

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DE L'OXYDATION DU FER FERREUX EN PRÉSENCE DE
DEUX BACTÉRIES FERRO-OXYDANTES NEUTROPHILES, DU CHAMP
HYDROTHERMAL DE LOIHI, HAWAÏ

MÉMOIRE
PRÉSENTE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
CHRISTELLE NOT

MARS 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENT

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur, Kim Juniper, pour son soutien scientifique et financier. Chacune des rencontres m'a permis d'apprendre toujours plus et d'approfondir mes connaissances. Je tiens également à le remercier pour m'avoir laissé une grande autonomie et permis de rencontrer de nombreuses personnes.

Je voudrais aussi remercier tout le laboratoire de biologie marine et particulièrement Richard Léveillé pour son aide théorique et pratique à tout moment de ces deux années. Je voudrais aussi souligner l'aide aussi bien scientifique que de tous les jours aux 'junipettes' qui ont fait partie du laboratoire pour quelques mois ou plus, c'est-à-dire : Hélène Limen, Angela Kouris, Marie Morineaux, Zineb Bourras, Julie Veilliette, Catherine Stevens et Raphaëlle Dancette.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui ont à leur façon donné des sourires et des fous rires (cité sans aucun ordre) : Alexandre Myre, Pascal Audet, Chantal Gosselin, Sandrine Solignac, Branwen William, Sébastien Caron, Matthieu Moingt, Christian Chouinard et Maxime Paiement.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble de ma famille et mes amis outre atlantique pour leur aide et leur écoute inconditionnelle.

Enfin je souhaite dire merci pour toutes ses heures de question, de réponse, de rire, de bien être passées à tes côtés, merci Benoît.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
CARACTÉRISATION DE L'OXYDATION BIOTIQUE DU FER EN PRÉSENCE DE JV1 ET PV1, DEUX BACTÉRIES DES SOURCES HYDROTHERMALES SOUS-MARINES DE LOIHI, HAWAÏ	3
1.1 Introduction	3
1.1.1 Le fer et son oxydation abiotique	3
1.1.2 L'oxydation biotique du fer	6
1.1.2.1 Les bactéries ferro-oxydantes acidophiles	8
1.1.2.2 Les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles	10
1.1.2.3 L'intérêt des bactéries ferro-oxydantes	11
1.1.3 L'oxydation du fer par les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles	13
1.1.3.1. Mécanismes de l'oxydation	13
1.1.3.2. Bioénergétique de l'oxydation du fer ferreux	14
1.1.3.2.1. L'oxydation chimique	14
1.1.3.2.2. L'oxydation via les bactéries ferro-oxydantes	17
1.1.3.3. JV1 et PV1 : Deux bactéries ferro-oxydantes neutrophiles	24
1.2. Lieu d'étude	26
1.2.1. Les sources hydrothermales	26
1.2.2. Les conditions oxydo-réductrices des sources hydrothermales	27
1.2.3. Le champ hydrothermal de Loihi	28
1.3. Méthodologie	30
1.3.1. Cultures des bactéries JV1 et PV1	30
1.3.2. Mesure de la quantité de fer	32
1.3.3. Production de la biomasse et rendement énergétique	33
1.3.4. Protocole expérimental utilisé	33
1.4. Résultats	34

1.4.1. Contrôle des conditions de culture	34
1.4.1.1. La culture des souches bactériennes JV1 et PV1	35
1.4.1.2 Effet de la quantité d'oxygène présent dans le milieu de culture	36
1.4.1.3. Effet de la variation de la quantité d'oxygène et du pH	39
1.4.1.4. Influence de l'homogénéisation des cultures	39
1.4.1.5. Changement de source de fer	40
1.4.1.6. Nouvelle méthodologie	42
1.4.2. Taux d'oxydation chimique vs taux d'oxydation biotique	45
1.4.2.1. Mise en cultures utilisées	45
1.4.2.2. Validations statistiques	51
1.4.2.2.1. Analyse de régression	51
1.4.2.2.2. Analyse de covariance : ANCOVA	51
1.4.2.2.3. Analyse de variance : ANOVA	53
1.5. Discussion	54
1.6. Conclusion	58
CHAPITRE II	
CARACTÉRISATION DES OXYDES DE FER BACTÉRIENS PRODUITS LORS	
DE L'OXYDATION BIOTIQUE DU FER FERREUX PAR LES	
SOUCHES BACTÉRIENNES JV1 ET PV1 DU CHAMP HYDROTHERMAL	
DE LOIHI, HAWAÏ	
	59
2.1. Introduction	59
2.1.1. Les oxydes de fer et leurs formations	59
2.1.2. Les oxydes de fer bactériens	63
2.1.3. Les oxydes de fer au niveau des sources hydrothermales	66
2.1.4. Les oxydes de fer de JV1 et PV1	68
2.2. Lieu d'étude	71
2.3. Méthodologie	74
2.4. Résultats	76
2.4.1. Les observations visuelles	76
2.4.2. Les observations quantitatives	80
2.5. Discussion	84
2.6. Conclusion	86

CONCLUSION	87
APPENDICE A	
A.1 Concentration en fer ferreux au cours du temps en absence et en présence de bactéries ferro-oxydantes	89
APPENDICE B	
ANALYSE STATISTIQUE DU CHAPITRE I	
B.1 Analyse de régression dans la culture en absence de bactéries	91
B.2 Analyse de régression dans la culture en présence de JV1	94
B.3 Analyse de régression dans la culture en présence de JV1 tuées	96
B.4 Analyse de régression dans la culture en présence de PV1	98
B.5 Analyse de régression dans la culture en présence de PV1 tuées	100
B.6 Analyse de variance : ANCOVA	102
B.7 Analyse de variance : MANOVA	106
APPENDICE C	
ANALYSE STATISTIQUE DU CHAPITRE II	
C.1 Analyse de variance pour chaque type après 216 heures de culture	110
C.2 Analyse de variance pour chaque type après 384 heures de culture	113
C.3 Analyse de variance en absence de bactéries	116
C.4 Analyse de variance en présence de JV1	119
C.5 Analyse de variance en présence de PV1	122
C.6 Corrélation entre les différentes variables	125
APPENDICE D	
PHOTOS AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION (MET) DES DIFFÉRENTS TYPES DE CULTURE AU COURS DU TEMPS	
D.1 Photos au MET de la culture sans bactérie après 216 heures de culture	129
D.2 Photos au MET de la culture en présence de la souche JV1 après 216 heures de culture	130
D.3 Photos au MET de la culture en présence de la souche PV1 après 216 heures de culture	131
D.4 Photos au MET de la culture sans bactéries après 384 heures de culture	132
D.5 Photos au MET de la culture en présence de la souche JV1 après 384 heures de culture	133
D.6 Photos au MET de la culture en présence de la souche PV1 après 384 heures de	

culture	134
D.7 Photo au MET au début de la culture	135
RÉFÉRENCES	136

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Le cycle fondamental du fer	5
1.2 Classification générale des Protéobactéria	7
1.3 Mécanisme d'interaction entre les bactéries et le minéral ferreux	9
1.4 Rôle des bactéries comme source de carbone renouvelable	12
1.5 Energie disponible pour le métabolisme via l'oxydation du fer ferreux	15
1.6 Variation de l'énergie libre et de la cinétique lors de l'oxydation du fer ferreux	17
1.7 Chaîne énergétique bactérienne	19
1.8 Courbe de croissance de JV1	24
1.9 Arbre phylogénétique de la souche PV1	25
1.10 Localisation du champ hydrothermal de Loihi	29
1.11 Protocole expérimental	34
1.12 Concentration en fer présente dans les bouteilles de culture en absence de bactéries, en présence de JV1 et en présence de PV1 au cours du temps	35
1.13 Concentration en fer au cours du temps, dans 3 cultures différentes en absence de bactéries ferro-oxydantes, en présence de JV1 et en présence de PV1	37
1.14 Concentration en fer ferreux au cours du temps en absence et en présence de bactérie ferro-oxydantes	41
1.15 Concentration en fer ferreux au cours du temps de culture. Evolution de la concentration en absence de bactéries et en présence de JV1 et PV1	43
1.16 Concentration en fer ferreux au cours du temps en absence de bactéries (CO), en présence de bactéries de la souche JV1 (JV1) et en présence de bactéries JV1 tuées après 24h de culture (JV1k)	46
1.17 Concentration en fer ferreux et quantité de bactéries au cours du temps selon les différentes cultures	48
1.18 Quantité de fer ferreux oxydé au cours du temps dans les différentes cultures, en absence, en présence des souches bactériennes JV1 et PV1 vivantes et mortes	49

2.1	Formation et transformation des oxydes de fer	61
2.2	Photo au microscope électronique environnemental, d'oxydes de fer d'une source hydrothermale active	65
2.3	Morphologie des oxydes de fer	70
2.4	Localisation des sites d'échantillonnage des souches bactériennes JV1 et PV1, au niveau du mont sous marin de Loihi, proche de Pele's Pit	71
2.5	Photo du champ hydrothermal de Loihi	73
2.6	Photo au microscope électronique à transmission de la souche JV1 au temps au temps zéro de culture, traitée avec le logiciel ImageJ	76
2.7	Photo au microscope électronique à transmission dans la culture après 216 heures	78
2.8	Photo au microscope électronique à transmission dans la culture après 284 heures	79
2.9	Longueur moyenne des oxydes de fer en absence de bactéries (co), en présence de la souche bactérienne JV1 et en présence de la souche bactérienne PV1	80
2.10	Longueur des oxydes de fer dans la culture en absence de bactéries, au début de la culture, après 216 heures de culture et après 384 heures de culture	81
2.11	Longueur des oxydes de fer dans la culture en présence de la souche bactérienne JV1, au début de la culture, après 216 heures de culture et après 384 heures de culture	82
2.12	Longueur des oxydes de fer dans la culture en présence de la souche bactérienne PV1, au début de la culture, après 216 heures de culture et après 384 heures de culture	83
2.13	Graphique représentant le pourcentage de bactéries observées liées a des oxydes de fer, dans les différentes cultures	83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Pages
1.1 Exemple de la constance de vitesse pour l'oxydation du fer ferreux	16
1.2 Besoins énergétiques pour différentes réactions lors de la fixation du CO ₂	20
1.3 Données sur l'oxydation Fe ²⁺ dans différents environnements	22
1.4 Comparaison des fluides hydrothermaux	30
1.5 Concentration en fer ferreux au cours du temps en présence et en absence de bactéries	40
1.6 Tableau comparatif du taux d'oxydation selon les modifications dans la culture	44
1.7 Taux d'oxydation du fer ferreux en présence et en absence de bactéries	50
1.8 Propriétés des analyses de régression dans les différentes cultures étudiées	51
1.9 Effet du test permettant de comparer les pentes des droites de régression	52
1.10 Effet du test permettant de comparer les ordonnées à l'origine des droites de régression	52
1.11 Quantification des différentes quantités du fer ferreux dans chaque culture	53
1.12 Résultats permettant le calcul du rendement énergétique	55
2.1 Présentation des treize oxydes de fer ferrique	59
2.2 Conditions de formation de certains oxydes	63
2.3 Diversité et localisation des biominéraux du fer chez différents organismes	64
2.4 Occurrence des structures d'oxydes de fer au niveau des dépôts hydrothermaux marins	67

RÉSUMÉ

L'oxydation du fer ferreux (Fe^{2+}) en fer ferrique (Fe^{3+}) peut avoir lieu chimiquement à un pH neutre dans des conditions aérobiques. Les souches bactériennes de l'étude, nommées JV1 et PV1 sont également capables d'oxyder le fer ferreux, dans les mêmes conditions physico-chimiques. Il y a alors compétition entre l'oxydation chimique et l'oxydation bactérienne.

Les différentes formes du fer jouent un rôle dans formation des cheminées hydrothermales, qui sont la base des sources de l'écosystème hydrothermal. C'est dans l'optique de mieux comprendre le fonctionnement de l'oxydation du fer dans l'environnement hydrothermal que l'étude est menée. Ceci se traduit par l'optimisation des besoins de croissance des bactéries, la détermination de la cinétique de l'oxydation du fer ferreux ainsi que le rendement énergétique des deux souches bactériennes.

De plus il a été observé que la présence de JV1 et PV1 inhibait l'oxydation chimique, cette observation est à la base de notre méthodologie qui consiste à déterminer la part des bactéries dans l'oxydation comme la différence entre un taux d'oxydation bactérien et un taux d'oxydation en présence de bactéries mortes afin de déterminer le taux d'oxydation bactérien réelle. Les quantités de Fe^{2+} et Fe^{3+} sont déterminées par la méthode ferrozine (dosage colorimétrique du fer), alors que la croissance bactérienne est déterminée par comptages DAPI.

La part de bactéries JV1 et PV1 dans l'oxydation du fer ferreux est quantifiée à 15% de l'oxydation totale du fer, les taux d'oxydation et les rendements énergétiques pour chacune des souches bactériennes sont très faibles. La croissance bactérienne est faible et influence le taux d'oxydation et le rendement énergétique. Les oxydes de fer, observés au microscope électronique à transmission, n'ont pas de morphologie particulière et aucune tendance dans la longueur des oxydes n'a été mise en évidence. Il semble donc que le milieu de culture ne semble pas adaptée à une croissance et activité normales des bactéries, ceci peut être dû à une trop grande quantité de bactéries minéralisées dès le début de la culture empêchant la quantification de l'oxydation bactérienne du fer. On peut imaginer que l'utilisation de technique de cultures plus précises pour les conditions d'oxygène et de pH devrait permettre de déterminer la part des bactéries ferro-oxydantes neutrophiles dans l'oxydation du fer ferreux.

Mots clés : Bactéries ferro-oxydantes, sources hydrothermales, chimie du fer

INTRODUCTION

Le fer est un élément abondant sur terre, son cycle exogène est largement régi par les microorganismes, qui ont un rôle important dans sa régulation. Le fer est présent sous différentes formes qui incorporent le fer sous forme ferreux ou sous forme ferrique. Cette étude est centrée sur l'oxydation du fer ferreux en forme ferrique, ainsi que sur la formation d'oxydes de fer à partir de la libération du fer ferrique. L'oxydation du fer ferreux a d'abord été mise en évidence comme étant un processus chimique s'effectuant en présence d'oxygène à pH neutre. Il y a seulement quelques dizaines d'années qu'il a été observé le même processus mais en présence de bactéries ferro-oxydantes neutrophiles. L'oxydation du fer ferreux à pH neutre est donc un processus compétitif entre l'oxydation abiotique (via l'oxygène) et l'oxydation biotique (via les bactéries ferro-oxydantes). La présente étude observe plus particulièrement deux souches bactériennes ferro-oxydantes, JV1 et PV1 provenant du champ hydrothermal de Loihi, Hawaï. Ces deux souches sont des bactéries chimilitoautotrophes obligatoire, ce qui signifie qu'elle tire leur énergie nécessaire à leur croissance uniquement via l'oxydation d'un composé minéral, le fer ferreux. Au niveau des sources hydrothermales de Loihi, l'environnement est riche en fer ferreux et pauvre en oxygène, qui correspond aux conditions optimales pour la croissance des bactéries ferro-oxydantes neutrophiles qui sont visible sous forme de tapis bactérien orangé. Ce tapis est également constitué d'oxydes de fer formés à partir du fer ferrique libéré lors de l'oxydation du fer ferreux. Les oxydes de fer se caractérisent par leur composition et leur morphologie. L'oxyde de fer le plus commun au niveau du champ de Loihi, est un oxyde, ayant une structure cristalline faiblement ordonnée la ferrihydrite à laquelle s'incorpore de la silice rendant la ferrihydrite non transformable vers un oxyde plus ordonné (Emerson and Moyer, 2002; Karl et al., 1988). La morphologie des oxydes de fer bactérien est variable et la plupart ont une forme amorphe, cependant il a été mis en évidence que certaines souches bactériennes formaient des morphotypes particuliers comme la souche *Gallionella ferruginea* qui forme des oxydes de fer en gaine hélicoïdale. La souche PV1 étudiée forme des oxydes de fer en forme de filament alors que JV1 n'a montré aucune forme particulière dans ses oxydes de fer. Le but de cette étude est de quantifier la part de l'oxydation biotique par rapport à l'oxydation totale du fer ferreux, ainsi que d'observer les morphotypes d'oxydes de fer formés par les différentes souches bactériennes étudiées et de quantifier leur évolution au

cours du temps. Afin de quantifier l'effet des bactéries sur l'oxydation du fer ferreux, les cultures bactériennes sont séparées par une culture en absence de bactéries, une en présence de la souche bactérienne étudiée et une dernière en présence de cette même souche mais dans laquelle les bactéries ont été tué. L'ensemble de ces cultures permet de quantifier le métabolisme bactérien actif, les effets secondaires bactériens sur l'oxydation du fer ferreux dus à la présence des cellules ou des produits cellulaires, ainsi que l'effet net des bactéries sur l'oxydation du fer ferreux (Neubauer et al., 2002). L'étude des bactéries ferro-oxydantes des sources hydrothermales permet également l'étude des dépôts de fer anciens car ils sont considérés comme des analogues modernes. La source primaire de fer sur la Terre provient de dépôts de fer de l'archéen (Banded Iron Formation, BIF), bien que très bien étudiés, leur origine est toujours controversée et la part des bactéries ferro-oxydantes dans la précipitation du fer de ceux-ci est encore très mal compris (Emerson, 2000). L'étude des bactéries ferro-oxydantes permet donc de mieux comprendre l'impact de l'oxydation et de la précipitation biotiques par rapport aux processus abiotiques.

Les principaux objectifs de cette étude sur les souches bactériennes JV1 et PV1 du champ hydrothermal de Loihi sont : (1) La mise au point de la culture et le contrôle des conditions de culture afin de voir leur effet respectif sur l'oxydation du fer ferreux. (2) La quantification de l'effet net des bactéries, ainsi que leur effet secondaire sur l'oxydation du fer ferreux. (3) Observer la morphologie des oxydes de fer ferrique formés par l'oxydation du fer ferreux au cours du temps et selon l'espèce bactérienne. (4) Observer le type d'oxydes de fer ferrique ainsi que leurs longueurs au cours du temps de culture et selon l'espèces bactériennes. L'ensemble devrait permettre de mieux comprendre la dynamique de l'oxydation du fer ferreux via les bactéries ferro-oxydantes JV1 et PV1.

CHAPITRE I

CARACTERISATION DE L'OXYDATION BIOTIQUE DU FER EN PRESENCE DE JVI ET PVI, DEUX BACTERIES DES SOURCES HYDROTHERMALES SOUS MARINES DE LOIHI, HAWAÏ

1.1. Introduction :

Le fer est le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre, et le second plus abondant au niveau des habitats redox actifs avec une interface aqueuse, ce qui en fait un métal dont le rôle est important dans les cycles biogéochimiques. Il est reconnu que les microorganismes participent au cycle du fer, cependant leur rôle central qui a trait au cycle redox du fer est peu connu et joue un rôle non négligeable dans la conservation de l'énergie. De plus les réactions redox du fer sont liées à de nombreux cycles biogéochimiques, comme celui du carbone, avec des composantes écologiques significatives. L'augmentation des connaissances sur le rôle des bactéries dans les transformations redox du fer se reflète par l'engouement des études en biologie et en environnement sur la conservation d'énergie pour la croissance à partir des composés redox du fer. Cet engouement a été très important pour l'étude de la chimiotrophie au niveau des fonds océaniques. Certains habitats clés comme les sources hydrothermales des fonds océaniques sont le lieu de l'oxydation bactérienne du fer jouant un rôle biologique et biogéochimique significatif sur l'environnement hydrothermal. Les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles doivent faire l'objet d'attention particulière afin de mieux comprendre leur fonctionnement physiologique, leur diversité phylogénétique, ainsi que leur activité dans les océans. A travers cette étude nous avons tenté de mieux comprendre leur fonctionnement, ce qui se traduit tout d'abord par une mise au point de leur culture, puis par la suite par la quantification de leur part dans l'oxydation du fer ferreux.

1.1.1. Le fer et son oxydation abiotique :

Le fer existe sous deux forme, le fer ionique (le fer ferreux : Fe^{2+} et le fer ferrique : Fe^{3+}), et le fer minéral qui inclut les sulfures (pyrite), les sulfates, les oxydes et hydroxydes

(hématite, magnétite) ainsi que les silicates et les carbonates (sidérite). Le fer est présent sous ses différentes formes, dans de très nombreux environnements terrestres, lacustres ou marins. Cependant la forme ionique bien que largement présente au niveau des sources hydrothermales est en faible quantité dans les environnements tels que l'océan. Le temps de résidence du fer ionique dans l'océan est très faible car il se transforme rapidement en $\text{Fe}(\text{OH})_3$ et précipite.

Il est un des éléments mineurs essentiels à la plus part des organismes ; bactéries, champignons, plantes, animaux, et même pour l'homme. Le fer joue un rôle vital dans de nombreux processus biologiques ; la photosynthèse, la fixation de l'azote, la méthanogenèse, le transport de l'oxygène ou encore la synthèse de l'ADN. La disponibilité du fer est limitée par sa solubilité et la cinétique de dissolution. Malgré son importance, le fer a également un potentiel de toxicité. Les organismes ont donc développé de nombreux mécanismes de régulation pour leur besoin et leur excédent en fer.

Un des systèmes qui règle les besoins en fer est la synthèse de sidérophores par des organismes comme des bactéries ou certaines plantes. Les sidérophores sont des ligands organiques, de faible poids moléculaire, avec une haute affinité et une haute spécificité pour la liaison avec le fer. Cependant la mise en place, ainsi que l'utilisation des sidérophores demandent de grandes quantités d'énergie (Kraemer, 2004).

Un autre type de mécanisme de régulation est la présence du répresseur Fur, qui agit sur la transcription de gènes intervenant dans la respiration, le cycle des acides carboxyliques, la résistance au stress redox, etc. Le répresseur Fur a fait l'objet de nombreuses études chez *Escherichia coli*, où ce mécanisme est très bien compris (McHugh et al., 2003; Touati, 2000).

Les mécanismes de régulation permettent de limiter la quantité de fer soit en limitant l'apport à l'organisme ou en limitant la disponibilité du fer sous une forme (complexée ou ionique). Cependant le passage entre les deux formes ioniques peut se faire par l'intervention de procaryotes ; c'est le cycle du fer.

Le cycle du fer consiste en la transformation du fer ferreux (Fe^{2+}) en fer ferrique (Fe^{3+}) ou inversement en la transformation du fer ferrique en fer ferreux (fig.1.1). Ces opérations ont lieu dans différentes conditions physico-chimique (pH, température, etc.) de manière abiotique et biotique.

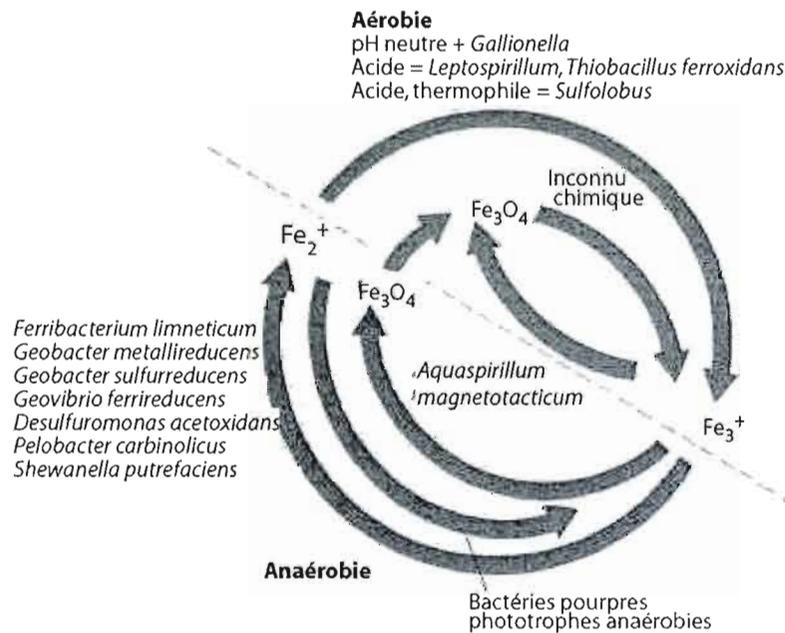


Figure 1.1 : Le cycle fondamental du fer, avec des exemples de micro-organismes participant aux processus d'oxydation et de réduction. (Prescott et al., 2003).

L'oxydation chimique du fer ferreux aqueux dépend du pH et de la concentration en oxygène (le taux d'oxydation augmente lorsque le pH et la concentration en oxygène augmentent). A un pH acide (<4), l'oxydation chimique du fer ferreux n'est plus significative et le fer ferreux est alors utilisé par les bactéries ferro-oxydantes acidophiles comme source d'énergie. *Acidothiobacillus*, *Acidomicrobium*, *Ferrimicrobium*, *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* et *Thiobacillus* sont des genres communs de bactéries ferro-oxydantes acidophiles, que l'on retrouve principalement dans des environnements comme les mines ou en présence de dissolution de la pyrite.

Dans les environnements aqueux à pH neutre (~6 à 8) et saturé en oxygène (~8mg/l) l'oxydation chimique du fer est rapide et les populations bactériennes ne représentent pas une part significative de l'oxydation. Cependant en présence d'une faible concentration d'oxygène (<2mg/l), le taux d'oxydation chimique diminue et les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles sont capables d'utiliser le fer ferreux comme source d'énergie, et on se trouve en présence d'une compétition.

1.1.2. L'oxydation biotique du fer :

L'oxydation du fer ferreux en fer ferrique peut également être catalysée par des bactéries. Dans un milieu pourvu d'oxygène, l'oxydation bactérienne peut avoir lieu à pH acide, on parle alors de bactéries ferro-oxydantes acidophiles, ou à pH neutre, on parle alors de bactéries ferro-oxydantes neutrophiles. De plus cette même oxydation a lieu en absence d'oxygène via les bactéries photo-autotrophes. Pour ces bactéries, le taux d'oxydation est corrélé de façon positive à l'intensité lumineuse de leur environnement (Croal et al., 2004).

La phylogénie des bactéries ferro-oxydantes est très variée, mais on les classe principalement dans le phylum des Protéobacteria, dans les classes α -, β - et γ -Protéobacteria (fig.1.2).

1.1.2.1. Les bactéries ferro-oxydantes acidophiles :

Les bactéries ferro-oxydantes acidophiles sont les bactéries ferro-oxydantes les mieux étudiées car elles sont les plus aisées à maintenir en culture. Cette caractéristique a permis de mettre en évidence et d'étudier un grand nombre d'entre elles, avant l'utilisation des approches moléculaires.

Les bactéries ferro-oxydantes acidophiles sont présentes dans des environnements variées ; elles vivent à un pH inférieur à 1 jusqu'à un pH proche de 5.5, jusqu'à des températures allant à plus de 65°C. De plus les bactéries ferro-oxydantes acidophiles peuvent être autotrophes ou hétérotrophes comme *Acidiphilium* (Hallberg and Johnson, 2003; Johnson et al., 2003; Lopez-Archilla et al., 2004). Les plus connues sont *Acidothiobacillus ferrooxidans* et *Leptospirillum ferrooxidans* qui ont fait l'objet de nombreuses études depuis le début des années 1900.

Acidothiobacillus ferrooxidans est une bactérie chimiolithotrophe aérobie, qui utilise le fer ferreux ainsi que les sulfures comme source d'énergie pour son activité métabolique. Elle utilise l'oxygène comme oxydant et comme accepteur terminal d'électron dans le processus d'oxydation. La fixation du CO₂ se fait par le cycle de Calvin; l'ATP et le NAD(P)H nécessaires sont obtenus au cours de l'oxydation de molécules minérales. Le cycle de Calvin permet, à partir d'une molécule à cinq atomes de carbones comme le ribulose, et d'une molécule de CO₂, la formation de deux sucres composés de trois carbones. Cette réaction nécessite une enzyme particulière : la ribulose Bisphosphate Carboxylase Oxygénase (Rubisco).

Les conditions de croissance optimales d'*Acidothiobacillus ferrooxidans* se situent à des températures entre 30 et 40°C et un pH proche de 2. La consommation d'oxygène varie selon les souches, mais aussi selon le substrat de croissance (Sampson and Blake II, 1999).

Les protons libérés lors de la dissolution des minéraux sulfureux sont utilisés par les bactéries pour l'oxydation de fer ferreux. Crundwell (2003) propose que la dissolution des minéraux sulfureux soit favorisée en présence de bactéries, comme *Acidithiobacillus ferrooxidans* via la sécrétion d'un oxydant enzymatique. Depuis, plusieurs mécanismes d'interactions ont été proposés entre la bactérie et le minéral (fig.1.3):

- a) Le minéral est lessivé par les ions ferriques qui sont produits par la bactérie et diffusés proche du minéral.

- b) La bactérie produit des ions ferriques de l'oxydation des ions ferreux, qui lessivent le minéral. Ces ions ferriques se rendent au minéral via un éxopolymère bactérien entre la bactérie et le minéral.
- c) La bactérie oxyde le minéral sans l'intervention des ions ferriques.

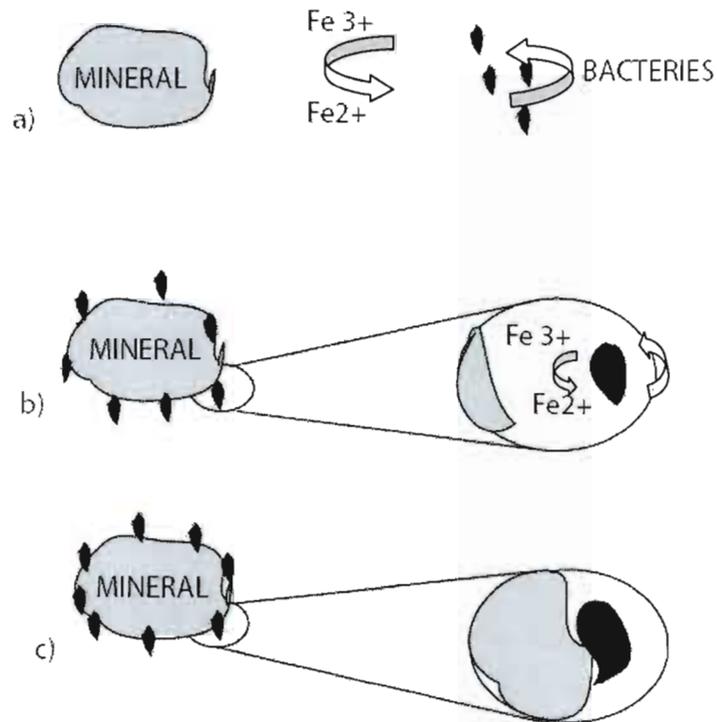


Figure 1.3 : Différentes possibilités de mécanismes d'interaction entre la bactérie et le minéral pour *Acidiobacillus ferrooxidans*. D'après Crundwell (2003).

Ces trois mécanismes ont fait l'objet d'un long débat depuis 40 ans, récemment l'étude de Crundwell (2003) montre que l'interaction entre la bactérie et le minéral permet d'augmenter le taux de lessivage, cependant le mécanisme exacte n'est pas encore clair, c'est-à-dire que la bactérie peut entraîner une augmentation de la porosité du minéral, et donc une diffusion facilitée. Alternativement la bactérie peut entraîner une augmentation du pH, qui permet l'augmentation du lessivage. L'oxydation du fer est donc un processus compliqué qui semble varier aussi bien selon l'espèce bactérienne en jeu ou le minéral (le lessivage de la pyrite ou de la sphalérite ne semble pas être le même en présence de *Acidobacillus ferrooxidans*).

Pendant l'étude de nombreuses bactéries acidophiles sur le plan physiologique et moléculaire, les recherches ont essayé de comprendre l'intérêt ainsi que le fonctionnement des bactéries ferro-oxydantes neutrophiles qui vivent dans les mêmes conditions que celle de l'oxydation chimique.

1.2.2.2. Les bactéries ferro-oxydante neutrophiles :

Dans des eaux à pH neutre et en présence de dioxygène, il y a compétition entre l'oxydation bactérienne et l'oxydation chimique et c'est pour cette raison que les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles sont peu étudiées. Cependant la stabilité du fer ferreux en présence d'oxygène est corrélée fortement avec le pH du milieu, à un pH proche de 7, la demi vie du fer ferreux est de 12-15 minutes, alors qu'à un pH de 5 et à faible teneur en oxygène, sa demi vie passe à 30 années (Davison and Seed, 1983; Juniper and Tebo, 1995).

On retrouve des bactéries ferro-oxydantes neutrophiles dans des environnements variés comme les eaux usées, les racines de plantes, les stalactites ou encore les sources hydrothermales.

La définition d'une bactérie ferro-oxydante neutrophile, est liée au pH de croissance, cependant celui-ci peut être assez différent d'une bactérie à l'autre. *Acidiphilium cryptum* est une bactérie ferro-oxydante hétérotrophe, qui tolère un pH de 2.1 à 5.8 dans des conditions de croissances aérobiques, mais à partir d'un pH de 5, on commence à obtenir une croissance anoxique, on parle alors d'une bactérie qui n'est plus acidophile, mais qui semblerait être une forme intermédiaire. Dans ces dernières conditions *Acidiphilium cryptum* peut réduire le fer, ce qui lui permet une croissance au niveau du sédiment (Bilgin et al., 2004).

D'autres bactéries ont un pH de croissance plus proche de la neutralité, comme *Gallionella ferruginea* ou *Leptothrix ochracea*, connues depuis 1840, mais cultivées en laboratoire plus d'un siècle après, cependant leur effet catalytique sur l'oxydation et la précipitation du fer n'est pas encore complètement compris.

L'existence de bactéries ferro-oxydantes neutrophiles n'est plus discutée, cependant leur rôle par rapport à l'oxydation chimique du fer est encore très mal compris et fait l'objet de plusieurs études dans les différents environnements où on les retrouve.

1.1.2.3. L'intérêt des bactéries ferro-oxydantes :

Les transformations redox du fer affectent la distribution du fer dans son cycle, dû à la différence de solubilité entre le fer ferreux et le fer ferrique. Dans l'eau oxygénée, à un faible pH le fer ferrique est à l'état stable tandis qu'à un pH neutre celui-ci forme des oxydes et hydroxydes très insolubles. Le fer ferreux, lui est stable dans une eau avec une faible teneur en oxygène, dans de nombreux systèmes d'eaux douces on le trouve souvent uniquement sous sa forme dissoute (taille des particules inférieure à 0.025 μm). En présence d'une forte teneur en carbone, sulfure et ortho phosphate il forme des sels insolubles (Shaked et al., 2004).

Les réactions d'oxydo-réduction du fer via les bactéries ont de nombreux intérêts industriels et technologiques, l'oxydation bactérienne du fer ferreux dans les mines permet de diminuer le pH des eaux, qui passe à travers ce système. De plus, les bactéries ferro-oxydantes régénèrent continuellement via l'oxydation de l'ion ferreux, des ions ferriques qui forment des minéraux ferriques qui permettent de piéger les ions phosphates dans des conditions anaérobiques (Weiss et al., 2003). Il est intéressant d'essayer de comprendre la physiologie des bactéries ferro-oxydantes, afin de voir comment elles peuvent interagir avec leur environnement, c'est-à-dire connaître la quantité de fer produit, combien reste sous forme d'oxydes ? Mais il est également enrichissant de savoir la quantité de carbone qui entre dans le cycle global du carbone, à travers la biomasse bactérienne produite par l'oxydation du fer ferreux.

Les bactéries ferro-oxydantes pourraient également jouer un rôle important pour la mise en place d'un cycle du carbone industriel. Les travaux de Tributsch (2003) proposent que la biomasse bactérienne soit utilisée comme source de carbone via la fixation du CO_2 . Actuellement la source de carbone majeure est les plantes, qui fixent le CO_2 via la photosynthèse. Ces plantes sont la base énergétique de notre société, à travers la nourriture, l'énergie, le matériel et le combustible, or notre évolution nous entraîne à nous tourner vers des énergies recyclables. L'énergie géothermale des fissures des fonds océaniques permet la conversion des sulfates en sulfures, selon un processus chimique. Comme le montre Juniper et Fouquet (1988) les dépôts de filaments de fer et de silice au niveau de sites hydrothermaux récents et anciens, présente une agrégation des filaments microbiens qui peuvent former une base à la précipitation des minéraux. Ces structures filamenteuses paraissent antérieures à la précipitation des oxydes de fer et de la silice, mais elles ne semblent pas avoir une apparence minéralogique. De plus les structures

filamenteuses ressemblent à des filaments bactériens qui sont communs aux bactéries sulfo- et métalloydantes. On déduit qu'une grande biomasse bactérienne sulfo- et ferro-oydantes est présente au niveau de la libération de l'énergie géothermale.

Les sulfates sont ensuite reformés grâce aux bactéries sulfo-oydantes, l'ensemble de ses bactéries produisent de l'énergie que l'on retrouve impliquée dans le cycle du carbone, via la fixation du CO_2 (fig.1.4). Les bactéries ferro-oydantes ont via l'oxydation de sulfates de fer, un rôle similaire aux bactéries sulfo-oydantes. Il apparaît donc très intéressant de comprendre leur physiologie afin de pouvoir tester leur potentiel en tant que puits de carbone.

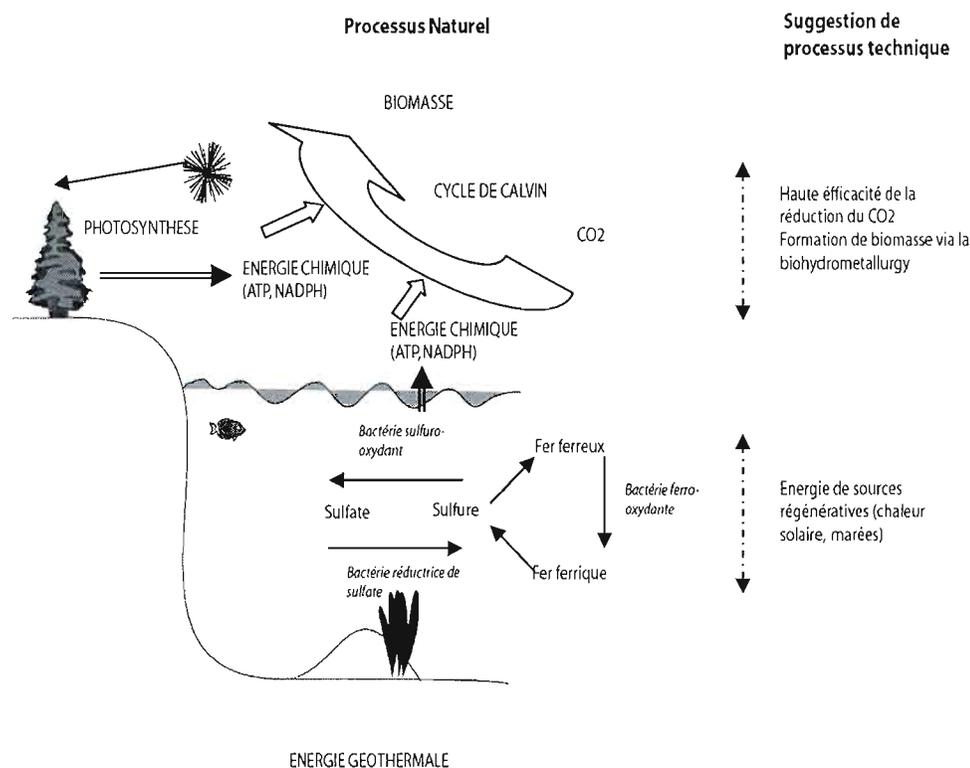
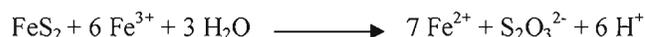


Figure 1.4 : Le cycle de Calvin permet la fixation du CO_2 en utilisant l'énergie de la photosynthèse et celle de la chimiosynthèse bactérienne. Couplage de la production bactérienne de biomasse comme une source de carbone renouvelable. Modifiée d'après Tributsch (2003).

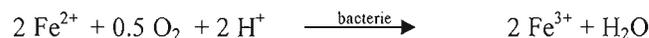
1.1.3. L'oxydation du fer par les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles :

1.1.3. 1. Mécanismes de l'oxydation :

L'oxydation bactérienne neutrophile du fer est encore un mécanisme mal expliqué. A un pH acide, la dissolution du métal est favorisée, par exemple la dissolution de la pyrite entraîne un enrichissement des eaux en fer et sulfate soluble. Cette dissolution se fait en absence d'oxygène :



Cette dissolution entraîne la disponibilité des ions ferreux permettant alors leur oxydation :



Cependant dans des conditions de faible acidité les oxydes de fer sont stables comparativement au fer ferrique, c'est pourquoi les micro-organismes utilisent leur énergie disponible à la précipitation des minéraux, au lieu du relargage du fer ferrique. Le taux d'oxydation du fer ferreux en oxyde de fer comme l'hématite libère deux fois et demi plus d'énergie que l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique (McCollom and Shock, 1997).



Les bactéries ferro-oxydantes représentent un catalyseur de l'oxydation chimique du fer, mais les preuves de l'effet catalytique des bactéries varient énormément. Selon Kasama et Murakami (2001) et Kennedy *et al.* (2002) elles permettent d'augmenter l'oxydation jusqu'à 4 fois. Cependant Søgaard et al. (2000b) montre que le taux d'oxydation/précipitation du fer en présence de *Gallionella ferruginea* est 60 fois plus rapide que lors du processus chimique. De plus l'oxydation bactérienne correspond à une grande partie de l'oxydation totale, de 50 à 80 % selon l'espèce et l'environnement (Emerson and Moyer, 1997; Emerson and Revsbech, 1994a). Or Neubauer et al. (2002) montre que les bactéries peuvent avoir un effet inhibiteur sur l'oxydation chimique, qui se ferait par une captation des ions ferreux au niveau de la membrane bactérienne diminuant

la disponibilité des ions ferreux pour l'oxydation chimique. Cette hypothèse permet alors d'en déduire un effet net des bactéries sur l'oxydation du fer ferreux, ceci se fait par l'utilisation d'une culture en absence de bactérie, une en présence et une dernière en présence de bactéries tuées.

1.1.3.2. Bioénergétique de l'oxydation du fer ferreux :

1.1.3.2.1. L'oxydation chimique :

Pour connaître les caractéristiques d'une réaction chimique, on étudie la cinétique et la thermodynamique de cette réaction. La thermodynamique permet de déterminer si la réaction est exergonique, c'est-à-dire qu'elle se fait spontanément aux conditions de la réaction ($\Delta G < 0$) ou si la réaction nécessite un apport d'énergie pour se réaliser. La cinétique permet de connaître la vitesse d'une réaction qui est proportionnelle à la constante de vitesse et à la concentration des réactifs.

L'oxydation chimique du fer permet la transformation du fer ferreux en fer ferrique, celui-ci est très rapidement réutilisé pour la formation d'oxyde de fer qui est la forme thermodynamiquement stable. Dans un environnement de pH proche de la neutralité et en présence de faibles concentrations d'oxygène, le fer ferreux réagit comme-ci :



Cette réaction n'est plus réalisable au-delà d'une température supérieure à 50°C, car l'énergie libre disponible n'est plus suffisante. On remarque que l'énergie libérée pour l'oxydation du fer peut varier selon l'oxyde ferrique formé. De plus il semblerait que ces valeurs varient selon les auteurs, ce qui est peut être due au fait que les mesures proviennent de milieux différents où la concentration en fer ferreux diffère. Selon Roden et al (2004) l'oxydation du fer ferreux en un minéral comme l'hématite (Fe_2O_3) permet de la libération de -20 kcal/mole Fe d'énergie, alors que l'oxydation du fer ferreux en oxyde aqueux, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ libère -21.5 kcal/mole Fe (fig.1.5). Or selon la publication de McCollom & Shock (1997), citée ci-dessous, l'oxydation du fer ferreux en oxyde de fer comme l'hématite libère deux fois et demi plus d'énergie que l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique.

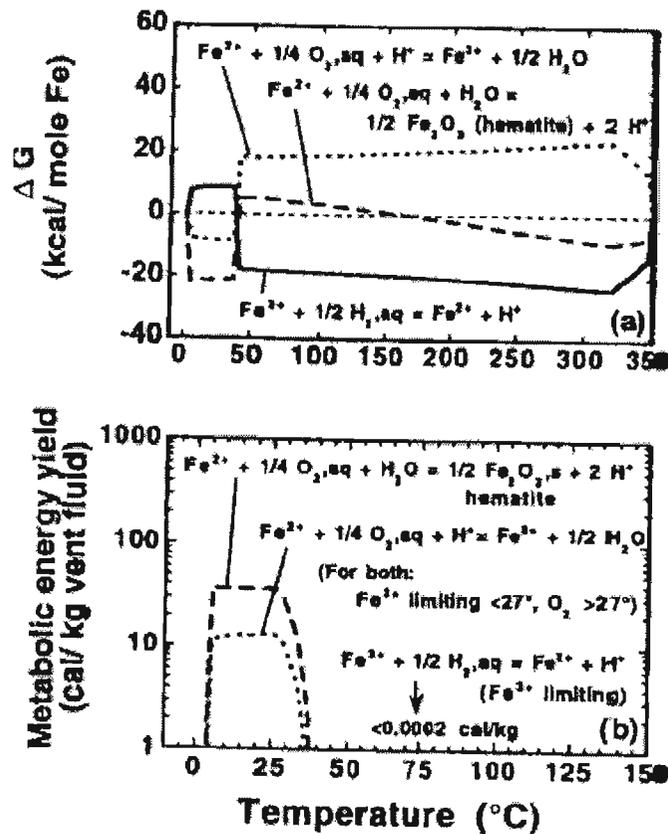


Figure 1.5 : Energie disponible pour le métabolisme via l'oxydation du fer ferreux et la réduction du fer ferrique lors du mélange du fluide hydrothermale et de l'eau de mer. (a) Energie libre (b) Taux d'énergie disponible pour le métabolisme en fonction de la température lors du mélange (McCollom and Shock, 1997).

La cinétique qui décrit l'oxydation chimique du fer est :

$$-\frac{d[\text{Fe(II)}]}{dt} = k [\text{Fe(II)}] [\text{OH}^-]^2 p_{\text{O}_2}$$

On observe que la cinétique de l'oxydation du fer ferreux au cours du temps, dépend de la constante de vitesse k et de la concentration des réactifs. En comparant les constantes de vitesse on observe que celle-ci ne varient pas énormément pour différentes conditions de l'oxydation chimique du fer (Tabl.1.1).

Milieu	Concentration en fer ferreux (μM)	pH	Température ($^{\circ}\text{C}$)	Valeur de k ($\text{min}^{-1} \text{atm}^{-1} \text{mol}^{-2} \text{litre}^{-2}$)
Eaux souterraines ¹	30-90	7.5-7.8	10.5-14.5	$0.5-2.4 \times 10^{13}$
Puits ¹	30-90	6.8	25	2.9×10^{13}
Eau courante ¹	-	6.25	-	60×10^{13}
Lac oxygéné ¹	6	7.0	10	$1.9 \pm 0.7 \times 10^{13}$
Lac anoxique ¹	7-400	6.8-7.2	10	$2.2 \pm 0.8 \times 10^{13}$
$\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{CO}_2$ ¹	< 50	6.4-7.5	20.5	$8 \pm 2.7 \times 10^{13}$
$\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{CO}_2$ ¹	< 100	6.3	25	$16-21 \times 10^{13}$
Eau de mer ²	100	7	-	$8 \pm 2.5 \times 10^{13}$
Eaux polluées, présence de bactérie ¹ s	2.3	5.7-5.8	10.2-10.7	$3.3-4.4 \times 10^{16}$
Eaux polluées, présence de bactéries ¹	21	5.7-5.8	10.2-10.6	$10-12 \times 10^{16}$
Eaux polluées, présence de bactéries ¹	52	5.6	10.2-10.7	$19-21 \times 10^{16}$
Eaux polluées, présence de bactéries ¹	126	5.7	10.3-10.9	$7.7-13 \times 10^{16}$

Tableau 1.1 : Exemple de valeur pour la constante de vitesse de l'oxydation du fer ferreux ¹(Sogaard et al., 2000a) ²(Emerson, 2000)

On remarque que la vitesse de l'oxydation est corrélée de façon positive avec la température et de façon négative avec le pH. On sait d'après l'équation de la cinétique du fer, que la constante varie selon la concentration en fer ferreux. De plus le pH influence la solubilité du fer ferreux dans le milieu, à un pH acide le fer ferreux est stable, donc moins facilement soluble (Emerson, 2000).

La cinétique chimique nous montre que la concentration de fer ferreux est aussi affectée par la concentration en oxygène. La demi-vie du fer ferreux dépend de la concentration d'oxygène et du pH. Pour un pH donné de 7, on observe l'augmentation de la concentration en oxygène diminue la demi-vie du fer ferreux, mais ne semble pas avoir une très grande influence sur l'énergie libre disponible lors de la réaction (diminution <5%) (Roden et al., 2004) (fig.1.6).

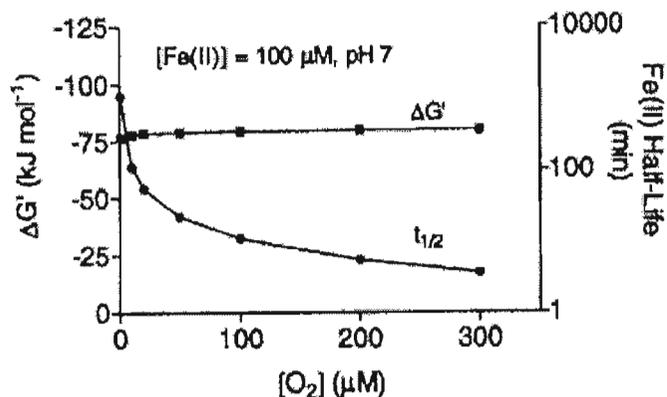


Figure 1.6 : Changement de l'énergie libre et de la cinétique de l'oxydation abiotique du fer ferreux en fonction de la concentration en oxygène, pour une concentration initiale de 100 μM et pour un pH constant de 7 (Roden et al., 2004).

On observe que l'augmentation de la teneur en oxygène dissous entraîne une diminution exponentielle de la demi-vie du fer ferreux. En présence de très faibles concentrations en oxygène (quelques micro-molaires), la demi-vie du fer ferreux est d'environ 500 minutes à un pH de 7, alors qu'à une concentration de 100 μM , la demi-vie du fer ferreux est 40 minutes.

La concentration en oxygène est un facteur important dans la disponibilité du fer ferreux oxydable.

1.1.3.2.2. L'oxydation via les bactéries ferro-oxydantes :

L'oxydation du fer ferreux peut avoir lieu grâce à la présence de bactéries ferro-oxydantes, qui utilise l'énergie récupérée par l'oxydation pour leur biosynthèse et donc leur croissance. Les bactéries ferro-oxydantes permettent d'accélérer le taux d'oxydation du fer, il a été montré que l'effet des bactéries pouvait permettre d'augmenter de trois ordres de grandeur le taux d'oxydation (tabl.1.1).

Cependant on remarque que la concentration en fer ferreux n'affecte pas de façon importante la quantité d'énergie libérée par l'oxydation du fer ferreux. D'après la figure 1.5, l'énergie libérée par l'oxydation du fer ferreux est influencée par la température où a lieu la réaction.

Les bactéries ferro-oxydantes sont classées parmi les bactéries chimolithoautotrophes. Les bactéries chimolithoautotrophes sont des organismes spécialisés pour obtenir

l'énergie nécessaire à leur croissance par l'oxydation de substances inorganiques. La croissance autotrophe requiert un minimum d'énergie, qui est généré via l'oxydation, permettant d'obtenir le carbone nécessaire pour l'anabolisme bactérien.

Celui-ci est obtenu via la fixation du CO_2 dans le cycle de Calvin, cette opération nécessite 80% de l'ATP produit. Chez l'ensemble des organismes l'énergie est générée par la chaîne respiratoire, qui est une chaîne de transport d'électron permettant le passage de l'oxygène à la molécule d'eau ainsi que la génération de proton permettant la synthèse d'ATP via l'ATP synthase. Pour que l'oxydation permette de fournir l'énergie nécessaire au métabolisme pour la synthèse d'ATP, elle doit donc être exergonique, c'est-à-dire libérer suffisamment d'énergie pour toutes les étapes. Les équivalents d'hydrogène produits lors de l'oxydation doivent être utilisés pour la réduction du NAD^+ (fig.1.7).

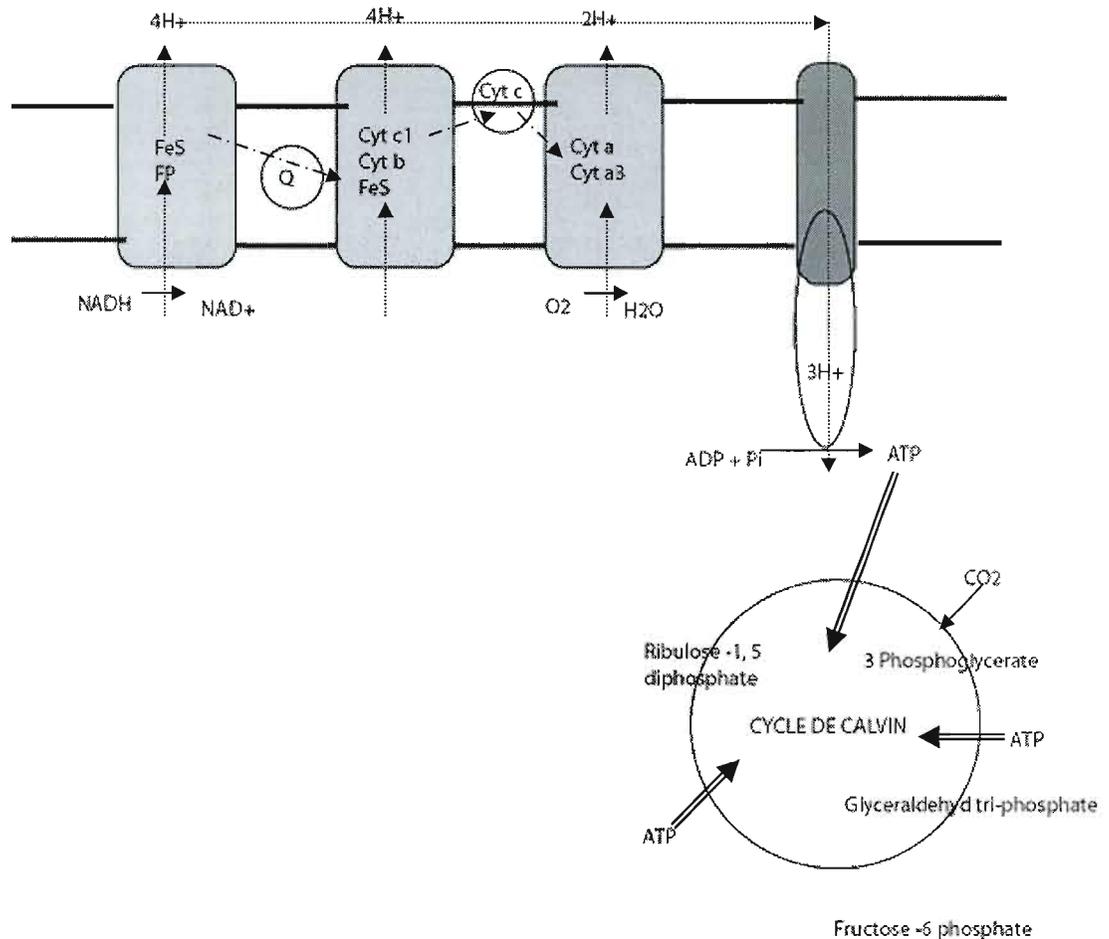


Figure 1.7 : Schéma de la chaîne énergétique bactérienne ; Le transfert d'électron permet la génération de l'ATP qui est utilisé pour la biosynthèse via le cycle de Calvin. Construit d'après Kelly et Prescott et al. (2003).

La formation d'ATP requiert entre 37 et 59 $\text{kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$, alors que la fixation du CO_2 nécessite 495 $\text{kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$. L'oxydation du fer permet la génération d'une faible quantité d'énergie, 25 $\text{kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$ à un pH de 3, 30 $\text{kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$ à un pH de 2 et 33 $\text{kJ}\cdot\text{mole}^{-1}$ à un pH de 1.5 (Tabl.1.2)(Kelly, 1978).

Selon Kelly, la synthèse d'une mole d'ATP nécessite donc l'oxydation de 2 moles de fer. L'oxydation du fer permet de catalyser la réduction du cytochrome c et l'entrée des électrons dans la chaîne à ce niveau et donc également la production d'ATP. De plus certains électrons transférés au cytochrome c via le fer ferreux, circule vers le NAD^+ pour sa réduction. Les bactéries chimiolithoautotrophes ferro-oxydantes synthétisent entre 9 et 14 moles d'ATP à travers la chaîne respiratoire pour la synthèse d'une mole de CO_2 .

	Besoins Energétiques (kJ.mole⁻¹)	
1 mole d'ATP	37 à 59	
Fixation d'une mole de CO₂	495	
Oxydation d'une mole de fer	pH 1.5	-33
	pH 2	-30
	pH 3	-25

Tableau 1.2 : Besoins énergétiques pour différentes réactions intervenant lors de la fixation du CO₂, via un processus chimiolithoautotrophes. Construit d'après Kelly.

Les connaissances des données thermodynamiques nous permettent de déduire le rendement énergétique de chaque organisme c'est-à-dire la quantité de fer qui doit être oxydée pour permettre la fixation d'une mole de CO₂.

Les données théoriques de la thermodynamique nous permettent d'écrire, qu'il faut 2 moles de fer oxydé pour la synthèse d'une mole d'ATP et qu'il est nécessaire d'avoir entre 8,4 et 13,3 moles d'ATP (Energie pour la fixation d'une mole de CO₂/Energie pour la synthèse d'une mole d'ATP) pour la fixation d'un CO₂. Il faut donc entre 16.8 et 26.6 mole de fer oxydé pour fixer une mole de CO₂. Cependant Kelly (1978) nous montre une étude pour le cas d'*Acidobacillus ferroxidans*, en croissance à un pH de 1.5, on trouve 0.35g de bactéries par mole de fer oxydée. En admettant qu'une bactérie contient 48% de carbone, on obtient environ 0.014 mole de CO₂ fixée pour une mole de fer oxydée, soit 71.4 mole de fer oxydée pour la fixation d'une mole de CO₂. De plus on peut déterminer l'efficacité du rendement énergétique par le rapport entre l'énergie nécessaire à la fixation d'une mole de CO₂ sur l'énergie de l'oxydation de la quantité de fer nécessaire à cette fixation (495/(71.4x33)), on obtient alors une efficacité de 23%, ce qui signifie que 23% de l'énergie disponible grâce à l'oxydation du fer est utilisé pour le fixation d'une mole de CO₂.

Ceci montre que comme toutes les réactions régies par les lois de la thermodynamique, l'efficacité biologique ne peuvent pas être 100% et de plus elle est rarement supérieure à 50%.

Les données du rendement énergétique pour les bactéries ferro-oxydantes sont rares, des seules observations obtenues, on remarque que le rendement énergétique semble varié aussi bien selon les caractéristiques de l'environnement (pH, Température) que selon

l'espèce bactérienne en jeu. Les données publiées sur la quantité de bactéries présentes et la teneur en fer ferreux montrent de très grandes variations (4 ordres de grandeur), ce qui nous laisse penser, qu'il n'existe pas de rendement énergétique précis correspondant à une espèce bactérienne ou à un environnement, mais que le rendement est particulier à un système espèce - conditions environnementales précis (Tabl.1.3). La plupart des données du tableau 1.3 sont des concentrations en fer mesurés lors de la culture en laboratoire des bactéries. Cette concentration en fer est dépendante de l'environnement étudié, mais elle varie également selon la méthodologie utilisée pour la culture des bactéries. On observe que les concentrations en fer ferreux dissous mesurées sur le terrain sont beaucoup moins variables que celles mesurés en laboratoire. La variabilité reliée à l'abondance des bactéries peut s'expliquer en partie par le fait que les expériences de laboratoire tendent vers une optimisation des conditions de culture pour favoriser la croissance, ce qui laisse penser que les quantités de bactéries dénombrés ne sont pas représentatives de l'abondance naturelle. On remarque que le taux d'oxydation est dépendant de la teneur en fer ferreux mais indépendant à la quantité de bactérie ferro-oxydantes dans l'environnement (Edwards et al., 2004; Roden et al., 2004).

Tableau 1.3 : Données sur la concentration en fer, le nombre de bactéries, le taux d'oxydation et le taux d'oxydation par bactérie pour différents environnements et espèces bactériennes. Le taux d'oxydation est obtenue en supposant que le pourcentage d'oxydation des bactéries est de 60% (moyenne des pourcentages obtenus dans la littérature), de la façon suivante : Taux d'oxydation par bactérie = { $[Fe^{2+}]_{milieu} \times 0.6$ } / nombre de bactéries. Les données en italiques correspondent à des mesures sur le terrain, alors que les autres correspondent à des mesures en laboratoire. (¹Edwards et al., 2003; ²Jannasch and Mottl, 1985; ³Emerson and Moyer, 2002; ⁴Emerson and Revsbech, 1994a; ⁵Emerson and Moyer, 1997; ⁶Neubauer et al., 2002; ⁷Sogaard et al., 2000a; ⁸Romero et al., 2003; ⁹Emerson et al., 1999; ¹⁰Emerson and Revsbech, 1994a; ¹¹Emerson, 2000 ; ¹²Roden et al., 2004).

Environnement		Espèce bactérienne	Concentration en fer ferreux (μM)	Nombre de bactéries (10^5)	Quantité fer oxydé par bactérie ($\mu M/bactérie$)	% de l'oxydation bactérienne	Rendement énergétique	pH
<i>Sources hydrothermales</i>	Dorsale Juan de Fuca ¹		10000	10	6×10^{-3}			
	Sources chaudes ²		1600	4,7	2×10^{-3}			
	Sources froides ²		50	10000	3×10^{-8}			
	Mont sous-marin de Loihi ³	<i>PVI et JVI</i>	268	1000	$1,6 \times 10^{-6}$			
Expérience de laboratoire ¹²		TW2					1,65 g C per mol Fe ²⁺	7
<i>Rhizome de plantes</i>	<i>Rhizome de plantes (Marselisborg)¹⁰</i>	<i>Leptothrix ochracea</i>	250	5000	3×10^{-7}	45 à 80		
	Rhizome de plantes <i>Typha latifolia</i> (Maryland) ⁶	<i>BrT</i>	100	100	6×10^{-6}	32 à 53	0,7 g de CH ₂ O/mol Fe ²⁺	6,5
	<i>Rhizome de plantes (Contary Creek,</i>	<i>Acidobacillus ferrooxidans</i>	50	20	$1,5 \times 10^{-5}$			4

	<i>Virginie</i> ⁹							
<i>Eaux usées</i>	Eaux usées de Michigan ⁵	<i>ES1</i>	8	1000	$4,8 \times 10^{-8}$	80		7,1
	Eaux usées de Michigan ⁵	<i>ES2</i>	8	500	$9,6 \times 10^{-8}$	80		7,1
	<i>Eaux usées Danemark</i> ⁴	<i>Leptothrix ochracea</i>	250	10000	$1,5 \times 10^{-7}$			7,3
	Eaux usées Danemark	<i>Gallionella ferruginea</i>	1163	10000	$6,9 \times 10^{-7}$			5,6
	<i>Solution commerciale de bio-lxiviation des plantes</i> ⁸	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	53000	1	0,3			2,5
<i>Sédiment</i> ¹¹		L7 = <i>Chromatium vinosum</i>					7.6 g CH ₂ O per mol Fe ²⁺	
		SW-2 = <i>Rhodobacter capsulatus</i>					7.6 g CH ₂ O per mol Fe ²⁺	

1.1.3.3. JV1 et PV1 : Deux bactéries ferro-oxydantes neutrophiles :

JV1 et PV1, qui seront l'objet de cette étude, sont deux bactéries chimiolithoautotrophes mésophiles microaérophiles obligatoires, ferro-oxydantes, et se développent à des températures comprises entre 25°C et 30°C. Les deux souches sont chimiolithoautotrophes car elles ne sont pas aptes à obtenir leur énergie d'une source organique de carbone, mais elles l'obtiennent à partir de l'oxydation du fer ferreux. De plus elles sont adaptées à l'eau de mer et n'ont pas montrés de capacité à croître en eau douce. JV1 a un temps de génération de 24h, celui de PV1 n'est connu (fig.1.8).

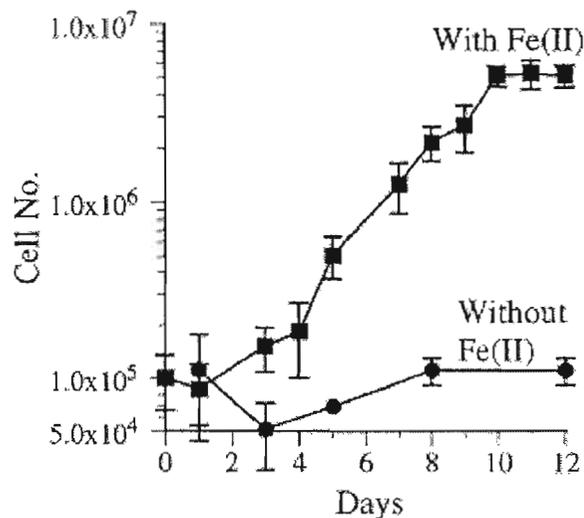


Figure 1.8 : Courbe de croissance de JV1. La souche croit en culture liquide en présence d'eau de mer artificielle, de solution de minéraux traces et de vitamines, avec un ajout de fer ferreux et d'air chaque jour (Emerson and Moyer, 2002).

Un des moyens pour établir la phylogénie des bactéries est de séquencer puis comparer la similarité de l'ADNr 16S. Les études effectuées (Emerson and Bradburne, 2001; Emerson and Moyer, 1997) ont démontré que JV1 et PV1 n'ont pas de grandes similitudes avec *Gallionella*, mais plutôt avec un autre groupe de bactéries ferro-oxydantes, auquel appartiennent les deux bactéries ES1 et ES2.

Ces deux dernières souches proviennent des eaux usées du quartier est de Lansing, au Michigan, elles ne forment pas de filaments ou des gaines, mais elles représentent une

population dominante parmi les micro-organismes ferro-oxydants. Phylogénétiquement, elles forment une nouvelle lignée dans les γ Proteobacteries (fig.1.9) (Emerson and Moyer, 1997). Cependant seul est visible PV1 sur l'arbre, car JV1 a été isolée au cours d'une mission plus récente, mais les analyses semblent indiquer qu'elle est proche de PV1. La souche PV1 est en cours de séquençage de son génome par The Venter Institute. Un nom proposé par Emerson est *Siderrooxidans marimum*, où *Siderrooxidans* représente un nouveau genre des bactéries ferro-oxydantes obligatoire des gamma-proteobacterias. Il semblerait que JV1 ferait également parti du même genre *Siderrooxidans* (Emerson, D. Comm. Pers. Et www.who.edu/science/MCG/edwards/PV1)

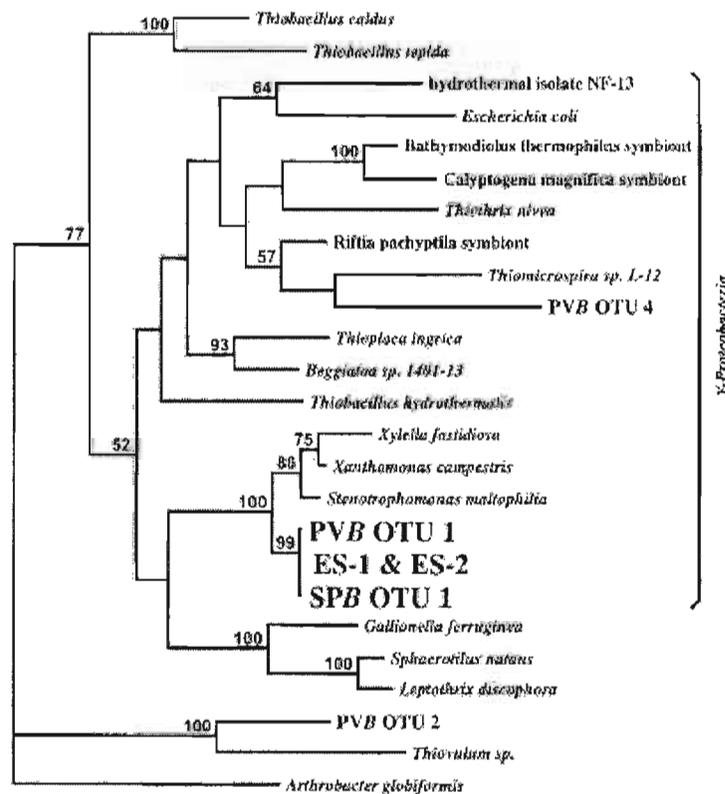


Figure 1.9 : Arbre phylogénétique réalisé à partir de séquences d'ARNr 16S démontrant les relations entre ES1, ES2, SPB OTU1 (bactérie du permafrost sibérien) et PVB OTU 1 (bactérie champ hydrothermal Pele) avec d'autres γ Proteobacteries (Emerson, D., et C. Moyer. 1997).

1.2. Lieu d'étude :

1.2.1. Les sources hydrothermales :

Les sources hydrothermales sous marines sont associées au système des dorsales océaniques, des bassins arrière arc et des volcans sous marins. La fissuration et la perméabilité de la croûte océanique dans ces zones permettent la percolation de l'eau de mer qui est réchauffé par la proximité de la chambre magmatique et chargée d'éléments dissous. L'eau de mer chaude, acide et altérée relargue des métaux (Fe, Mn, Zn et Cu) et réduit les sulfures (H_2S) de la roche volcanique ; ces éléments sont transportés par le fluide hydrothermal jusqu'au plancher océanique où ils forment des dépôts de minéraux métalliques (Zierenberg et al., 2000). La composition des fluides émis dans ces zones de divergence des plaques, diffère d'un endroit à l'autre selon, leur degré de dilution avec l'eau de mer avant leur émergence, leur degré d'oxydation et également selon l'importance de la percolation de l'eau de mer sous le plancher océanique. Ces différences caractérisent le type de source hydrothermale rencontrée et entraînent des conséquences importantes au niveau biologique. Les éléments retrouvés dans les fluides hydrothermaux (soufre, fer etc.) permettent une production microbienne chimioautotrophe locale, entraînant, dans certains cas, un réseau trophique complexe (Jannasch and Mottl, 1985; McCollom and Shock, 1997; Van Dover, 2000).

Les premières observations de ses écosystèmes en 1977 se posent comme une découverte majeure dans le domaine de la biologie et de l'océanographie, remettant en cause les idées la nécessité de l'énergie photosynthétique pour le développement de la vie. L'exploration subséquente des sources hydrothermales a conduit à la découverte et à la caractérisation de plusieurs nouvelles espèces, ainsi qu'à l'étude des adaptations physiologiques qui permettent à ces organismes de se développer dans de telles conditions (température, pression et pH). De nombreuses études ont permis de caractériser la macrofaune des sources et d'observer des symbioses bactériennes, avec des organismes tels que des vestimentifères comme *Riftia pachyptila*. De plus des études récentes sur la méiofaune des sources hydrothermales permettent d'avoir une meilleure idée des réseaux trophiques hydrothermaux (Levesque and Juniper, 2002; Tunnicliffe, 1992; Van Dover, 2000). L'existence des bactéries comme à l'origine de la vie hydrothermale n'est plus discutée, cependant les environnements hydrothermaux étant très variables (conditions redox), les processus thermodynamiques et

moléculaires, leur permettant de tirer leur énergie à partir de l'oxydation ou la réduction d'un élément minéral, sont très mal connus.

1.2.2. Les conditions oxydo-réductrices des sources hydrothermales :

Les sources hydrothermales sont un écosystème particulier où l'environnement physico-chimique est hostile; Malgré ces conditions, la vie s'est installée. Le paysage hydrothermal est formé par des dépôts minéraux, des fois sous la forme d'oxydes de fer dont l'étude approfondie de leurs composés a permis de mettre en évidence la présence de filaments, qui laissait envisager une possibilité bactérienne dans la précipitation des minéraux siliceux et ferreux.

À travers l'étude de Juniper et Fouquet (1988) sur les dépôts de filament de fer et de silice au niveau de sites hydrothermaux récents et anciens, on remarque que l'agrégation des filaments microbiens peut former une base à la précipitation des minéraux en créant un micro-environnement propice. Ces structures filamenteuses paraissent antérieures à la précipitation des oxydes de fer et de la silice, mais elles ne semblent pas avoir une apparence minéralogique. De plus les structures filamenteuses ressemblent à des filaments bactériens qui sont communs aux bactéries sulfo- et métallo-oxydantes.

Les bactéries présentent donc un rôle dans la formation des minéraux sulfureux. Le cycle du soufre est composé des bactéries réductrices de sulfate qui génèrent du sulfure d'hydrogène, lorsque celui s'associe aux composés ferreux il permet la formation de sulfures de fer : il y a donc un lien entre le cycle du soufre et celui du fer. Ces sulfures de fer participent à la formation des cheminées. La dégradation des sulfures peut se faire par des bactéries. Lors de l'oxydation du fer ferreux par les bactéries il y a alors libération d'ions ferriques, qui sont semble être responsable de la dégradation des sulfures (Juniper and Tebo, 1995). Les bactéries sulfo- et ferro-oxydantes ont donc un rôle dans le développement du paysage hydrothermal.

Les études menées sur le site hydrothermal du volcan sous-marin Loihi (Hawaï), montrent qu'un environnement où la concentration en fer est élevée, en présence de faible température, est propice pour les bactéries ferro-oxydantes. De plus, on peut observer un tapis bactérien

orangé, qui est une couche d'oxyde de fer, sur les laves autour du champ, ce qui montre l'importance quantitative des bactéries ferro-oxydantes (Emerson and Moyer, 2002).

1.2.3. Le champ hydrothermal de Loihi :

Une description plus détaillée du champ hydrothermal de Loihi est présentée dans le paragraphe 2.2. Dans la partie ci-dessous l'emphase est mis sur les conditions présentent permettant l'oxydation du fer biotique et abiotique.

Loihi est un volcan sous marin actif de type point chaud, et potentiellement la prochaine île Hawaïenne, localisé à 30km au Sud Est de l'île d'Hawaï. Des évidences géochimiques et biologiques suggère que les systèmes hydrothermaux situés au milieu des plaques diffèrent de ceux présents aux limites des plaques. Par exemple, les eaux hydrothermales de Pele's Vent (au sud d'Hawaï) contiennent cent fois plus de CO_2 dissous qu'au niveau des champs hydrothermaux situés au Galapagos, par conséquent le pH est également plus bas. La quantité de fer dissous (1mM) est 2×10^6 plus important que dans l'eau de mer ambiante. Le sommet et la cratère volcanique se situe dans une zone de concentration minimum d'oxygène où la moyenne de l'eau de mer est de 0.5mg/l (Emerson and Moyer, 1997; Emerson and Moyer, 2002; Karl et al., 1988)

Le champ hydrothermal de Loihi ne connaît pas une communauté luxuriante de macrofaune souvent présente au niveau des autres sources hydrothermales, ceci est dû à la faible quantité de sulfures, aux fortes concentration en CH_4 ou en fer, ou encore au faible pH.

Les champs hydrothermaux de Naha et Ikaika (Pele's Pit) sont respectivement les lieux d'échantillonnage pour PV1 et JV1 (fig.1.10). Cependant PV1 a aussi été identifiée au niveau du site hydrothermal Axial Volcano, Juan de Fuca Ridge, qui présente les mêmes caractéristiques chimiques que Loihi (Kennedy et al., 2002).

En 1996, les conditions ont changé dû à une éruption au sommet, altérant le paysage et la chimie du champ hydrothermal. Un cratère d'une profondeur de 300m a été formé au sommet, nommé Pele's Pit. A sa base des nouveaux champs hydrothermaux se sont formés. Les caractéristiques des nouveaux flux hydrothermaux sont une température de 200°C , un flux enrichi en CO_2 et un pH passa autour de 5.6.

Les conditions physico-chimiques du champ hydrothermal de Loihi présentent des fortes concentrations en CO_2 ($>17\text{mM}$) et en fer ($268 \mu\text{M}$) comparativement aux fluides hydrothermaux tempérés (Tabl.1.4) (Emerson and Moyer, 2002).

	Concentration au niveau des fluides hydrothermaux chauds (mol.L^{-1})	Concentration au niveau des fluides hydrothermaux tempérés (mol.L^{-1})	Concentration au niveau du fluide hydrothermal de Loihi, Hawaï (mol.L^{-1})
Température	200-360 °C	6-40 °C	10-167 °C
Fe	$0.7-6.4 \times 10^{-3}$	$0.006-0.1 \times 10^{-3}$	0.27×10^{-3}
CO_2	$4.2-15 \times 10^{-3}$	N.D	17×10^{-3}

Tableau 1.4 : Comparaison de quelques éléments de la chimie des flux hydrothermaux avec la chimie du fluide hydrothermal de Loihi, Hawaï (Butterfield et al., 1997; Butterfield et al., 2001).

1.3 Méthodologie

1.3.1. Culture des bactéries JV1 et PV1

Les deux souches bactériennes JV1 et PV1 (obtenues par l'intermédiaire de David Emerson) sont cultivées en milieu liquide. Ce milieu de culture contient un milieu minimum d'eau de mer artificiel Wolfe modifié composé (par litre) :

27.5 g de NaCl,
 5.38 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
 6.78 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
 0.72 g de KCl, 0.2 g de NaHCO_3 ,
 1.4 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
 1 g de NH_4Cl ,
 0.05 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

De plus il est enrichi en minéraux traces (solution de l'ATCC) en g/litre :

EDTA 0.500,
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.000,
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.500,
 NaCl 1.000,
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.100,
 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.100 ,

CaCl_2 (anhydrous) 0.100,
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.100,
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.010,
 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ (anhydrous) 0.010,
 H_3BO_3 0.010,
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.010,
 Na_2SeO_3 (anhydres) 0.001,
 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.010,
 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.020

et en vitamines (solution de l'ATCC) en mg/litre :

Folic acid 2.000,
 Pyridoxine hydrochloride 10.000,
 Riboflavin 5.000,
 Biotin 2.000,
 Thiamine 5.000,
 Nicotinic acid 5.000,
 Calcium pantothenate 5.000,
 Vitamin B12 0.100,
 p-Aminobenzoic acid 5.000,
 Thioctic acid 5.000,
 Monopotassium phosphate 900.0.

Les bactéries étant microaérophiles elles ont besoin uniquement d'une faible quantité d'oxygène. De plus la présence d'oxygène en grande quantité entraînerait l'oxydation naturelle. Une bouteille permet l'élaboration du milieu de culture qui est ensuite redistribué dans chaque bouteille de culture constituée de 35ml de milieu. L'ensemble du matériel est autoclavé avant utilisation, puis le milieu de culture est préparé afin d'en obtenir 35ml dans chaque bouteille. On utilise donc un multiple de 35ml d'eau de mer artificielle, auquel on incorpore une solution de minéraux (multiple de 35 μ l), puis l'ensemble du milieu est bullé pendant 15 minutes avec de l'azote, le pH est ajusté à 6.5 avec du CO_2 avant d'être autoclavé. L'ensemble des manipulations se font pour cette première partie dans une boîte à gant sous atmosphère d'azote, alors que la deuxième ce fait sous atmosphère d'un mélange gazeux de 1% d' O_2 , 19% de CO_2 et 80% de N_2 . Par la suite on incorpore au milieu de culture une solution de vitamines (multiple de 40 μ l) et on ajoute une quantité de chlorure de fer afin d'obtenir une concentration de 1mM. Ensuite le milieu de culture est distribué dans chaque bouteille de culture en quantité de 35ml, puis ensuite chaque bouteille est inoculée en absence ou en présence d'une souche bactérienne étudiées. Les cultures sont placées à une température de 24°C, qui correspond à la température du laboratoire.

1.3.2. Mesure de la quantité de fer :

Une des difficultés est de quantifier l'oxydation bactérienne par rapport à l'oxydation chimique, c'est dans cet optique que nous allons déterminer la concentration en fer en présence et en absence de bactéries.

Nos mesures vont porter sur la quantité de fer présente en solution dans la culture au cours du temps (de 0 à 200 heures).

Le dosage des quantités de fer ferreux et de fer ferrique dans le milieu de culture est obtenu grâce à la méthode ferrozine. Elle consiste en la mesure spectrophotométrique du fer ferreux et du fer total dans la culture, par colorimétrie (ferrozine). Le fer ferreux forme un complexe ferrozine, sa quantité est donc proportionnelle à l'intensité de couleur de la ferrozine. Le fer ferrique, lui ne forme pas de complexe, on peut donc le quantifier, via la mesure du fer totale, qui correspond au fer ferreux et au fer ferrique réduit en fer ferreux via l'hydroxylamine. La quantité de fer ferrique est obtenue par la soustraction du fer total par le fer ferreux (Viollier et al., 2000).

Les mesures du fer ferreux se font en utilisant 500 μ l de ferrozine (colorant), 375 μ l d'ammonium acétate (tampon), et 100 μ l d'échantillon et 900 μ l d'eau milliQ. Pour la mesure du fer ferreux est ajouté l'hydroxylamine hydrochloridrique (125 μ l, réducteur). L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 562 nm. De plus chaque échantillon est filtré avant la mesure de l'absorbance pour éviter des problèmes de lecture en présence des bactéries et des oxydes. Chaque groupe de mesure sera fait 5 fois pour chaque souche bactérienne afin d'observer la reproductibilité, et de connaître l'écart des variations.

Les observations se font sur la cinétique de ses mesures, appliquées aux différentes cultures au cours du temps. L'ensemble de ces mesures permet la caractérisation de l'oxydation du fer en absence et en présence des bactéries, et donc de comprendre le rôle quantitatif des deux microorganismes ferro-oxydantes.

1.3.3. Production de biomasse et rendement énergétique :

La détermination de la biomasse en culture au cours du temps se fait par des comptages cellulaires, qui se font après coloration au DAPI d'extrait de culture. Il y a donc fluorescence en bleu des acides nucléiques de chaque bactérie, visible grâce au microscope à épifluorescence, ce qui nous permet de les dénombrer. D'après la quantité de bactérie on en déduit la concentration bactérienne de notre échantillon à chaque temps de mesure et donc l'évolution de notre population (Prescott et al., 2003).

Pour des raisons pratiques lors des séries temporelles, les échantillons permettant les comptages bactériens sont fixés grâce à de l'eau de mer artificielle formolée à 4% (500µl), avec un volume de 1ml d'échantillon. Après environ 48h de culture, les oxydes présents dans la lame empêchent le comptage des bactéries. Il faut donc ajouter de l'hydroxylamine hydrochloridrique pour réduire les oxydes (200µl).

La combinaison des données sur la quantité de fer au cours du temps et celles de la biomasse au cours du temps vont nous permettre de calculer le rendement énergétique de l'oxydation bactérienne. Pour la détermination du rendement énergétique et donc la quantité de carbone produite, on assume que le poids sec d'une bactérie est de 2.5×10^{-13} g et que le carbone représente 50% du poids sec (Prescott et al., 2003).

1.3.4. Protocole expérimental utilisé :

Neubauer et al. (2002) propose que les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles aient un effet inhibiteur sur l'oxydation chimique. Le processus mis en cause, serait une captation du fer ferreux dissout par les bactéries, le rendant ainsi moins disponible pour l'oxydation chimique. Cet effet inhibiteur peut être mis en évidence grâce à l'étude d'une culture en présence de bactéries mortes, ainsi ils obtiennent le taux d'oxydation biotique comme la différence entre le taux d'oxydation dans la culture en présence de bactéries et celui dans la culture en présence de bactéries mortes. L'effet inhibiteur des bactéries est calculé comme étant la différence entre le taux d'oxydation des bactéries mortes et le taux d'oxydation du fer ferreux en absence de bactéries. Afin de confirmer l'hypothèse de Neubauer, sur l'effet inhibiteur des bactéries ferro-oxydantes sur l'oxydation chimique, trois séries de bouteille vont être utilisées

pendant l'expérimentation. Une en absence de bactéries, une en présence de bactéries vivantes et une dernière série en présence de bactéries tuées au début de la culture par l'ajout de sodium azide, un inhibiteur du métabolisme cellulaire (fig.1.11). Le but étant de quantifier le taux d'oxydation chimique et bactérien, ainsi que l'effet inhibiteur des bactéries.

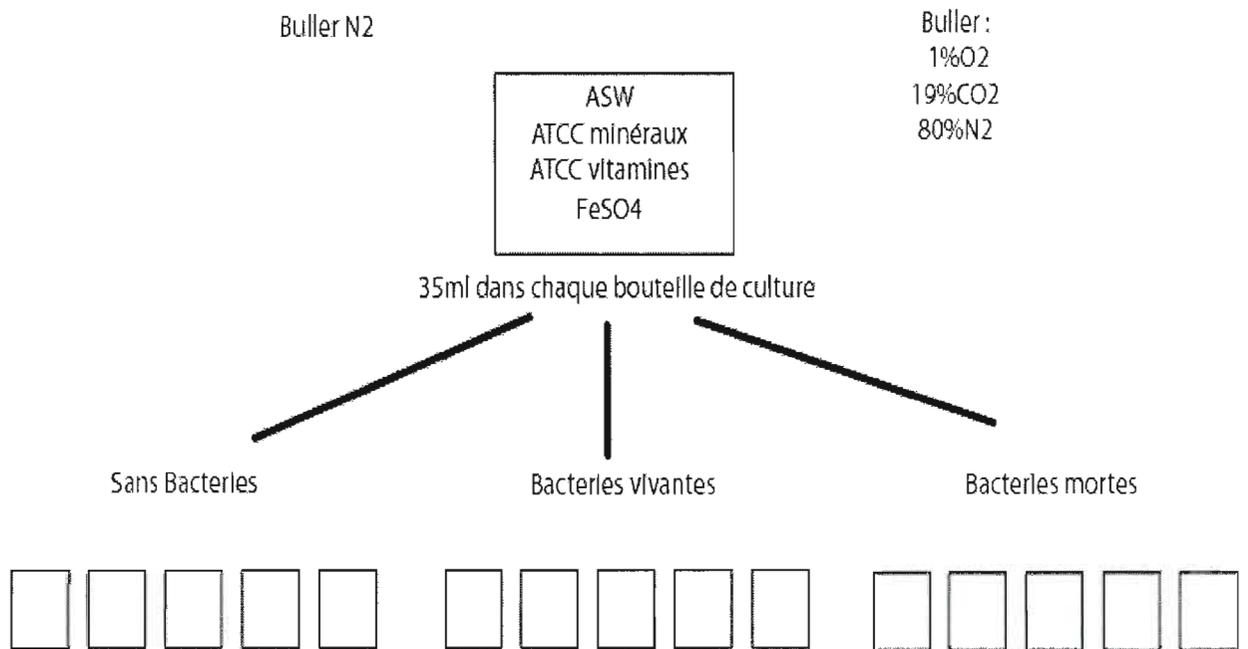


Figure 1.11 : Protocole utilisé pour déterminer la part des bactéries ferro-oxydantes dans l'oxydation du fer ferreux. Protocole construit selon l'hypothèse de Neubauer (2002) mettant en évidence l'effet inhibiteur des bactéries ferro-oxydantes dans l'oxydation chimique.

1.4. Résultats :

1.4.1. Contrôle des conditions de culture :

Nous avons donc testé différents paramètres (quantité d'oxygène, pH, source de fer) des conditions de culture afin d'observer leur influence dans la culture des bactéries ainsi que dans l'oxydation du fer.

1.4.1. 1. La culture des souches bactériennes JV1 et PV1 :

La première étape de la compréhension de l'oxydation du fer par les bactéries ferroxydantes, JV1 et PV1 passe par la culture de celles-ci dans des conditions optimums telles que celles décrites par Emerson et Moyer (2002). La culture des bactéries s'est effectuée en présence de 35 ml d'eau de mer artificielle autoclavée avec un ajout de 40 μ l de vitamines et 40 μ l de minéraux, ainsi que de 80 μ l d'une solution de chlorure de fer ferreux (146 μ M), l'ensemble étant bullée 3 minutes sous azote. La quantité de fer présente dans chaque culture (absence de bactéries, présence de JV1, présence de PV1) a été suivie au cours du temps, afin d'observer l'effet des bactéries.

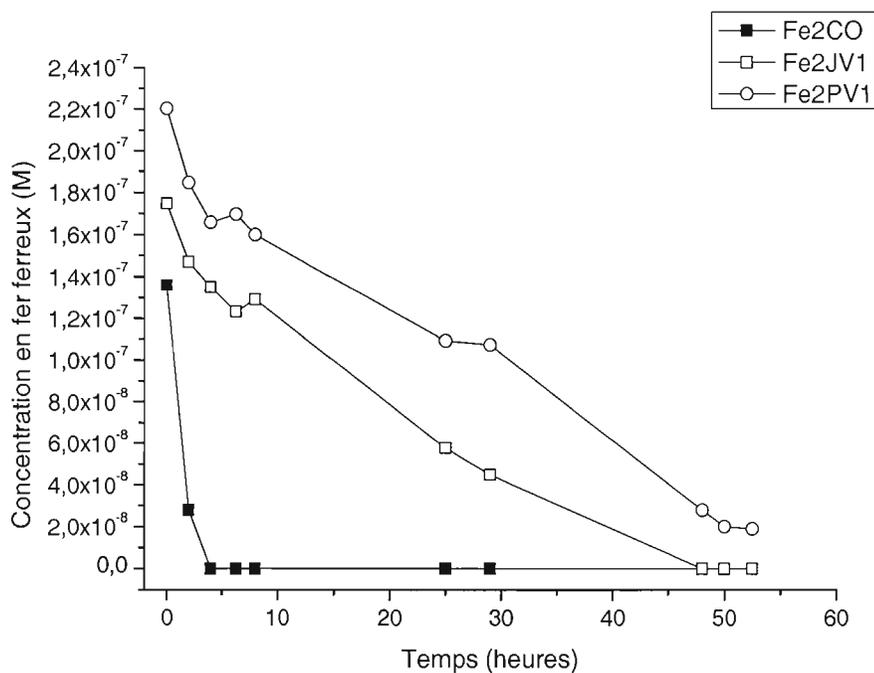


Figure 1.12 : Concentration en fer présente dans les bouteilles de culture en absence de bactéries, en présence de JV1 et en présence de PV1 au cours du temps.

On observe que la concentration en fer ferreux diminue au cours du temps dans toutes les bouteilles de cultures en absence ou en présence de bactéries. Cependant on note qu'en

absence de bactérie la concentration devient nulle en moins de cinq heures, alors qu'en présence de JV1 et PV1 la concentration diminue en 50 heures (fig.1.12). A pH neutre l'oxydation du fer ferreux peut se faire par l'oxygène d'une part et par les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles d'autre part, or on observe une oxydation très rapide du fer présent dans le milieu de culture ce qui est plus probablement due à l'oxygène présent qu'aux bactéries ferro-oxydantes neutrophiles. L'oxygène responsable de l'oxydation du fer ferreux entraîne un biais dans quantification de la part des bactéries ferro-oxydantes dans l'oxydation du fer ferreux.

1.4.1.2. Effet de la quantité d'oxygène présent dans le milieu de culture :

D'après nos premières observations, l'oxygène présent dans la culture est responsable de l'oxydation rapide du fer ferreux. Il devient alors important de contrôler sa quantité afin d'observer son effet sur les cultures en présence et en absence de bactéries. Les cultures ont été préparées avec le même protocole expérimental que précédemment, c'est-à-dire l'ajout dans chaque bouteille de culture de 35ml d'eau de mer artificielle (autoclavée) ainsi que 40 μ l de minéraux et de vitamines, auquel sont ajouté 80 μ l d'une solution de chlorure de fer (FeCl_2) autoclavée de concentration 65mM. L'ensemble de la mise en culture s'effectue dans une boîte à gant purgée d'azote, où les bouteilles de culture sont bullées pendant 2 minutes chacune à l'azote (afin de limiter la quantité d'oxygène).

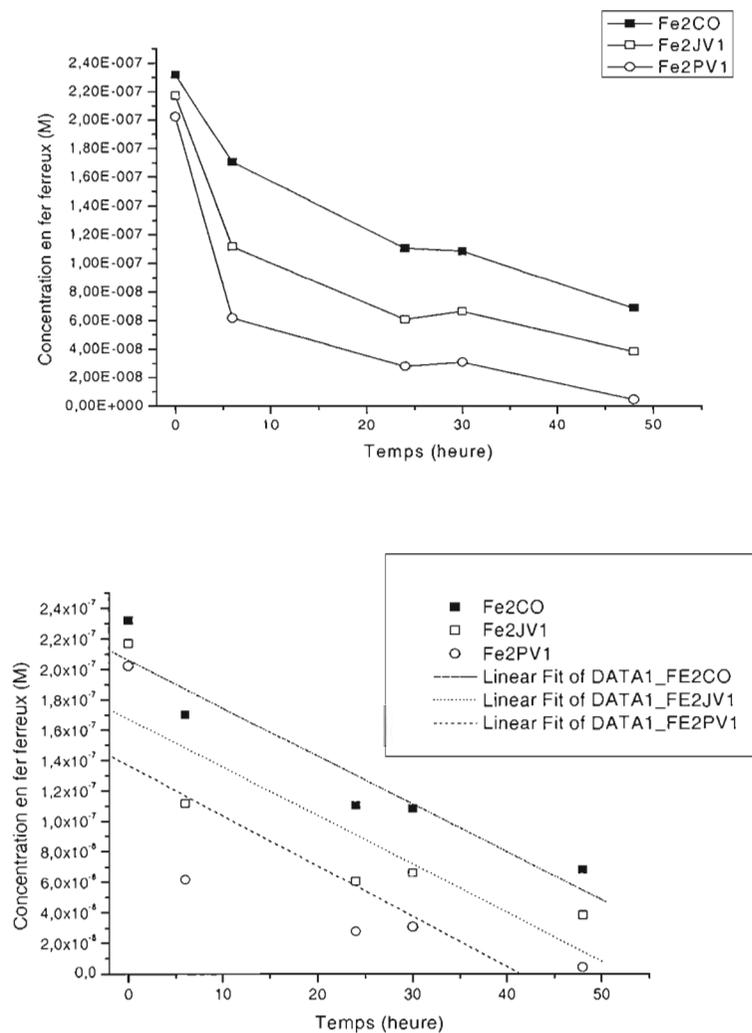


Figure 1.13 : A. Concentration en fer au cours du temps, dans 3 cultures différentes en absence de bactéries ferro-oxydantes, en présence de JV1 et en présence de PV1, deux souches de bactéries ferro-oxydantes neutrophiles du champ hydrothermal de Loihi, Hawaii. B. Droite de régression de la concentration en fer ferreux au cours du temps, les équations de régression sont pour la culture sans bactéries (CO) $y=2.06 \times 10^{-7} - 3.15 \times 10^{-9}x$ ($R^2=0.95$), pour la culture en présence de JV1 $y=1.67 \times 10^{-7} - 3.18 \times 10^{-9}x$ ($R^2=0.85$) et pour la culture en présence de PV1 $y=1.36 \times 10^{-7} - 3.29 \times 10^{-9}x$ ($R^2=0.8$).

On observe (fig.1.13) que la concentration en fer ferreux diminue au cours du temps, aussi bien en absence qu'en présence de bactéries ferro-oxydantes, cependant cette diminution est plus rapide en absence de bactéries. On peut obtenir la vitesse de l'oxydation du fer ferreux au cours du temps par la pente décrite dans l'équation de la régression linéaire, la vitesse de l'oxydation du fer est donc de $3.15 \times 10^{-9} \text{MFe}^{2+}/\text{heures}$ en absence de bactéries, alors qu'elle est réciproquement de $3.18 \times 10^{-9} \text{MFe}^{2+}/\text{heures}$ et $3.29 \times 10^{-9} \text{MFe}^{2+}/\text{heures}$ en présence de JV1 et de PV1. En outre on peut noter que la pente varie au cours du temps, ce qui laisse penser que l'oxydation du fer ne s'effectue pas forcément de façon linéaire. Si on admet que la concentration en fer ferreux en fonction du temps est une relation exponentielle, on peut alors calculer une vitesse entre chaque pas de temps. On obtient alors une vitesse d'oxydation plus rapide pour PV1 ($2,35 \times 10^{-8} \text{M}$), JV1 ($1,76 \times 10^{-8} \text{M}$) par rapport à l'oxydation abiotique ($1,02 \times 10^{-8} \text{M}$) entre 0 et 6 heures de cultures. Pendant le reste de la culture, la vitesse d'oxydation est plus rapide en absence de bactéries. On note donc la différence entre l'oxydation biologique et chimique du fer ferreux se fait principalement au cours des premières heures de culture. Dans ce cas, en tenant compte uniquement des dix premières heures de culture il semblerait que l'oxydation du fer ferreux par PV1 serait plus rapide que celle effectuée par JV1 et plus rapide de l'oxydation chimique du fer.

On remarque également que la concentration en fer ferreux présente au début de la culture est d'environ $2.2 \times 10^{-7} \text{M}$, cependant la concentration en fer théorique mise dans chaque bouteille de culture est de $1.5 \times 10^{-4} \text{M}$, ceci montre qu'il y a une perte importante de fer ferreux avant la première mesure au temps zéro, qu'on suppose à un maximum de dix minutes après l'inoculation des bouteilles (fig.1.13). Cette perte semble encore une fois due à la compétition entre l'oxygène et les bactéries ferro-oxydantes dans l'oxydation du fer ferreux. Il semble donc que l'effet de diminuer la quantité d'oxygène dans la culture n'affecte pas l'oxydation du fer en présence et en absence de bactéries, nous avons donc essayer de vérifier l'effet du pH, une diminution de celui-ci permet d'allonger la demi-vie du fer ferreux.

1.4.1.3. Effet de la variation de la quantité d'oxygène et du pH :

Comme décrit précédemment, la demi-vie du fer ferreux est fortement corrélée au pH. A un pH neutre la demi-vie du fer ferreux est de l'ordre de quelques minutes, alors qu'elle passe à l'ordre de l'année en diminuant le pH à 4. Nous avons donc diminué le pH entre 5.5 et 6.0 tout au long de la culture afin de vérifier son influence. De plus afin d'avoir une idée un peu plus quantitative de la proportion d'oxygène présente dans la culture, pour cela nous avons utilisé un mélange gazeux pour buller nos cultures contenant 1% d'oxygène, 19% de dioxyde de carbone et 80% d'azote, permettant ainsi de tester l'effet pour une quantité connue d'oxygène. Le protocole utilisé restant le même, chaque bouteille a une concentration de $178\mu\text{M}$ en fer ferreux.

On observe une grande disparité de la concentration initiale en fer ferreux dans chaque bouteille de culture, de plus celle-ci est encore inférieure à la concentration en fer ferreux théorique, ce qui nous indique que la diminution de pH n'affecte pas les premières heures de l'oxydation du fer. On note sur chacune des cultures que la concentration en fer ferreux augmente dans les premières heures, ceci est peut être du à un problème de solubilité du chlorure de fer qui se ferait après la première mesure, c'est dans cette objectif que nous allons essayer de tester l'influence de l'homogénéisation des cultures (appendice A).

1.4.1.4. Influence de l'homogénéisation des cultures :

Le fait de faire un seul milieu de culture est de le répartir dans les bouteilles de culture devrait permettre d'avoir la même concentration de départ ce qui permet de comparer les différentes cultures. Le milieu de culture est préparé en conservant les mêmes proportions d'eau de mer artificielle, de minéraux et de vitamines que dans les bouteilles de cultures. Le mélange est bullé par le mélange pendant 15 minutes dans la bouteille de préparation du milieu de culture, puis deux minutes dans chaque bouteille de culture et le pH est maintenu à 6.0. Finalement le chlorure de fer est introduit directement dans le milieu de culture sans être préparé auparavant et sans être autoclavé, dans une concentration de 1.3mM.

Temps de culture	Concentration en fer ferreux (M)	
	Sans Bactéries	JV1
0	9.36×10^{-5}	$9,95 \times 10^{-5}$
22	2.41×10^{-5}	9.59×10^{-6}

Tableau 1.5 : Concentration en fer ferreux au cours du temps en présence et absence de bactéries. Les équations des droites de régression sont indiquées ci-dessous : (CO) $y=9.36 \times 10^{-5}-2.72 \times 10^{-6}x$, pour la culture en présence de JV1 $y=9.94 \times 10^{-5}-3.52 \times 10^{-6}x$.

On note que la quantité de fer présente au début de la culture est identique dans chaque bouteille, en outre on observe, comme précédemment, que la concentration théorique n'est toujours pas conservée. Cependant les pertes semblent moins importantes, on trouve ici un peu plus d'un ordre de grandeurs, alors que dans les tests antérieurs la perte correspondait à au moins trois ordres de grandeurs. Il semblerait donc que le fait de faire un seul milieu de culture permet un meilleur contrôle de la concentration de fer ferreux dans chaque bouteille de culture (tabl.1.5). Bien que l'absence d'autoclavage semble diminuer la perte de fer des le début de la culture elle n'explique pas la différence totale entre le concentration théorique et la concentration mesurée.

1.4.1.5. Changement de source de fer :

La stabilité de la quantité de fer ferreux étant variable au début de culture, nous avons décidée de voir si notre solution de chlorure de fer n'était pas elle-même oxydée, ce qui expliquerait que les valeurs de la première mesure soient toujours inférieure à la valeur théorique. Nous avons donc testé un changement dans la source de fer en remplaçant le chlorure de fer pour un sulfate de fer. La concentration en sulfate de fer introduit dans le milieu de culture bullé avec le mélange gazeux est de 1.37mM.

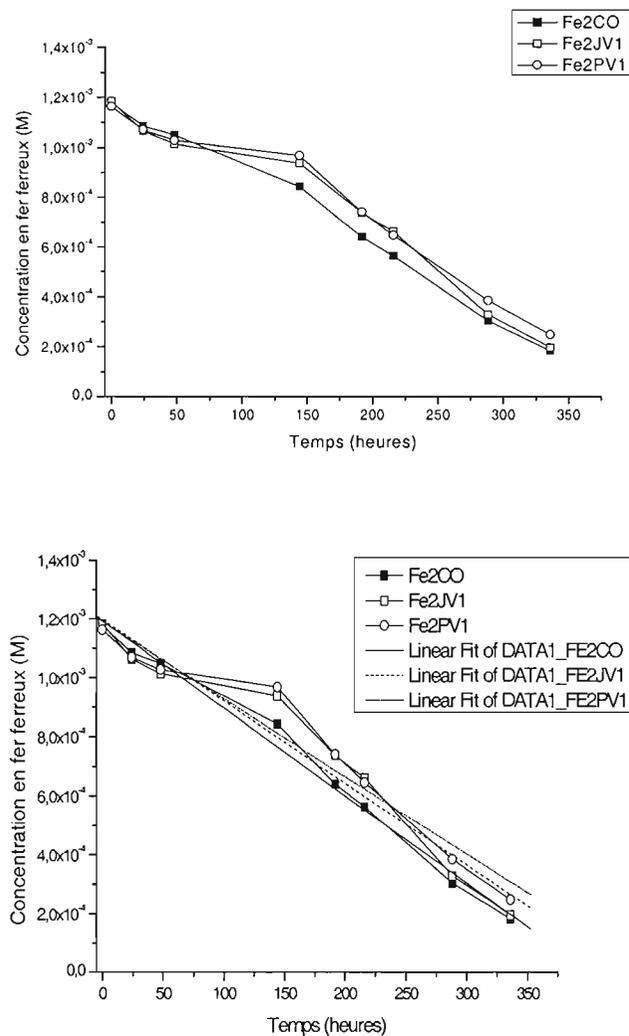


Figure 1.14 : A) Concentration en fer ferreux au cours du temps de culture. Evolution de la concentration en absence de bactéries et en présence de JV1 et PV1. B) Droite de régression pour les courbes représentant la concentration en fer ferreux au cours du temps, (CO) $y=0.00119-2.96 \times 10^{-6}x$ ($R^2=0.99$), pour la culture en présence de JV1 $y=0.0012-2.77 \times 10^{-6}x$ ($R^2=0.97$) et pour la culture en présence de PV1 $y=0.00119-2.62 \times 10^{-6}x$ ($R^2=0.97$).

On observe que la concentration en fer diminue au cours du temps, en outre la concentration en fer initiale est proche de la concentration théoriques et est égale dans chacune des

bouteilles de cultures. Il semble donc que le changement de la source en fer ferreux a un effet positif sur la culture des bactéries et sur l'oxydation du fer en présence et en absence de bactéries. Cependant on ne remarque pas de différence importante dans le taux d'oxydation du fer, en absence comme en présence de bactéries. Le taux d'oxydation étant la quantité de fer ferreux oxydé au cours du temps, ce qui correspond à la pente de la droite de régression pour une série de donnée (Neubauer et al., 2002). Dans ce cas, on note que les pentes des droites de régression pour chacune des cultures (CO, JV1 et PV1) n'ont pas des valeurs différentes dans leurs intervalles d'erreur (CO pente= $2.96 \times 10^{-6} \pm 1.19 \times 10^{-7}$, JV1 pente= $2.77 \times 10^{-6} \pm 2.64 \times 10^{-7}$, PV1 pente= $2.62 \times 10^{-6} \pm 2.45 \times 10^{-7}$) (fig.1.14). Afin de mieux comprendre l'oxydation du fer ferreux en présence et en absence de bactéries, nous allons tester une nouvelle méthodologie dans la détermination du taux d'oxydation en conservant le sulfate de fer comme source de fer dans la culture.

1.4.1.6. Nouvelle méthodologie :

Neubauer et al. (2002) propose que les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles aient un effet inhibiteur sur l'oxydation chimique. Cet effet inhibiteur peut être mis en évidence grâce à l'étude d'une culture en présence de bactéries mortes, ainsi ils obtiennent le taux d'oxydation biotique comme la différence entre le taux d'oxydation dans la culture en présence de bactéries et celui dans la culture en présence de bactéries mortes. L'effet inhibiteur des bactéries est calculé comme étant la différence entre le taux d'oxydation des bactéries mortes et le taux d'oxydation du fer ferreux en absence de bactéries. En suivant les mêmes conditions de culture que celles préalablement décrites (FeSO₄, mélange gazeux, pH, un seul milieu de culture...), nous avons alors ajouté une culture en présence de bactéries tuées après 24h grâce à une dose de 60μM de sodium d'azide qui arrête le métabolisme cellulaire (Katsuki et al., 1977; Zweifel and Hagstrom, 1995).

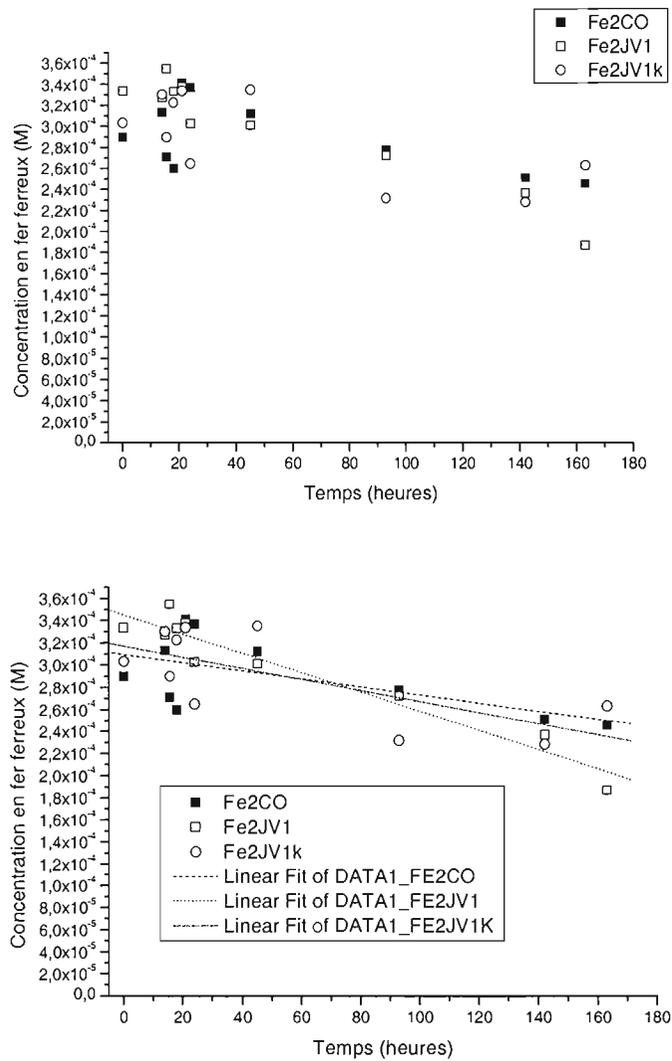


Figure 1.15 : A) Concentration en fer ferreux au cours du temps en absence de bactéries (CO), en présence de bactéries de la souche JV1 (JV1) et en présence de bactéries JV1 tuées après 24h de culture (JV1k). B) Droite de régression pour les courbes représentant la concentration en fer ferreux au cours du temps, (CO) $y=0.000309-3.65 \times 10^{-7}x$ ($R^2=0.61$), pour la culture en présence de JV1 $y=0.000345-8.69 \times 10^{-7}x$ ($R^2=0.96$) et pour la culture en présence de JV1 tuées $y=0.000317-5.00 \times 10^{-7}x$ ($R^2=0.70$).

Après l'ajout du sodium azide dans la culture à 22 heures de cultures, on remarque une chute de la concentration en fer ferreux dans la culture. Après 48 heures de culture la concentration a de nouveau augmenté pour se retrouver à une concentration supérieure à la concentration initiale. On obtient un taux d'oxydation en absence de bactéries de $3.65 \times 10^{-7} \text{MFe}^{2+}/\text{h}$, en présence de JV1 de $8.69 \times 10^{-7} \text{MFe}^{2+}/\text{h}$ et en présence de JV1 tuées après 24h (JV1k) de $5 \times 10^{-7} \text{MFe}^{2+}/\text{h}$. D'après l'hypothèse de Neubauer et al. (2002), on peut quantifier le taux d'oxydation biotique à $3.7 \times 10^{-8} \text{MFe}^{2+}/\text{h}$ soit $0.037 \mu\text{MFe}^{2+}/\text{h}$, ainsi que la présence d'effets secondaires dus à des bactéries ou à des exopolymères bactériens, par la différence entre le taux d'oxydation en présence de bactéries mortes et le taux d'oxydation sans bactéries. On obtient alors un effet inhibiteur des bactéries sur l'oxydation chimique de $0.135 \mu\text{MFe}^{2+}/\text{h}$. On peut alors calculer l'effet net des bactéries (JV1) sur le taux d'oxydation total du fer ferreux comme la somme du taux d'oxydation biotique et des effets secondaires, on obtient alors dans ce cas, un taux d'oxydation net de $0.172 \mu\text{MFe}^{2+}/\text{h}$ (fig.1.15). Lorsque l'analyse de covariance est effectuée sur les coefficients des droites de régression, on remarque qu'il n'y a pas de différence statistique ($n=2$), cependant il semble intéressant d'observer le phénomène de l'oxydation avec plusieurs repliquats, étant donné de la variabilité importante de l'oxydation du fer ferreux à pH neutre.

Le tableau 1.6 présente l'ensemble des variables et leurs effets sur le taux d'oxydation.

Modification de la culture	Taux d'oxydation (MFe^{2+}/h)		
	Sans bactéries	Avec JV1	Avec PV1
Limiter la quantité d'oxygène (bullaer N2)	$3,15 \times 10^{-9}$	$3,18 \times 10^{-9}$	$3,29 \times 10^{-9}$
Baisse du pH	$2,98 \times 10^{-9}$	$1,64 \times 10^{-9}$	$5,43 \times 10^{-9}$
Homogénéisation	$2,72 \times 10^{-6}$	$3,52 \times 10^{-6}$	-
Changement de source de fer	$2,96 \times 10^{-6}$	$2,77 \times 10^{-6}$	$2,62 \times 10^{-6}$

Tableau 1.6 : Tableau comparatif du taux d'oxydation en absence de bactérie, ainsi qu'en présence des souches bactériennes JV1 et PV1 selon les modifications dans la culture.

1.4.2. Taux d'oxydation chimique vs taux d'oxydation biotique :

1.4.2. 1. Mise en cultures utilisées :

Neubauer propose que les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles aient un effet inhibiteur sur l'oxydation chimique. C'est afin de confirmer cette hypothèse et a fortiori d'être capable de quantifier le rôle des bactéries ferro-oxydantes neutrophiles dans l'oxydation du fer ferreux au niveau du champ hydrothermal de Loihi que nous avons modifié la méthodologie utilisée. La méthodologie employée correspond à celle décrite dans la figure 1.11.

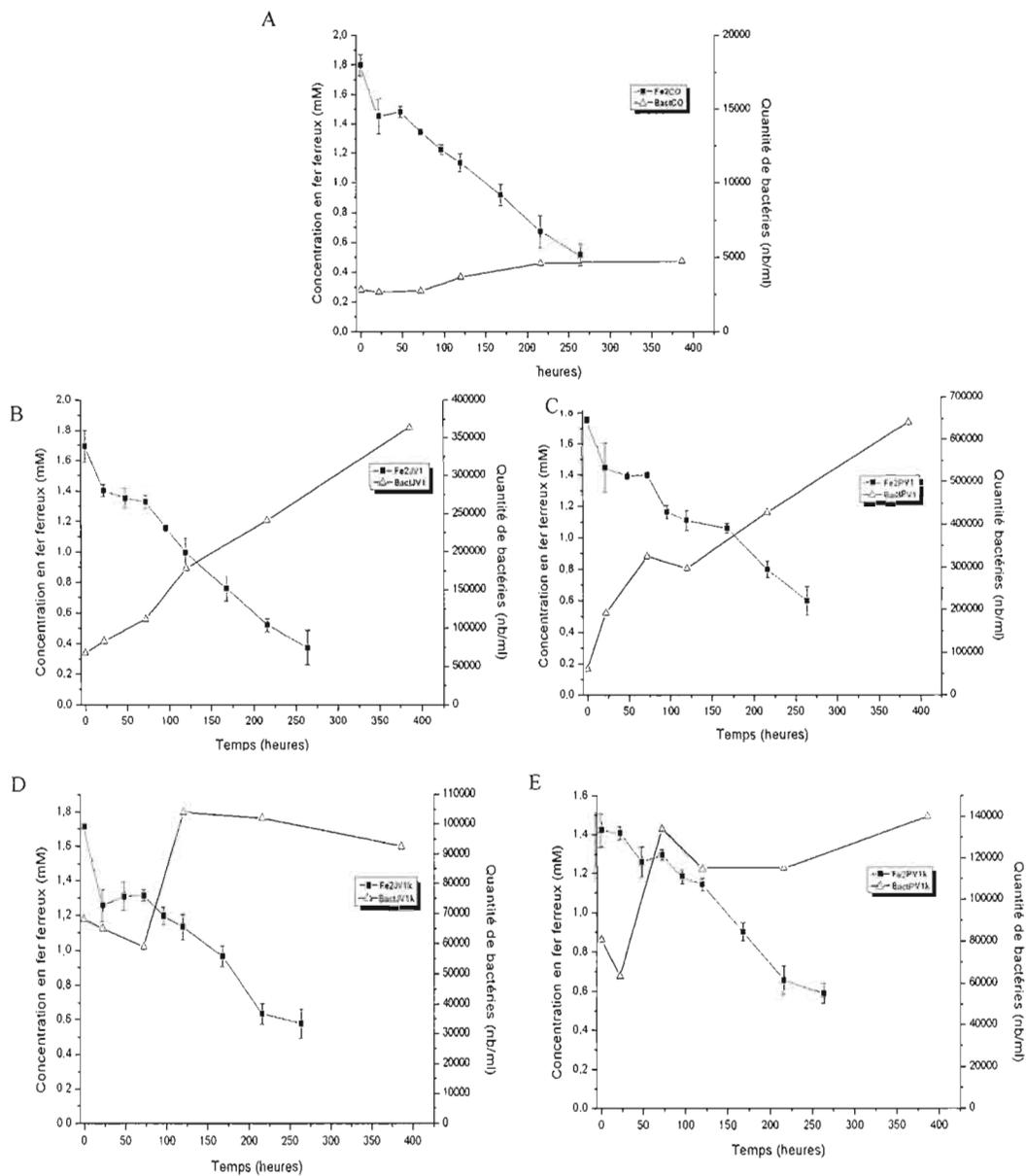


Figure 1.16 : Concentration en fer ferreux et quantité de bactéries au cours du temps selon les différentes cultures, en absence de bactéries (A), en présence de bactéries vivantes (JV1 en B et PV1 en C) et en présence de bactéries tuées (JV1k en D et PV1k en E). Les courbes sont les moyennes des cinq réplicats.

Dans un premier temps on observe que l'ensemble des cultures a une concentration en fer ferreux initiale d'environ 1.7mM (sauf pour la culture JV1k due à un problème de dissolution du sulfate de fer). De plus tout au long des 286 heures la concentration en fer ferreux diminue. On note également une croissance bactérienne, dans la culture en absence de bactéries on dénombre 5×10^3 bactéries/ml, ce qui correspond à une contamination du milieu de culture. Dans le cas de JV1 et PV1 on observe une croissance continue allant jusqu'à 3.6×10^5 et 6.4×10^5 bactéries/ml respectivement, cependant après 286 heures la courbe de croissance n'a pas atteint son plateau. Pour les cultures tuées au début de la manipulation montre un début de croissance les premières heures puis ensuite on observe une diminution ou un arrêt de la croissance bactérienne, pour atteindre une valeur proche de 1×10^5 bactéries/ml (fig.1.16). On peut également observer la quantité de fer ferreux oxydée au cours de la culture, on observe qu'après 286 heures de culture, la souche JV1 a oxydé 70% du fer ferreux présent au début de la culture ce qui correspond à une quantité de 2.45×10^{-5} mole de fer ferreux. Alors que la souche PV1 a oxydé environ 65% du fer ferreux présent au début de la culture, ce qui correspond à 2.28×10^{-5} mole de fer ferreux. Cependant on remarque que le pourcentage de fer ferreux oxydé après 286 heures varie de façon très importante aussi bien en présence qu'en absence de bactéries, ceci est peut être due à la présence de fer ferreux qui peut être complexé au niveau des cellules et qui ne peut pas être mesuré de manière uniforme dans chaque culture (fig.1.17).

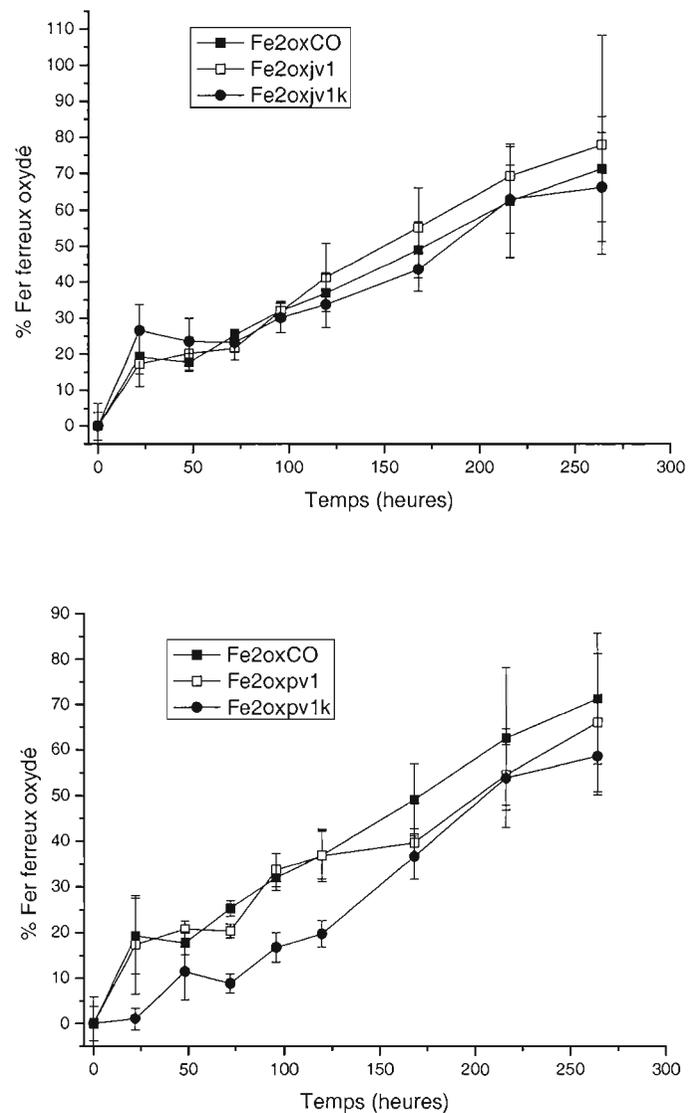


Figure 1.17 : Quantité de fer ferreux oxydé au cours du temps dans les différentes cultures, en absence, en présence des souches bactériennes JV1 et PV1 vivantes et mortes. La souche JV1 dans le graphique du haut, et la souche PV1 dans le graphique du bas.

En utilisant l'hypothèse de Neubauer et al. on peut alors quantifier le taux d'oxydation biotique, à partir des droites de régression (fig.1.18).

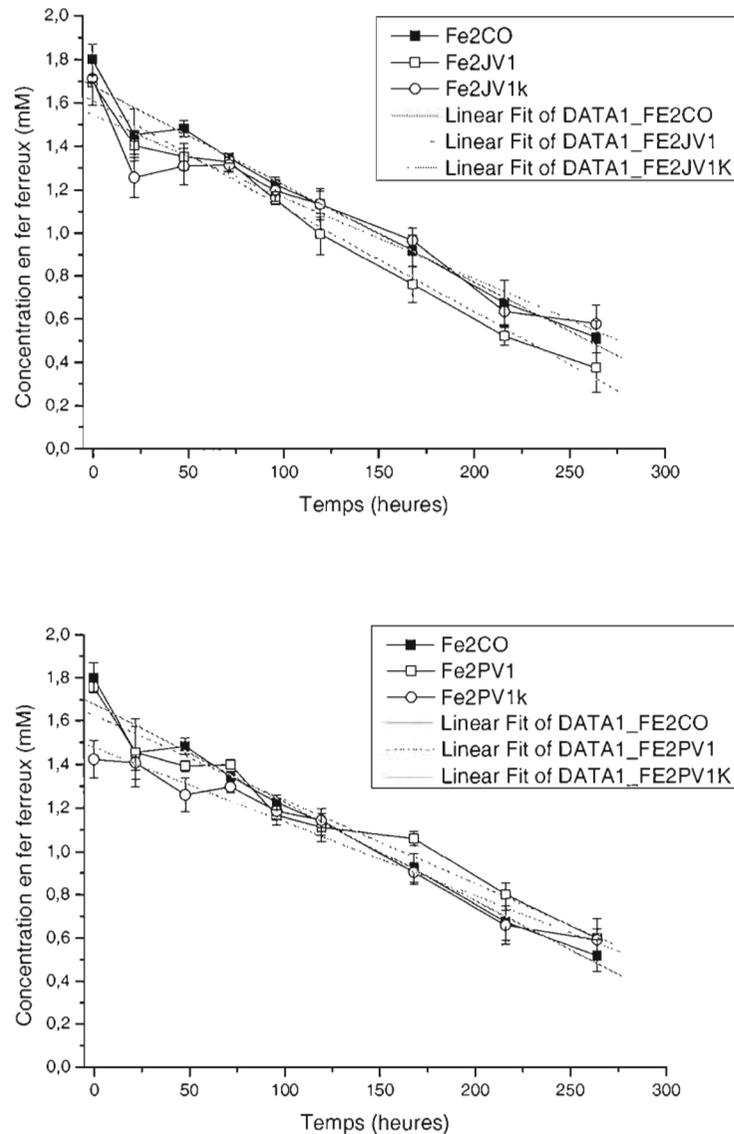


Figure 1.18 : Droite de régression sur les courbes de concentration en fer ferreux au cours du temps. Dans la partie supérieure pour la culture de la souche JV1 et dans la partie inférieure pour la culture de la souche bactérienne PV1 (n=5). Les équations des droites de régression sont pour la culture sans bactéries (CO) $y=1.67-0.00454x$ ($R^2=0.98$), pour la souche JV1 $y=1.6-0.00487x$ ($R^2=0.99$), pour la culture JV1k $y=1.54-0.00379x$ ($R^2=0.95$), pour la souche PV1 $y=1.62-0.00387x$ ($R^2=0.97$) et pour la culture PV1k $y=1.47-0.00342x$ ($R^2=0.98$).

Pour la souche JV1, d'après la méthodologie de Neubauer on obtient un taux d'oxydation biotique de $1.08\mu\text{MFe}^{2+}/\text{h}$, on quantifie les effets secondaire a $0.75\mu\text{MFe}^{2+}/\text{h}$, ce qui signifie

que les bactéries ont un effet inhibiteur sur l'oxydation abiotique du fer, via la captation du fer ferreux par la cellule ou par un exopolymère afin d'empêcher son oxydation par l'oxygène. L'effet net des bactéries sur l'oxydation du fer ferreux est de $0.33\mu\text{MFe}^{2+}/\text{h}$.

Pour la souche PV1, le taux d'oxydation biotique est de $0.45\mu\text{MFe}^{2+}/\text{h}$, alors que les bactéries ont un effet inhibiteur de $1.12\mu\text{MFe}^{2+}/\text{h}$ sur l'oxydation chimique du fer, ce qui amène l'effet net des bactéries inférieur à zéro.

Cependant le taux d'oxydation du fer ferreux peut aussi être déterminé comme la quantité de fer oxydé au cours du temps, ce qui peut se calculer comme la différence entre la concentration en fin et en début de culture, par unité de temps. En utilisant l'hypothèse de Neubauer et le taux d'oxydation comme la différence de concentration en fin et en début de culture par unité de temps, on peut alors quantifier la part des bactéries ferro-oxydantes neutrophiles (Tabl.1.7).

	Concentration initiale en fer ferreux (mM)	Concentration finale en fer ferreux (mM)	Temps (h)	Taux d'oxydation ($\mu\text{M}/\text{h}$)
CO	1,799	0,516	264	4,860
JV1	1,694	0,373	264	5,004
JV1k	1,711	0,576	264	4,296
PV1	1,757	0,597	264	4,393
PV1k	1,422	0,589	264	3,155

Tableau 1.7 : Taux d'oxydation du fer ferreux calculé à partir de la différence entre la concentration finale et initiale des cultures par unité de temps.

D'après la méthode de Neubauer, le taux d'oxydation biotique de JV1 est de $0.714\mu\text{M}/\text{h}$, l'effet secondaire des bactéries est de $0.66\mu\text{M}/\text{h}$, alors que l'effet net des bactéries sur l'oxydation du fer ferreux est de $0.144\mu\text{M}/\text{h}$. Dans le cas de PV1, le taux d'oxydation biotique est de $1.24\mu\text{M}/\text{h}$, l'effet secondaire équivaut à $1.71\mu\text{M}/\text{h}$, ce qui entraîne un effet net des bactéries de $-0.47\mu\text{M}/\text{h}$.

1.4.2.2. Validations statistiques

1.4.2.2.1. Analyse de régression :

Les analyses de régression nous permettent de quantifier la quantité de fer qui est oxydée au cours du temps en présence et en absence de bactéries. Les paramètres de l'équation de régression nous renseignent sur la vitesse de l'oxydation du fer ferreux à travers le terme de la pente. La pente indique le changement dans la concentration en fer ferreux par unité de temps c'est-à-dire sur le taux d'oxydation. Les équations obtenues sont celles qui obéissent aux conditions d'application de la régression, c'est-à-dire la normalité des résidus, l'homoscédasticité de la variance résiduelle, la linéarité de la relation et finalement le fait que la variable dépendante est fixe ou sans erreur (le temps)(tabl.1.8). L'ensemble des conditions d'applications sont testées dans l'appendice B1 à B5 grâce au logiciel JMP IN 5.1.

	Equation de régression	R ²	Ordonnée à l'origine	Pente
Co	$\log\text{Fe}2 = 1,7079803 - 0,3609524 \log\text{Temps}$	0.65	1.71±0.5	-0.36±0.1
JV1	$\text{Fe}2 = 1,6060088 - 0,0045021 \text{ temps}$	0.92	1.61±0.07	-0.0045±0.0004
JV1k	$\text{Fe}2 = 1,5335164 - 0,0034242 \text{ temps}$	0.82	1.53±0.09	-0.0034±0.0006
PV1	$\text{Fe}2 = 1,6261923 - 0,0036046 \text{ Temps}$	0.9	1.63±0.06	-0.0036±0.0004
PV1k	$\text{Fe}2 = 1,462789 - 0,0030517 \text{ Temps}$	0.85	1.46±0.7	-0.0031±0.0005

Tableau 1.8 : Propriétés de chaque analyse de régression dans les différentes cultures étudiées, en absence de bactéries (Co), en présence de la souche JV1 vivante et tuée (JV1 et JV1k) et en présence de la souche PV1 vivante et tuée (PV1 et PV1k).

1.4.2.2.2. Analyse de covariance : ANCOVA

L'ensemble des droites de régression permet de quantifier à partir de leur différence le taux d'oxydation biotique, ainsi que les effets secondaires des bactéries dans l'oxydation du fer ferreux. Une analyse de covariance, permet dans un premier temps de tester la différence

entre les pentes de plusieurs droites de régression, puis de tester les différences au niveau de l'ordonnée à l'origine de chacune des droites.

Source	Nparm	DF	Sum of square	F ratio	Prob>F
Bactérie	4	4	0,10082253	1,38863897	0,2579753
Temps	1	1	4,92977485	271,593158	4,5496e-18
Bactérie*Temps	4	4	0,09457515	1,30259315	0,28807432

Tableau 1.9 : Effet du test permettant de comparer les pentes de plusieurs droites de régressions.

La probabilité associée à F est significative si elle est inférieure à 0.05, on remarque alors que la régression de la concentration en fer ferreux par rapport aux bactéries n'est pas significative et que celle par rapport au temps l'est. De plus le terme croisé représentant les pentes n'est pas significatif ce qui signifie que les pentes ne sont pas statistiquement différentes l'une de l'autre (tabl.1.9 et appendice B6).

On peut alors regarder si les ordonnées à l'origine sont semblables, car même si les pentes ne sont pas différentes, les ordonnées à l'origine différentes pourraient rendre compte de droite de régressions différentes. On effectue alors une régression multiple en absence du terme d'interaction (terme qui renseigne sur la pente) afin de tester la différence des ordonnées à l'origine.

Source	Nparm	DF	Sum of square	F ratio	Prob>F
Bactérie	4	4	0,1008225	1,3468	0,2700
Temps	1	1	4,9297749	263,4179	<,0001

Tableau 1.10 : Effet du test permettant de comparer les ordonnées à l'origine de plusieurs droites de régressions.

La probabilité associée aux bactéries n'est pas significative, les ordonnées à l'origine ne sont pas statistiquement différentes les une des autres (tabl.1.10 et appendice B6). Les pentes et les ordonnées à l'origine n'étant pas statistiquement différentes, on en conclut que chacune des droites de régression n'est pas différentes d'une autre, il n'y a donc pas de différence

entre la droite de régression de la culture en absence ou en présence de bactéries vivantes ou mortes.

1.4.2.2.3. Analyse de variance : ANOVA

L'ANOVA ou analyse de variance permet de déterminer si des moyennes sont statistiquement différentes des une des autres. Dans ce cas on cherche à savoir si la quantité de fer oxydée au cours du temps est différentes dans chaque culture, en absence et en présence de bactéries vivantes ou mortes. On a donc testé la différence entre les quantités de fer oxydé (la quantité de fer oxydé étant la différence entre la quantité de fer ferreux au début et à la fin de la culture) selon les souches de culture, absence de bactérie, présence de JV1, JV1 tuées, PV1 et PV1 tuées. Le tableau 1.11 nous permet de quantifier la différence statistique entre les quantités de fer oxydé (moyenne obtenue à partir de 5 répliquas).

Abs(Dif)-LSD	JV1	CO	PV1	JV1k	PV1k
JV1	-0,12554	-0,10014	-0,01754	-0,00054	0,20126
CO	-0,10014	-0,12554	-0,04294	-0,02594	0,17586
PV1	-0,01754	-0,04294	-0,12554	-0,10854	0,09326
JV1k	-0,00054	-0,02594	-0,10854	-0,12554	0,07626
PV1k	0,20126	0,17586	0,09326	0,07626	-0,12554

Tableau 1.11 : Quantification des différences entre les quantités de fer ferreux oxydé dans chaque culture. L'analyse de variance pour l'ensemble des quantités de fer oxydé, nous indique qu'il n'y a pas de différences significatives (F ratio=9.14 et Prob>F = 0.0002). Les valeurs positive sont celles où il y a une différence statistique entre les valeurs, alors que les valeurs négatives sont celles où il y a absence de différence statistique.

On note que seule la quantité de fer ferreux oxydé en présence de PV1 est statistiquement différente des autres, autrement dit les quantités de fer ferreux oxydé en absence de bactéries ainsi qu'en présence de JV1, JV1 tués et PV1 tués ne sont pas statistiquement différentes.

1.5. Discussion

Contribution bactérienne dans l'oxydation du fer ferreux :

L'oxydation du fer ferreux à pH neutre est un processus complexe, qui fait intervenir dans certain cas l'oxygène et les bactéries ferro-oxydantes, il y a alors compétition dans le milieu. Le but de cette étude est de quantifier le rôle des bactéries ferro-oxydantes neutrophiles JV1 et PV1, souches bactériennes du champ hydrothermal de Loihi, Hawaï. L'étude particulière de différents facteurs environnementaux a permis de tester leur influence sur l'oxydation biotique et abiotique du fer ferreux. On en déduit qu'une faible baisse de pH (une unité), un changement de concentration dans la source de fer, une concentration fixe (1%) et connue d'oxygène, ainsi que l'homogénéisation des cultures n'ont pas une influence significative sur l'oxydation du fer ferreux par les bactéries ferro-oxydantes (fig.1.12 et 1.13, tabl.1.9). Cependant le changement de source de fer semble influencer l'oxydation du fer ferreux en présence et en absence de bactéries, le passage du chlorure de fer ferreux au sulfate de fer ferreux, a permis d'obtenir une meilleure stabilité (fig.1.14 et 1.16). Celle-ci est peut être due à la différence de solubilité entre les deux, le sulfate de fer étant moins soluble.

D'après les résultats (tableau 1.12) et les données thermodynamiques (Kelly, 1978) on peut déterminer le rendement énergétique brut qui correspond à la quantité de mole de fer ferreux oxydée pour la fixation d'une mole de CO_2 . On obtient alors que la souche JV1 doit oxyder 166 moles de Fe^{2+} pour fixer une mole de CO_2 alors que la souche PV1 doit oxyder 120 moles de Fe^{2+} pour fixer une mole de CO_2 . On peut alors déterminer l'efficacité du rendement énergétique en comparant l'énergie utilisée à celles liées aux données thermodynamiques, ce qui nous permet de conclure que JV1 utilise 12% de l'énergie disponible grâce à l'oxydation du fer est utilisée pour fixer une mole de CO_2 alors que PV1 utilise 16%. Les faibles efficacités obtenues dans l'ensemble des études métaboliques réalisées au niveau environnemental n'apparaissent pas avantageuse pour la croissance bactérienne. Cependant le rendement énergétique net et donc l'efficacité ne sont pas mesurables dans ces conditions de culture, car l'ensemble du fer oxydé mesuré n'est pas directement utilisé au niveau enzymatique.

	JV1	PV1
Moles de fer oxydées (mol Fe²⁺)	0,000014	0,000021
Nombre de bactéries dans la culture (nb bact)	9625000	17500000
Poids des bactéries (g de bact)	2,4x10 ⁻⁶	4,375x10 ⁻⁶
Poids de bactéries par mole de fer oxydée (g bact/mole Fe²⁺ox)	0,172	0,208
Quantité de carbone par mole de fer oxydée (g C/mol Fe²⁺ox)	0,08	0,1
Nombre de mole de fer pour fixer une mole de CO2 (moles Fe²⁺)	166	120
Rendement énergétique (%)	12	16

Tableau 1.12 : Résultats permettant le calcul de rendement énergétique de l'oxydation du fer ferreux pour les souches bactériennes JV1 et PV1.

L'hypothèse de Neubauer propose que les bactéries ferro-oxydantes aient un effet secondaire sur l'oxydation abiotique des bactéries. Les microorganismes captureraient le fer ferreux en solution, le rendant ainsi indisponible pour l'oxydation via l'oxygène, sans pour autant utiliser immédiatement le fer à des fins de conservation d'énergie. Selon la méthode utilisée pour mesurer le taux d'oxydation du fer (pente ou différence entre les concentrations initiales et finales), on observe un taux d'oxydation variant de 0.714 à 1.08 $\mu\text{MFe}^{2+}/\text{h}$, pour la souche JV1, alors que le taux d'oxydation pour la souche PV1 varie de 0.45 à 1.24 $\mu\text{MFe}^{2+}/\text{h}$. A partir des concentrations initiales en fer ferreux dans les cultures et le taux d'oxydation obtenu, on peut calculer que la souche JV1 contribue de 12 à 18% de l'oxydation totale du fer ferreux dans des conditions de pH neutre. La souche PV1 contribue de 7 à 20% de l'oxydation du fer ferreux dans des conditions de pH neutre.

La fraction biotique de l'oxydation totale du fer ferreux calculée dans cette étude pour les souche JV1 et PV1 correspond à une faible portion par rapport aux autres bactéries ferro-oxydantes neutrophiles. L'étude effectuée par Neubauer et al.(2002) sur la souche BrT dans les rhizomes de plantes permet de mettre en évidence que l'oxydation biotique peut constituer jusqu'à 60% de l'oxydation totale du fer ferreux. Alors qu'Emerson et Revsbech (1994b) rapporte que l'oxydation biotique peut atteindre 80% de l'oxydation totale du fer ferreux, en

présence de bactéries comme ES1 et ES2. Deux autres études rapportent que l'oxydation biotique au niveau de rhizome de plantes peut varier de 30 à 80 % (Emerson and Moyer, 1997; Emerson et al., 1999). Le taux d'oxydation biotique rapporté dans l'étude actuelle est faible en comparaison, mais les cultures liquides employées sont loin de dupliquer la situation complexe présente au niveau des sources hydrothermales sous-marines. On peut donc s'attendre à une perte d'efficacité des bactéries en absence de leurs conditions environnementales particulières. Malgré la croissance des bactéries pendant la période d'incubation, on observe donc que les bactéries n'ont aucun effet quantitatif à notre niveau ni sur la vitesse d'oxydation du fer, ni que le rendement net de cette oxydation. Ceci est peut être du au fait que le processus a lieu trop rapidement dans notre environnement pour être enregistré. Il est également possible que les gènes nécessaires dans le processus de l'oxydation ne soit pas activé dans les mêmes conditions (température, pression) que les gènes de la croissance comme c'est le cas par exemple pour les protéines de choc thermique (Heat Shock Protein)(Prescott et al., 2003).

Croissance bactérienne :

Les souches JV1 et PV1 sont des bactéries lithotrophes obligatoires, phylogénétiquement proche d'autres bactéries ferro-oxydantes, elles ne peuvent croître en absence d'une source de fer ferreux dans le milieu (Edwards et al., 2003; Emerson and Moyer, 1997; Emerson and Moyer, 2002; Weiss et al., 2003). Le temps pour doubler la population est d'environ de 24h dans la cas de PV1, alors qu'il passe à un peu moins de 72h pour la souche JV1. Ce qui est deux à trois fois plus que le temps décrit par Emerson(2002), peut être due au fait que le volume de culture est différent ou encore la densité de cellule maximum n'est peut être pas identique dans l'ensemble des cultures. Ce temps de doublement est 3 à 9 fois plus long que celui des souches ES1 et ES2 phylogénétiquement proche des souches étudiées dans cette étude. Cependant il est important de noter que la phase stationnaire de la courbe de croissance n'est pas atteinte, ce qui signifie que la population était encore amenée à croître après 400 heures de culture donc la population n'est pas à son maximum.

A partir du tableau 1.12 on, observe que la souche bactérienne JV1 fixe 0.08g C par mole de Fe^{2+} oxydée alors que la souche PV1 en fixe 0.1g par mole de Fe^{2+} oxydée. Le rendement énergétique brut observé est légèrement différent de celui décrit dans la littérature où il varie

entre 0.7 à 1.65 gC par mole de Fe^{2+} oxydée dans des environnements tels que les racines de plantes ou même les sources hydrothermales, alors qu'il augmente à 7.6gC par mole de Fe^{2+} oxydée dans les sédiments (Edwards et al., 2004; Emerson and Moyer, 1997; Emerson and Revsbech, 1994b). La différence entre les rendements énergétiques brutes peut être reliée au fait que les cultures JV1 et PV1 ne semblent pas dans des conditions optimum de croissance.

Effet bactérien sur l'oxydation abiotique du fer ferreux :

Basé sur la comparaison entre les taux d'oxydation obtenus dans les cultures en absence de bactéries et en présence de bactéries tuées, il apparaît que les souches JV1 et PV1 aient un effet inhibiteur sur l'oxydation abiotique du fer ferreux. Cet effet 'Neubauer' se distingue de la compétition entre l'oxygène et les bactéries, car il est mis en évidence après la mort des bactéries. Une des hypothèses à cet effet inhibiteur est la présence d'exopolymère ou de molécules organiques extracellulaires bactériennes qui lient le fer ferreux dissous le rendant moins disponible pour l'oxydation chimique. Dépendant de la constante de stabilité du complexe entre le fer ferreux et la matière organique, des concentrations en matières organiques, oxygène, fer ferreux et de la nature de la matière organique, la matière organique peut accélérer, inhiber et n'avoir aucun effet sur l'oxydation abiotique du fer ferreux (Roth et al., 2000; Stone, 1997; Theis and Singer, 1974).

La souche PV1 produit une matrice extracellulaire, en forme de pédoncule tout comme les souches bactériennes phyllogénétiquement proche comme ES1 et ES2, cependant la souche JV1 ne semble pas à l'heure actuelle avoir développé une matrice extracellulaire (Emerson and Moyer, 1997; Emerson and Moyer, 2002). Cependant la composition, le rôle et le fonctionnement de ses exopolymères ou des matrices extracellulaires n'est encore très peu connue. Ce fonctionnement afin de limiter l'oxydation chimique est peut être une stratégie évolutionnaire développée par les organismes dans le but de concurrencer les taux rapides d'oxydation abiotique du fer ferreux dans les environnement de pH neutre.

1.6. Conclusion

Certains microorganismes gagnent l'énergie nécessaire à leur croissance de l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique à pH neutre. Cependant cette physiologie est risquée car l'énergie disponible au cours de l'oxydation du fer ferreux est faible, de plus en présence d'oxygène la demi-vie en solution du fer ferreux varie de 2 à 10 minutes dans un pH neutre, alors que le temps de doublement minimum pour une bactérie de ce type est 8h (Emerson and Moyer, 1997). L'étude tente de montrer que les souches de bactéries ferro-oxydantes JV1 et PV1 jouent un rôle dans l'oxydation du fer ferreux d'environ 15% pour les souches JV1 et PV1, de plus elles semblent être responsables d'effets secondaires sur l'oxydation abiotique en liant le fer ferreux le rendant indisponible à l'oxydation. Cependant l'effet net des bactéries n'est pas important voire nul dans le cas de PV1 alors qu'il est $0.33 \mu\text{MFe}^{2+}/\text{h}$ pour JV1, ceci laisse penser que les conditions de cultures en milieu liquide, mises en place au laboratoire, n'étaient pas entièrement optimales pour la croissance et l'oxydation du fer ferreux par les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles.

CHAPITRE II :

CARACTERISATION DES OXYDES DE FER BACTERIENS PRODUITS LORS DE L'OXYDATION BIOTIQUE DU FER FERREUX PAR LES SOUCHES BACTERIENNES JV1 ET PV1 DU CHAMP HYDROTHERMAL DE LOIHI, HAWAÏ

2.1. Introduction

2.1.1. Les oxydes de fer et leurs formations

Il existe seize oxydes de fer, que l'on distingue en hydroxyde, oxyde-hydroxyde et oxyde de fer. Ils sont tous composés de fer (Fe) lié avec de l'oxygène (O) ou un groupe hydroxyde (OH). Dans la plupart des composés le fer est sous sa forme trivalente, on parle d'oxyde de fer ferrique (on en dénombre treize) (tableau 2.1). Les oxydes de fer ferrique au sens strict sont ceux où les atomes de fer sont liés à de l'oxygène, de la même manière, les hydroxydes sont liés à un groupement OH, alors que les oxyde-hydroxyde sont liés au deux groupement (O et OH) ce qui leur confère leur propriété d'insolubilité (Cornell and Schwertmann, 1996).

Oxyde-hydroxyde et Hydroxyde	Oxydes
Goethite α -FeOOH	Hématite α -Fe ₂ O ₃
Lepidocrocite γ -FeOOH	Maghémite γ -Fe ₂ O ₃
Akaganéite β -FeOOH	B-Fe ₂ O ₃
Schwertmannite Fe ₁₆ O ₁₆ (OH) _y (SO ₄) _z .nH ₂ O	E-Fe ₂ O ₃
Feroxyhyte δ -FeOOH δ' -FeOOH	
Ferrihydrite Fe ₅ HO ₈ .4H ₂ O	
Bernalite Fe(OH) ₃	
Green Rusts Fe _x ^{III} Fe _y ^{II} (OH) _{3x+2y-z} (A ⁻) _z A ⁻ = Cl ⁻ ; ½ SO ₄ ²⁻	

Tableau 2.1 : Présentation des treize oxydes de fer ferrique, ainsi que leurs formules.

La plupart des oxydes de fer ont une structure cristalline où le degré de la structure ainsi que la taille des cristaux dépend des conditions de formation. Seuls la ferrihydrite et la schertmannite ont une faible structure cristalline, ce qui fait d'elles des oxydes peu stables, qui ne sont souvent qu'un état de transition vers un oxyde de fer plus stable. L'arrangement des atomes est régit par l'arrangement spatial des anions qui ont une taille plus importante. Le diamètre d'un ion O^{2-} est de 0.14nm alors que celui de l'ion ferrique Fe^{3+} est 0.065nm. Il existe deux systèmes pour représenter la structure cristalline des oxydes de fer, l'une en terme d'arrangement spatial des anions et l'autre en fonction du type d'assemblage spatial à partir du cation (octaédrique ou tétraédrique). L'ensemble des ses caractéristiques permet d'obtenir une structure spatiale particulière pour chaque oxyde de fer.

La structure des cristaux d'oxydes de fer varie de façon importante pour un même assemblage ionique, celle-ci dépend de la diffusion des ions, de l'adsorption des ions, de la possibilité de déshydratation, finalement des processus de transport et des réactions chimiques à la surface. Une des caractéristiques majeures est la supersaturation en ions ferriques et oxygène ou hydroxyde dans la solution, permettant ainsi un taux de croissance du cristal important (Cornell and Schwertmann, 1996). La structure du cristal est responsable de nombreuses caractéristiques physico-chimiques de celui-ci comme l'allure de son spectre aux rayons infra-rouge, sa porosité, son comportement magnétique etc.

Nous n'expliquerons pas plus en détails toutes ces caractéristiques de chacun des oxydes de fer, car l'objectif de notre étude est plus quantitatif que descriptif. Il est cependant nécessaire d'avoir une vue générale de leur propriété afin de mieux comprendre leur évolution quantitative.

Un des processus qui requiert néanmoins un plus d'explication est la formation des oxydes de fer. A première vue la formation des oxydes de fer nécessite deux mécanismes de base :

- la précipitation directe d'une solution contenant des ions ferreux ou ferriques
- la transformation en précurseur d'oxyde de fer par le processus de dissolution/reprécipitation ou via un état de transformation solide (réarrangements internes) (Cornell and Schwertmann, 1996).

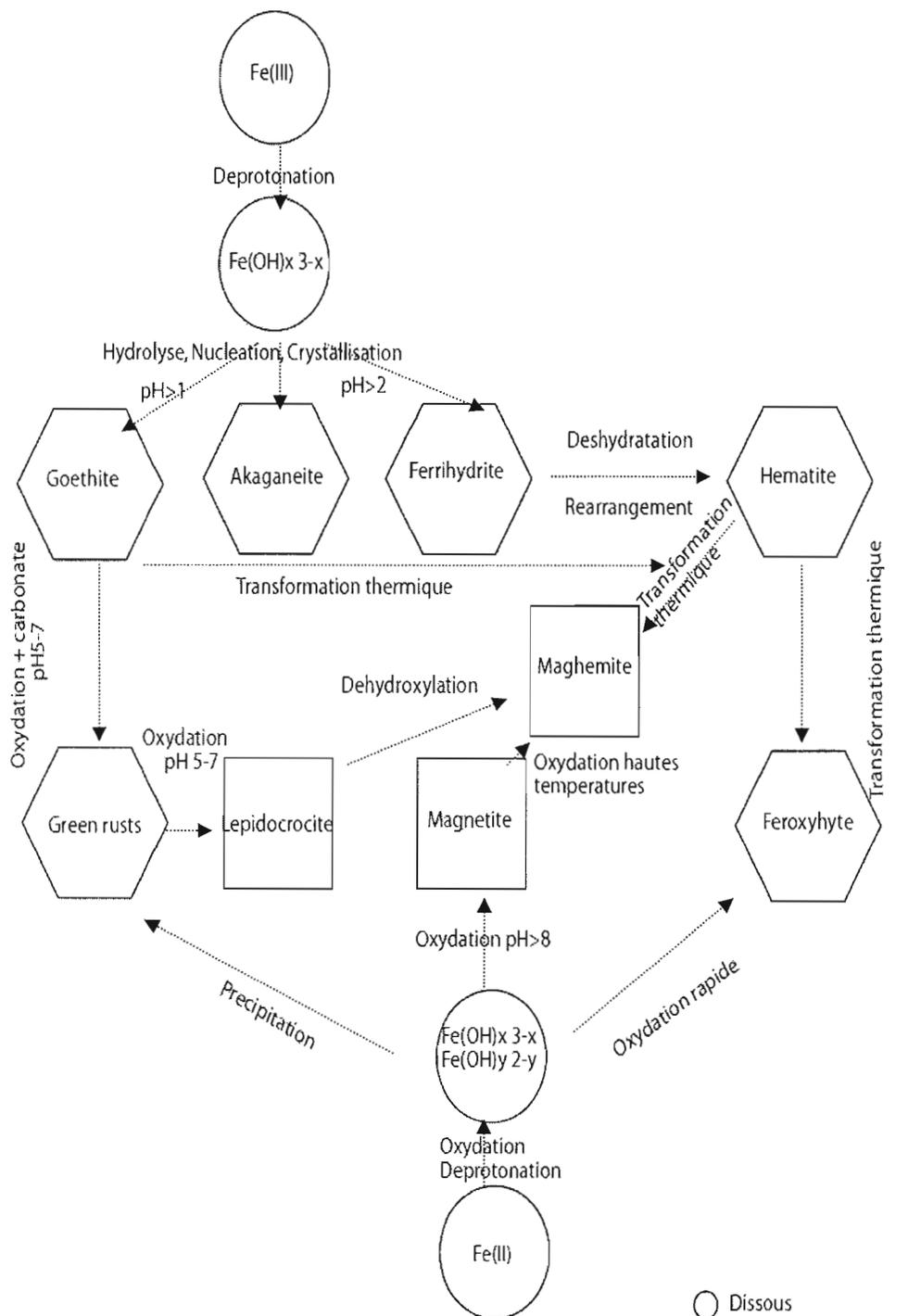


Figure 2.1 : Représentation schématique des processus de formation et transformation des oxydes de fer communs. D'après Cornell et Schwertmann, 1996.

La figure 2.1 nous propose une vue générale des formations et transformations majeures permettant la mise en place des oxydes de fer principaux. Cependant seule la formation des oxydes de fer à partir d'un système aqueux riche en ion ferreux sera détaillé, et ce car c'est la situation la plus proche de la formation des oxydes via les bactéries ferro-oxydantes JV1 et PV1.

La goethite, la lepidocrocite, l'akaganéite, la maghémite, la ferrihydrite, la feroxyhyte et l'hématite peuvent être produites à partir d'une solution ferreuse par une oxydation suivie d'une hydrolyse. Le type d'oxyde formé est gouverné par le pH, le taux d'oxydation, la température, la concentration en fer ferreux ainsi que les composés extérieurs au système. La réaction d'oxydation du fer ferreux peut s'écrire comme :



L'oxydation est lente à un pH inférieur à 6 alors qu'elle accélère rapidement quand le pH augmente, de la même façon la vitesse de l'oxydation augmente quand le milieu passe au dessus de 15°C. De plus l'oxydation est accélérée en présence d'anions tels que F⁻, H₂PO₄ et HPO₄²⁻ et est ralentie en présence de (par ordre) ClO₄⁻ > NO₃⁻ > Cl⁻ > H₃SiO₄⁻ > Br⁻ > I⁻ > SO₄²⁻. De faible quantité de Cu, Mn, Co et certains anions qui se complexent avec l'ion ferrique ont un effet catalytique alors que les ligands organiques retardent l'oxydation (tabl.2.2). A un pH proche de 7, l'oxydation du fer ferreux est autocatalytique c'est-à-dire que la réaction s'accélère en présence de la ferrihydrite formée, probablement après l'adsorption de quelques ions ferreux à la surface. Les autres oxydes de fer (cités de façon croissante) ont le même effet sur l'oxydation ferrihydrite, goethite, lepidocrocite, akaganéite (Cornell and Schwertmann, 1996).

	Goethite	Lepidocrocite	Ferrihydrite
Conditions de formation	CO ₂ présent Sulfate Oxydation rapide pH<5 Al, Mn, CO	CO ₂ absent Chloride Oxydation lente pH>5	Oxydation rapide pH<5

Tableau 2.2 : Conditions de formation pour la prédominance d'un oxyde de fer via l'oxydation d'une solution de fer ferreux (pH variant de 4 à 9) D'après (Cornell and Schwertmann, 1996).

2.1.2. Les oxydes de fer bactériens

Le fer ferrique produit lors de l'oxydation bactérienne se retrouve sous la forme d'oxydes, hydroxydes ou oxyde-hydroxyde. Pour certaines souches bactériennes, on peut corrélérer l'activité bactérienne avec le morphotype d'un oxyde particulier, car leurs oxydes possèdent une morphologie particulière, cependant visuellement la majorité des oxydes de fer apparaissent homogènes (c'est le cas des oxydes avec une importante structure cristalline comme la goethite).

Une classe importante des biominéraux du fer est les hydroxydes de fer qui se retrouvent sous une forme amorphe, sous forme de précipités colloïdaux, sous la forme d'un minéral quasi-cristallin comme la ferrihydrite ou encore comme un minéral cristallin comme le lepidocrocite et la goethite. Des oxy-hydroxydes de fer amorphes sont produits au niveau des gaines et des filaments des bactéries qui utilisent le fer ferreux comme source d'énergie telles que *Leptotrix* ou *Gallionella*. Cependant des oxy-hydroxydes de fer ont également été trouvés au niveau du derme de certains invertébrés marins comme chez *Molpadia* (Holoturides). Un autre biominéral du fer important est la magnétite, Fe₃O₄, c'est un oxyde de fer ferreux. La magnétite a une structure cubique en spinelle inverse et elle est ferromagnétique à température ambiante, on la retrouve également dans de nombreux organismes comme les bactéries, bien sûr, mais aussi chez plusieurs organismes marins (tabl.2.3) (Frankel and Blakemore, 1989).

Minéral	Formule	Organisme
<i>Iron Oxy-hydroxydes</i>		
Ferrihydrite	$5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	Bactéries et plusieurs organismes
Lepidocrocite	$\gamma\text{-FeOOH}$	Patelle et Chiton
Goethite	$\alpha\text{-FeOOH}$	Patelle et Chiton
Amorphous	$\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Bactéries
<i>Iron oxides</i>		
Magnétite	Fe_3O_4	Bactéries, Saumons,

Tableau 2.3: Diversité et localisation chez divers organismes des biominéraux du fer.

Il n'existe aucune généralisation publiée sur les formes de dépôt des oxydes de fer bactérien, cependant on retrouve des formes décrites à partir de certaines espèces bactériennes, comme la gaine hélicoïdale de *Gallionella ferruginea*, ou la gaine de *Leptotrix ochracea*. Les oxydes de fer des autres bactéries n'ont pas de forme particulière (fig.2.2). Les morphotypes produits semble être constitué de matrice organique où peut se faire le dépôt d'oxydes de fer, ceci est visible après réduction des oxydes de fer via l'hydroxylamine hydrochloridrique.

Cependant Kennedy et al. (2003a) classe les échantillons selon leur degré de minéralisation permettant ainsi, la classe 1 correspond à un échantillon modérément minéralisé avec la présence de gaine ou pédoncule. La classe 2 est en début de minéralisation où on retrouve des bactéries libres d'oxydes. La classe 3 correspond à des échantillons où l'oxyde de fer est de la goethite, que l'on observe sous forme agrégée aux bactéries.

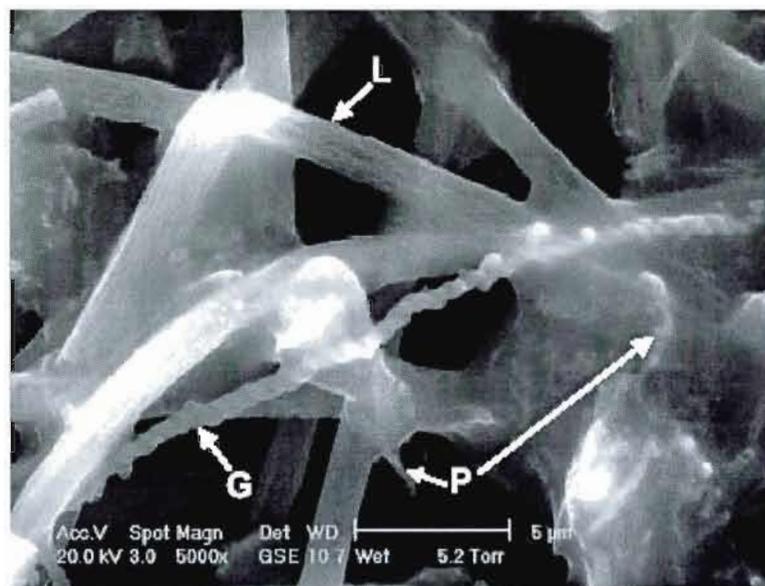


Figure 2.2: Photo au microscope électronique environnemental, d'oxydes de fer d'une source hydrothermale active. Polymorphe d'oxyde de bactérie comme la gaine de *L. ochracea* (L), le pédoncule de *G. ferruginea* (G) et des filaments qui ressemblent à ceux produit par PV1 (P) (Kennedy et al., 2003b)

Bien que les bactéries ferro-oxydantes neutrophiles jouent un rôle important dans le taux d'oxydation du fer ferreux (50 à 90%, selon les auteurs), il a été montré que les oxydes bactériens ont également un effet catalytique dans le taux d'oxydation du fer ferreux (Emerson and Moyer, 2002; Emerson and Revsbech, 1994a; Sobolev and Roden, 2001).

Le rôle des bactéries dans la formation biogénique des oxydes de fer est considéré comme double, d'un part elles interviennent au niveau de réactions biotiques ainsi qu'au niveau de réactions abiotiques passives. La première a lieu lors de l'oxydation du fer ferreux permettant un gain d'énergie par les bactéries ferro-oxydantes nécessaire à leur croissance. L'oxydation du fer ferreux entraîne la formation d'oxydes de fer au niveau de la membrane cellulaire ou de l'exopolymère bactérien. Les réactions passives liées à la formation des oxydes biogéniques sont dues à la réactivité de la membrane cellulaire. La plupart des bactéries possèdent une charge négative à leur surface résultats de la présence de groupe tels que les groupements carboxyle et phosphate de la membrane. L'attraction électrostatique entre les charges négatives des bactéries et les charges positives minérales, comme les oxydes de fer, permettent l'adsorption des ions minéraux au niveau de la membrane cellulaire qui sont la base de la nucléation des oxydes de fer (Fein et al., 1997; Fortin et al., 1998; Fortin and

Langley, 2005). De plus Fein et al (1997) ont montré que l'adsorption des ions augmente avec une hausse du pH, indiquant que les ions permettent la déprotonation des groupes fonctionnels au niveau de la membrane.

2.1.3. Les oxydes de fer au niveau des sources hydrothermales :

Le fer ferreux est commun et souvent abondant au niveau des fluides hydrothermaux, cependant peu de connaissance existe à propos des bactéries ferro-oxydantes des sources hydrothermales. La plupart des recherches sur les oxydes de fer et l'oxydation chimique au niveau des sources hydrothermales sont centrées sur les assemblages de minéraux ferreux associés aux sources hydrothermales de faibles températures. Ces études ont démontré que les signatures des bactéries ferro-oxydantes, sous la forme des morphotypes d'oxyde formé étaient présentes aussi bien au niveau des sites hydrothermaux actifs ou éteints (Halbach et al., 2001).

La minéralogie des dépôts d'oxyde de fer est dominée par des oxyde-hydroxydes faiblement ordonnés (2 lignes de ferrihydrite) avec des quantités significatives de silice amorphe (>73% poids sec) et de manganèse (>14% poids sec) (Little et al., 2004). Selon Kennedy *et al.* (2003b) l'oxyde de fer le plus répandue dans les sites hydrothermaux de faibles températures est un oxyhydroxyde, la ferrihydrite, caractérisée par deux pics à 2.6 et 1.5 Å en diffraction aux rayons X. La ferrihydrite est faiblement ordonnée et permet donc l'insertion d'atome dans sa structure, comme la silice, mais celle-ci inhibe la conversion vers une forme plus cristalline d'oxyde de fer comme l'hématite ou la goethite.

L'important échantillonnage au niveau des sources hydrothermales a permis de nombreuses observations sur les oxydes de fer au niveau des dépôts riches en fer, mais aussi au niveau des fluides hydrothermaux (tableau 2.4). Les filaments d'oxydes de fer ont habituellement un diamètre entre 1 et 5µm et 10 à 100µm de longueur. De nombreux auteurs ont différencié des morphologies particulières comme des gaines, des filaments dendritiques, des formes tournées, hélicoïdales (Emerson and Moyer, 2002; Halbach et al., 2001; Juniper and Fouquet, 1988; Little et al., 2004).

Localisation	Profondeur (m)	Type de dépôts	Morphologie des filaments	Référence
Magic Moutain Explorer Ridge (NE Pacifique)	1794-1808	Si et Mn oxydes riche en fer + Silicates de fer	Cavité circulaire et ovale	Fortin
Philosopher Vent Explorer Ridge		Oxydes de fer	Filaments	(Juniper and Fouquet, 1988)
Main Endeavour Segment, Juan de Fuca Ridge (JdFR)	2400	Sulfite de fer	Filaments irréguliers et tournés	
Axial volcano, JdFR	1500	Oxydes de fer	Spirales, Gaines et filament PV1	(Kennedy et al., 2003a)
East Pacific Rise (EPR)		Fragment d'oxyde de cheminées inactives	Filaments	(Juniper and Fouquet, 1988)
Red Sea Mount, EPR	1940	Oxydes de fer	Spirales	(Juniper and Fouquet, 1988)
Loihi Seamount, Hawaiï	1200	Oxydes de fer	Filaments enroulés, Gaines, Tapis bactériens important	(Emerson and Moyer, 2002)

Tableau 2.4: Occurrence des structures d'oxydes de fer au niveau des dépôts hydrothermaux marins. Construit d'après(Little et al., 2004)

Des observations au microscope électronique à transmission des oxydes de fer présents au niveau du plancher océanique proche des sources hydrothermales au sud d'Explorer Ridge présentent des sections de bactéries, où la membrane peut être partiellement conservée de processus diagénétiques, et d'autres bactéries où l'intérieur bactérien est remplacé par du

matériel dense composé de fer (Fein et al., 1997; Fortin et al., 1998; Fortin and Langley, 2005). De plus les observations ont montrées que les oxydes de fer présents au niveau des bactéries minéralisées ou des polymères bactériens ne sont pas composés d'une phase pure d'oxyde de fer, mais ils contiennent une quantité variable de silice et de manganèse, cependant les quantités sont plus importante que celles présentes au niveau des oxydes de fer naturel, ce qui laisse penser à la présence d'oxydes de fer jumelés à des oxydes de manganèse et des silicates de fer (Fortin and Langley, 2005).

2.1.4. Les oxydes de fer de JV1 et PV1 :

Les bactéries ferro-oxydantes extraient l'énergie nécessaire à leur croissance de l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique. Au cours de ce processus les bactéries libèrent des ions ferriques ou des oxydes de fer. L'équipe d'Emerson s'est constituée une collection de bactéries ferro-oxydantes, celles-ci proviennent de différents environnements comme des eaux usées, des racines de plantes ou encore des sources hydrothermales sous marines. La morphologie des oxydes produits permet une différenciation des souches bactériennes responsable de l'oxydation.

La souche JV1 forme des oxydes amorphes, indistinguables de ceux formés par d'autres ferro-oxydantes et des oxydes abiotiques(Emerson and Moyer, 2002).

La souche PV1, quant à elle, forme des filaments d'oxydes qui sont sans doute la première localisation pour l'oxydation, cependant ses filaments sont fins comparativement aux autres oxydes filamenteux (Little et al., 2004).

PV1 est une souche particulière de la collection du laboratoire de D. Emerson, car elle forme des structures filamenteuses composées principalement d'oxydes de fer amorphes. La cellule bactérienne semble croître au terminus du filament qui est probablement la première localisation des oxydes. De plus Emerson met en évidence que la structure du filament varie avec l'âge de la culture, ainsi il observe des filaments irréguliers dans des jeunes cultures, alors que des cultures plus âgées présentes des filaments de forme rubanée (fig.2.3). Le filament aurait donc un rôle dans le relargage des oxydes à l'extérieur de la cellule, ce qui a été mis en évidence que la réduction des oxydes laissait apparaître une fine matrice, qui semble être de nature organique, au niveau du filament. Ce mode de croissance est semblable

à celui observé chez *Gallionella ferruginea* qui croît dans la partie apicale de sa gaine. JV1 ne semble pas former de filament à partir des oxydes produits, on parle d'oxydes amorphes (www.whoj.edu/science/MCG/edwards/PV1 (Emerson and Moyer, 2002)).

Le but de la présente étude est d'observer la différence de taille des oxydes selon si l'oxydation responsable de leur formation est biotique ou abiotique et de plus quantifier la variation de la taille des oxydes selon l'espèce bactérienne en jeu.

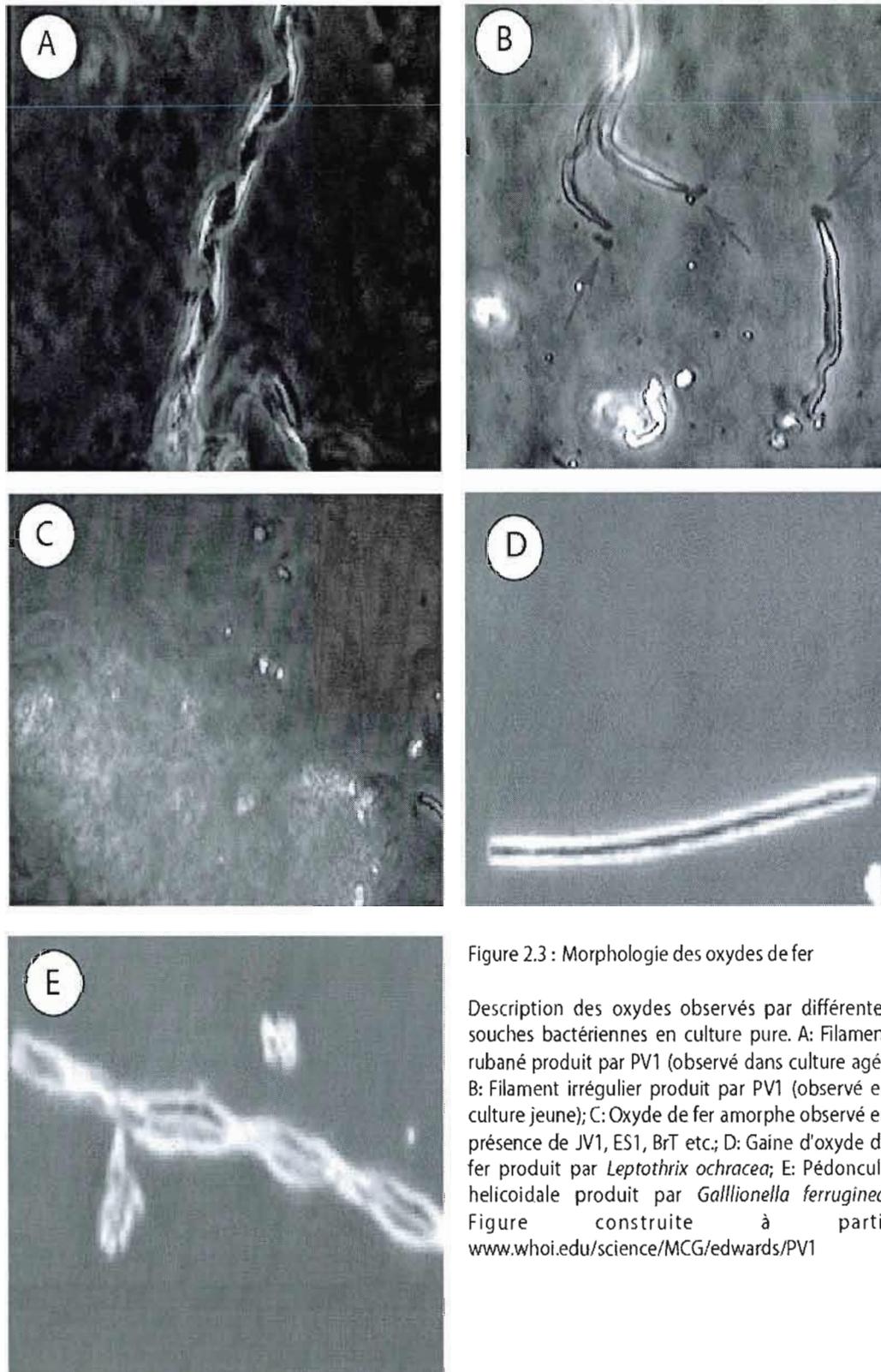


Figure 2.3 : Morphologie des oxydes de fer

Description des oxydes observés par différentes souches bactériennes en culture pure. A: Filament rubané produit par PV1 (observé dans culture agé); B: Filament irrégulier produit par PV1 (observé en culture jeune); C: Oxyde de fer amorphe observé en présence de JV1, ES1, BrT etc.; D: Gaine d'oxyde de fer produit par *Leptothrix ochracea*; E: Pédoncule helicoidale produit par *Gallionella ferruginea*. Figure construite à partir www.whoi.edu/science/MCG/edwards/PV1

2.2. Lieu d'étude

L'impact d'une grande concentration en Fe^{2+} se caractérise par la présence d'une large couche d'oxydes de fer qui se forme au niveau des orifices hydrothermaux. Le tapis bactérien orangé est dû à une couche d'oxyde de fer qui couvre les laves périphériques au champ. Le tapis bactérien est formé de fer, de silice et de chlore principalement, la silice est responsable de la bonne préservation lors de l'arrêt de l'activité microbienne (Emerson and Moyer, 2002; Karl et al., 1988; Kennedy et al., 2003b).

JV1 et PV1, les souches bactériennes de cette étude, viennent du champ hydrothermal de Loihi, volcan sous marin du système de point chaud d'Hawaï. Elles viennent toutes les deux de site peu profond (1000m) proche de Pele's Pit (fig.2.4).

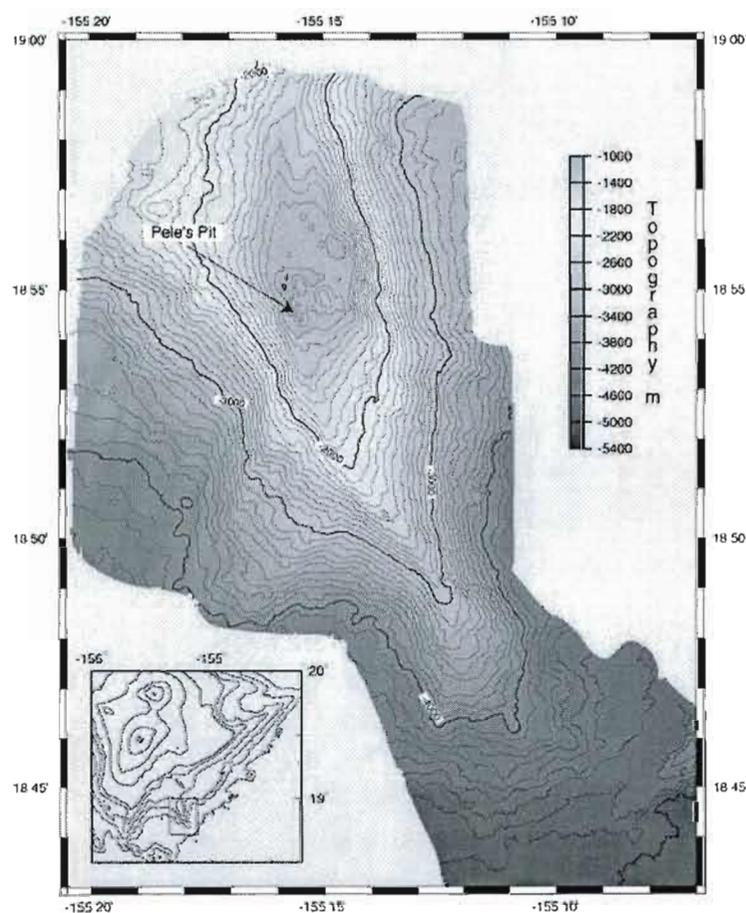


Figure 2.4 : Localisation des sites d'échantillonnage des souches bactériennes JV1 et PV1, au niveau du mont sous marin de Loihi, proche de Pele's Pit.

D'après Emerson et Bradburne (2001), le résultat des conditions environnementales très particulières du champ hydrothermal de Loihi est la présence abondante de tapis bactérien fortement incrustés d'oxydes de fer (fig.2.5).

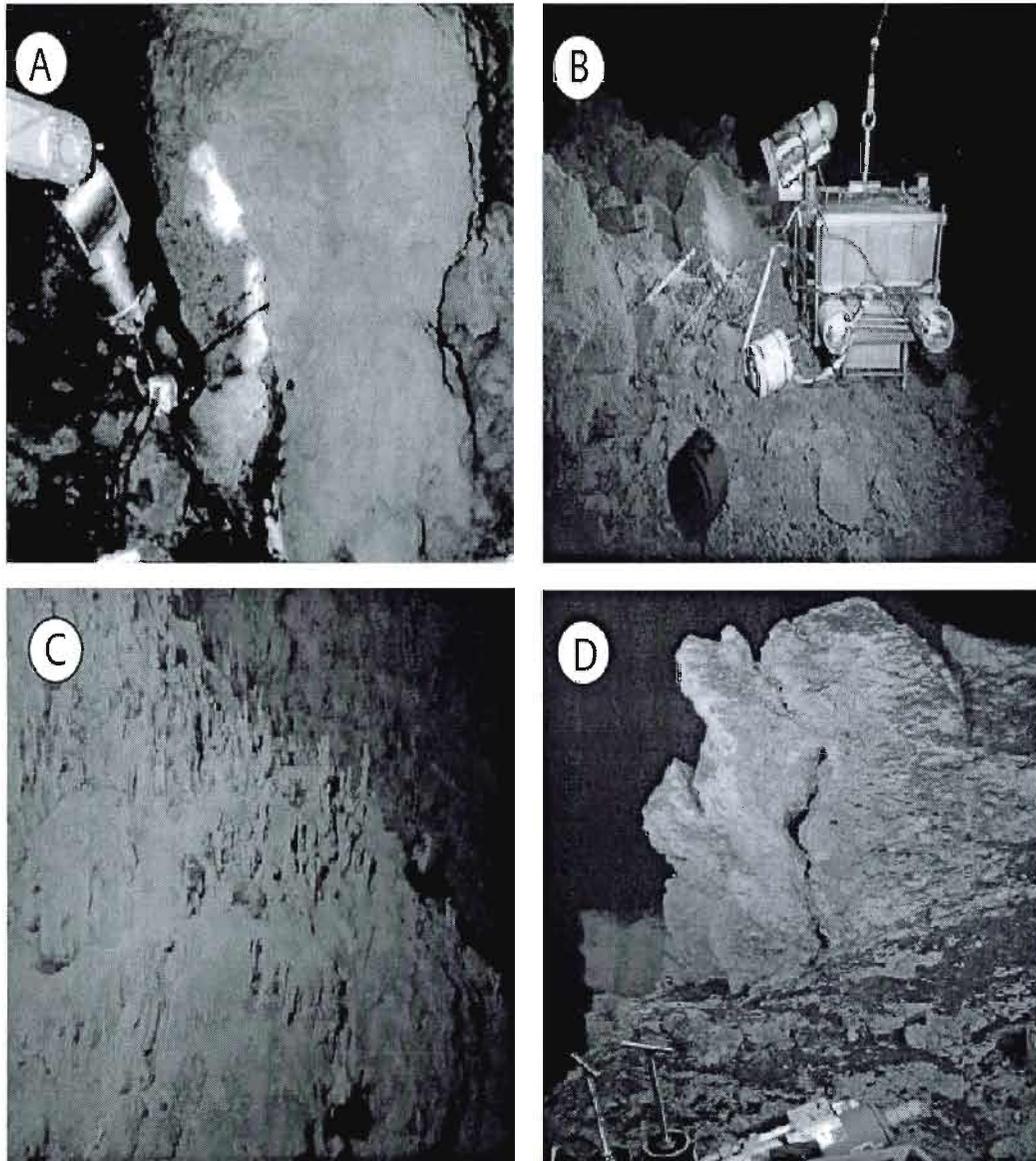


Figure 2.5 : Photo du champ hydrothermal de Loihi. A: Cheminée hydrothermal de Loihi. Insertion d'une sonde de température dans l'orifice hydrothermal. On note la présence d'un depot intensif d'oxyde de fer autour de l'ouverture de la cheminée. B: Observatoire du fond océanique à Pele's Vent. C et D : Photo montrant la présence d'oxydes de fer au niveau du champ hydrothermal de Loihi. D'après <http://nai.arc.nasa.gov/year6/year4.cfm> et www.oar.noaa.gov/spotlite/archive/spotloihi.html et www.who.edu/science/MCG/edwards/PV1

Des observations au microscope des tapis bactérien ont permis de mettre en évidence trois morphotypes d'oxydes de fer :

- Les morphotypes d'oxydes de type *Leptothrix ochracea*, des filaments tubulaire de 1 à 3 μm de diamètre
- Des filaments irréguliers ou enroulés de 1 à 2 μm de diamètre
- Des particules d'oxyde amorphe

Les deux premières formes peuvent être directement attribuable à l'action de bactéries ferro-oxydantes, alors que les particules d'oxydes amorphes peuvent être aussi bien dues à de l'oxydation chimique ou biotique. Lors de leur étude Emerson et Bradburne (2001) ont identifié 60 morphotypes d'oxydes présents au niveau des différents champs hydrothermaux de Loihi. A chaque site échantillonné en 1998 la présence d'oxydes de fer est remarquée, ces oxydes sont associés à des tapis bactériens floculants, et jusqu'à quelques mètres de l'orifice hydrothermal. L'épaisseur des tapis d'oxydes est communément de 1 à 5 cm. La normalisation au poids secs, nous permet de déterminer des concentrations en fer total réductible variant de 55 à 183 mg de fer/g de tapis, cependant aucune corrélation n'est observée avec la température ou la quantité d'oxydes de fer (Emerson and Moyer, 2002; Karl et al., 1988). Les cultures pures de deux des souches bactériennes du champ hydrothermal vont permettre une meilleure connaissance du fonctionnement des oxydes de fer des souches JV1 et PV1.

2.3. Méthodologie

Le processus de formation des oxydes est peu connu. Certaines souches bactériennes forment des morphotypes d'oxydes particuliers comme le pédoncule de *Gallionella ferruginea* ou même le filament de PV1. A travers l'observation des cultures au microscope électronique à transmission nous allons essayer de d'observer la mise en place ainsi que l'évolution au cours de la culture, afin de déterminer si il est possible de présumer la taille des oxydes de fer formés en relation avec le temps de culture, la quantité de fer dans le milieu et la quantité de bactéries.

Des échantillons provenant des cultures sont fixés au glutaraldehyde pour préserver la structure des cellules. Ensuite les échantillons sont rincés grâce à des centrifugations

successives (4 centrifugations à 5000 rpm, 8 minutes) et laissés 5 minutes dans le tampon avant de resuspendre pour la nouvelle centrifugation. Puis le culot est mis en suspension dans un mélange d'osmium (1 vol) et de tampon caco (3 vol) pendant 45 minutes à température ambiante, et enfin centrifuger à 7000 rpm pendant 7 minutes. Le culot subit une suite de quatre rinçages dans le tampon de rinçage suivie chacun d'une centrifugation à 5000 rpm pendant 10 minutes. La gélose d'agar (2%) est ensuite incorporé au culot, une fois solidifié, des blocs de 0,5 à 1 mm³ sont découpés. Les blocs préparés sont alors déshydratés via un bain d'acétone 30% pendant 5 minutes (deux fois), puis un bain d'acétone à 50% pour une période de 5 minutes (deux fois), un bain d'acétone à 70% pendant 5 minutes (deux fois), un bain d'acétone 80% pendant 5 minutes (deux fois), un bain d'acétone 95% pendant 15 minutes et finalement 3 bains d'acétone 100% pendant 15 minutes chacun. Les échantillons sont alors prêts pour l'imprégnation et l'inclusion, qui se fait par une suite de bain, la résine utilisé est composé d'épon, de DDSA (dodecyl succinic anhydride), MNA (methyl nadic anhydride) et de BDMA (benzyl dimethylamine). Le premier est un bain composé d'un quart de résine avec trois quarts de propylène pendant deux heures. Le deuxième est un bain dont la moitié est composé de la résine et l'autre partie de propylène pendant trois heures. Le troisième bain est composé de trois quarts de résine et d'un quart de propylène pendant une nuit. Le quatrième bain est de même composition que le troisième et a une durée de trois heures, finalement le dernier bain est un bain de résine pure pendant une heure sous vide à 50°C. Ensuite les inclusions sont déposées dans des cubes, puis placés 48 heures à 60°C pour la polymérisation, les blocs sont ensuite placés à température ambiante afin de durcir. Puis finalement des lames très fines sont alors coupés, permettant l'observation au microscope électronique à transmission. Les observations ont été faites à l'université McGill sur un microscope Tecnai 12. Afin de mieux comprendre la morphologie des oxydes bactériens et leur croissance, l'observation au microscope électronique à transmission, va se faire pour une même culture à différents intervalles de temps, compris entre 0 et 316 h. Ceci devrait nous permettre ainsi de voir une évolution de la minéralisation par rapport aux bactéries. De plus l'utilisation du logiciel ImageJ, va nous permettre de mesurer la longueur des oxydes et d'avoir des données quantitatives sur les oxydes bactériens (fig.2.6)



Figure 2.6 : Photo au microscope électronique à transmission de la souche JV1 au temps zéro de culture. L'image a été traitée à partir du logiciel ImageJ afin de mesurer la longueur des oxydes de fer. Les traits noir foncés sont les oxydes mesurés (l'échelle représente 0.2 μ m).

En associant les données d'observation visuelle, les données quantitatives sur les oxydes de fer bactérien et les données des conditions de cultures, cela devrait permettre une meilleure compréhension des oxydes de fer bactérien et de leur association avec les bactéries.

2.4. Résultats

2.4.1. Les observations visuelles :

L'observation visuelle a été effectuée à partir de 4 photos par type de culture (absence de bactéries, présence de JV1 et présence de PV1) à deux temps de culture différents (216 et 384 heures de cultures) prises au microscope électronique à transmission. Chacune des photos utilisées sont regroupées dans l'appendice D.

Dans un premier temps on observe que des oxydes de fer bactériens sont présents dans chacune des cultures et à tout les temps de culture. De plus on remarque des structures filamenteuses d'oxydes de fer dans chaque échantillon, cependant leur taille ainsi que leur quantité varie. Dans la culture en absence de bactéries, on note la présence de bactéries et également la présence d'oxydes autour de celles-ci, or ces bactéries semblent être des

bactéries complètement minéralisées (Fortin et al., 1998). Les oxydes de fer sont pour la plupart en forme de filaments assez bien développés (appendice D1 et D4). Dans le cas de la souche JV1, on remarque des bactéries qui semblent minéralisées, mais également des bactéries non minéralisées. Les oxydes bactériens semblent être présent sous deux formes, une en forme de filament et l'autre sans forme particulière qui se met en place autour des bactéries. On remarque également que les filaments sont plus nombreux autour d'une seule bactérie. Dans le cas de la souche PV1, on observe également des bactéries minéralisées et des bactéries en cours de minéralisation (fig 2.7, 2.8 et appendice D3 et D6), comme dans le cas de JV1, on note la présence d'oxydes en forme de filament et amorphe, cependant les filaments sont plus nombreux.

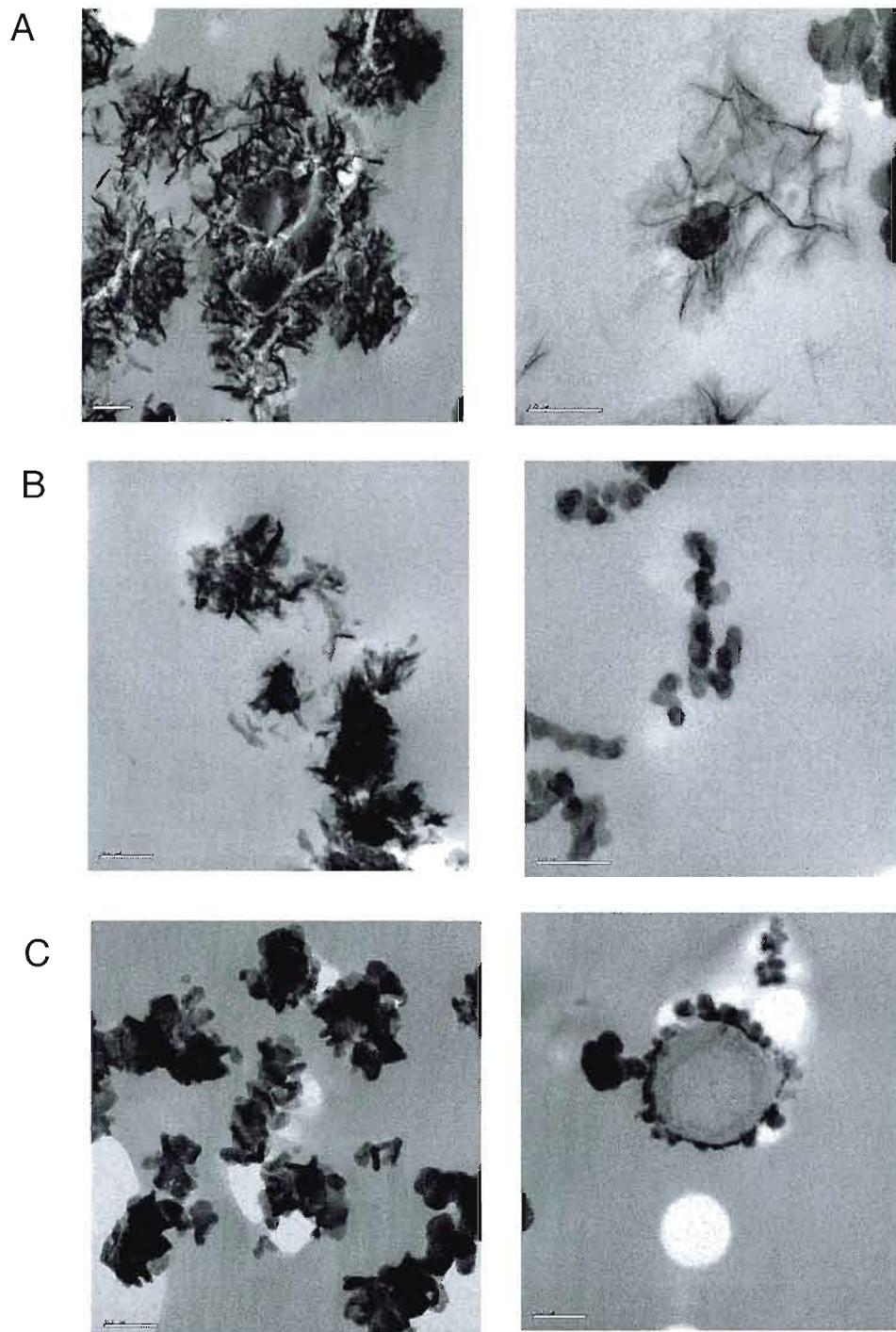


Figure 2.7 : Photo au microscope électronique à transmission dans la culture en absence de bactéries (A), dans la culture en présence de JV1 (B) et en présence de PV1 (C) après 216 heures de cultures.

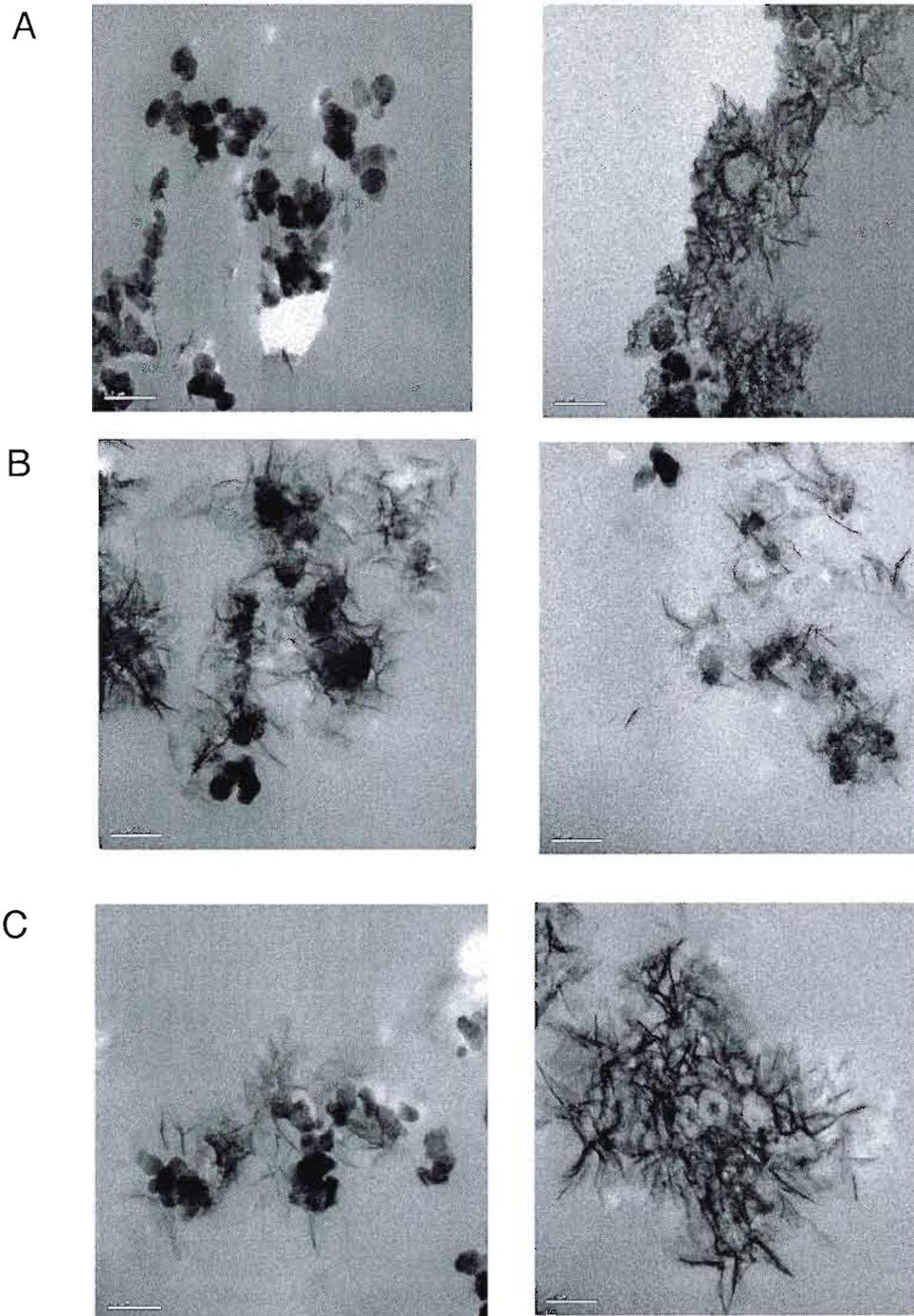


Figure 2.8 : Photo au microscope électronique à transmission dans la culture en absence de bactéries (A), dans la culture en présence de JV1 (B) et en présence de PV1 (C) après 384 heures de cultures.

De plus en comparant visuellement les oxydes de fer observés au microscope électronique à transmission des échantillons JV1 et PV1 à ceux décrit dans l'article de Fortin et al. (1998) il semblerait que les oxydes de fer soient composés de fer, mais aussi de silice. Les mêmes structures d'oxydes de fer sont observables dans l'étude de Boyd et Scott (2001), mais aucune hypothèse n'est émise quant à leur nature.

2.4.2. Les observations quantitatives :

A partir du logiciel ImageJ (permet de mesurer différents paramètres comme la longueur sur les photos en surlignant les objets à mesurer), on a pu déterminer la longueur des oxydes de fer présent dans les différentes cultures, en compilant les données on obtient la variation de la longueur des oxydes de fer pour chaque culture étudiée (fig.2.9) et l'évolution de la taille des oxydes au cours du temps pour chacune des souches étudiées (fig.2.10, 2.11 et 2.12).

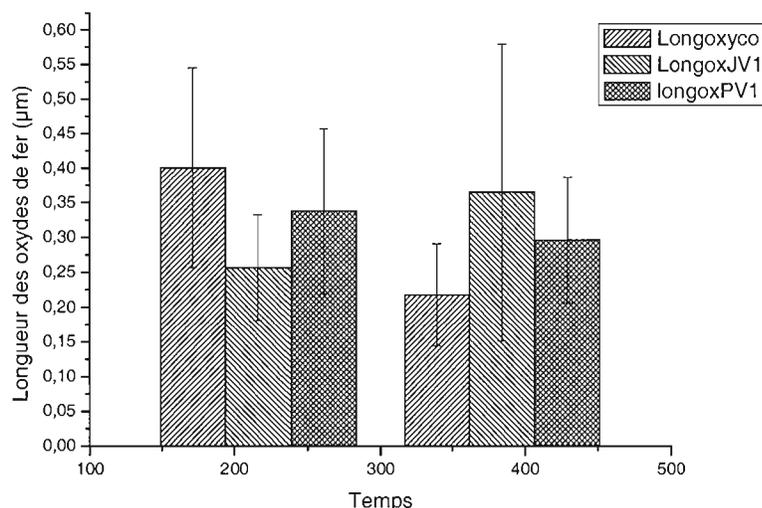


Figure 2.9 : Longueur moyenne des oxydes de fer en absence de bactéries (co), en présence de la souche bactérienne JV1 et en présence de la souche bactérienne PV1.

Après 216 heures de cultures, les oxydes de fer de la culture en présence de JV1 sont les plus petits (0,25µm) alors que ceux en absence de bactéries et ceux en présence de PV1 ne sont statistiquement pas différents (0,35µm) (les ANOVA sont présentées dans l'appendice C1 et

C2). Alors qu'après 384 heures de cultures, les oxydes en absence de bactéries sont les plus petits ($0,23\mu\text{m}$) alors que ceux en présence de JV1 sont les plus grands ($0,35\mu\text{m}$) et les oxydes présents dans la culture de PV1 ont une taille moyenne ($0,3\mu\text{m}$).

La figure 2.10 présente l'évolution de la longueur des oxydes de fer en absence de bactéries au cours du temps. L'analyse de variance nous permet de dire que la longueur est statistiquement différente pour chacun des temps de culture. La longueur des oxydes de fer a tendance à diminuer au cours du temps de culture.

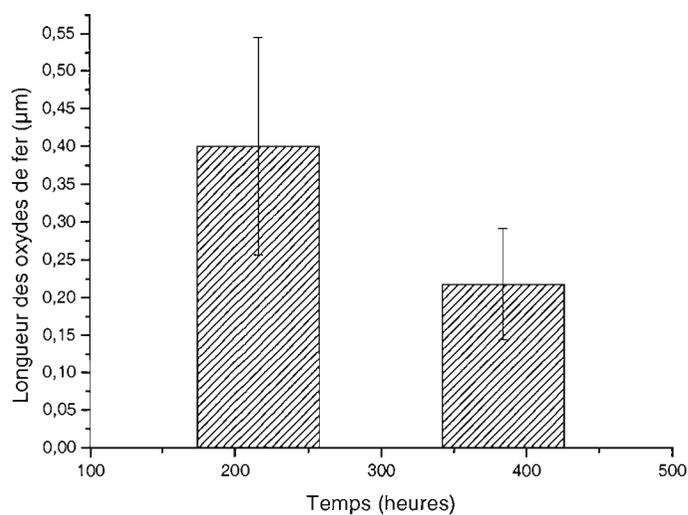


Figure 2.10 : Longueur des oxydes de fer dans la culture en absence de bactéries, après 216 heures de culture et après 384 heures de culture.

Dans le cas de la culture en présence de la souche JV1, on note que la longueur des oxydes ne varie pas de manière importante de $0,25\mu\text{m}$ à $0,35\mu\text{m}$, on remarque une augmentation de la longueur des oxydes en fin de culture (fig.2.11). La longueur des oxydes est statistiquement différente entre les deux temps de culture (appendice C4).

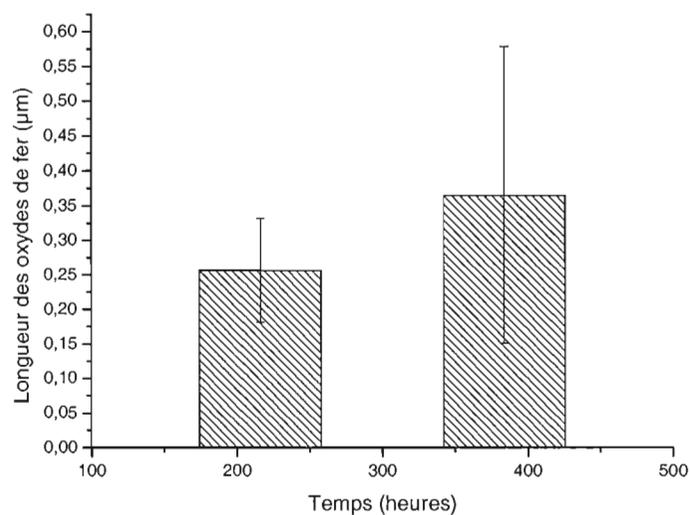


Figure 2.11 : Longueur des oxydes de fer dans la culture en présence de la souche bactérienne JV1, après 216 heures de culture et après 384 heures de culture.

La figure 2.12 présente l'évolution de la longueur des oxydes de fer en présence de la souche bactérienne PV1. On observe une diminution de la longueur des oxydes de fer au cours de la culture, même si la longueur des oxydes après 216 heures de cultures et pas statistiquement différente de celle en fin de culture. Il semblerait qu'il y a quand même une diminution de $0,05\mu\text{m}$ dans la longueur des oxydes.

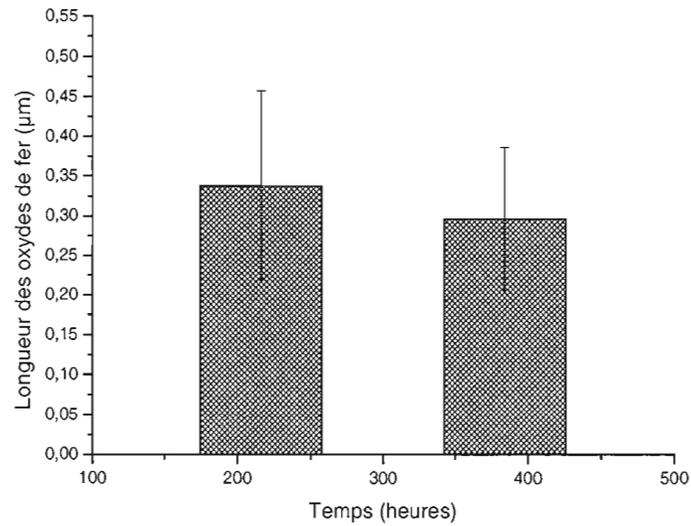


Figure 2.12 : Longueur des oxydes de fer dans la culture en présence de la souche bactérienne PV1, après 216 heures de culture et après 384 heures de culture.

On a également observé la quantité de bactéries présente dans les photos qui étaient liées à des oxydes de fer (fig.2.13).

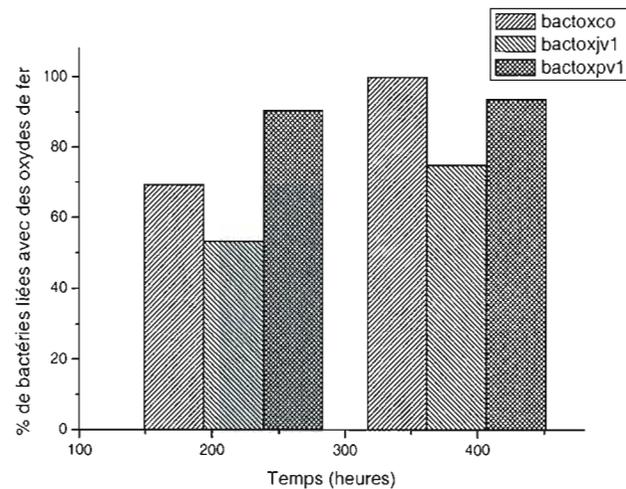


Figure 2.13 : Graphique représentant le pourcentage de bactéries observées liées a des oxydes de fer, dans les différentes cultures (absence de bactéries, présence de JV1 et de PV1) et à différents temps de culture.

Dans la culture sans bactéries, on observe un minimum de 70% des bactéries sont liées à des oxydes de fer, dans le cas de JV1 le pourcentage de bactéries liées à des oxydes de fer varie jusqu'à 80% au cours du temps. Dans le cas de PV1, il semblerait que 50% des bactéries seraient liées à des oxydes de fer après 216 heures de culture et que cette valeur passerait à plus de 90% après 384 heures de cultures.

On a également testé les relations possibles entre la longueur des oxydes et le nombre de bactéries, ou la concentration en fer ferreux dans le milieu et il semble n'avoir aucune relation statistiquement valide entre ses différentes variables (appendice C6). On remarque uniquement que la vitesse d'oxydation du fer ferreux entre 200 et 300 heures de culture est plus lente pour les bactéries tuées en début de culture, cependant les concentrations sont très faibles (fig.1.18) et à la limite de détection avec la méthode utilisée (dosage ferrozine). Cependant il paraît clair que le processus d'oxydation du fer et celui de mise en place des oxydes se font sur des échelles de temps différentes. Après 200 heures de culture la concentration en fer ferreux a diminué de deux tiers, alors que la longueur des oxydes n'est pas différente de celle du début de culture (fig.1.18 et appendice D7).

2.5. Discussion

A travers les observations au microscope électronique à transmission on n'observe aucune morphologie particulière à une espèce bactérienne. Les observations montrent deux structures différentes. L'une est de fines particules allongées, comme des filaments ou des aiguilles, et l'autre est d'une forme plus arrondie. En comparant ces structures à celles décrites par Fortin et al. (1998) il semblerait qu'on retrouve le fer ferrique sous deux formes distinctes, l'une étant la ferrihydrite, un oxyde de fer ferrique faiblement ordonné avec de la silice (un maximum de 20 à 25%) et l'autre étant un silicate de fer de structure comme la montronite (plus de 25% de silice). La présence de ferrihydrite est en accord avec les caractéristiques des bactéries étudiées qui utilisent le fer ferreux en libérant du fer ferrique qui forme ensuite des oxydes de fer ferrique. La ferrihydrite est l'un de ses oxydes de fer ferrique qui a la propriété d'être un des oxydes à se former le plus rapidement grâce à sa structure faiblement ordonnée. Cependant l'incorporation de silice au niveau de la ferrihydrite l'empêche de continuer son processus de transformation, ce qui nous permet de comprendre pourquoi la ferrihydrite est

présente même au niveau de cultures âgées. Cependant la présence de quantité importante de silice permettant la mise en place de silicate, semble limiter par la quantité de silice mise dans le milieu de culture, qui est très pauvre en silice. Il paraît donc peu probable de retrouver des silicates de fer dans les échantillons. Ceci signifie que la morphologie des silicates de fer observé par Fortin et al. (1998) est proche de celle d'oxyde de fer ferrique, or aucune analyse aux rayons X, nous permet de déterminer la quantité de silice dans les cultures des souche JV1 et PV1.

On observe donc aucune différence dans la morphologie des oxydes aussi bien en absence de bactéries qu'en présence de JV1 et PV1. Sur le plan quantitatif, on note que les oxydes de fer ont une longueur moyenne d'environ $0,3\mu\text{m}$, avec une variation au cours du temps de $0,05\mu\text{m}$. Cependant on ne remarque pas une tendance au niveau de la variation de la longueur moyenne des oxydes de fer. De plus en étudiant les relations possibles entre la longueur moyenne des oxydes et la concentration en fer ferreux restant dans le milieu de culture ou même la quantité de bactéries, on remarque qu'il n'y a aucune relation statistiquement valide, ce qui indique que de tels facteurs n'ont pas d'influence sur la taille des oxydes. On peut donc penser que la longueur des oxydes est plus en relation avec les conditions de leur formation, comme par exemple, la possibilité de lier le fer ferrique ionique aux groupes avec une charge négative située sur la membrane cellulaire, autrement dit selon le pH.

On observe de nombreuses structures arrondie de couleur foncé comme le sont les filaments d'oxydes de fer ferrique. Ces structures peuvent être identifiés comme des oxydes de fer amorphes (Little et al., 2004) ou encore comme des bactéries minéralisées (Fortin et al., 1998). On observe également des bactéries non minéralisées et d'autre encore en processus de minéralisation (appendice D2, D5 et D6), cependant dans le cas des bactéries minéralisées ou des oxydes de fer amorphe il est impossible de les distinguer avec certitude, ce qui rend moins évident l'observation des photos prise au microscope électronique. Or si on estime que ces sphères rondes pleines d'oxydes sont des bactéries minéralisées, on remarque une quantité importante de celles-ci par rapport à des bactéries vivantes dès le début de la mise en culture, ce qui expliquerait alors pourquoi la quantification de la part des bactéries ferroxydantes dans l'oxydation du fer ferreux n'ai pas aboutie a des résultats concluants et que la croissance bactérienne soit lente. On peut alors imaginer que la culture utilisée pour

inséminer la nouvelle culture comportait une grande quantité de bactéries minéralisées (non différenciable par comptage DAPI) étant non viable pour l'oxydation du fer ferreux.

2.6. Conclusion

Cette étude a permis d'observer les oxydes de fer ferrique formés par les souches bactériennes JV1 et PV1 du champ hydrothermal de Loihi. Aucune différence visuelle n'est observable quant à la morphologie des oxydes formés en absence de bactéries ou en présence de JV1 et PV1. De plus la longueur des oxydes formés a une moyenne de $0,35\mu\text{m} \pm 0,05\mu\text{m}$, mais aucune tendance dans la variation de la longueur des oxydes n'est obtenue. On observe également des bactéries fortement ou même entièrement minéralisé dès le début de la culture ce qui laisse penser qu'une partie de la population bactérienne en début de culture n'est pas vivante, ce qui expliquerait donc le faible taux de croissance des bactéries et leur faible part dans l'oxydation du fer ferreux.

CONCLUSION

L'oxydation du fer ferreux à pH neutre est régit par la compétition entre l'oxygène et les bactéries ferro-oxydantes. La culture de deux de ses bactéries, les souche JV1 et PV1, provenant du champ hydrothermal de Loihi a permis de mieux caractériser leurs besoins de croissance et d'en conclure qu'une baisse de pH, qu'un changement de concentration initiale en fer ferreux, ainsi que la quantité d'oxygène fixe à 1% n'ont pas d'influence significative sur l'oxydation du fer ferreux. Les souches JV1 et PV1 ont un taux d'oxydation et un rendement énergétique très faible et leur part dans l'oxydation du fer est d'environ 15% de l'oxydation du fer total, ce qui est comparable aux autres espèces bactériennes. L'ensemble de ces données, ajouté à la faible croissance bactérienne au cours des culture, laisse penser que le milieu de culture liquide ne semble pas très bien adapté aux souche JV1 et PV1. L'observation au microscope des oxydes de fer formés par les bactéries des souches JV1 et PV1 pendant l'oxydation du fer ferreux n'a pas permis de mettre en évidence des morphologies particulières pour les souches. De plus la longueur moyenne des oxydes est d'environ $0.25\mu\text{m}$, mais aucune tendance dans les variations n'a été mise en évidence. Cependant certaines observations ont permis de mettre en évidence la présence, dès le début de la culture, de bactéries ferro-oxydantes complètement ou en cours de minéralisation, ce qui pourrait expliquer la faible croissance ainsi le rôle mineur des bactéries dans l'oxydation du fer ferreux au cours de cette étude.

APPENDICE A

A.1 Concentration en fer ferreux au cours du temps en absence et en présence de
bactérie ferro-oxydantes

89

A.1 CONCENTRATION EN FER FERREUX AU COURS DU TEMPS EN ABSENCE ET EN PRESENCE DE BACTERIES FERRO-OXYDANTES

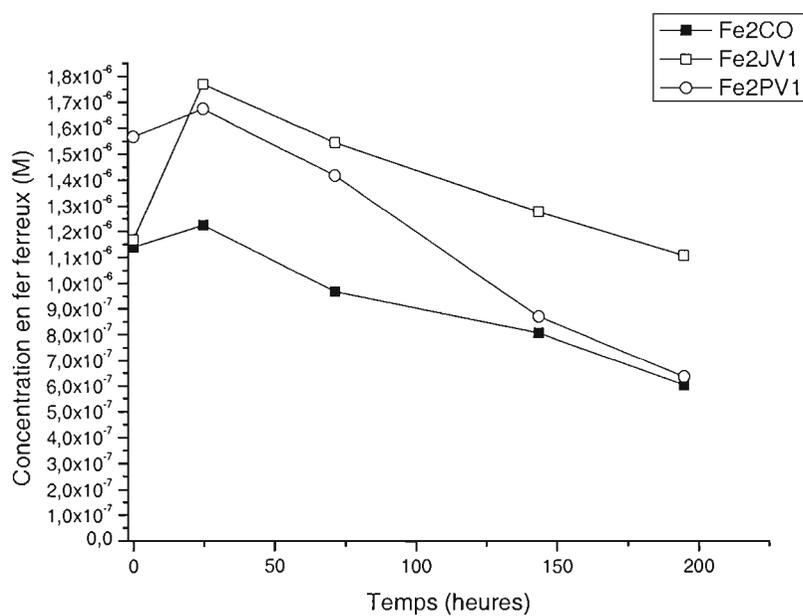


Figure 1.14 : Concentration en fer ferreux au cours du temps en absence et en présence de bactérie ferro-oxydantes. Les équations des droites de régression sont indiquées ci-dessous : (CO) $y=1.2 \times 10^{-6} - 2.98 \times 10^{-9}x$ ($R^2=0.96$), pour la culture en présence de JV1 $y=1.51 \times 10^{-6} - 1.64 \times 10^{-9}x$ ($R^2=0.48$) et pour la culture en présence de PV1 $y=1.7 \times 10^{-6} - 5.43 \times 10^{-9}x$ ($R^2=0.97$).

APPENDICE B

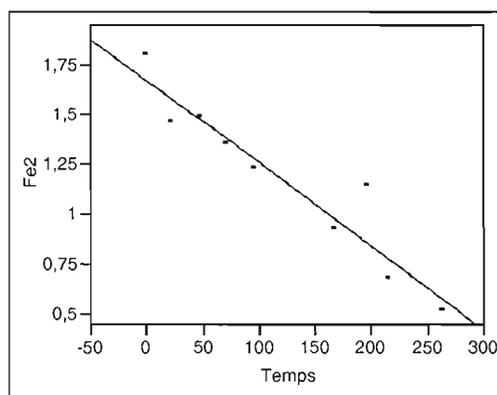
ANALYSE STATISTIQUE DU CHAPITRE I

B.1	Analyse de régression dans la culture en absence de bactéries	91
B.2	Analyse de régression dans la culture en présence de JV1	94
B.3	Analyse de régression dans la culture en présence de JV1 tuées	96
B.4	Analyse de régression dans la culture en présence de PV1	98
B.5	Analyse de régression dans la culture en présence de PV1 tuées	100
B.6	Analyse de variance : ANCOVA	102
B.7	Analyse de variance : MANOVA	106

B1. ANALYSE DE REGRESSION POUR LA CULTURE EN ABSENCE DE BACTERIES

Caractéristiques de la régression :

Bivariate Fit of Fe2 By Temps



Linear Fit

$$\text{Fe2} = 1,6720594 - 0,0041589 \text{ Temps}$$

Summary of Fit

RSquare	0,902863
RSquare Adj	0,888987
Root Mean Square Error	0,136586
Mean of Response	1,171833
Observations (or Sum Wgts)	9

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	1	1,2138014	1,21380	65,0634
Error	7	0,1305897	0,01866	Prob > F
C. Total	8	1,3443910		<,0001

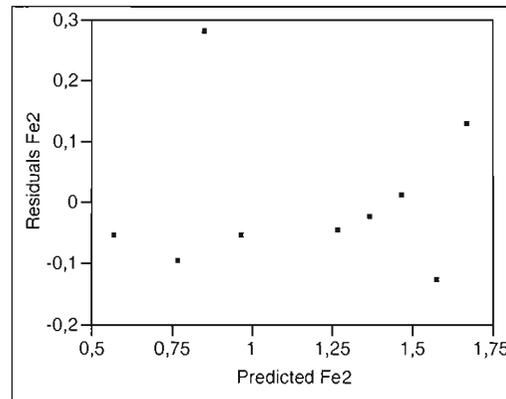
Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	1,6720594	0,076933	21,73	<,0001
Temps	-0,004159	0,000516	-8,07	<,0001

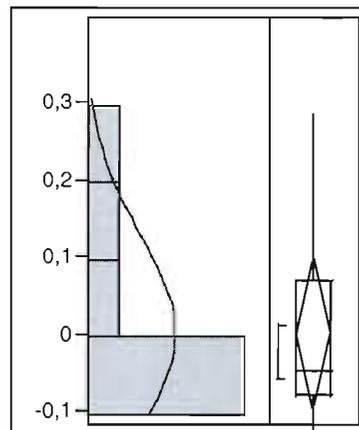
Conditions d'applications :

- La relation est linéaire
- La variable indépendante (temps) est considérée fixe ou sans erreur

- Les variances résiduelles ne semblent pas homogène



- Les résidus ne sont pas distribués normalement ($P < 0.05$)



Goodness-of-Fit Test

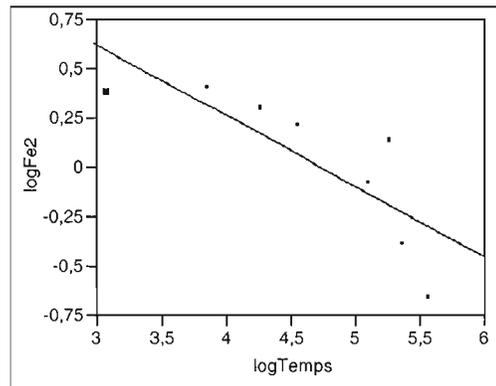
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,832420	0,0475

Les conditions d'application n'étant pas respectées, une transformation est nécessaire afin d'obtenir une droite de régression statistiquement valide. En transformant les données en log,

on complète alors toutes les conditions d'application. Les nouvelles caractéristiques de la régression sont

Bivariate Fit of logFe2 By logTemps



Linear Fit

$$\log\text{Fe2} = 1,7079803 - 0,3609524 \log\text{Temps}$$

Summary of Fit

RSquare	0,656518
RSquare Adj	0,599272
Root Mean Square Error	0,242802
Mean of Response	0,031397
Observations (or Sum Wgts)	8

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	1	0,6760793	0,676079	11,4682
Error	6	0,3537155	0,058953	Prob > F
C. Total	7	1,0297948		0,0147

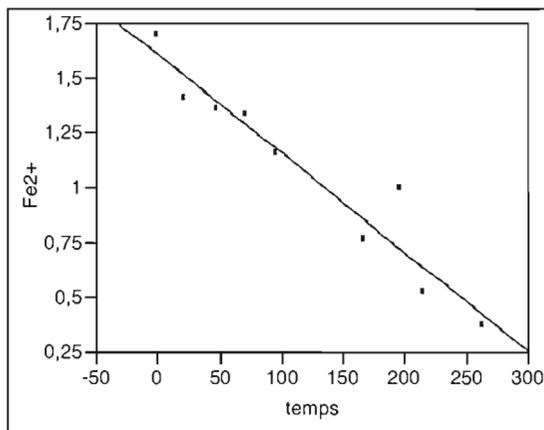
Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	1,7079803	0,50247	3,40	0,0145
logTemps	-0,360952	0,106587	-3,39	0,0147

B.2 ANALYSE DE REGRESSION POUR LA CULTURE EN PRESENCE DE JVI

Caractéristiques de la régression:

Bivariate Fit of Fe2+ By temps



Linear Fit

$$\text{Fe}^{2+} = 1,6060088 - 0,0045021 \text{ temps}$$

Summary of Fit

RSquare	0,921847
RSquare Adj	0,910682
Root Mean Square Error	0,13125
Mean of Response	1,064511
Observations (or Sum Wgts)	9

Analysis of Variance

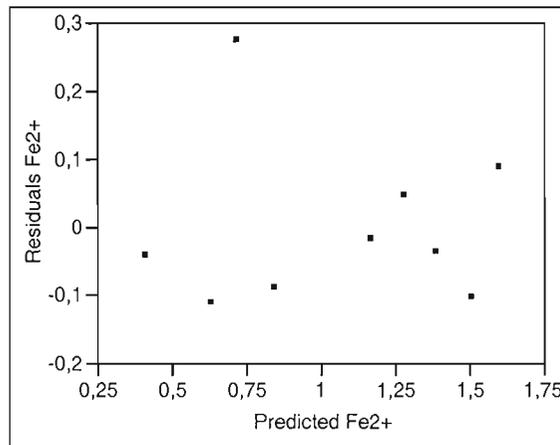
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	1	1,4223560	1,42236	82,5681
Error	7	0,1205852	0,01723	Prob > F
C. Total	8	1,5429413		<,0001

Parameter Estimates

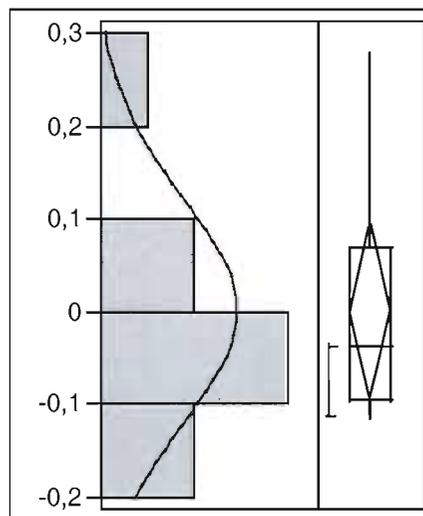
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	1,6060088	0,073928	21,72	<,0001
temps	-0,004502	0,000495	-9,09	<,0001

Conditions d'applications :

- La relation est linéaire
- La variable indépendante (temps) est considérée fixe ou sans erreur
- Les variances résiduelles semblent homogènes



- Les résidus sont distribués normalement ($P > 0.05$)



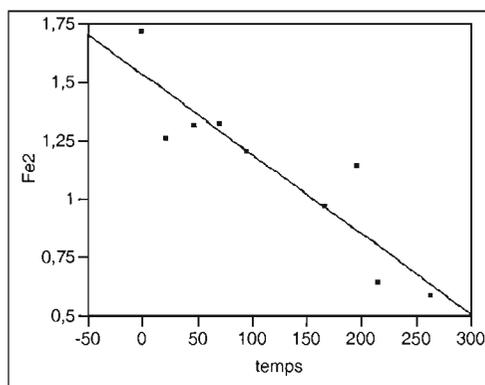
Goodness-of-Fit Test
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,849827	0,0742

B.3 ANALYSE DE REGRESSION DANS LA CULTURE EN PRESENCE DE JV1 TUEES

Caractéristiques de la régression:

Bivariate Fit of Fe2 By temps



Linear Fit

$$\text{Fe2} = 1,5335164 - 0,0034242 \text{ temps}$$

Summary of Fit

RSquare	0,821137
RSquare Adj	0,795585
Root Mean Square Error	0,160015
Mean of Response	1,121656
Observations (or Sum Wgts)	9

Analysis of Variance

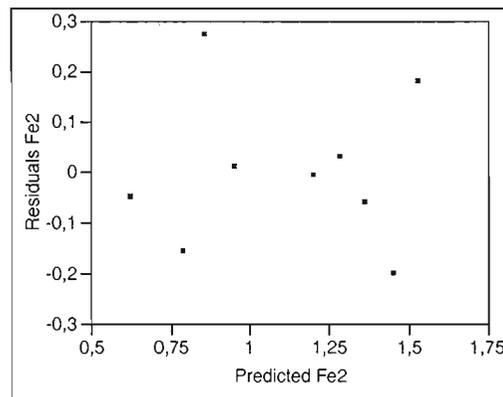
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	1	0,8228412	0,822841	32,1360
Error	7	0,1792347	0,025605	Prob > F
C. Total	8	1,0020759		0,0008

Parameter Estimates

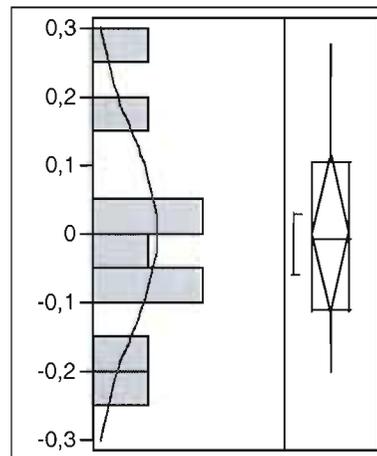
Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	1,5335164	0,09013	17,01	<,0001
temps	-0,003424	0,000604	5,67	0,0008

Conditions d'applications :

- La relation est linéaire
- La variable indépendante (temps) est considérée fixe ou sans erreur
- Les variances résiduelles semblent homogènes



- Les résidus sont distribués normalement ($P > 0.05$)



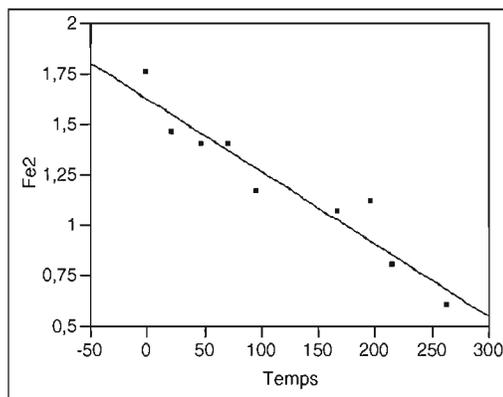
Goodness-of-Fit Test
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,944677	0,6319

B.4 ANALYSE DE REGRESSION DANS LA CULTURE EN PRESENCE DE PVI

Caractéristiques de la régression:

Bivariate Fit of Fe2 By Temps



Linear Fit

$$\text{Fe2} = 1,6261923 - 0,0036046 \text{ Temps}$$

Summary of Fit

RSquare	0,909508
RSquare Adj	0,896581
Root Mean Square Error	0,113843
Mean of Response	1,192633
Observations (or Sum Wgts)	9

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	1	0,9118249	0,911825	70,3553
Error	7	0,0907220	0,012960	Prob > F
C. Total	8	1,0025469		<,0001

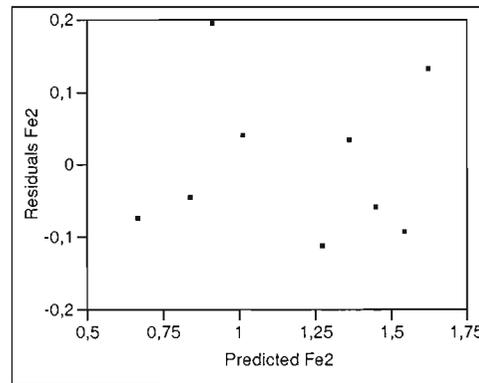
Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	1,6261923	0,064123	25,36	<,0001
Temps	-0,003605	0,00043	-8,39	<,0001

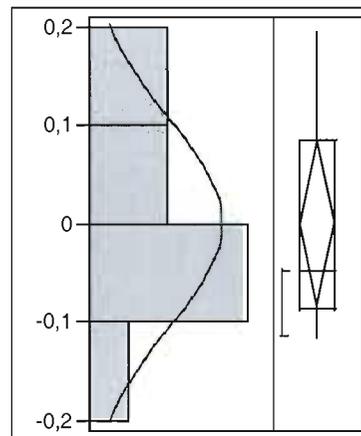
Conditions d'applications :

- La relation est linéaire

- La variable indépendante (temps) est considérée fixe ou sans erreur
- Les variances résiduelles semblent homogènes



- Les résidus sont distribués normalement ($P > 0.05$)



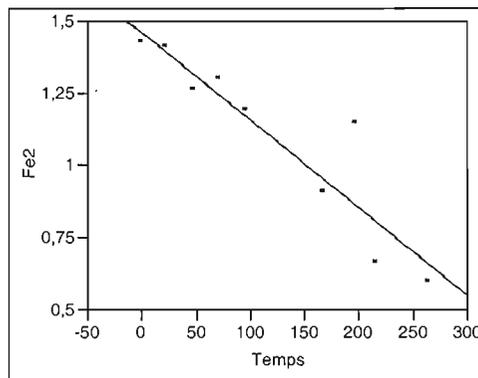
Goodness-of-Fit Test
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob < W
0,900991	0,2578

B.5 ANALYSE DE REGRESSION DANS LA CULTURE EN PRESENCE DE PV1 TUEES

Caractéristiques de la régression:

Bivariate Fit of Fe2 By Temps



Linear Fit

$$\text{Fe2} = 1,462789 - 0,0030517 \text{ Temps}$$

Summary of Fit

RSquare	0,851288
RSquare Adj	0,830044
Root Mean Square Error	0,127708
Mean of Response	1,09574
Observations (or Sum Wgts)	9

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	1	0,65352649	0,653526	40,0709
Error	7	0,11416469	0,016309	Prob > F
C. Total	8	0,76769118		0,0004

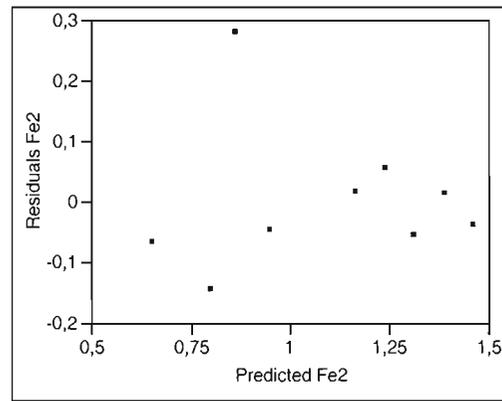
Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	1,462789	0,071933	20,34	<,0001
Temps	-0,003052	0,000482	-6,33	0,0004

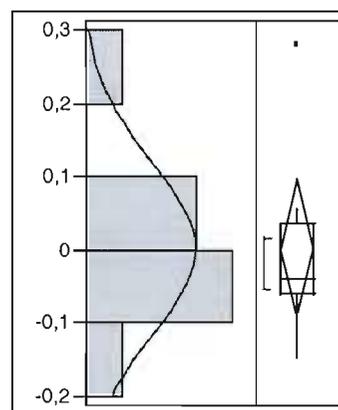
Conditions d'applications :

- La relation est linéaire
- La variable indépendante (temps) est considérée fixe ou sans erreur

- Les variances résiduelles semblent homogènes



- Les résidus sont distribués normalement ($P > 0.05$)



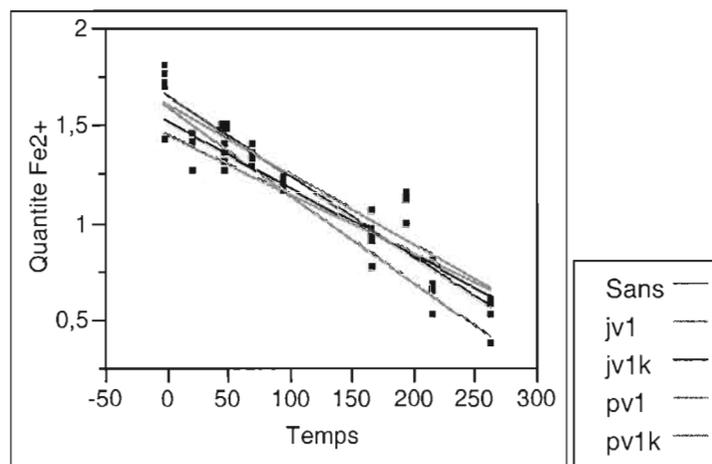
Goodness-of-Fit Test
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,838537	0,0556

B.6 ANALYSE DE VARIANCE : ANCOVA

Comparaison des pentes

Regression Plot



Summary of Fit

RSquare	0,889714
RSquare Adj	0,861355
Root Mean Square Error	0,134727
Mean of Response	1,129275
Observations (or Sum Wgts)	45

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	5,1251725	0,569464	31,3731
Error	35	0,6352963	0,018151	Prob > F
C. Total	44	5,7604688		<,0001

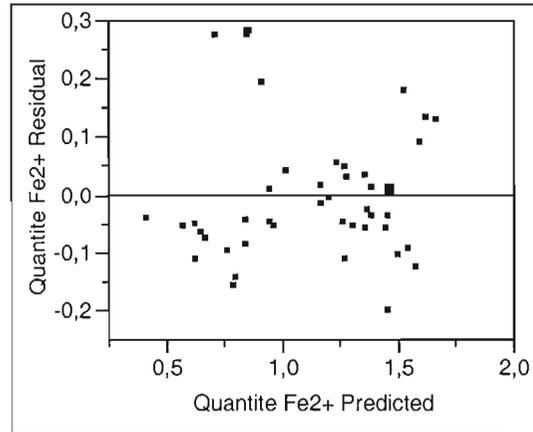
Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	1,5801132	0,033937	46,56	<,0001
Bacterie[Sans]	0,0425587	0,040168	1,06	0,2966
Bacterie[jv1]	-0,064764	0,040168	-1,61	0,1159
Bacterie[jv1k]	-0,007619	0,040168	-0,19	0,8507
Bacterie[pv1]	0,0633587	0,040168	1,58	0,1237
Temps	-0,003748	0,000227	-16,48	<,0001
Bacterie[Sans]*(Temps-120,278)	-0,000411	0,000455	-0,90	0,3729
Bacterie[jv1]*(Temps-120,278)	-0,000754	0,000455	-1,66	0,1065
Bacterie[jv1k]*(Temps-120,278)	0,0003241	0,000455	0,71	0,4809
Bacterie[pv1]*(Temps-120,278)	0,0001437	0,000455	0,32	0,7540

Effect Tests

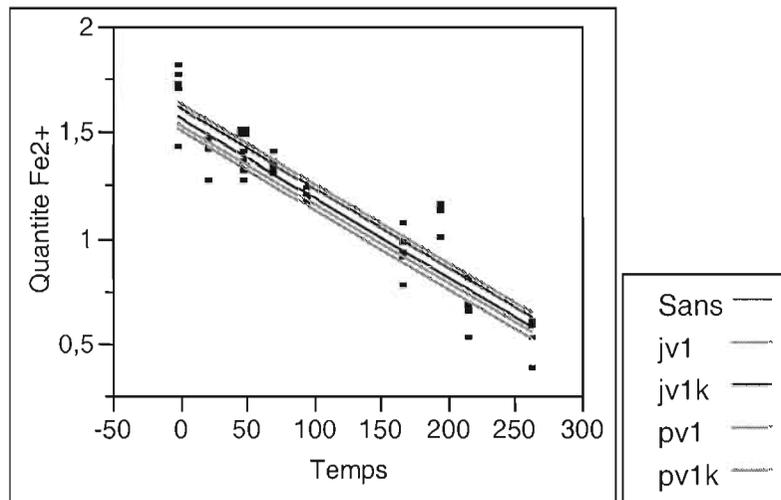
Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
Bacterie	4	4	0,1008225	1,3886	0,2580
Temps	1	1	4,9297749	271,5932	<,0001
Bacterie*Temps	4	4	0,0945752	1,3026	0,2881

Residual by Predicted Plot



Comparaison des ordonnées à l'origine

Regression Plot



Summary of Fit

RSquare

0,873297

RSquare Adj	0,857052
Root Mean Square Error	0,136802
Mean of Response	1,129275
Observations (or Sum Wgts)	45

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	5	5,0305974	1,00612	53,7611
Error	39	0,7298714	0,01871	Prob > F
C. Total	44	5,7604688		<,0001

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	1,5801132	0,03446	45,85	<,0001
Bacterie[Sans]	0,0425587	0,040786	1,04	0,3032
Bacterie[jv1]	-0,064764	0,040786	-1,59	0,1204
Bacterie[jv1k]	-0,007619	0,040786	-0,19	0,8528
Bacterie[pv1]	0,0633587	0,040786	1,55	0,1284
Temps	-0,003748	0,000231	-16,23	<,0001

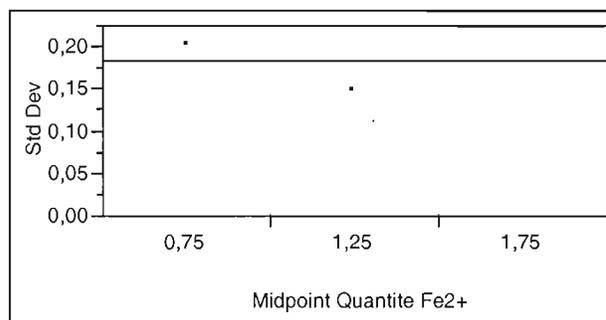
Effect Tests

Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
Bacterie	4	4	0,1008225	1,3468	0,2700
Temps	1	1	4,9297749	263,4179	<,0001

Conditions d'applications :

- Linéarité
- Homoscedasticité

Tests that the Variances are Equal



Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median
0,75	3	0,2021092	0,1432222	0,1863667
1,25	5	0,1477417	0,1184320	0,1363400

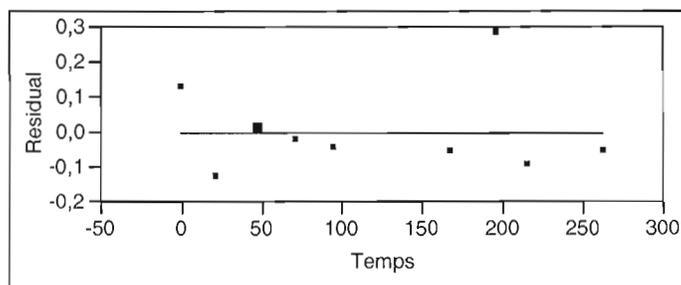
Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median	
1,75	1	.	0,000000	0,000000	
Test		F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]		0,5601	1	6	0,4825
Brown-Forsythe		2,2926	1	6	0,1808
Levene		0,1852	1	6	0,6820
Bartlett		0,2316	1	.	0,6303

Warning: Small sample sizes. Use Caution.

Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal

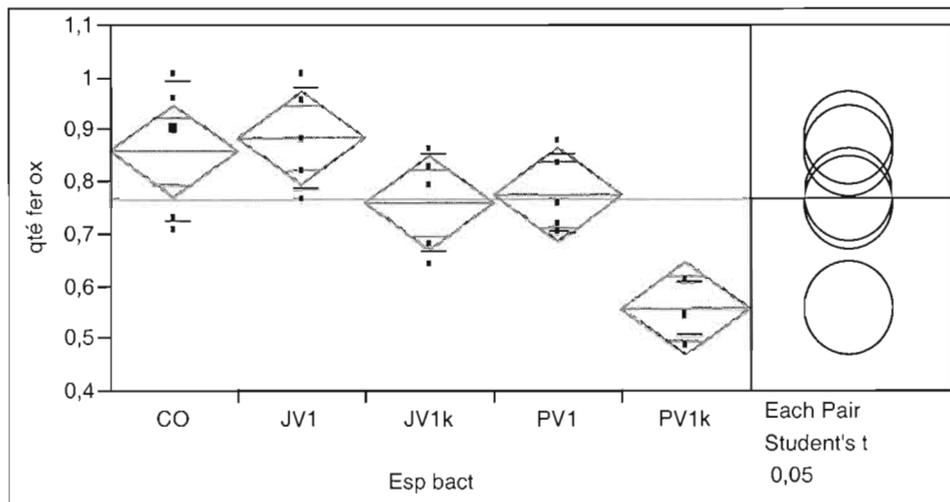
F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
21,7079	1	3,3175	0,0149

- Normalité des résidus



B.7 ANALYSE DE VARIANCE : MANOVA

Caractéristiques de la MANOVA : comparaison des moyennes selon les cultures :



Summary of Fit

Rsquare	0,646495
Adj Rsquare	0,575794
Root Mean Square Error	0,095158
Mean of Response	0,76736
Observations (or Sum Wgts)	25

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Esp bact	4	0,33120296	0,082801	9,1441	0,0002
Error	20	0,18110280	0,009055		
C. Total	24	0,51230576			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
CO	5	0,859000	0,04256	0,77023	0,94777
JV1	5	0,884400	0,04256	0,79563	0,97317
JV1k	5	0,759400	0,04256	0,67063	0,84817
PV1	5	0,776400	0,04256	0,68763	0,86517
PV1k	5	0,557600	0,04256	0,46883	0,64637

Comparisons mean for each pair using Student's t

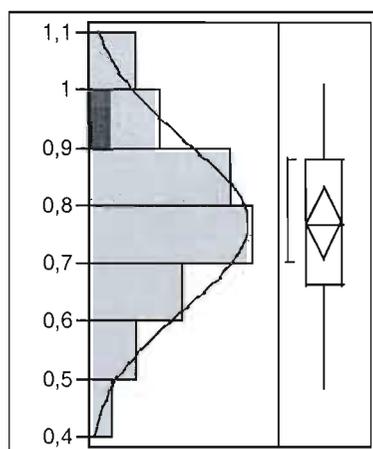
t	Alpha					
2,08596	0,05					
Abs(Dif)-LSD		JV1	CO	PV1	JV1k	PV1k
JV1		-0,12554	-0,10014	-0,01754	-0,00054	0,20126

	t	Alpha				
CO		-0,10014	-0,12554	-0,04294	-0,02594	0,17586
PV1		-0,01754	-0,04294	-0,12554	-0,10854	0,09326
JV1k		-0,00054	-0,02594	-0,10854	-0,12554	0,07626
PV1k		0,20126	0,17586	0,09326	0,07626	-0,12554

Level		Mean
JV1	A	0,88440000
CO	A	0,85900000
PV1	A	0,77640000
JV1k	A	0,75940000
PV1k	B	0,55760000

Conditions d'applications :

- Normalité de la distribution

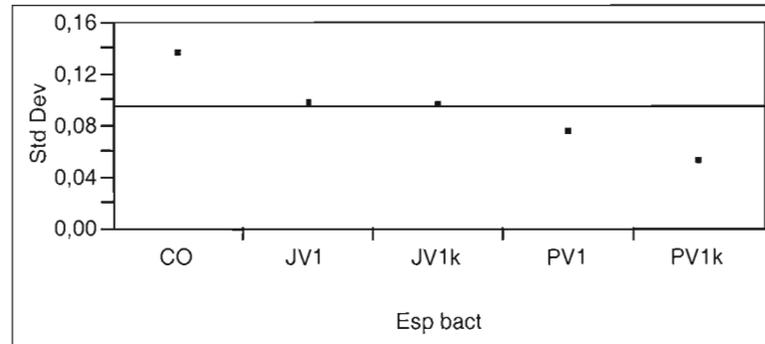


Goodness-of-Fit Test

Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,975109	0,7745

- Egalité de la variance



Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median
CO	5	0,1360000	0,1144000	0,1178000
JV1	5	0,0970608	0,0756800	0,0864000
JV1k	5	0,0948146	0,0791200	0,0798000
PV1	5	0,0751485	0,0620800	0,0656000
PV1k	5	0,0521709	0,0403200	0,0394000

Test	F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]	2,4577	4	20	0,0788
Brown-Forsythe	2,1365	4	20	0,1138
Levene	2,5918	4	20	0,0678
Bartlett	0,8433	4	.	0,4974

Warning: Small sample sizes. Use Caution.

Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal

F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
14,3420	4	9,7272	0,0004

APPENDICE C

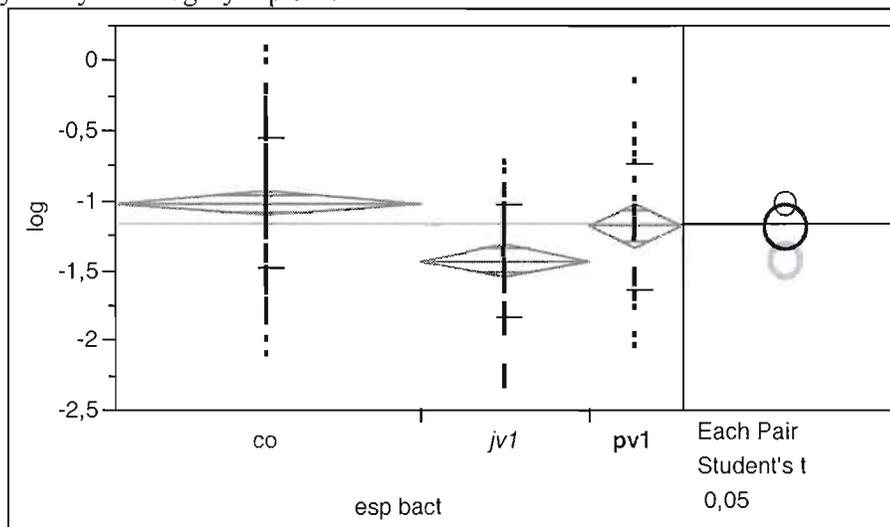
ANALYSE STATISTIQUE DU CHAPITRE II

C.1	Analyse de variance pour chaque type après 216 heures de culture	110
C.2	Analyse de variance pour chaque type après 384 heures de culture	113
C.3	Analyse de variance en absence de bactéries	116
C.4	Analyse de variance en présence de JV1	119
C.5	Analyse de variance en présence de PV1	122
C.6	Corrélation entre les différentes variables	125

C.1 ANALYSE DE VARIANCE POUR CHAQUE TYPE DE CULTURE APRES 216 HEURES

Caractéristiques de l'ANOVA :

Oneway Analysis of log By esp bact



Summary of Fit

Rsquare	0,144327
Adj Rsquare	0,135367
Root Mean Square Error	0,445781
Mean of Response	-1,16981
Observations (or Sum Wgts)	194

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
esp bact	2	6,402000	3,20100	16,1080	<,0001
Error	191	37,955717	0,19872		
C. Total	193	44,357716			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
co	105	-1,0198	0,04350	-1,106	-0,934
jv1	58	-1,4335	0,05853	-1,549	-1,318
pv1	31	-1,1844	0,08006	-1,342	-1,026

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
1,97246	0,05

Abs(Dif)-LSD	t	Alpha	co	pv1	jv1
co			-0,12135	-0,01514	0,26984
pv1			-0,01514	-0,22334	0,05347
jv1			0,26984	0,05347	-0,16328

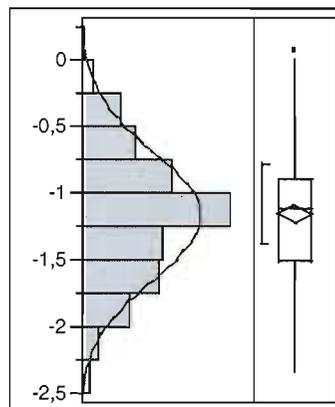
Level		Mean
co	A	-1,019825
pv1	A	-1,184418
jv1	B	-1,433516

Levels not connected by same letter are significantly different

Level	- Level	Difference	Lower CL	Upper CL	p-Value
co	jv1	0,4136906	0,269839	0,5575425	5,149e-8
pv1	jv1	0,2490984	0,053470	0,4447262	0,0128476
co	pv1	0,1645923	-0,015139	0,3443239	0,0724433

Conditions d'applications :

- Normalité de la distribution

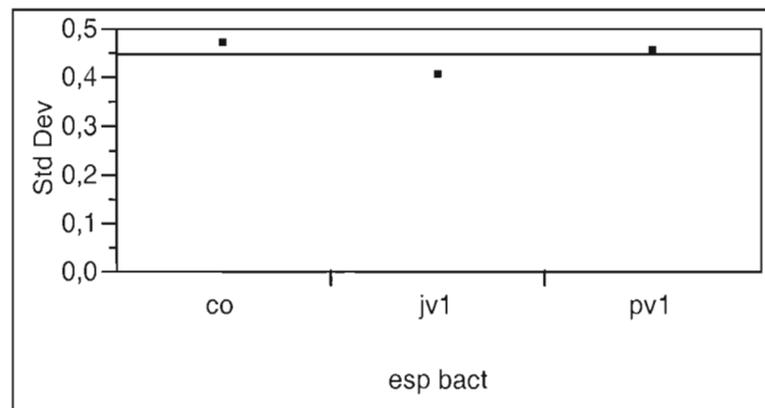


Goodness-of-Fit Test

Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,993626	0,5701

- Egalité de la variance



Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median
co	105	0,4654075	0,3676954	0,3674397
jv1	58	0,4048323	0,3277378	0,3181183
pv1	31	0,4504515	0,3471701	0,3476812

Test	F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]	0,8169	2	191	0,4433
Brown-Forsythe	0,5910	2	191	0,5548
Levene	0,4202	2	191	0,6575
Bartlett	0,6924	2	.	0,5004

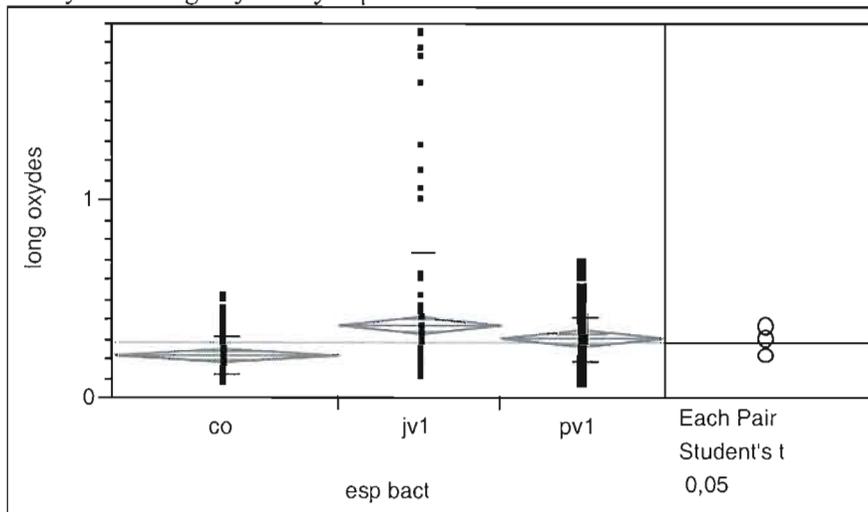
Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal

F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
17,3646	2	79,324	<,0001

C.2 ANALYSE DE VARIANCE POUR CHAQUE TYPE DE CULTURE APRES 384 HEURES

Caractéristiques de l'ANOVA :

Oneway Analysis of long oxydes By esp bact



Summary of Fit

Rsquare	0,074817
Adj Rsquare	0,06953
Root Mean Square Error	0,217286
Mean of Response	0,283977
Observations (or Sum Wgts)	353

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
esp bact	2	1,336293	0,668147	14,1517	<,0001
Error	350	16,524570	0,047213		
C. Total	352	17,860864			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
co	146	0,217760	0,01798	0,18239	0,25313
jv1	103	0,365223	0,02141	0,32312	0,40733
pv1	104	0,296471	0,02131	0,25457	0,33838

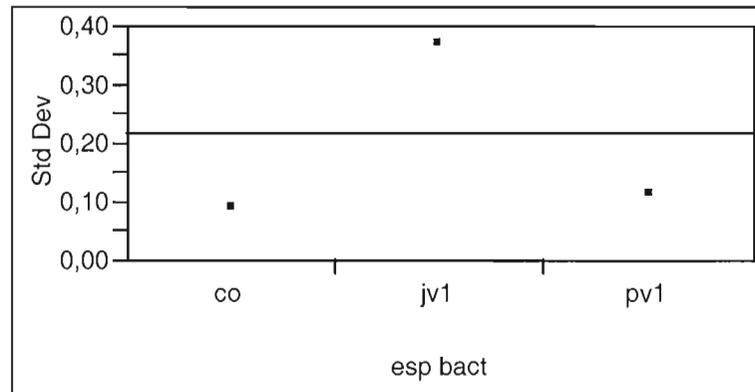
Std Error uses a pooled estimate of error variance

Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha
1,96677	0,05

- Egalité de la variance



Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median
co	146	0,0916497	0,0732825	0,0720205
jv1	103	0,3701587	0,2140880	0,1727379
pv1	104	0,1136693	0,0899373	0,0872981

Test	F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]	10,5681	2	350	<,0001
Brown-Forsythe	8,8141	2	350	0,0002
Levene	22,7685	2	350	<,0001
Bartlett	137,0301	2	.	<,0001

Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal

F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
22,4424	2	181,59	<,0001

Test non paramétrique car la normalité n'est pas obtenue même en effectuant des transformations

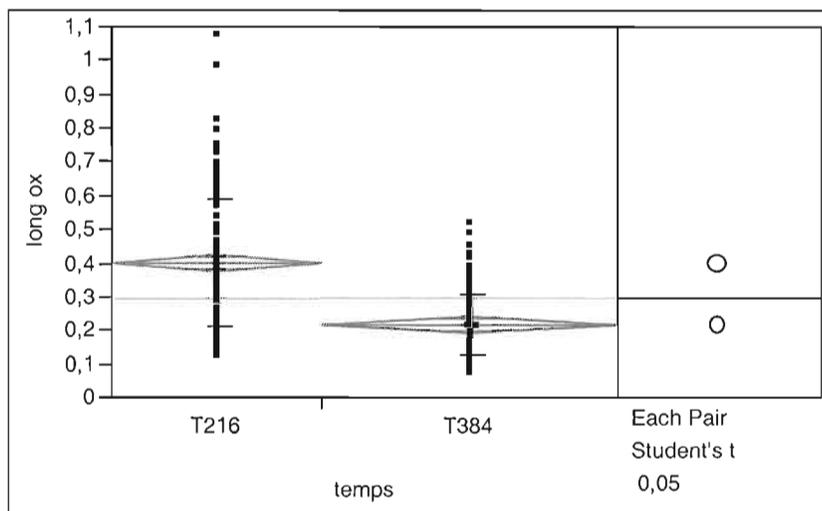
Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums)

Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
co	146	20214	138,452	-5,960
jv1	103	20191,5	196,034	2,249
pv1	104	22075,5	212,264	4,196

1-way Test, ChiSquare Approximation

ChiSquare	DF	Prob>ChiSq
36,8376	2	<,0001

C.3 ANALYSE DE VARIANCE EN ABSENCE DE BACTERIES

Caractéristiques de l'ANOVA :

Summary of Fit

Rsquare	
Adj Rsquare	0,295412
Root Mean Square Error	0,292582
Mean of Response	0,139863
Observations (or Sum Wgts)	0,294255
	251

t Test

T216-T384

Assuming equal variances

Difference	0,182859	t Ratio	10,21753
Std Err Dif	0,017897	DF	249
Upper CL Dif	0,218107	Prob > t	0,0000
Lower CL Dif	0,147611	Prob > t	0,0000
Confidence	0,95	Prob < t	1,0000

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
temps	1	2,0422083	2,04221	104,3980	<,0001
Error	249	4,8708774	0,01956		
C. Total	250	6,9130857			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
T216	105	0,400619	0,01365	0,37374	0,42750

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
T384	146	0,217760	0,01158	0,19496	0,24056

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Means and Std Deviations

Level	Number	Mean	Std Dev	Std Err Mean	Lower 95%	Upper 95%
T216	105	0,400619	0,187415	0,01829	0,36435	0,43689
T384	146	0,217760	0,091650	0,00758	0,20277	0,23275

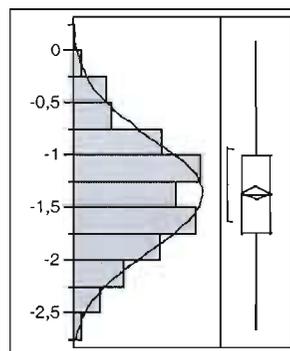
Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

	t	Alpha		
	1,96954	0,05		
Abs(Dif)-LSD			T216	T384
T216			-0,03802	0,14761
T384			0,14761	-0,03224

Conditions d'applications :

- Normalité de la distribution



Goodness-of-Fit Test

Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,995118	0,6083

- Egalité de la variance

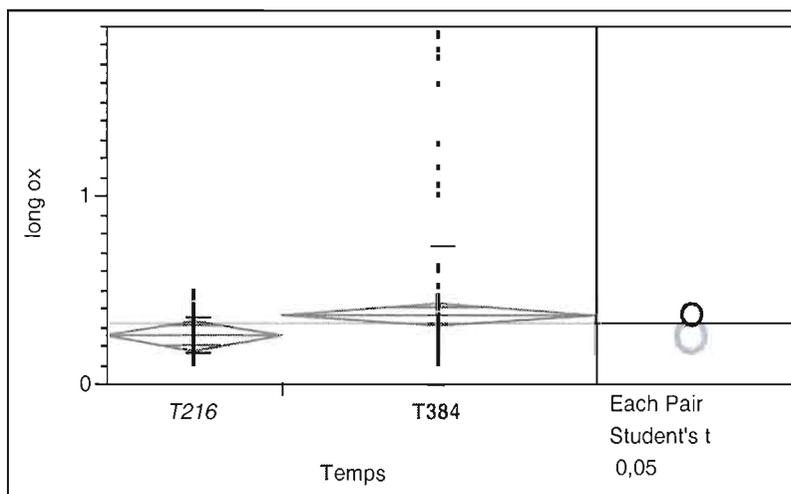
Tests that the Variances are Equal

Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median
T216	105	0,1874147	0,1440952	0,1405333
T384	146	0,0916497	0,0732825	0,0720205

Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median	
Test		F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]		26,0947	1	249	<,0001
Brown-Forsythe		32,1313	1	249	<,0001
Levene		39,9963	1	249	<,0001
Bartlett		61,4518	1	.	<,0001
F Test 2-sided		4,1816	104	145	<,0001
Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal					

F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
85,2887	1	139,88	<,0001

C.4 ANALYSE DE VARIANCE EN PRESENCE DE JV1

Caractéristiques de l'ANOVA :

Summary of Fit

Rsquare	0,029362
Adj Rsquare	0,023258
Root Mean Square Error	0,301596
Mean of Response	0,326106
Observations (or Sum Wgts)	161

t Test

T216-T384

Assuming equal variances

Difference	-0,10859	t Ratio	-2,19314
Std Err Dif	0,04951	DF	159
Upper CL Dif	-0,01080	Prob > t	0,0297
Lower CL Dif	-0,20637	Prob > t	0,9851
Confidence	0,95	Prob < t	0,0149

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Temps	1	0,437504	0,437504	4,8099	0,0297
Error	159	14,462631	0,090960		
C. Total	160	14,900135			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
T216	58	0,256638	0,03960	0,17843	0,33485
T384	103	0,365223	0,02972	0,30653	0,42391

Std Error uses a pooled estimate of error variance

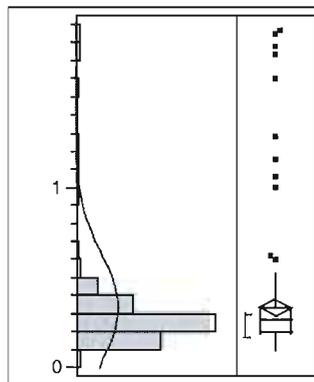
Means Comparisons

Comparisons for each pair using Student's t

t	Alpha		
1,97500	0,05		
Abs(Dif)-LSD		T384	T216
T384		-0,08300	0,01080
T216		0,01080	-0,11061

Conditions d'applications :

- Normalité de la distribution



Goodness-of-Fit Test

Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,522319	0,0000

La normalité n'étant pas obtenue même avec en transformant les données, des tests non paramétriques sont donc utilisés pour comparer les moyennes.

Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests (Rank Sums)

Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
T216	58	4517,5	77,8879	-0,634
T384	103	8523,5	82,7524	0,634

2-Sample Test, Normal Approximation

S	Z	Prob> Z
4517,5	-0,63385	0,5262

1-way Test, ChiSquare Approximation

ChiSquare	DF	Prob>ChiSq
0,4040	1	0,5250

Median Test (Number of Points Above Median)

Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
T216	58	29	0,500000	0,177

Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
T384	103	50	0,485437	-0,177
2-Sample Test, Normal Approximation				
	S	Z	Prob> Z	
	29	0,17690	0,8596	
1-way Test, ChiSquare Approximation				
	ChiSquare	DF	Prob>ChiSq	
	0,0313	1	0,8596	
Van der Waerden Test (Normal Quantiles)				
Level	Count	Score Sum	Score Mean	(Mean-Mean0)/Std0
T216	58	-6,96919	-0,12016	-1,172
T384	103	6,96919	0,06766	1,172
2-Sample Test, Normal Approximation				
	S	Z	Prob> Z	
	-6,969186	-1,17226	0,2411	
1-way Test, ChiSquare Approximation				
	ChiSquare	DF	Prob>ChiSq	
	1,3742	1	0,2411	

Aucun test non paramétrique est statistiquement valide, on en conclut qu'on ne peut pas déterminer statistiquement la variance entre ses deux variables.

- Egalité de la variance

Tests that the Variances are Equal

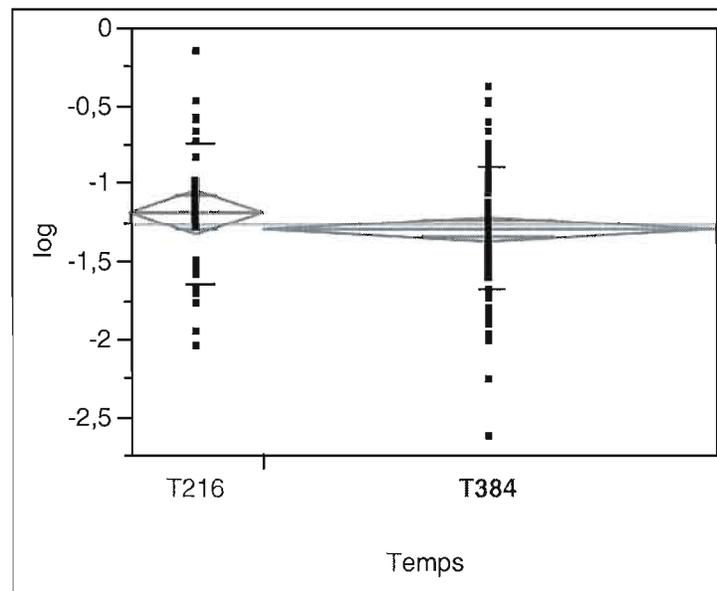
Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median	
T216	58	0,0924185	0,0753526	0,0750517	
T384	103	0,3701587	0,2140880	0,1727379	
Test					
		F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]		5,0304	1	159	0,0263
Brown-Forsythe		4,6046	1	159	0,0334
Levene		12,0645	1	159	0,0007
Bartlett		92,3977	1	.	<,0001
F Test 2-sided		16,0420	102	57	<,0001
Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal					

F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
7,9801	1	123,13	0,0055

t Test
2,8249

C.5 ANALYSE DE VARIANCE EN PRESENCE DE PV1

Caractéristiques de l'ANOVA :



Summary of Fit

Rsquare	0,011742
Adj Rsquare	0,004311
Root Mean Square Error	0,405459
Mean of Response	-1,26477
Observations (or Sum Wgts)	135

t Test

T216-T384

Assuming equal variances

Difference	0,10430	t Ratio	1,257059
Std Err Dif	0,08297	DF	133
Upper CL Dif	0,26841	Prob > t	0,2109
Lower CL Dif	-0,05981	Prob > t	0,1055
Confidence	0,95	Prob < t	0,8945

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Temps	1	0,259780	0,259780	1,5802	0,2109
Error	133	21,864841	0,164397		
C. Total	134	22,124621			

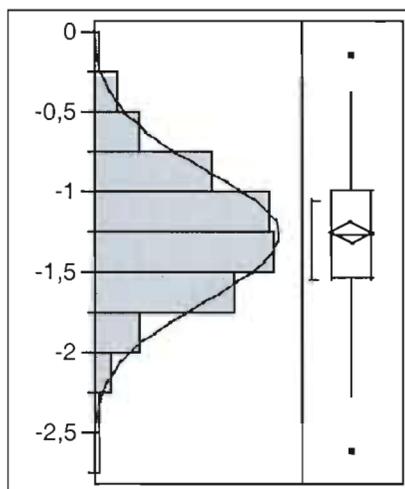
Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
T216	31	-1,1844	0,07282	-1,328	-1,040
T384	104	-1,2887	0,03976	-1,367	-1,210

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Conditions d'applications :

- Normalité de la distribution



Goodness-of-Fit Test

Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,995152	0,9324

- Egalité de la variance

Tests that the Variances are Equal

Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median	
T216	31	0,4504515	0,3471701	0,3476812	
T384	104	0,3913835	0,3058683	0,3054992	
Test		F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
O'Brien[.5]		0,9449	1	133	0,3328
Brown-Forsythe		0,6683	1	133	0,4151
Levene		0,6451	1	133	0,4233

Level	Count	Std Dev	MeanAbsDif to Mean	MeanAbsDif to Median
Bartlett		0,9535	1	0,3288
F Test 2-sided		1,3246	30	103

Welch Anova testing Means Equal, allowing Std Devs Not Equal

F Ratio	DFNum	DFDen	Prob > F
1,3566	1	44,366	0,2503

t Test
1,1647

C.6 CORRELATION ENTRE LES DIFFERENTES VARIABLES

Caractéristiques des corrélations :

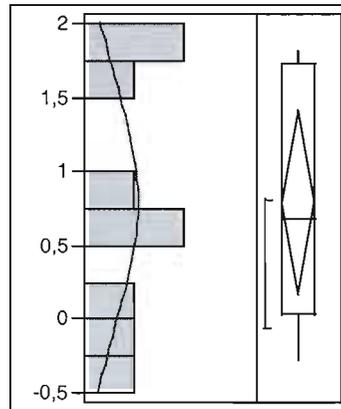
	temps	Fe2+(mM)	Long oxydes
temps	1,0000	-0,9869	0,0305
Fe2+(mM)	-0,9869	1,0000	-0,0562
Long oxydes	0,0305	-0,0562	1,0000
err long	0,1458	-0,2094	0,7712
bact av ox	0,0591	-0,0109	-0,8037
bact tot	-0,1243	0,1364	-0,8043
Long/bact	0,0594	-0,0641	0,8930

Corrélations partielles

Variable	by Variable	Correlation	Count	Signif Prob
Fe2+(mM)	temps	-0,9869	9	0,0000
Long oxydes (µm)	temps	0,0305	9	0,9380
Long oxydes (µm)	Fe2+(mM)	-0,0562	9	0,8859
err long	temps	0,1458	9	0,7082
err long	Fe2+(mM)	-0,2094	9	0,5887
err long	Long oxydes (µm)	0,7712	9	0,0150
bact avec oxydes	temps	0,0591	9	0,8800
bact avec oxydes	Fe2+(mM)	-0,0109	9	0,9777
bact avec oxydes	Long oxydes (µm)	-0,8037	9	0,0091
bact avec oxydes	err long	-0,4721	9	0,1994
bact tot	temps	-0,1243	9	0,7500
bact tot	Fe2+(mM)	0,1364	9	0,7264
bact tot	Long oxydes (µm)	-0,8043	9	0,0090
bact tot	err long	-0,4562	9	0,2171
bact tot	bact avec oxydes	0,9308	9	0,0003
Long/bact	temps	0,0594	9	0,8793
Long/bact	Fe2+(mM)	-0,0641	9	0,8698
Long/bact	Long oxydes (µm)	0,8930	9	0,0012
Long/bact	err long	0,5844	9	0,0984
Long/bact	bact avec oxydes	-0,8398	9	0,0046
Long/bact	bact tot	-0,9355	9	0,0002

Conditions d'applications :

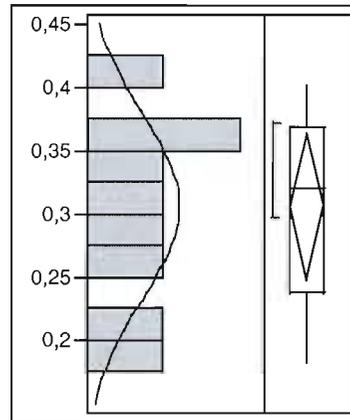
- L'échantillonnage aléatoire
- La linéarité
- La normalité de la distribution
Concentration Fe²⁺



Goodness-of-Fit Test
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,894328	0,2209

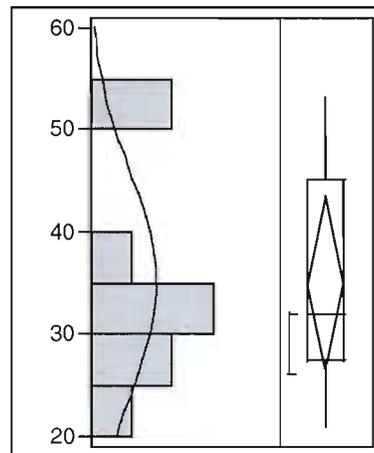
Longueur des oxydes



Goodness-of-Fit Test
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,953701	0,7307

Bactéries présentes



Goodness-of-Fit Test
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0,890914	0,2039

APPENDICE D

PHOTOS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET) DES DIFFERENTS TYPES DE CULTURE AU COURS DU TEMPS

D.1	Photos au MET de la culture sans bactérie après 216 heures de culture	129
D.2	Photos au MET de la culture en présence de la souche JV1 après 216 heures de culture	130
D.3	Photos au MET de la culture en présence de la souche PV1 après 216 heures de culture	131
D.4	Photos au MET de la culture sans bactéries après 384 heures de culture	132
D.5	Photos au MET de la culture en présence de la souche JV1 après 384 heures de culture	133
D.6	Photos au MET de la culture en présence de la souche PV1 après 384 heures de culture	134
D.7	Photos au MET au début de la culture en présence	135

D.1 PHOTOS AU MET DE LA CULTURE SANS BACTERIES APRES 216 HEURES DE CULTURE

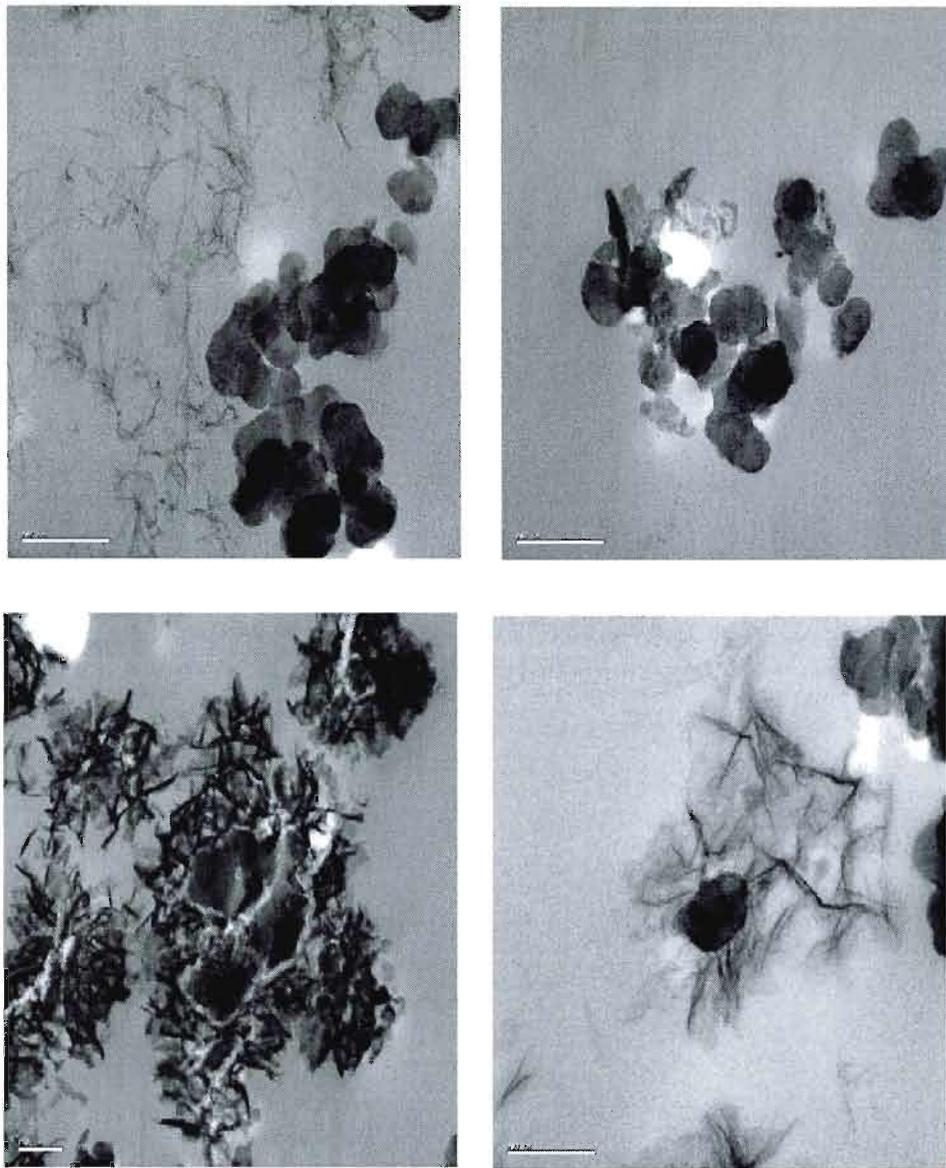


Figure D.1 : Quatre photos au MET de la culture sans bactéries après 216 heures de culture. Les photos ont permis les observations visuelles ainsi que les mesures de la longueur des oxydes.

D.2 PHOTOS AU MET DE LA CULTURE EN PRESENCE DE LA SOUCHE JV1 APRES
216 HEURES DE CULTURE

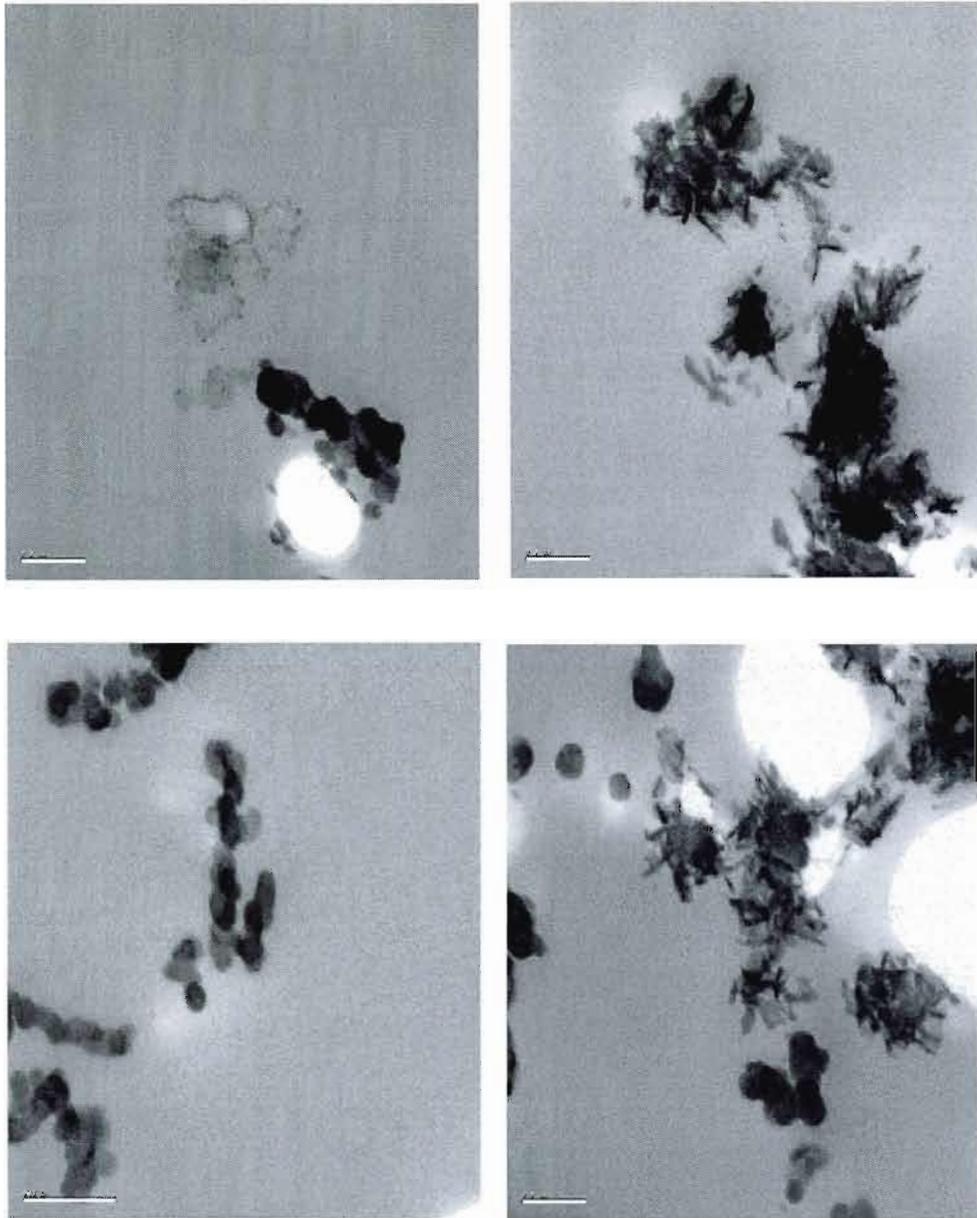


Figure D.2 : Quatre photos au MET de la culture en présence de la souche JV1 après 216 heures de culture. Les photos ont permis les observations visuelles ainsi que les mesures de la longueur des oxydes.

D.3 PHOTOS AU MET DE LA CULTURE EN PRESENCE DE LA SOUCHE PV1 APRES
216 HEURES DE CULTURE

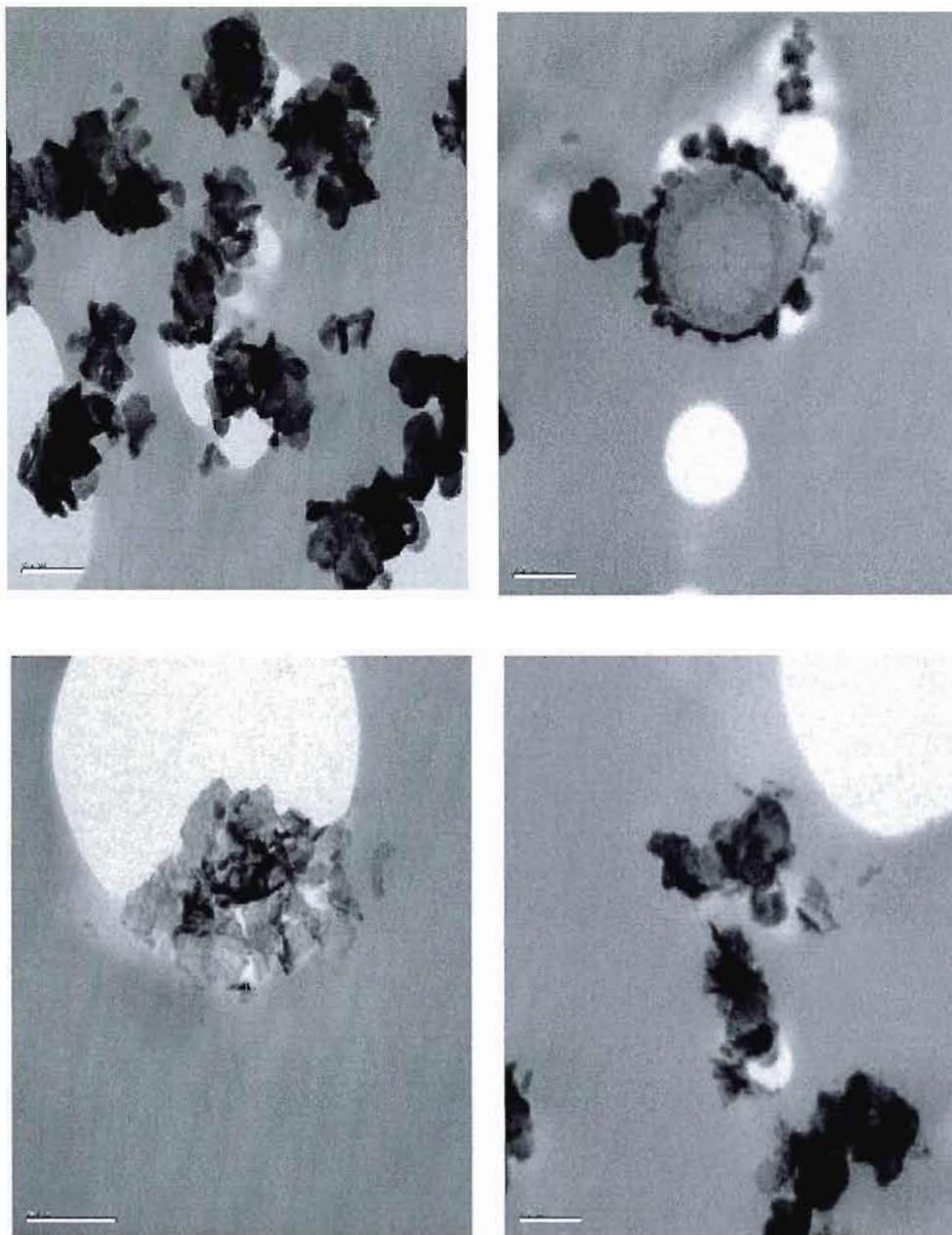


Figure D.3 : Quatre photos au MET de la culture en présence de la souche PV1 après 216 heures de culture. Les photos ont permis les observations visuelles ainsi que les mesures de la longueur des oxydes.

D.4 PHOTOS AU MET DE LA CULTURE SANS BACTERIES APRES 384 HEURES DE CULTURE

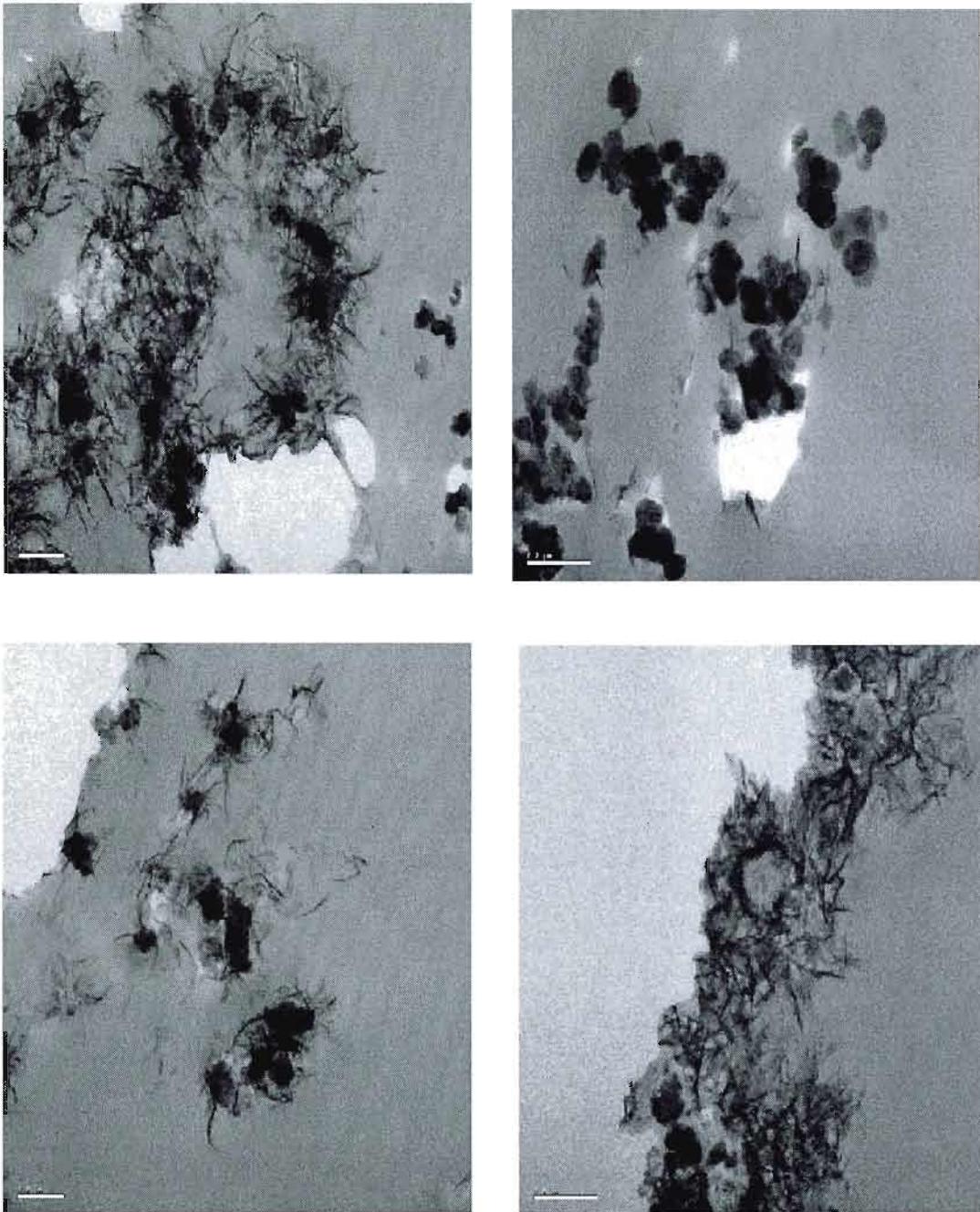


Figure D.4 : Quatre photos au MET de la culture sans bactéries après 384 heures de culture. Les photos ont permis les observations visuelles ainsi que les mesures de la longueur des oxydes.

D.5 PHOTOS AU MET DE LA CULTURE EN PRESENCE DE LA SOUCHE JV1 APRES
384 HEURES DE CULTURE

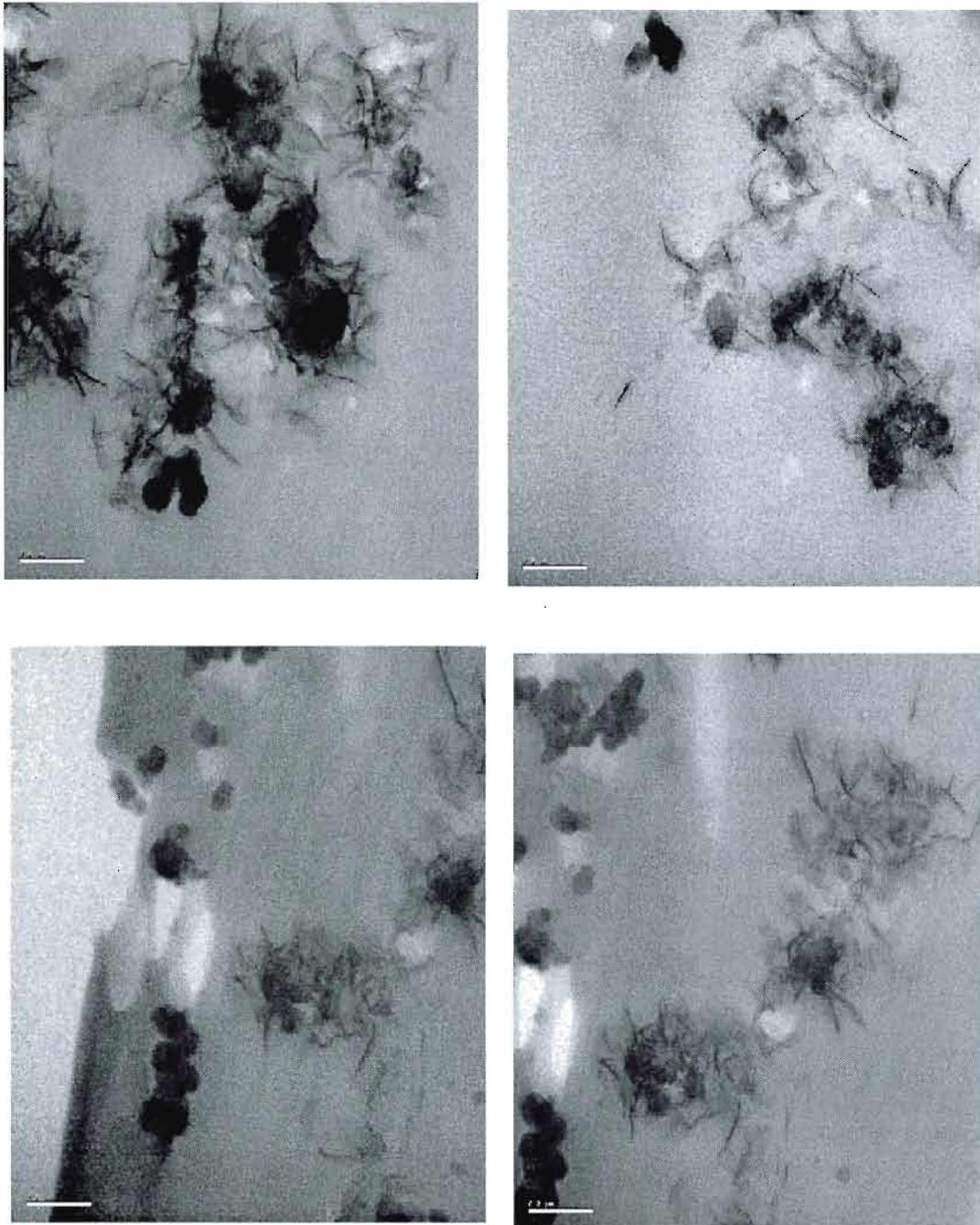


Figure D.5 : Quatre photos au MET de la culture en présence de la souche JV1 après 384 heures de culture. Les photos ont permis les observations visuelles ainsi que les mesures de la longueur des oxydes.

D.6 PHOTOS AU MET DE LA CULTURE EN PRESENCE DE LA SOUCHE PV1 APRES
384 HEURES DE CULTURE

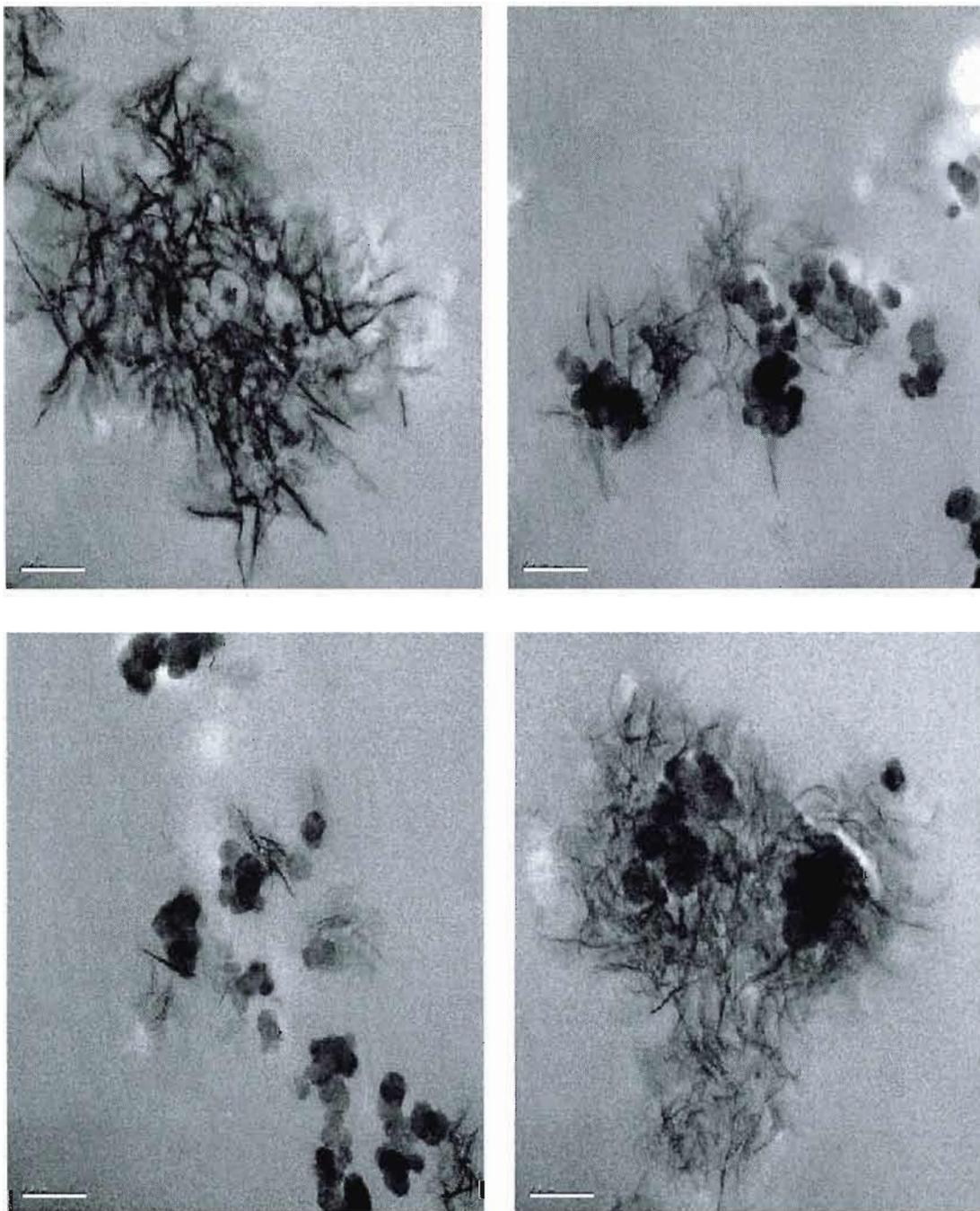


Figure D.6 : Quatre photos au MET de la culture en présence de la souche PV1 après 384 heures de culture. Les photos ont permis les observations visuelles ainsi que les mesures de la longueur des oxydes.

D.7 PHOTOS AU MET AU DEBUT DE LA CULTURE

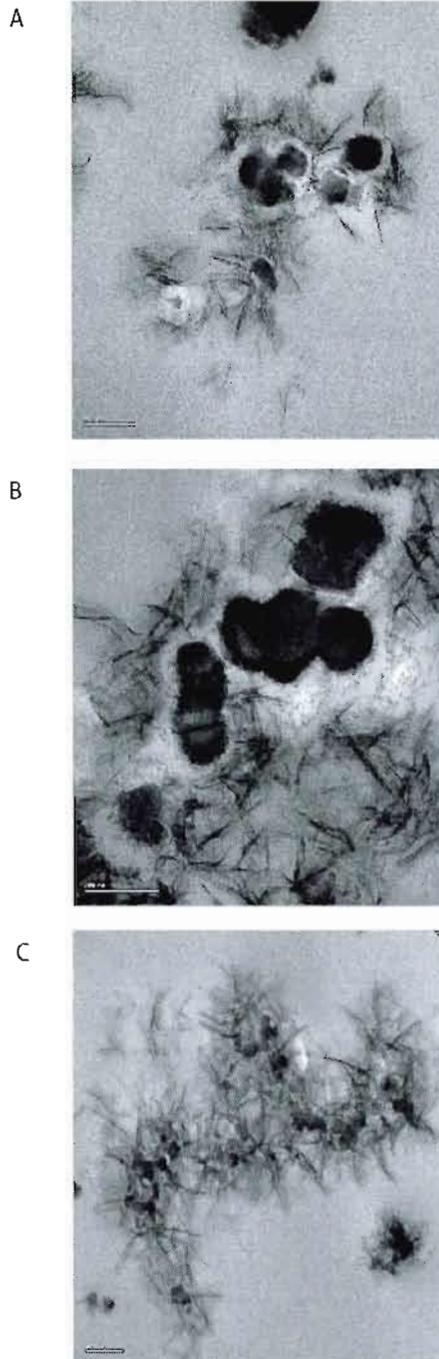


Figure D.7 : Trois photos au MET de la culture en au début de la culture en absence de bactéries (A), en présence de JV1 (B) et en présence de PV1 (C). Les photos ont permis les observations visuelles ainsi que les mesures de la longueur des oxydes.

REFERENCES

- Bilgin, A.A., Silverstein, J. and Jenkins, J.D., 2004. Iron respiration by *Acidiphilium cryptum* at pH 5. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 137-143.
- Boyd, T.D. and Scott, S.D., 2001. Microbial and hydrothermal aspects of ferric oxyhydroxides and ferrosic hydroxydes: the example of Franklin Seamount, Western Woodlark Basin, Papua New Guinea. *Geochemical transactions*, 7.
- Butterfield, D.A. et al., 1997. Seafloor eruptions and evolution of hydrothermal fluid chemistry. 369-386.
- Butterfield, D.A., Seyfried, W.E. and Lilley, M.D., 2001. Composition and Evolution of Hydrothermal Fluids. In: M.G. Dastidar (Editor), *Energy and mass transfer in marine hydrothermal systems*. Die Deutsche Bibliothek, Berlin, pp. 365.
- Cornell, R.M. and Schwertmann, U., 1996. *The Iron Oxides*. WILEY-VCH, Weinheim, 664 pp.
- Croal, L.R., Johnson, C.M., Beard, B.L. and Newman, D.K., 2004. Iron isotope fractionation by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(6): 1227-1242.
- Crundwell, F.K., 2003. How do bacteria interact with minerals? *Hydrometallurgy*, 71: 75-81.
- Davison, W. and Seed, G., 1983. The kinetics of the oxidation of ferrous iron in synthetic and natural waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 47: 67-79.
- Edwards, K.J., Bach, W., McCollom, T.M. and Rogers, D.R., 2004. Neutrophilic iron-oxidizing bacteria in the ocean: Their habitats, diversity, and roles in mineral deposition, rock alteration, and biomass production in the deep-sea. *Geomicrobiology Journal*, 21(6): 393-404.
- Edwards, K.J., Rogers, D.R., Wirsén, C.O. and McCollom, T.M., 2003. Isolation and Characterization of novel psychrophilic, neutrophilic Fe-oxidizing, Chemolithoautotrophic α - and γ - *Proteobacteria* from deep sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5): 2906-2913.
- Emerson, D., 2000. Microbial oxidation of Fe(II) and Mn(II) at circumneutral pH. In: D.R. Lovley (Editor), *Environmental Microbe-Metal Interactions*. ASM Press, Washington, D.C.
- Emerson, D. and Bradburne, C., 2001. Morphological and Metabolic Aspects of Neutrophilic, Lithotrophic Fe-Oxidizing from Deep-Ocean Hydrothermal Vents in the Pacific Ocean. In: CSA (Editor), *General Meeting of the NASA Astrobiology Institute*.
- Emerson, D. and Moyer, C.L., 1997. Isolation and characterization of novel iron oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12): 4784-4792.
- Emerson, D. and Moyer, C.L., 2002. Neutrophilic Fe-oxidizing bacteria are abundant at the Loihi Seamount hydrothermal vent and play a major role in Fe oxide deposition. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6): 3085-3093.

- Emerson, D. and Revsbech, N.P., 1994a. Investigation of an iron-oxidizing microbial mat community located near Aarhus, Denmark: Field Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11): 4022-4031.
- Emerson, D. and Revsbech, N.P., 1994b. Investigation of an iron-oxidizing microbial mat community located near Aarhus, Denmark: Laboratory studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11): 4032-4038.
- Emerson, D., Weiss, J.V. and Magonigal, J.P., 1999. Iron-oxidizing bacteria are associated with Ferric Hydroxide precipitates (Fe-plaque) on the roots of wetland plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6): 2758-2761.
- Fein, J.B., Duughney, C.J., Yee, N. and Davis, T.A., 1997. A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(16): 3319-3328.
- Fortin, D., Ferris, F.G. and Scott, S.D., 1998. Formation of Fe-silicates and Fe-oxides on bacterial surfaces in samples collected near hydrothermal vent on the Southern Explorer Ridge in the northeast Pacific Ocean. *American Mineralogist*, 83: 1399-1408.
- Fortin, D. and Langley, S., 2005. Formation and occurrence of biogenic iron-rich minerals. *Earth-Science Reviews*.
- Frankel, R.B. and Blakemore, R.P., 1989. *Iron biominerals*. Plenum Press, New York and London, 435 pp.
- Halbach, P.E., Fouquet, Y. and Herzig, P., 2001. Mineralization and compositional Patterns in Deep-sea Hydrothermal Systems. In: P.E. Halbach, V. Tunnicliffe and J.R. Hein (Editors), *Energy and mass transfer in marine hydrothermal systems*. Die Deutsche Bibliothek, Berlin, pp. 365.
- Hallberg, K.B. and Johnson, D.B., 2003. Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy*, 71: 139-148.
- Jannasch, H., W. and Mottl, M.J., 1985. Geomicrobiology of Deep-sea Hydrothermal Vents. *Science*, 229: 717-725.
- Johnson, D.B., Okibe, N. and Roberto, F.F., 2003. Novel thermo-acidophilic bacteria isolated from geothermal sites in Yellowstone National Park : physiological and phylogenetic characteristics. *Archives of microbiology*, 180: 60-68.
- Juniper, S.K. and Fouquet, Y., 1988. Filamentous iron-silica deposits from modern and ancient hydrothermal sites. *Canadian Mineralogist*, 26: 859-869.
- Juniper, S.K. and Tebo, B.M., 1995. Microb-metal interactions and Mineral Deposition at hydrothermal Vents. In: K.D. M (Editor), *The microbiology of Deep sea hydrothermal vents*. CRC, pp. 219-253.
- Karl, D.M., McMurty, G.M., Malahoff, A. and Garcia, M.O., 1988. Loihi Seamount, Hawaii : a mid-plate volcano with a distinctive hydrothermal system. *Nature*, 335: 532-535.
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. and Murad, F., 1977. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res*, 3(1): 23-35.

- Kelly, D., P., 1978. Bioenergetics of chemolithotrophic bacteria. Chapter 15: Companion to microbiology: 363-386.
- Kennedy, C.B., Martinez, R.E., Scott, S.D. and Ferris, F.G., 2003a. Surface chemistry and reactivity of bacteriogenic iron oxides from Axial Volcano, Juan de Fuca Ridge, north-east Pacific Ocean. *Geobiology*, 1: 59-69.
- Kennedy, C.B., Scott, S.D. and Ferris, F.G., 2002. Ultrastructure and potential sub-seafloor evidence of bacteriogenic iron oxides from Axial Volcano, Juan de Fuca Ridge, North-east Pacific Ocean. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 247-254.
- Kennedy, C.B., Scott, S.D. and Ferris, F.G., 2003b. Ultrastructure and potential sub-seafloor evidence of bacteriogenic iron oxides from Axial Volcano, Juan de Fuca Ridge, North-east Pacific Ocean. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 247-254.
- Kraemer, S.M., 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic sciences*, 66: 3-18.
- Lecointre, G. and Le Guyader, H., 2000. Classification phylogénétique du vivant, Paris, 543 pp.
- Levesque, C. and Juniper, S.K., 2002. Particulate matter as food source at a nascent hydrothermal vent on the Juan de Fuca Ridge. *Cahiers de Biologie Marine*, 43: 289-292.
- Little, C.T.S., Glynn, S.E.J. and Mills, R.A., 2004. Four-hundred-and-ninety-million-year record of bacteriogenic iron oxide precipitation at sea-floor hydrothermal vents. *Geomicrobiology Journal*, 21(6): 415-429.
- Lopez-Archilla, A.I., Gérard, E., Moreira, D. and Lopez-Garcia, P., 2004. Macrofilamentous microbial communities in the metal-rich and acidic River Tinto, Spain. *FEMS Microbiology Ecology*, 235: 221-228.
- McCollom, T.M. and Shock, E.L., 1997. Geochemical constraints on chemolithoautotrophic metabolism by microorganisms in seafloor hydrothermal systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(20): 4375-4391.
- McHugh, J.P. et al., 2003. A new mechanism for iron homeostasis. *Journal of Biology Chemistry*, 278(32): 29478-29486.
- Neubauer, S.C., Emerson, D. and Megonigal, J.P., 2002. Life at the energetic Edge : Kinetics of circumneutral iron oxidation by lithotrophic iron-oxidizing bacteria isolated from the wetland plant rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3988-3995.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A., 2003. *Microbiologie*, Bruxelles, 1137 pp.
- Roden, E.E., Sobolev, D., Glazer, B. and Luther, G.W., 2004. Potential for microscale bacterial Fe redox cycling at the aerobic-anaerobic interface. *Geomicrobiology Journal*, 21(6): 379-391.
- Romero, J., Yanez, C., Vasquez, M., Moore, E.R.B. and Espejo, R.T., 2003. Characterization and identification of an iron-oxidizing, *Leptospirillum*-like

- bacterium, present in the high sulfate leaching solution of a commercial bioleaching planté. *Research in Microbiology*, 154: 353-359.
- Roth, R.I., Panter, S.S., Zegna, A.I. and Levin, J., 2000. Bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) stimulates the rate of iron oxidation. *J Endotoxin Res*, 6(4): 313-9.
- Sampson, M.I. and Blake II, R.C., 1999. The cell attachment and oxygen consumption of two strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, 12(6): 671-686.
- Shaked, Y., Erel, Y. and Sukenik, A., 2004. The biogeochemical cycle of iron and associated element in Lake Kinneret. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(7): 1439-1451.
- Sobolev, D. and Roden, E.E., 2001. Suboxic deposition of ferric iron by bacteria in opposing gradients of Fe(II) and oxygen at circumneutral pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3): 1328-1334.
- Sogaard, E.G., Aruna, R., Abraham-Peskir, J. and Bender Koch, C., 2000a. Conditions for biological precipitation of iron by *Gallionella ferruginea* in a slightly polluted ground water. *Applied Geochemistry*, 16: 1129-1137.
- Sogaard, E.G., Medenwaldt, R. and Abraham-Peskir, J.V., 2000b. Conditions and rates of biotic and abiotic iron precipitation in selected danish freshwater plants and microscopic analysis of precipitate morphology. *Water Research*, 34(10): 2675-2682.
- Stone, A.T., 1997. Reactions of extracellular organic ligands with dissolved metal ions and mineral surfaces. In: B.a.K.H. Nealson (Editor), *Geomicrobiology: Intercation between microbe and minerals*. Mineralogical Society of America, Washington, D.C., pp. 309-344.
- Theis, T.L. and Singer, P.C., 1974. Complexation of iron(II) by organic matter and its effect on iron(II) oxygenation. *Environmental science & technology*, 8: 569-573.
- Touati, D., 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of biochemistry and biophysics*, 373(1): 1-6.
- Tributsch, H., 2003. Coupling bio-geochemical processes to regenerative energy for an industrial carbon cycle. *Hydrometallurgy*, 71: 293-300.
- Tunnicliffe, V., 1992. Hydrothermal-vent communities of the deep-sea. *American Scientist*, 80: 336-350.
- Van Dover, C.L., 2000. *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. Princeton University Press, Princeton.
- 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.
- Weiss, J.V., Emerson, D., Backer, S.M. and Megonigal, J.P., 2003. Enumeration of Fe(II)-oxidizing and Fe(III)-reducing bacteria in the root zone of wetland plants : Implications for a rhizosphere iron cycle. *Biogeochemistry*, 64: 77-96.

- Zierenberg, R.A., Adams, M.W.W. and Arp, A.J., 2000. Life in extreme environments: Hydrothermal vents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24): 12961-12962.
- Zweifel, U.L. and Hagstrom, A., 1995. Total Count of marine bacteria Include a large fraction of non-nucleid containing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 61(6): 2180-2185.