clay Science*. 47(1-2), 51-57.
- Matray, J.M., Savoye, S. and Cabrera, J. (2007). Desaturation and structure relationships around drifts excavated in the well-compacted Tournemire's argillite (Aveyron, France). *Engineering Geology*. 90(1-2), 1-16.
- Maurice, P. A. and Warren. L.A. (2006). Introduction to geomicrobiology: Microbial interactions with minerals. *CMS Workshop Lectures*. 14, 1-35.
- Mauclaire, L. Mckenzie, J.A. Schwyn, B. and Bossart, P. (2006). Detection and cultivation of indigenous microorganisms in Mesozoic claystone core samples from the Opalinus Clay Formation (Mont Terri Rock Laboratory). *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 32(1-7), 232-240.
- Marty, N.C.M., Fritz, B., Clément, A. and Michau, N. (2010). Modelling the long term alteration of the engineered bentonite barrier in an underground radioactive waste repository. *Applied Clay Science*. 47(1-2), 82-90.
- Merola, R and McGuire, M. M. (2009). Crystallographic site distribution and redox activity of Fe in nontronites determined by optical spectroscopy. *Clays and Clay Minerals*. 57(6), 771-778.

- Meunier, A. (2003). Argiles. Collection Geosciences, Editions scientifiques GB, Contemporary Publishing International, GB Science Publisher, 433 p.
- Michot, L. J., Bihannic, I., Maddi, S., Funari, S. S., Baravian, C., Levitz, P. and Davidson, P. (2006). Liquid-crystalline aqueous clay suspensions. PNAS. 103 (44), 16101-16104.
- Miot, J., Benzerara, K., Obst, M., Kappler, A., Hegler, F., Schädler, S., Bouchez, C., Guyot, F. and Morin, G. (2009). Extracellular Iron Biomineralization by Photoautotrophic Iron-Oxidizing Bacteria. Appl. Envir. Microbiol. 75, 5586 - 5591.
- Motamedi, M. Karnland, O. and Pedersen, K. (1996). Survival of sulphate reducing bacteria at different water activities in compacted bentonite. FEMS Microbiology Letters. 141, 83-87.
- Motellier, S., Ly, J., Gorgeon, L., Charles, Y., Hainos, D., Meier P. and Page, J. (2003). Proposed indirect determination of the interstitial water composition of an argillaceous rock using the ion-exchangers theory. Application to the callovo-oxfordian lowwater-content formation. Appl. Geochem. 18 (10), 1517-1530.
- Monnier, G., Stengel, P. and Fies, J.C. (1973). Une méthode de mesure de la densité apparente de petits agglomérats terreux. Application à l'analyse de système de porosité du sol. Ann. Agron. 24, 533-545.
- Mosser-Ruck, R., Cathelineau, M., Guillaume, D., Charpentier, D., Rousset, D., Barres, O. and Michau, N. (2010). Effects of temperature, pH, and iron/clay and liquid/clay ratios on experimental conversion of dioctahedral smectite to berthierine, chlorite, vermiculite, or saponite. Clays and Clay Minerals. 58, 280-291
- Murray, H. H. (1977). Industrial Minerals Outlook for the Paper Industrie. TAPPI 60(8), 70-72.
- Mustin, C., Berthelin, J., Marion, P. and de Donato, P. (1992). Corrosion and electrochemical oxidation of a pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. Appl. Env. Microbiol. 58, 1175-1182
- Myers, C.R. and Nealson, K.H. (1988). Microbial reduction of manganese oxides: Interaction with iron and sulfure. Geochim. Cosmochim. Acta 52 (11), 2727-2732.
- Nadson, G. A. (1903). Mikroorganizmy kak geologicheskiesyatelii (Microorganisms as Geological Agents). d. St. Petersburg, Tip. Saikina.
- Nazina, T. N., Kosareva, I. M., Petrunyaka, V. V., Savushkina, M. K., Kudriavtsev, E. G., Lebedev, V. A., Ahunov, V. D., Revenko, Y. A., Khafizov, R. R., Osipov, G. A., Belyaev S. S. and Ivanov. M. V. (2004). Microbiology of formation waters from the deep repository of liquid radioactive wastes Severnyi. FEMS Microbiology Ecology. 49(1),97-107.
- Neilands, J.B. (1974). Iron and its role in microbial physiology. in: Microbial iron metabolism (J.B. Neilands, editor), Academic Press, New York, 3-34.
- Neilands, J.B. (1989a). Siderophore systems of bacteria and fungi. In poindexter, J.S. and Leadbetter, E.R. (eds), Bacteria in Nature. Plenum press, Newyork, 141-163.
- Neilands, J. B. (1989b). Molecular mechanisms of iron regulation of siderophore systems in gram negative bacteria Journal of Inorganic Biochemistry. 36(3-4), 320-339.
- Nealson, K.H and Little, B. (1997). Breathing manganese and iron: solid-state respiration. Adv. Appl. Microbiol. 45, 213-239.
- Nealson, K.H., Inagaki, F. and Takai, K. (2005). Hydrogen-driven subsurface lithoautotrophic microbial ecosystems (SLiMEs): do they exist and why should we care? Trends in Microbiology. 13(9), 405-410.
- O'Reilly, S. E., Furukawa Y. and Newell, S. (2006). Dissolution and microbial Fe(III) reduction of nontronite (NAu-1). Chemical Geology. 235(1-2), 1-11.
- Odin, G.S. (1988). Green Marine Clays development in Sedimentology. Elsevier, Amsterdam, 45, pages.
- Odin, G. S. (1990). Clay mineral formation at the continent-ocean boundary : the verdine facies. Clay Minerals, 25, 477-483.
- OECD, (1999). Confidence in the evaluation of safety deep geological repositories - Its development and communication. N.E. Agency.
- OECD, (2006). Safety of Geological Disposal of High-level and Long-lived Radioactive Waste in France: An International Peer Review of the Dossier 2005 Argile Concerning Disposal in the Callovo-Oxfordian Formation. OECD Papers 6, 88-164.

- Panin, V.V., Karavaiko, G.I. and Polkin, S.I. (1985). Mechanism and kinetics of bacterial oxidation of sulphide minerals, in : Karavaiko G.I., Groudev S.N. (Eds.), Biogeotechnology of metals. UNEP, Moscou, URSS, 197–215.
- Papillon, F., Michaud, V., Bataillon, C., Locoge P. and Jullien, M. (1999). Expériences « Module Corrosion à 25 et 80°C » : Synthèse et analyse des résultats. NT CEA SESD 99-35, 58 p.
- Papillon, F., Jullien, M. and Bataillon, C. (2003). Carbon steel behaviour in compacted clay : two long term tests for corrosion prediction. In Prediction of the long term corrosion behaviour in nuclear waste systems. Féron and MacDonald Eds., European Federation of Corrosion Publications.36, 439-454, Maney Publishing, UK.
- Patriarche, D., Ledoux, E., Simon-Coinçon, R., Michelot, J.L. and Cabrera, J. (2004). Characterization and modeling of diffusion process for mass transport through the Tournemire argillites (Aveyron, France). Applied Clay Science. 26(1-4), 109-122.
- Parkes, R.J., Cragg B.A., Bale S.J., Getliff J.M., Goodman K., Rochelle P.A., Fry J.C., Weightmann A.J. and Harvey S.M., (1994). Deep bacterial biosphere in Pacific Ocean sediments. Nature. 371, 410–413.
- Parkes, R.J. (2000). A case of bacterial immortality. Nature. 407, 844-845.
- Pedersen, K. (1996). Investigations of subterranean bacteria in deep crystalline bedrock and their importance for the disposal of nuclear waste. Canadian Journal of Microbiology. 42, 382-391.
- Pedersen, K. (1997). Microbial life in granitic rock. FEMS Microbiol. Rev. 20, 399-414.
- Pedersen, K., Motamedi., M. Karnland O. and Sandén, T. (2000a). Cultivability of microorganisms introduced into a compacted bentonite clay buffer under high-level radioactive waste. Engineering geology. 58(2), 149-161.
- Pedersen, K., Motamedi., M. Karnland O. and Sandén, T. (2000b). Mixing and sulphate reducing activity of bacteria in swelling compacted bentonite clay at high-level radioactive waste repository conditions. Journal of Applied Microbiology. (89) 1038-1047.
- Pedersen, K., Nilsson, E., Arlinger, J., Hallbeck, L and O'Neill A. (2004). Distribution, diversity and activity of microorganisms in the hyperalkaline spring waters of Maqarin in Jordan. Extremophiles. 8,151-164.
- Pelmont, J.(1993). Bactéries et environnement - Adaptations physiologiques. Collection Grenoble Science.
- Perronnet, M. (2004). Réactivité des matériaux argileux dans un contexte de corrosion métallique. Thèse INPL. ED. SIRPPE. 240p.
- Perronnet, M., Villieras, F. and Jullien, M. (2007). Towards a link between the energetic heterogeneities of the edge faces of smectites and their stability in the context of metallic corrosion. Geochim. Cosmochim. Acta. 71(6),1463-1479.
- Perronnet, M., Jullien, M. and Villieras, F. (2008). Evidence of a critical content in Fe(0) on FoCa7 bentonite reactivity at 80 °C. Applied Clay Science . 38(3-4), 187-202.
- Porrenga, D. H. (1967). Chamosite in recent sediments of the Niger and Orinoco deltas Geologie en Mijnbouw , 44, 400-403.
- Postgate, J.R. (1979). The Sulphate Reducing Bacteria, (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Poulain, S. (2006). Caractérisation microbiologique de l'argile à Opalinus du Mont Terri et de l'argilite du Callovo-Oxfordien de Meuse/Haute-Marne. Thèse Bordeaux I, France.
- Poulain, S., Sergeant, C., Simonoff, M., Le Marrec, C. and Altmann, S. (2008). Microbial investigation of Opalinus Clay, an argillaceous formation as the potential host rock under evaluation for a radioactive waste repository. Geomicrobiology Journal. 25(5), 240-249.
- Powelson, D. K. and Mills, A. L. (1996). Bacterial enrichment at the gas-water interface of a laboratory apparatus. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2593-2597.
- Rainha, V.L. and Fonseca, I.T.E. (1997). Kinetic studies on the SRB influenced corrosion of steel: A first approach. Corrosion Science. 39(4), 807-813.
- Rajasekar, A. and Ganesh Babu, T. (2007). Biodegradation and corrosion behavior of manganese oxidizer Bacillus cereus ACE4 in diesel transporting pipeline. Corrosion Science. 49(6), 2694-2710.

- Raynal, J. and Jullien M. (2006). Experimental and macroscopic evidence of the anomalous state of the water in a clay system. *Clay Science*. 12( 2), 52-56.
- Regeimbal, J., Gleiter, S., Trumpower, B.L., Yu, C.A., Diwakar, M., Ballou D.P. and Bardwell, J.C. (2003). Disulfide bond formation involves a quinhydrone-type charge-transfer complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 13779–13784.
- Rivkina, E. M., Friedmann, E. I. McKay, C. P. and Gilichinsky, D. A. (2000). Metabolic activity of Permafrost Bacteria below the freezing point. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(8), 3230-3233.
- Roden, E.E. and Zachara, J.M. (1996). Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: influence of oxide surface area and potential for cell growth. *Environ. Sci. Technol.* 30, 2368-2372.
- Roden, E.E. (2003). Fe(III) oxide reactivity toward biological versus chemical reduction. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1319-1324.
- Rosenberg, D.R. and Maurice, P.A. (2003). Siderophore adsorption to and dissolution of kaolinite at pH 3 to 7 and 22°C. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 67(2) , 223-229.
- Rozenson, I. and Heller-Kallai, L. (1976). Reduction and oxidation of Fe<sup>3+</sup> in dioctahedral smectites--1: reduction with hydrazine and dithionite. *Clays and Clay Minerals*. 24, 271-282.
- Saffarini, D.A., Dichristina, T.J., Bermudes, D. and Nealson, K.H. (1994). Anaerobic respiration of *Shewanella putrefaciens* requires both chromosomal and plasmid-borne genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 119, 271-277.
- Sambrook, J., Pollack, R. and Sidney Fleischer, L.P. (1974). Basic methodology for cell culture-cell transformation. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 583-592.
- Sanin, S.L., Sanin. F.D. and Bryers. J.D. (2003). Effect of starvation on the Adhesive Properties of xenobiotic degrading Bacteria. *Process Biochemistry*. 38, 909-914.
- Savary, V. and Pagel, M. (1997). The effects of water radiolysis on local redox conditions in the Oklo, Gabon, natural fission reactors 10 and 16. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 61(21), 4479-4494.
- Sayles, F.L. and Mangesldorf, P. C. (1977). The equilibration of clay minerals with sea water: exchange reactions. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 41, 951-960.
- Schaefer, A., Ustohal, P., Harms, H., Stauffer, F., Dracos, T. and Zehnder A.J.B. (1998). Transport of bacteria in unsaturated porous media. *J. Contam. Hydrol.* 33, 149-169.
- Scott, J.H., Nealson, K.H. (1994). A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *J. Bacteriol.* 176, 3408-3411.
- Sévèque, J.L. (1986). Étude expérimentale de la dissolution des minéraux sulfurés en milieu oxydant : application à la prospection minière. Thèse université Paris-6, France.
- Shau, Y., Peacor, D.R. and Essene, E.J. (1993). Formation of magnetite single-domain magnetite in ocean ridge basalts with implications for sea floor magnetism. *Science*. 261, 343–345.
- Shawn Lewenza, R.K., Falsafi, G.W., Gooderham, W.J., McPhee, J.B., Brinkman, F.S.L. and Hancock, R.E.W. (2005). Construction of a mini-Tn5-luxCDABE mutant library in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. A tool for identifying differentially regulated genes *Genome Res.* 15, 583-589.
- Sherman, D.M. and Vergo, N. (1988). Optical (diffuse reflectance) and Mössbauer study of nontronite and related Fe-bearing smectites. *American Mineralogist*. 73, 1346-1354.
- Srodon, J. and Ebert, D.D. (1987). Illite. In "Micas", Bailey S.W. editor, rev. *Miner., Miner. Soc. Amer.* 13, 495-544.
- Steeffel, C.I. (2008). CrunchFlow, Software for Modeling Multicomponent Reactive Flow and Transport. User's Manual. Earth Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, 90 p.
- Steinberg, M., Holtzapffel, T. and Raurureau, M. (1987). Characterization of overgrowth structures formed around individual clay particles during early diagenesis. *Clays Clay Miner.* 35, 189-195.
- Stemmler, S.J., Loyaux-Lawniczak, S. and Berthelin, J. (2004). Effet de la teneur en eau d'un sol sur la réduction bactérienne d'oxydes de fer. *Comptes Rendus Geosciences*, 336(13), 1171-1179.
- Stevens, T.O. and Mckonley, J.P. (1995). Lithoautotrophic Microbial Ecosystems in Deep Basalt Aquifers. *Science*. 270(5235), 450-454.



- Scott, J. and Nealson, K. (1994). A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of *Shewanella putrefaciens*. *J Bacteriol.* 176, 3408-3411.
- Stotzky, G. (1966a). Influence of clay minerals on microorganisms. Effect of particle size, cation exchange capacity, and surface area on bacteria. *Canadian Journal of Microbiology.* 12(6), 1235-1246.
- Stotzky, G. (1966b). Influence of clay minerals on microorganisms. II. Effect of various clay species, homoionic clays, and other particles on bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 12(4), 831-848.
- Stotzky, G. and Rem, L.T. (1966). Influence of clay minerals on microorganisms. I. Montmorillonite and kaolinite on bacteria. *Canadian Journal of Microbiology.* 12(3), 547-563.
- Stotzky, G. and Rem, L.T. (1967). Influence of clay minerals on microorganisms. IV. Montmorillonite and kaolinites on fungi. *Canadian Journal of Microbiology.* 13(11), 1535-1550.
- Stroes-Gascoyne, S. and West, J.M. (1997). Microbial studies in the Canadian nuclear fuel waste management program. *FEMS Microbiology Reviews* 20(3-4), 573-590.
- Stroes-Gascoyne, S., Hamon, C. J., Dixon, D.A. and Martino, J.B. (2007). Microbial analysis of samples from the tunnel sealing experiment at AECL's Underground Research Laboratory. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 32(1-7), 219-231.
- Stookey, L.L. (1970). Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal Chem.* 42, 779-781.
- Stucki, J.W. and Anderson, W. L. (1981). The quantitative assay of minerals for Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> using 1,10-phenanthroline: I. Sources of variability: *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 45, 633-637.
- Stucki, J.W. (2006). Properties and Behaviour of Iron in Clay Minerals. In: *Developments in Clay Science.* Bergaya, F. Theng B.K.G. and Lagaly, G. 8 (1), 423-475.
- Stucki, J.W. and Kostka, J.E. (2006). Microbial reduction of iron in smectite. *Comptes Rendus Geosciences.* 338(6-7), 468-475.
- Suzuki, Y. and Banfield, J.F. (1999). Uranium: Mineralogy, Geochemistry and the Environment. in: Burns, F.C. Finch, R. (Eds.) 38. *Mineralogic Society of America.* Washington DC, USA, 388-393.
- Tallandier, 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. NT.Andra. ASCM 03.0042.
- Taylor, K. G. and Curtis, C. D. (1995). Stability and facies association of early diagenetic mineral assemblages: an example from a jurassic ironstone-mudstone succession. *U.K. Journal of Sedimentary Research.* A65, 358-368.
- Thamdrup, B. (2000). Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments. In: *Advances in Microbial Ecology*. Schink B. (ed) Kluwer academic/Plenum publishers, New York, 41-84.
- Thauer, R.K., Jungermann, K. and Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews.* 41(1), 100-180.
- Thauer, R.K. and Morris J.G.(1984). Metabolism of chemotrophic anaerobes : old views and new aspects. In *The microbe : part II*, Kelly, D.P., Carr N.G. editors, Cambridge university press.
- Thouveny, N., de Beaulieu, J.L., Bonifay, E., Creer, K.M., Guiot, J., Icole, M., Johnson, S., Jouzel, J., Reille, M., Williams, T., Williamson, D. (1994). Climate variations in Europe over the past 140 kyr deduced from rock magnetism. *Nature.* 371, 503.
- Todar, K. (2006). *Textbook of Bacteriology*, University of Wisconsin-Madison.
- Toniazzo, V. and Mustin, C. (1999). Superficial compounds produced by Fe(III) mineral oxidation as essential reactants for bio-oxidation of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Process Metallurgy.* Elsevier. 9(1), 177-186.
- Urios, L., Marsal, F., Pellegrini, D. and Magot, M. (2010). Evidence and identification of microorganisms in argillite from Tournemire (France). *Clays in natural and engineered barriers for radioactive waste confinement.*, 4th international meeting, March 2010, Nantes, France.
- Van Geet, M. (2004). Large Scale In Situ Demonstration Test for Repository Sealing in an Argillaceous Host Rock- The RESEAL Project. EuradWaste04.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W. and Zehnder, A.J.B. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews.* 54(1), 75-87.

- Vargas, M., Kashefi, K., Blunt-Harris, E.L. and Lovley, D.R. (1998). Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature*. 395, 65–67.
- Végliá, P. (1996). Lixiviation microbienne de boues résiduelles polluées par des métaux lourds. Thèse doctorale Université de Nancy, France.
- Végliá, P., Berthelin, J., Besnainou, B. and Sahut, C. (1996). Procédé de dépollution de sols et de déchets contenant des hydroxydes de fer et de métaux lourds. N°96401650.5-2309. Office Européen des brevets. P.B. 5818-Patentiaan 2, 2280 HV Rijswijk (ZH).
- Velde, B. (1995). Compaction and diagenesis. In "origin and mineralogy of clays. Clays and the environment. Velde B. ed., Springer, 220-246
- Videla, H.A. (1996). Corrosion inhibition by bacteria. In: Manual of Biocorrosion. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 121–135.
- Vignais, P.M. (2002). Continuous monitoring of the activation and activity of [NiFe]-hydrogenases by membrane-inlet mass spectrometry. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(11-12), 1441-1448.
- Vignais, P.M. and Billoud, B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview. *Chemical Reviews*. 107(10), 4206-4272.
- Villiéras, F. (1993). Etude des modifications des propriétés thermiques du talc et de la chlorite par traitement thermique. Thèse Doctorat ENSG I.N.P.L., Nancy, France.
- Viollier, E., Inglett, P.W., Hunter, K., Roychoudhury, A.N. and Van Cappellen, P. (2000). The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. *Applied Geochemistry*. 15(6), 785-790.
- Vinsot, A., Mettler, S. and Wechner, S. (2008). In situ characterization of the Callovo-Oxfordian pore water characterization. *Phys. Chem. of the Earth*. 33, S75-S78.
- Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M. and Fontecillacamps, J. C. (1995). Crystal-Structure of the Nickel-Iron Hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373(6515), 580-587.
- Walker, J.C.G. (1984). Suboxic diagenesis in banded iron formations. *Nature* 309, 340–342.
- Walker, J.C.G. (1987). Was the Archaean biosphere upside down? *Nature*. 329, 710–712.
- Walker, J. R. and Thompson, G. R. (1990). Structural variations in chlorite and illite in a diagenetic sequence from the Imperial Valley, California. *Clays and Clay Minerals*. 38, 315-321.
- West, J.M., Mckinley, I.G., Stroes-Gascoyne, S. and Livens, M.J. (2002). Chapter 9 Microbial effects on waste repository materials. In *Radioactivity in the Environment*. 255-277. Elsevier Science Ltd.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. and Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes, The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6578-6583.
- Yayanos, A.A. (1981). Reversible inactivation of deep-sea amphipods (*Paralicella capresca*) by a decompression from 601 bars to atmospheric pressure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Physiology*. 69(3), 563-565.
- Yayanos, A.A. and Moselio, S. (2009). High-Pressure Habitats, *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, Oxford, 228-239.
- Zachara, J.M., Fredrickson, J.K., Fredrickson, L., Fredrickson, S.-W., Kennedy, D.W., Smith, S.C., and Gassman, P.L. (1998). Bacterial reduction of crystalline Fe<sup>3+</sup> oxides in single phase suspensions and subsurface materials. *Am. Mineral. J.* 83, 1426– 1443.
- Zhou, H.M., Wang, J.Q. and Zang, Q.S. (2007). Study on the Effect of Cl<sup>-</sup> Concentration on the corrosion Fatigue Damage in a Rolled AZ31B Magnesium Alloy by Acoustic Emission. *Key Engineering Materials*. 353, 327-330.



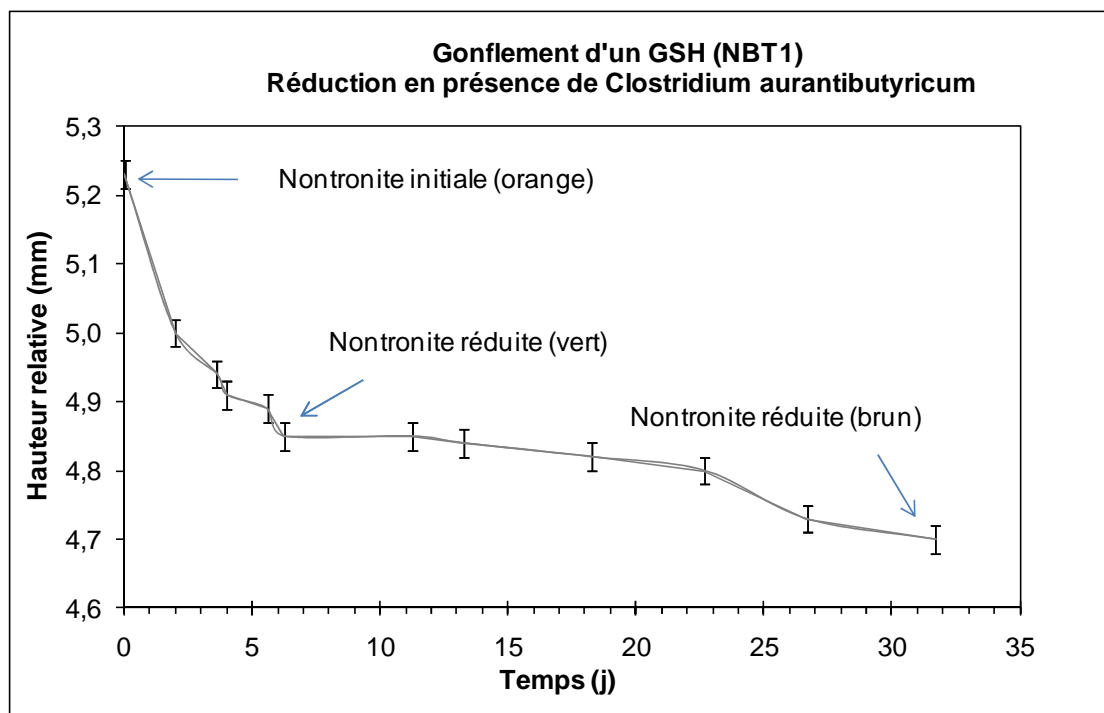
## ANNEXE

**1 : Impact sur les propriétés de gonflement : aspect mécanique**

L'aspect mécanique du GIH-nontronite est caractérisé par une mesure précise via un palper, variation de 0,01mm (Figure 85). Lors de la réduction bactérienne du Fe(III) structural, des variations volumiques du GIH (dégonflement) sont observées. Une cinétique de gonflement est réalisée en présence de la bactérie *Clostridium aurantibutyricum* (Figure 86).



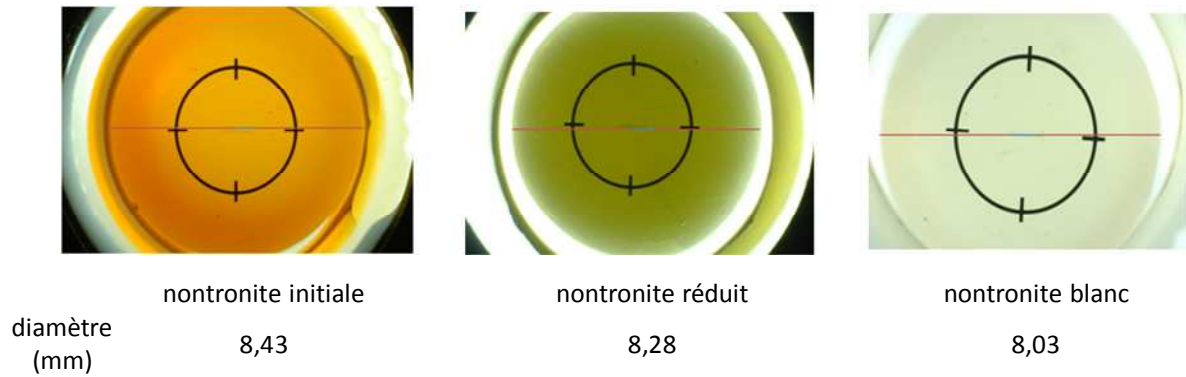
**Figure 85 : Module expérimental de mesure de gonflement du GIH-nontronite par un palper en condition anoxique en jarre (N<sub>2</sub> 90% CO<sub>2</sub> 10%)**



**Figure 86 : Cinétique de dégonflement du GIH-nontronite.**

Les variations de hauteur du GIH sont mesurées au cours du temps via un palper (0,01mm de précision). La réduction bactérienne entraîne une diminution de la hauteur (mm) due à une rétraction du GIH lors de la réduction du Fe(III) structural de la nontronite  $\text{Nau}_2$  (Figure 87). Cette variation peut être expliquée par un échange d'ions important lors de la réduction bactérienne. En effet les cations de l'interfoliaire de la nontronite ont été échangés initialement au  $\text{Na}^+$  (voir protocole), qui possède un grand rayon ionique. La réduction du Fe(III) entraîne une diminution de la charge dans l'octaèdre ce qui libère le  $\text{Na}^+$  interfoliaire compensateur de la charge du réseau cristallin (échange avec les protons présents) et donc une diminution de la taille de l'interfoliaire.

D'autre part, la déstabilisation des feuillets entraîne aussi une dissolution et donc une diminution de la densité de particules de nontronite et donc du potentiel gonflant dans le GIH. Une mesure du diamètre des GIH est décrite sur la figure 89, lors des phases d'altérations microbiennes (initiale, réduit, blanchi). Le diamètre du GIH-nontronite diminue d'autant plus au cours du temps, que l'altération est importante (stade GIH-blanchi). En effet la destruction des structures cristallines engendre une perte des centres colorés (structure absorbant la lumière et émettant une coloration). Ceci peut s'expliquer par une dissolution des particules de nontronite engendrant donc une diminution de la densité particulaire gonflante dans le GIH. Cependant, les transformations minéralogiques au sein du gel doivent être précisées avant de conclure sur un quelconque processus réactionnel. Des analyses cristallographiques des GIH altérés sont en cours



**Figure 87 : Mesure des diamètres des GIH-nontronite au cours de l'altération bactérienne.**

**En conclusion, Cette première étude seulement qualitative, décrit l'effet de l'activité des bactéries ferriréductrices sur le comportement mécanique d'un milieu poreux. Ces résultats mettent en avant les possibles altérations induites par ces bactéries sur ce système, notamment sur les variations de gonflement des structures argileuses. Cependant ces études ne permettent pas de faire une comparaison avec le comportement mécanique d'une barrière argileuse naturelle mais elles décrivent la possibilité d'une variation de volume dans les matériaux argileux poreux.**

## 2. Impact sur les propriétés de diffusion : aspect de transport en milieu argileux poreux

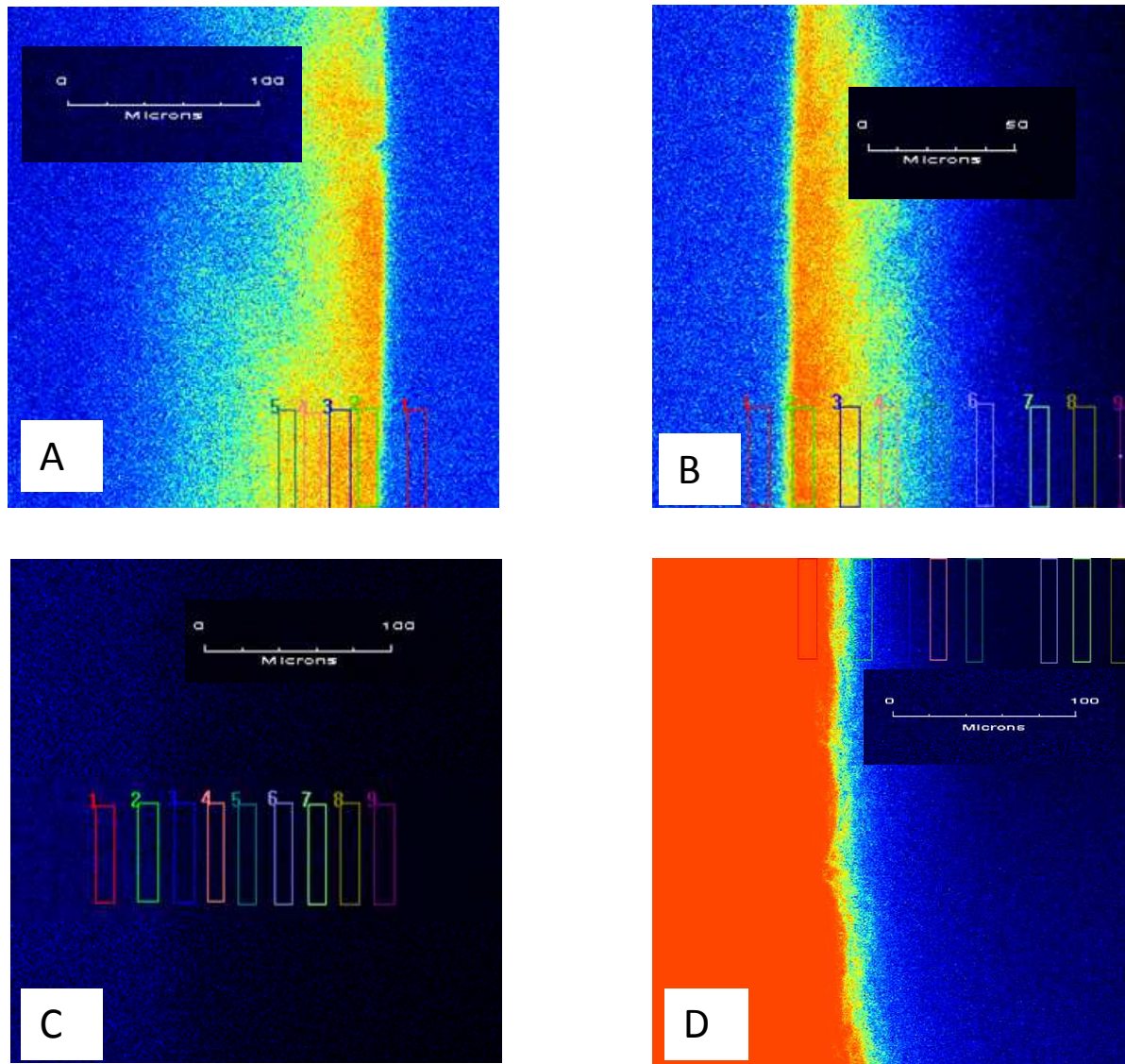
Deux sondes ioniques sont utilisées comme des traceurs chromophores (hydrophile SR6G et hydrophobe SRB, SulfoRhodamine B) afin de mesurer la diffusion dans les GIH-nontronite par fluorescence au microscope confocal (Figure 88). Le protocole est décrit dans le chapitre 1.

	Gel Silice GS	Gel Initial GSH NBT1	Gel Réduit GSH NBT1	Gel blanchit GSH NBT1	Gel Réduit* Cœur
	Zone 1	Zone 1	Zone 1	Zone 1	Zone 1
Profondeur (µm)	0-45	0-50	0-10	0-45	0-40
<b>SR6G</b>					
ADC ( $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ )	8,97	7,38	0,015	10,5	0,188
$R^2$ :	0,79	0,98	1	1	0,65
$n$	4	4	2	3	4
<b>SRB</b>					
ADC ( $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ )	8,99	4,03	0,138	7,77	4,61
$R^2$ :	1	0,99	1	0,99	0,8
$n$	4	4	2	3	3
<b>Tortuosité</b>	0,025	0,011	n.d	0,021	0,013
<b>Ratio 6G/B</b>	1	1,83	0,11	1,35	0,04

**Tableau 24 : Mesure des vitesses de diffusions dans les GIH-nontronite avant et après altération bactérienne. Modèle utilisé  $T90 = k \cdot L2/De$  avec  $k = 1.03$  (symétrie cylindrique) ; Apparent diffusion constant (ADC) or effective lateral diffusion (De) exprimé en  $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$  ; Tortuosité ( $1/\tau$ ) déterminée pour SRB  $1/\tau = De/Daq$  avec  $Daq = 3,65 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  à  $25^\circ\text{C}$  pour SRB (diffusion dans l'eau). \* Calcul à partir du front de diffusion (T50)**

La diffusion apparente (ADC), exprimée en  $\text{cm}^2/\text{s}$ , est déterminée pour chaque sonde ionique au sein des GIH (Tableau 24). Une comparaison des diffusions au sein des différents matériaux bio-altérés est décrite ci-dessous.

- La valeur de diffusion dans le gel de silice détermine la vitesse des sondes initiales dans les matériaux et le fait qu'elles n'interagissent pas avec le gel (vitesse égale entre les 2 sondes).
- Lorsque les particules de nontronite sont introduites dans le GIH : la vitesse de diffusion diminue, ce qui indique que la diffusion est dépendante de la densité de particules. De même ce critère est validé par le fait que la diffusion est plus lente dans le GIH initial à  $4 \text{ m}^2$  de nontronite que dans le GIH initial à  $1 \text{ m}^2$  de nontronite (non montré ici). Le second aspect que l'on peut observer est que la sonde hydrophobe est retenue lorsqu'elle diffuse au contact des nontronites.
- Après réduction bactérienne « gel réduit », une diminution importante de la vitesse de diffusion des sondes ioniques au sein du gel est observée. La réduction semble modifier les propriétés structurales et de porosité (augmentation de la densité particulaire) du GIH-nontronite initiale. Cependant il est difficile de relier la variation du coefficient de diffusion et la variation de la porosité. D'autres paramètres peuvent jouer notamment les facteurs de tortuosité et de constrictivité.
- Lorsque le gel est blanchi suite à l'action des  $\text{H}^+$ , produits du métabolisme bactérien, la diffusion des sondes ioniques est augmentée (la sonde hydrophile diffuse même plus vite que dans le GIH sans nontronite « gel de silice », ce qui induit que la structure interne du gel de silice a été altérée, sûrement par augmentation de la porosité ainsi que par la diminution de la densité particulaire via une forte dissolution des éléments structuraux.



**Figure 88: Images de diffusion des sondes ioniques dans le GIH (A), le GIH-nontronite (B), le GIH-nontronite réduit (C), le GIH-nontronite blanchi (D) après altération bactérienne.**





## **Publications acceptées en cours et à venir**

---

Esnault L., Libert M., Jullien M., Mustin C. 2009. Availability of nutrient sources for bacterial development in deep clay environments. *Geochimica Cosmochimica Acta*. 73, 338

Esnault L., Libert M., Bildstein O., Jullien M., 2010. Clay-Iron Reducing Bacteria interaction in deep geological environment: experimental and modeling approach. *Water-Rock Interaction* 13, 939-942.

Esnault L., Jullien M., Mustin C., Bildstein O., Libert M. Reactivation of metallic corrosion processes sustained by Iron-Reducing Bacteria: implication on long-term stability of protective layers. *Physics and Chemistry of the earth*, in press.

Libert M., Esnault L., Jullien M., Bildstein O. Molecular Hydrogen : an energy source for bacterial activity in nuclear waste disposal. *Physics and chemistry of the earth*, in press.

Esnault L., Libert M., Bildstein O., Jullien M., Marsal F., Mustin C. Impact of iron-reducing bacteria on the properties of argillites in the context of geological radioactive waste disposal  
Submitted to *Applied Clay Science*

Esnault L., Jullien M., Mustin C., Bornschneck D., Libert M. Reaction parameters for smectites alteration induced by IRB at low temperature, en preparation

Esnault L., Mustin C., Grybos M., Libert M., Jullien M. Electron Shuttle transport: efficient mechanism occurring at a distance for IRB respiration, en preparation

## **Communications orales dans congrès internationaux :**

---

Esnault L., Libert M., Jullien M. 2008. Reactivity of ferric - reducing bacteria.  
*7th International Symposium for Subsurface Microbiology, Shizuoka, Japan, 2008*

Esnault L., Libert M., Jullien M. 2008. Role of clay Fe(III) on Iron-reducing bacteria activity in deep geological environment. *XIV International Clay Conference, Castellaneta Marina Italie 2009*

Libert M., Esnault L. 2010. Molecular Hydrogen: an energy source for bacterial activity in nuclear waste disposal. *4th International Meeting on Clays in natural and engineered barriers for radioactive waste confinement. Andra, Nantes, 2010.*

## **Communications sous forme de poster :**

---

Esnault L., Libert M., Mustin C., Jullien M. 2009. Availability of nutrient sources for bacterial development in deep clay environments. *Goldschmidt Conference, Davos, Suisse 2009*

Esnault L., Jullien M., Mustin C., Libert M. 2010. Microbial impact on metallic corrosion processes. Case of Iron Reducing Bacteria. *4th International Meeting on Clays in natural and engineered barriers for radioactive waste confinement. Andra, Nantes, 2010.*

## RÉSUMÉ

Cette thèse s'est attachée à décrire le concept dynamique d'une activité microbiologique viable et durable en conditions de stockage géologique profond et à évaluer son impact sur les propriétés de confinement et les composants du stockage. Ainsi, dans cette étude, un modèle bactérien basé sur la ferriréduction a été choisi pour ses critères de viabilité dans le système et sa capacité à altérer les matériaux dans les conditions du stockage.

Les principaux résultats de ce travail de thèse ont permis de démontrer la capacité du milieu à supporter l'activité bactérienne ferriréductrice et les conditions de son développement dans les environnements argileux profonds. Il a été clairement montré la biodisponibilité du Fe(III) structural des matériaux argileux et des oxydes de fer produits lors des processus de corrosion métallique. Dans ce système, la corrosion paraît être un facteur positif pour les activités bactériennes notamment en produisant une source énergétique, l'hydrogène. Les activités bactériennes ferriréductrices peuvent entraîner une reprise de la corrosion métallique via la consommation des oxydes de fer de la couche passivante. La conséquence directe pourrait être une diminution de la durée de vie des enveloppes métalliques de colisage. Dans le cas des matériaux argileux ferrifères, les conséquences d'une telle activité sont telles qu'elles peuvent avoir un impact sur l'ensemble de l'édifice poreux que ce soit en termes de réactivité chimique des matériaux ou de comportement physique de la barrière argileuse. Un des résultats les plus marquants est la cristallisation de nouvelles phases argileuses à des températures très basses, inférieures à 40°C, témoignant de l'influence considérable de l'activité microbienne anaérobie dans les transformations minéralogiques des minéraux argileux. De plus, il faut noter que ces expériences ont permis de visualiser pour la première fois un mécanisme de respiration bactérienne à distance via une extension de la disponibilité d'éléments essentiels, ici le Fe<sup>3+</sup>.

En conclusion, ces résultats ont clairement démontré l'impact du facteur microbiologique sur la réactivité des matériaux argileux et métalliques tout en s'appuyant sur des paramètres de contrôle de l'activité bactérienne. La pertinence de la prise en compte de ces activités microbiologiques dans le cas des évaluations de sûreté d'un stockage est ainsi établie

**Mots clés :** Activité bactérienne ferri-réductrice ; Environnement argileux ; Biocorrosion ; Hydrogène ; Stockage géologique des déchets radioactifs.

## ABSTRACT

This thesis sought to describe the dynamic concept of a viable and sustainable microbiological activity under deep geological disposal conditions and to assess its impact on containment properties and storage components. Thus, in this study, a model based on the bacterial ferric reduction was chosen for its sustainability criteria in the system and its ability to alter the materials in storage conditions. The main results of this work demonstrated the capability of the environment to stand the iron-reducing bacterial activity and the conditions of its development in the deep clay environments. The bio-availability of structural Fe (III) in clay minerals and iron oxides produced during the process of metal corrosion was clearly demonstrated. In this system, the corrosion appears to be a positive factor on bacterial activities by producing an energy source, hydrogen. The iron-reducing bacterial activities can lead to a resumption of metallic corrosion through the consumption of iron oxides in the passive film. The direct consequence would be a reduction of the lifetime of metal containers. In the case of ferric clay minerals, the consequences of such an activity are such that they can have an impact on the overall porous structure both in terms of chemical reactivity of the materials or physical behavior of the clayey barrier. One of the most significant results is the crystallization of new clay phases at very low temperatures, below 40°C, highlighting the influence of the anaerobic microbial activity in the mineralogical transformations of clay minerals. Furthermore, these experiments also allowed to visualize, for the first time, a mechanism of bacterial respiration at distance, this increases the field of the availability of essential elements as Fe<sup>3+</sup> for bacterial growth in extreme environment.

In conclusion, these results clearly showed the impact of the microbiological factor on the reactivity of clay and metal minerals, while relying on control parameters on bacterial activity. The relevance of taking into account these microbiological activities in the case of safety assessments of a repository is then established.

**Key words:** Iron-Reducing Bacteria, Clayey minerals, Biocorrosion, Hydrogen, Deep geological waste disposal.