



**HAL**  
open science

**Cycles biogéochimiques du Fer et du Soufre dans les  
systèmes hydrothermaux en contexte sédimentaire du  
Bassin de Guaymas : traçages isotopiques et interactions  
micro-organismes/minéraux**

Nolwenn Callac

► **To cite this version:**

Nolwenn Callac. Cycles biogéochimiques du Fer et du Soufre dans les systèmes hydrothermaux en contexte sédimentaire du Bassin de Guaymas : traçages isotopiques et interactions micro-organismes/minéraux. Sciences de la Terre. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0076 . tel-01630578

**HAL Id: tel-01630578**

**<https://theses.hal.science/tel-01630578v1>**

Submitted on 7 Nov 2017

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

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

# UBO

université de bretagne  
occidentale



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*Mention : Microbiologie*

**École Doctorale des Sciences de la Mer**

présentée par

**Nolwenn Callac**

Préparée à l'Unité Mixte de Recherche (UMR 6197)

Laboratoire de Microbiologie des Environnements  
Extrêmes (LMEE)

Cycles biogéochimiques du Fer et du  
Soufre dans les systèmes  
hydrothermaux en contexte  
sédimentaire du Bassin de Guaymas :  
traçages isotopiques et interactions  
micro-organismes/minéraux

**Thèse soutenue le 9 juillet 2013**

devant le jury composé de :

**Bénédicte Ménez (Rapporteur)**

Professeur, Université Paris Diderot, IPGP

**Nathalie Pradel (Rapporteur)**

Chargée de recherche, IRD Marseille

**Christian Mustin (Examineur)**

Directeur de recherche, CNRS Nancy

**Mohamed Jebbar (Examineur)**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale,  
Brest

**Anne Godfroy (Directeur de thèse)**

Cadre de recherche, Ifremer Brest

**Olivier Rouxel (Co-directeur de thèse)**

Cadre de recherche, Ifremer Brest





## Remerciements

*Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE) sous l'encadrement d'Anne Godfroy et le co-encadrement d'Olivier Rouxel (Laboratoire Géochimie et Métallogénie). Ce travail a bénéficié du soutien financier du GIS Europôle Mer. L'UEB, l'UBO et l'Ifremer ont également participé à ce projet.*

*Je remercie tout d'abord les membres du jury qui ont accepté de lire et d'évaluer ce travail de thèse ; les rapporteurs Nathalie Pradel et Bénédicte Ménez ainsi que les examinateurs Christian Mustin et Mohamed jebbar.*

*Je remercie également les membres de mon comité de thèse : Bernard Ollivier, Christian Mustin, Laurent Toffin et Yves Fouquet pour leur aide et conseils.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes deux directeurs de thèse Anne Godfroy et Olivier Rouxel qui m'ont encadrée et guidée pendant ces années. Un grand merci de m'avoir fait confiance pour mener ce travail. Je tiens à vous remercier pour votre soutien, votre écoute, vos conseils et de m'avoir toujours encouragée. Merci d'avoir partagé avec moi vos connaissances, entre autre, de l'écosystème hydrothermal. Encore merci de m'avoir permis de participer à ma première campagne océanographique, à de nombreux congrès et d'aller réaliser des expériences au MIT à Boston.*

*Enfin, merci d'avoir relu et corrigé ce manuscrit.*

*Anne, merci de m'avoir tout appris du fonctionnement des bioréacteurs et pour m'avoir fait confiance pour lancer toutes ces manips. Vraiment merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, ton soutien de tout les jours et bien plus !!*

*Olivier, merci de m'avoir fait découvrir le monde de la géochimie et de l'isotopie et de m'avoir tout appris du travail en salle blanche à l'analyse des données. Merci pour ton soutien, ta disponibilité et ta patience et de m'avoir permis d'aller au MIT.*

*Je remercie Céline Rommevaux-Jestin de m'avoir impliquée dans ses travaux de colonisation in situ et d'avoir partagé avec moi ses connaissances en bio-altération des verres basaltiques. Merci pour ce premier leg de BIG : merci pour ton soutien, ton aide lors des échantillonnages et les bons moments passés à bord ou ici au labo.*

*Je tiens à remercier Shuhei Ono de m'avoir accueilli pendant un mois dans son laboratoire dans le département EAPS du MIT pour réaliser les analyses des isotopes multiples du soufre, pour sa gentillesse et sa bienveillance quant au déroulement de mes manip et de mon séjour.*

*Mes remerciements vont aussi à Harry Oduro et à William Olszewski pour leur gentillesse leur aide pour les analyses.*

*Je tiens à remercier Daniel Prieur pour m'avoir fait découvrir la microbiologie, en particulier les extremophiles et pour m'avoir accueillie au sein du LMEE depuis mon stage de Master 1. Merci à Karine Alain de m'avoir tout appris des cultures en conditions anaérobie et de la biologie moléculaire pendant mes stages de Master 1 et 2, merci pour tous ces précieux conseils. Je remercie aussi Mohamed Jebbar pour ses conseils et son soutien.*

*Je remercie tous les membres du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes pour leur accueil et gentillesse.*

*Je tiens à remercier en particulier Christine Lamy pour sa bonne humeur et son efficacité merci d'avoir résolu bon nombre de mes « petits » problèmes (carte d'accès, logement à l'étranger, impression du manuscrit entre autre !).*

*Merci à Patricia et à Josiane pour leur gentillesse et leur soutien.*

*Merci aussi à Stéphane pour ses conseils pour les cultures, Laurent pour nos discussions et notre périple aux USA avec Karine et Maria.*

*Je n'oublie pas non plus Jean-Louis Birrien, Marc Le Romancer, Frédéric Duthoit pour m'avoir toujours soutenu depuis le Master 1.*

*Je tiens aussi à remercier Cyrielle pour toutes nos discussions, tous les bons moments passés ensemble; Marine pour sa bonne humeur, sa gentillesse et les loisirs créatifs ! et Aline pour nos « papotages » et son soutien. Un grand merci à Cyrielle, Marine, Aline et Françoise pour nos réunions au sommet !!*

*Merci aussi à Valérie et Marie-Anne ainsi qu'aux répliquants : Gaëlle, Audrey, Gishlaine, Didier, Christophe, alias monsieur Bonjour et Sébastien pour toutes nos discussions scientifiques ou non et pour ses coups de main « Inskape »!!!*

*Je tiens à remercier tout particulièrement Françoise Lesongeur : un immense merci pour tout. Merci pour ton soutien quotidien, ta gentillesse, ta bienveillance, ton écoute et ton aide dans les manipulations. Merci d'avoir relu le manuscrit et corrigé l'orthographe. Merci aussi d'avoir supporté mes « petites manies » de faire des stocks de tout et partout (thés, gâteaux,... au bureau et de tubes, bouchons stériles ... au labo) pour les « aux cas où ». Merci pour tous les bons moments au labo, au bureau et à bord.*

*Merci aux doctorants du labo, pour leur soutien et bonne humeur : je vous souhaite bon courage pour la suite. Un merci particulier à Sandrine et à Gaëlle: bonne continuation.*

*Un merci aussi à tous ceux de l'IUEM pour leur accueil et nos discussions en tout genre lors de mes visites. Un merci particulier à Pôpô et Maria pour leur amitié et soutien depuis le Master 1. Je tiens aussi à remercier Pauline, Grégoire et Mickael pour leur aide lors des « manips sous pressions ».*

*J'en profite aussi pour remercier ma stagiaire, Sonia Laigle, master 1 de chimie que j'ai encadré lors des fermentations ciblant la ferri-réduction.*

*Je remercie aussi tous les membres du Pôle Spectrométrie Océan et de Géosciences Marine pour leur sympathie, conseil et soutien.*

*Aussi je tiens à remercier Manu et Yohan pour leur soutien et leur bonne humeur lors des mes passages en salle blanche et au Neptune. Merci à Céline Liourzou et Claire Bassoulet pour les analyses multi-élémentaires.*

*Merci à Sandrine Chéron et Joel Etoubleau d'avoir pris le temps de m'expliquer et de me montrer les analyses des spectres XRF et XRD. Merci aussi à Yves Fouquet pour ses discussions scientifiques.*

*Merci à tous ceux que j'ai côtoyé lors de mes passages en salle blanche : Nima, Bleuenn, les Yohan(s) et Stefan.*

*Nima, merci à pour ta bonne humeur, ta gentillesse, pour nos débuts en salle blanche et pour l'EGU à Vienne ! Bonne continuation !!*

*Merci à Bleuenn pour ta joie de vivre, ta gentillesse et nos discussions. Bon courage pour la suite. Merci à Stefan pour nos discussions sur la Terre ancienne, l'apparition de l'oxygène sur Terre et l'évolution des métabolismes et autres.*

*Je tiens aussi à remercier les membres du Laboratoire Environnement Profond pour leur gentillesse et soutien : Karine Olu, Jozée Sarrazin, Pierre-Marie Sarradin, les Phillippe(s) Rodier et Noel, Jean-Claude Caprais, Olivier Mouchel, Cécile, Julie et Ronan.*

*Merci à Pierre-Marie pour ses conseils et les discussions « chimie des fluides et Pepito ».*

*Merci à tous les participants de la campagne BIG (scientifiques, équipage de L'Atalante, équipes AUV et Nautille), merci pour tous ces échantillons et d'avoir contribué à la réalisation de cette thèse.*

*Karine Estève, je tiens à te remercier pour nos discussions, ta bonne humeur et ton soutien les week-ends « fermentations ». Je te souhaite une bonne continuation.*

*Carole, ma biologiste préférée : un grand merci pour tout ! Qu'est-ce que j'aurai fait sans toi et ton soutien !! Tu es formidable. Merci pour ta gentillesse et ton aide. Merci pour les pauses thés, les repas et nos discussions et tous les bons moments ! Merci aussi pour ton aide précieuse pour la mise en page de ce manuscrit. Je garde un très bon souvenir de tous nos bons moments ici, au labo et à bord (surtout lors des manips de nuits : toi et les sulfures, moi et les modules !).*

*Amandine et Anne-Sophie, merci pour votre bonne humeur, votre gentillesse votre soutien, nos discussions et nos rires !*

*Un merci particulier à Marianne, ma binôme et co-présentatrice du journal télévisé de 20h !!! Merci pour tout : nos petits repas, nos (fou)rires, parfois nos pleurs et surtout pour ton écoute et ton soutien de toujours et sans faille : on est des warriors !! Merci tous les bons moments passés ensemble et aux prochains.*

*Mathilde, on se connaît depuis la fac et depuis BIG encore plus : tu es quelqu'un de vraiment formidable ! Merci pour ton soutien depuis ces années et pour tous les bons moments passés ensemble. Merci pour ton aide à bord : de l'étiquetage des fioles aux découpages des carottes dans la « fameuse » tente !!! Je n'oublierai pas tous ces bons moments à bord et à Terre. Je croise les doigts pour toi !*

*Anaïs, je me souviendrai toujours du congrès Extremophiles à Séville : la visite de la bodega et son petit train, les boutiques à l'autre bout de la ville et les robes pour la soirée : quelles expériences!!!! Courage pour la suite et à bientôt à Lyon !*

*Merci à toi Adé, pour tes PPP (pensées positives permanentes)! PPP à toi aussi surtout pour le 8 juillet.*

*Merci à Marie-Agnès pour ton amitié, ton écoute et soutien sans faille. Merci pour toutes les activités sportives (surtout nos discussions pendant les longueurs de piscines) ou non, nos grandes discussions et nos petites et grandes protestations « vidage de tête » toujours justifiées !!!*

*Merci aussi à tous ceux que je n'ai pas cité pour leur soutien.*

*Merci à ma famille d'avoir toujours cru en moi et pour leur soutien.*

*Un immense merci à mes parents. Merci d'avoir toujours eu confiance et cru en moi, merci pour votre soutien de tous les jours, pour vos encouragements et votre présence. Merci d'avoir toujours été là pour moi, dans les moments difficiles comme dans les bons moments. Merci aussi d'avoir eu la patience de relire ce manuscrit et de corriger l'orthographe, je vous promets de faire attention aux « s » et « e » en trop ou que j'oublie de mettre quand il faut !!*

*Enfin, je remercie à toutes les personnes passionnées et passionnantes que j'ai pu rencontrer au cours de cette thèse.*

*Un grand merci à tous*



# Sommaire

---

<b>Remerciements</b> .....	3
<b>Sommaire</b> .....	7
<b>Liste des figures</b> .....	11
<b>Liste des tableaux</b> .....	17
<b>Liste des abréviations</b> .....	19
<b>I. Systèmes hydrothermaux océaniques profonds : cycles biogéochimiques du soufre et du fer et interactions géo-microbiologiques : Contexte de l'étude</b> .....	21
1. Contexte de l'étude : les systèmes hydrothermaux océaniques profonds.....	24
2. Cycles biogéochimiques du Soufre et du Fer et interactions géo-microbiologiques en condition hydrothermale.....	32
3. Relations microorganismes-biotope hydrothermal, à haute température.....	52
4. Le Bassin de Guaymas : un site d'étude particulier ?.....	54
5. Objectifs du projet.....	60
<b>II. De l'échantillonnage dans le Bassin de Guaymas aux analyses au laboratoire : Matériel et Méthodes</b> .....	65
1. Fond océanique du Bassin de Guaymas : localisation et description des sites d'études.....	69
2. Méthodes d'échantillonnages et conditionnement à bord.....	77
3. Analyses microbiologiques, géochimiques, isotopiques et minéralogiques au laboratoire.....	91
<b>III. Sites hydrothermaux de la Dépression Sud du Bassin de Guaymas : Description minéralogique des édifices et géochimie des fluides</b> .....	139
1. Description du site hydrothermal Rebecca's Roost et échantillonnage.....	141
2. Composition minéralogique des échantillons d'édifices hydrothermaux.....	146
3. Géochimie des fluides.....	147
4. Etude préliminaire des sédiments hydrothermaux :.....	164
<b>IV. Colonisation et altération des verres basaltiques <i>in situ</i></b> .....	171
1. Introduction des études.....	173
2. Méthodes utilisées.....	173
3. Etude A : Article 1- Microbial colonization of basaltic glasses deployed on hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin.....	175
4. Etude B : Article 2 - Microbial colonization of basaltic glasses in hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin.....	218
5. Résultats complémentaires.....	260
6. Synthèses des études.....	265



---

<b>V. Aperçu des interactions micro-organismes / minéraux lors d'une culture d'enrichissement en continu utilisant du fluide hydrothermal dilué comme milieu de culture et un fragment de cheminée hydrothermale comme inoculum</b> .....	271
1. Introduction de l'étude .....	273
2. Méthodes utilisées .....	274
3. Article 3 - Insights into microbial-mineral interactions with continuous enrichment culture of hydrothermal chimneys using hydrothermal fluid as medium.....	275
4. Synthèse de l'étude .....	311
<b>VI. Etude du fractionnement isotopique du fer par des microorganismes thermophiles : Cultures de communautés microbiennes (culture d'enrichissement en continu) et de souches pures ferri-réductrices</b> .....	313
1. Introduction de l'étude .....	315
2. Méthodes utilisées .....	316
3. Article 4 - Investigation of iron isotope fractionation by thermophilic microorganisms using continuous enrichment culture in bioreactor and pure strains .....	317
4. Synthèse de l'étude .....	355
<b>VII. Résultats des cultures en fioles</b> .....	359
1. Etude A : Cultures en fioles .....	361
2. Etude B : Article 5 - Caractérisation d'une nouvelle souche d' <i>Archaea</i> anaérobie et hyperthermophile isolée d'un édifice hydrothermal du Bassin de Guaymas: <i>Pyrococcus kulkkanii</i> sp. nov. ....	367
<b>VIII. Etude du fractionnement isotopique du soufre par des microorganismes thermophiles : Cas des sulfo-réducteurs et sulfato-réducteurs</b> .....	385
1. Introduction de l'étude .....	387
2. Méthodes utilisées .....	388
3. Article 6 - Reverse mass-dependant sulfur isotopes fractionation during sulfur-reduction and sulfate-reduction by hyperthermophilic <i>Archaea</i> isolated from deep-sea hydrothermal system	389
4. Synthèse de l'étude .....	411
<b>IX. Synthèse et perspectives</b> .....	413
1. Synthèse .....	415
2. Perspectives.....	425
3. Conclusion .....	426
<b>X. Bibliographie</b> .....	427
<b>XI. Annexes</b> .....	451
Annexe 1 : <i>Bacteria</i> isolées des sources hydrothermales océaniques profondes .....	453
Annexe 2 : <i>Archaea</i> isolées des sources hydrothermales océaniques profondes .....	475

Annexe 3 : Résumé de la présentation orale exposant la méthode d'analyse directe des isotopes du soufre de l'hydrogène sulfuré par la technique du « sparging », présenté à l'EGU en 2010 .....	487
<b>XII. Appendices .....</b>	<b>489</b>
Appendice 1: Communications orales.....	491
Appendice 2: Poster 1 - Stable isotopic tracing of Sulfur and Iron biogeochemical cycles in seafloor hydrothermal systems.....	492
Appendice 3: Poster 2 - Continuous enrichment culture in bioreactor: Access to iron-reduction by thermophilic microorganisms inhabiting deep-sea hydrothermal system of Guaymas Basin .....	494
Appendice 4: Poster 3 - Continuous enrichment culture using diluted hydrothermal fluid as medium: insights into sulfur and iron biogeochemical cycles, microbial actors, and mineral interactions in active deep-sea vent chimney of Guaymas Basin .....	496
Appendice 5: Article 7 – DNA extractions from deep subseafloor sediments: Novel cryogenic-mill-based procedure and comparison to existing protocols.....	498
Appendice 6: Article 8 – <i>Nautilia abyssi</i> sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfur-reducing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent .....	508
<b>Résumé.....</b>	<b>516</b>
<b>Summary .....</b>	<b>516</b>



## Liste des figures

---

- Figure I-1:** Localisation des dorsales océaniques, zone de subduction et bassins arrière-arcs, des sources hydrothermales actives et suspectées, des arcs volcaniques actifs et suspectés ainsi que les volcans intra-plaque actifs.....25
- Figure I-2:** Représentation schématique d'une source hydrothermale océanique.....27
- Figure I-3 :** Schéma illustrant le mélange entre le fluide hydrothermal réduit, riche en gaz dissous ( $H_2S$ ,  $H_2$ ,  $CH_4$ ) et en métaux (Fe, Mn) et l'eau de mer oxygénée qui contient des sulfates et des nitrates. ....29
- Figure I-4 :** Schéma illustrant le fractionnement isotopique entre deux compartiments 1 et 2 (molécules, minérale, organismes etc...), ou la variation d'abondance entre les isotopes A et B, de l'élément X au cours d'une réaction.....33
- Figure I-5:** Schéma représentant les deux stades de formation des cheminées hydrothermales.....35
- Figure I-6 :** Principales réactions du cycle biogéochimique du soufre modifié d'après Madigan et Martinko, 2002 (Madigan and Martinko 2007).....37
- Figure I-7 :** Principales réactions biogéochimiques impliquant l' $H_2S$  dissous en aérobiose et en anaérobiose, couplées au cycle du fer.....39
- Figure I-8 :** Cycle biogéochimique du Fer modifié d'après Kapler et Staub, 2005 et Taylor et Konhauser, 2011 (Kappler and Straub 2005; Taylor and Konhauser 2011); DIR signifie Dissimilatory Iron reduction ou réduction dissimilative du Fe(III). ....46
- Figure I-9 :** Cycle du Fer et souches (hyper)thermophiles isolées d'environnements hydrothermaux, impliqués dans ce cycle.....48
- Figure I-10 :** Carte du nord-ouest mexicain, montrant la localisation du Golfe de Californie entre les états de Sonora, de Sinaloa et de la péninsule de Basse Californie. La dorsale oblique traversant du nord au sud le golfe de Californie est aussi illustrée (modifié d'après (Mayer and Vincent 1999)). ....55
- Figure I-11 :** Carte de l'ouest du continent mexicain, de la péninsule de basse Californie et du Golfe de Californie, localisant le Bassin de Guaymas et illustrant les principaux fleuves qui alimentent le Golfe de Californie en apports terrigènes (modifié d'après Dean, 2004 (Dean et al. 2004)). ....56
- Figure I-12 :** Carte du Golfe de Californie, localisant le Bassin de Guaymas, les autres bassins ainsi que la dorsale oblique traversant le golfe de Californie du nord au sud (modifié d'après Lonsdale, 1980 (Lonsdale and Lawver 1980; Lonsdale et al. 1980)).....57

<b>Figure I-13</b> : Localisation des zones hydrothermales (Southern Trough et Northern Trough) et de la zone d'émission de fluide froid (Marge de Sonora) dans le Bassin de Guaymas (modifié d'après Otero, 2003 (Otero et al. 2003)).	58
<b>Figure I-14</b> : Schéma expérimental mis en place reposant d'une part pour un même échantillon d'étudier sa diversité microbienne par approches moléculaires et culturales et de le caractériser minéralogiquement, chimiquement (et isotopique lorsque c'est possible); et d'autre part, d'étudier le fractionnement isotopique à haute température, de cultures pures, de communautés microbiennes et de témoins abiotiques afin de corrélérer les signatures isotopiques in situ avec celui obtenu in vitro par des souches pures, des communautés ou des témoins abiotiques.	61
<b>Figure I-15</b> : Schéma expérimental mis en place lors de l'étude des modules de colonisation.	63
<b>Figure II-1</b> : Cartes satellites du Bassin de Guaymas avec la localisation de la zone hydrothermale au niveau de la Dépression Sud, de la zone d'émission de fluide froid au niveau de la marge de Sonora et de la zone de référence située hors axe des zones actives d'hydrothermalisme ou d'émission de fluide.	68
<b>Figure II-2</b> : Carte bathymétrique représentant la ride Sud du Bassin de Guaymas avec les cinq sites hydrothermaux : édifices hydrothermaux : Rebecca's Roost et BIG 2, et sédiments percolés de fluides hydrothermaux : Megamat, M27 et Mat Mound (BIG 1) échantillonnés lors de la campagne BIG.	70
<b>Figure II-3</b> : Carte bathymétrique représentant les sites de la Dépression Sud du Bassin de Guaymas, sont représentés les sites explorés et échantillonnés lors de la campagne BIG.	71
<b>Figure II-4</b> : Carte bathymétrique détaillant les sites hydrothermaux localisés au nord de la ride de la Dépression Sud.	71
<b>Figure II-5</b> : Carte bathymétrique détaillant les sites hydrothermaux et sédimentaires percolés par des fluides hydrothermaux localisés au niveau du rift de la Dépression Sud.	72
<b>Figure II-6</b> : (a) Photographie d'une flange (b) photographie de dessous de la flange; (c) schéma illustrant une flange avec le fluide hydrothermal piégé sous elle.	73
<b>Figure II-7</b> : Photographies du site Rebecca's Roost prises avec le submersible Nautille durant la campagne BIG.	74
<b>Figure II-8</b> : Photographies du site BIG 2.	74
<b>Figure II-9</b> : Photographies du site Mat Mound.	75
<b>Figure II-10</b> : (a et b) Photographies du site Marker 27 prises avec le submersible Nautille durant la campagne BIG.	76
<b>Figure II-11</b> : (a et b) Photographies du site MegaMat prises avec le submersible Nautille durant la campagne BIG (plongée 1764); (b) montre des bulles d'hydrocarbures s'échappant du sédiment pendant le déploiement de la chambre benthique CALMAR.	76
<b>Figure II-12</b> : Photographie du site de référence prise avec le submersible Nautille durant la campagne BIG (plongée 1771).	77

<b>Figure II-13</b> : Découpage et conditionnement des carottes « géomicrobiologie ».....	80
<b>Figure II-14</b> : Photographie de la boîte à gants anaérobie utilisée lors du découpage et du traitement des carottes «géomicrobiologie». ....	82
<b>Figure II-15</b> : Les outils de prélèvement de fluide. ....	83
<b>Figure II-16</b> : Photographie de module AISICS1 et du module de géomicrobiologie, déployés à proximité l'un de l'autre, sur le site Mat Mound.....	85
<b>Figure II-17</b> : Photographie de module AISISC 1 prise à bord pendant sa mise en œuvre.....	86
<b>Figure II-18</b> : Photographie des petits incubateurs biotiques et abiotiques contenus dans le colonisateur AISICS.....	86
<b>Figure II-19</b> : Photographie du module de colonisation géomicrobiologie après son déploiement. ....	88
<b>Figure II-20</b> : Schéma représentant le bioréacteur gas-lift et ses équipements.....	109
<b>Figure II-21</b> : Photographie du baby bioréacteur gas-lift à bord de L'Atalante pendant la campagne.....	113
<b>Figure II-22</b> : Photographies des deux bioréacteurs utilisés pour les deux cultures en condition de ferri-réduction réalisées au laboratoire. ....	115
<b>Figure II-23</b> : Représentation schématique du protocole de dosage du fer ferreux, du fer total dissous et du fer total par la méthode de la Ferrozine.....	120
<b>Figure II-24</b> : Représentation schématique du montage expérimental utilisé pour l'analyse directe des isotopes du soufre par Sparging développée au laboratoire.....	124
<b>Figure II-25</b> : Représentation graphique des rapports isotopiques en soufre $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ du standard $S_{\text{spex}}$ , du Cds et du PbS en fonction des rapports isotopiques en magnésium $^{26}\text{Mg}/^{25}\text{Mg}$ mesuré en même temps que l'échantillon et montrant que les rapports du S et du Mg évoluent selon la même tendance pour une composition isotopique du S donné.....	126
<b>Figure II-26</b> : Représentation schématique du montage lors de l'analyse d'un échantillon....	127
<b>Figure II-27</b> : Cas d'injections multiples d'une solution de $\text{Na}_2\text{S}$ (à 50 ppm) fixées sous forme de ZnS: (a) chaque injection génère un signal transitoire dont l'intensité est mesurée en volt (courbes bleues claire); (a et b) calcul du rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ en prenant l'intégrale de toutes les valeurs du rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ mesurées lors de la montée du signal transitoire (points en bleus foncés sur les graphiques) ; (b) valeurs isotopiques (points bleus) des rapports $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ obtenues pour ces injections multiples. ....	127
<b>Figure II-28</b> : Représentation graphique du signal transitoire en isotope 32 du S généré lors de l'acidification de 10 $\mu\text{g}$ de S d'un échantillon de CdS. Au fil des cycles d'analyses, le signal en $^{32}\text{S}$ diminue jusqu'à atteindre la ligne de base (0 volt). ....	128

<b>Figure II-29 :</b> Photographie du système utilisé pour les analyses des isotopes multiples du soufre. ....	132
<b>Figure II-30 :</b> Représentation schématique de la méthode utilisée pour convertir les précipités de ZnS en Ag <sub>2</sub> S. ....	133
<b>Figure III-1 :</b> Carte bathymétriques localisant les sites hydrothermaux dont Rebecca's Roost, situés au nord de la Dépression Sud. ....	141
<b>Figure III-2 :</b> Cheminées hydrothermales du site Rebecca's Roost.....	142
<b>Figure III-3 :</b> Flange hydrothermal échantillonnée lors de la plongée 1747.....	143
<b>Figure III-4 :</b> Localisation des échantillons prélevés par les bouteilles Titanes (1 sur le schéma) et par le système de collecte de fluide PEPITO (2 sur le schéma), au niveau du flange hydrothermal, lors de la plongée 1747. ....	143
<b>Figure III-5 :</b> Cheminée hydrothermale échantillonnée lors de la plongée 1772.....	144
<b>Figure III-6 :</b> Localisation des échantillons prélevés par le système de collecte de fluide PEPITO, dans le gradient de mélange fluide hydrothermal-eau de mer.....	145
<b>Figure III-7 :</b> Schéma représentant le fonctionnement d'un système hydrothermal et son impact sur la colonne d'eau sus-jacente.....	151
<b>Figure III-8 :</b> Schémas illustrant les trois comportement possibles des élément lors d'un mélange fluide hydrothermal-eau de mer.....	153
<b>Figure III-9 :</b> Diagramme illustrant, les concentrations en baryum dissous dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.....	157
<b>Figure III-10 :</b> Diagramme illustrant, les concentrations en soufre dissous et particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer. ....	157
<b>Figure III-11 :</b> Diagramme illustrant, les concentrations en H <sub>2</sub> S, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer. ....	158
<b>Figure III-12 :</b> Diagrammes illustrant, les concentrations en fer dissous et particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.....	158
<b>Figure III-13 :</b> Diagramme illustrant, les concentrations en cuivre dissous et particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.....	159
<b>Figure III-14 :</b> Diagrammes illustrant, les concentrations en cadmium particulaire, plomb particulaire et zinc particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer. ....	159

<b>Figure III-15</b> : Diagrammes illustrant, les concentrations en molybdène dissous et particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer. ....	160
<b>Figure III-16</b> : Diagrammes illustrant, les concentrations en uranium dissous et particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer. ....	161
<b>Figure III-17</b> : Valeur du $\delta^{56}\text{Fe}$ du fer dissous (en bleu) et du fer total (en rouge) par rapport aux pourcentages de mélange fluide hydrothermal-eau de mer.....	162
<b>Figure III-18</b> : Diagrammes illustrant, par site, les concentrations en magnésium dissous en fonction de la profondeur. ....	165
<b>Figure III-19</b> : Diagramme indiquant la courbe de mélange eau de mer-fluide hydrothermal et illustrant, la localisation des sites dans cette gamme de mélange, selon les concentrations en sulfate en fonction des concentrations en Mg. ....	166
<b>Figure III-20</b> : Diagrammes illustrant, par site, les concentrations en soufre total dissous et en $\text{H}_2\text{S}$ en fonction de la profondeur.....	167
<b>Figure IV-1</b> : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S issues des 2 modules de colonisation AISICS (en gras et en bleu) au sein des Crenarchaeota et des Korarchaeota (hors Euryarchaeota).....	260
<b>Figure IV-2</b> : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S issues des 2 modules de colonisation AISICS (en gras et en bleu) au sein des Euryarchaeota (hors Crenarchaeota et des Korarchaeota).....	261
<b>Figure IV-3</b> : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S issues des 2 modules de colonisation AISICS (en gras et en bleu) au sein des Bacteria (hors Proteobacteria).....	262
<b>Figure IV-4</b> : Zoom sur l'arbre phylogénétique représentant la position des séquences du gène codant l'ARNr 16S issues des 2 modules de colonisation AISICS (en gras et en bleu) au sein de Planctomycetes.....	263
<b>Figure IV-5</b> : Photographies MEB de verres basaltiques du module AISICS1 incubé en condition biologique (BSA électrons rétrodiffusés et SE électrons secondaires).....	264
<b>Figure IV-6</b> : Photographies MEB de verres basaltiques du module AISICS1 incubé en condition abiotique (BSA électrons rétrodiffusés et SE électrons secondaires).....	265
<b>Figure VII-1</b> : Arbre phylogénétique de distance minimale évolution, réalisé à partir des gènes codant les ARNr 16S (gène partiel) montrant la position des souches de Pyrococcus isolées (en gras rouge).....	363
<b>Figure IX-1</b> : Schéma illustrant l'influence des interactions fluides-phases minérales sur les métabolismes microbiens et réciproquement, le rôle des micro-organismes sur les processus de dissolution et de précipitation de phases minérales ; le tout étant contrôlé par des paramètres physico-chimiques. ....	417



**Figure IX-2 :** Représentation schématique du cycle du soufre en anaérobie, à haute température et de ces acteurs microbiens détectés lors de nos études.....418

**Figure IX-3 :** Représentation schématique du cycle du fer en anaérobie, à haute température et des micro-organismes détectés lors de nos études.. .....419

**Figure IX-4 :** Représentation schématique du cycle du soufre en anaérobie, à des températures proches de 40-50°C, et des acteurs microbiens impliqués, détectés lors de nos études.....420

**Figure IX-5 :** Représentation schématique du cycle du fer en anaérobie, à des températures proche de 40°C, et des micro-organismes détectés lors de nos études.....420

**Figure IX-6 :** Représentation schématique du fonctionnement des cycles du soufre et du fer via les interactions entre procaryotes-phases minérales-fluide, à haute température (85°C).....421

**Figure IX-7:** Représentation schématique du fonctionnement des cycles du soufre et du fer via les interactions entre procaryotes-phases minérales-fluide, à des températures proches de 40°C. ....421

**Figure IX-8:** Représentation schématique des différentes voies de formation de la pyrite dans les mini-colonisateurs biotiques et abiotiques. ....423

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau I-1 :</b> Métabolismes microbiens connus et suspectés, associés aux sources hydrothermales océaniques.....	30
<b>Tableau I-2 :</b> Degrés d'oxydation des composés soufrés. L'état d'oxydation de l'atome est celui de l'atome de soufre de la molécule.....	37
<b>Tableau I-3:</b> Tableau comparant les facteurs de fractionnement ( $\epsilon$ ) en fonction de la souche microbienne, du taux de réduction des sulfates par cellules, du donneur d'électrons et de sa concentration.....	45
<b>Tableau I-4:</b> Tableau comparant les valeurs de $\delta^{56}\text{Fe}$ du Fe(II) en fonction des réactions abiotiques et métabolismes microbiens. ....	51
<b>Tableau I-5 :</b> Composition des sédiments du Bassin de Guaymas.....	58
<b>Tableau II-1 :</b> Tableau répertoriant les trois cheminées hydrothermales échantillonnées selon leur numéro de plongée, le site de prélèvement, le type de structure et leurs conditionnements.....	77
<b>Tableau II-2 :</b> Tableau des prélèvements et des sous-échantillonnages des carottes « géomicrobiologie ». ....	80
<b>Tableau II-3 :</b> Caractéristiques des amorces utilisées pour les PCRs.....	95
<b>Tableau II-4 :</b> Compositions des solutions dénaturantes utilisées pour les gels de DGGE à 6% d'acrylamide/bisacrylamide. ....	98
<b>Tableau II-5 :</b> Inocula, sections sédimentaires et métabolisme ciblé lors de l'enrichissement.....	102
<b>Tableau II-6 :</b> Echantillons, métabolismes ciblés, milieux de cultures utilisés* et températures d'incubations lors des cultures d'enrichissements.....	106
<b>Tableau II-7 :</b> Tableau indiquant la valeur du $\delta^{34}\text{S}$ du NBS 123 fixé sous forme de ZnS, en fonction de la quantité de soufre injecté et au cours de plusieurs séries analytiques et des valeurs obtenues pour le PbS et le CdS. ....	129
<b>Tableau II-8 :</b> Tableau indiquant la valeur du $\delta^{34}\text{S}$ de l' $\text{H}_2\text{S}$ provenant d'échantillons naturels (eaux interstitielles, fluide hydrothermal et de souches microbiennes) fixé sous forme de ZnS ; par rapport à la valeur du $S_{\text{spex}}$ mesurée. ....	130
<b>Tableau III-1 :</b> Tableau associant l'échantillon à sa température.....	146
<b>Tableau III-2 :</b> Tableau comparant les abondances relative de chaque phase minérale entre l'échantillon de flange hydrothermale (PI 1747) et de cheminée hydrothermale (PI 1772) .....	147
<b>Tableau III-4 :</b> Concentration en acides organiques, en sulfates et en éléments majeurs et traces dans l'eau de mer, dans les fluides hydrothermaux de la plongée 1747 collectés avec des bouteilles Titanes et le système de prélèvement PEPITO.....	149

**Tableau III-5** : Tableau comparant les end-members obtenus à partir des fluides collectés lors de la plongée 1772 (en gras), ceux obtenus précédemment lors de l'étude de Von Damm et ceux obtenu à NGS (National Geographic Society) un site de la dorsale Est pacifique à 21°N (site où le fluide ne traverse pas une importante couche de sédiments). .....150

**Tableau III-6** : Tableau répertoriant les concentrations en H<sub>2</sub>S, S, Fe, Cu, Cd, Pb, Zn, Mo, U Mn et Mg dissous dans les fluides collectés lors de la plongée 1772.....156

**Tableau III-7** : Tableau répertoriant les concentrations en S, Fe, Cu, Cd, Pb, Zn, Mo, U Mn et Mg total dans les fluides collectés lors de la plongée 1772.....156

**Tableau III-8** : Tableau associant chaque échantillon à sa température moyenne, son pH et sa contribution hydrothermale (en pourcentage de mélange avec le fluide hydrothermal).....157

**Tableau III-9** : Tableau comparant les valeurs isotopiques du fer dissous obtenus dans la zone de mélange (plongée 1772 (en gras)), à celles obtenues dans des fluides collecté au niveau de la ride de Juan de Fuca (Sharma et al. 2001), au niveau de la dorsale médio-atlantique (MAR) (Severmann et al. 2004) et au niveau de la dorsale Est pacifique (Beard et al. 2003).....164

**Tableau III-10** : Tableau comparant les valeurs isotopiques du fer total obtenus dans la zone de mélange (plongée 1772 (en gras)), à celles des sédiments hydrothermaux superficiels (Severmann et al. 2004).... .....165

**Tableau VII-1** : Tableau résumant le type d'échantillon, le métabolisme ciblé lors de l'enrichissement ainsi que les milieux de culture et les températures d'incubation testés. ....361

**Tableau VII-2** : Isolats obtenus en fonction de l'inoculum, du milieu de culture utilisé et de la température d'isolement.....364

## Liste des abréviations

---

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AISICS** : Autonomous *In Situ* Instrumented Colonization System
- ANME** : ANaerobic MEthanotroph
- AOM** : Anaerobic Oxidation of Methane
- APS** : Adénosine-5' phosphosulfate réductase
- APS** : Ammonium persulfate (DGGE)
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNr** : ARN ribosomique
- ATP** : Adénosine tri-phosphate
- BIG** : Biodiversité et Interaction à Guaymas (campagne océanographique)
- BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool
- CARD-FISH** : Catalyzed Reporter Deposition coupled with Fluorescence *In Situ* Hybridization
- CT** : Carottier tube
- DIR** : Dissimilatory Iron-Reduction
- DGGE** : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
- DHVE** : Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal group
- DMSO** : Diméthyl sulfoxyde
- dNTP** : Desoxyribonucléotide triphosphate en mélange [dATP (désoxyadénine tri-phosphate), dTTP (désoxythymine tri-phosphate), dGTP (désoxyguanine tri-phosphate), dCTP (désoxycytosine triphosphate)]
- DNRA** : Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium
- EDTA** : Acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique
- EPR** : East Pacific Rise
- FISH** : Fluorescent *in situ* hybridization
- GCT** : Grand carottier tube
- Gene *dsrAB***: gène encodant la (di)sulfite réductase
- Gene *mcrA***: gène encodant la méthyl co-enzyme M réductase
- HR-ICP-MS** : High-Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer
- ICP-AES** : Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer
- MAR** : Mid-Atlantic ridge
- MC-ICP-MS** : Multi-Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer

**MEB** : Microscopie électronique à balayage  
**MBG** : Marine Benthic Group  
**MCG** : Miscellaneous Crenarchaeotic Group  
**MG** : Marine Group  
**NCBI** : National Center for Biotechnology Information  
**NEXAFS** : Near Edge X-Ray Absorption Fine Structure  
**OTU** : Operational taxonomic unit  
**pb** : paire de bases  
**PBS** : Phosphate Buffer Saline  
**PCI** : Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol  
**PCR** : Polymerase chain reaction  
**Q-PCR** : PCR quantitative  
**RT-PCR** : Reverse transcription PCR  
**STXM** : Scanning Transmission X-ray Microscope  
**TAE** : Tampon Tris Acétate EDTA  
**TE** : Tampon Tris-EDTA  
**TEMED** : N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine  
**UV** : Ultra-violet  
**v** : volume  
**v.v.min-1** : volume par volume et par minute  
**v/v** : volume par volume  
**w/v** : poids par volume

# **I. Systèmes hydrothermaux océaniques profonds : cycles biogéochimiques du soufre et du fer et interactions géomicrobiologiques : Contexte de l'étude**

---

1. Contexte de l'étude : les systèmes hydrothermaux océaniques profonds
2. Cycles biogéochimiques du soufre et du fer et interactions géomicrobiologiques en conditions hydrothermales
3. Relations microorganismes-biotope hydrothermal à haute température
4. Le Bassin de Guaymas, un site d'étude particulier ?
5. Objectifs du projet



En 1977, lors d'une plongée du submersible américain Alvin, au large des Iles Galápagos (dorsale Est Pacifique), une équipe de scientifiques découvrit ébahie, de véritables oasis de vie associés à des sorties de fluides chauds (Corliss and Ballard 1977; Lonsdale 1977). La découverte de ces sources hydrothermales allait avoir un impact important sur l'approche de la biologie et de la chimie des océans profonds et allait ouvrir aux microbiologistes les portes d'un monde microbien unique.

Dans un premier temps, l'approche culturelle en microbiologie, focalisée sur la diversité microbienne phylogénétique et spécifique aux écosystèmes hydrothermaux, a permis d'isoler des espèces vivant dans des conditions qualifiées « d'extrêmes » (haute température, haute pression hydrostatique, vivant dans des environnements soumis à de forts gradients thermiques et chimiques). Les « conditions » de vie de ces micro-organismes spécifiques, suscitèrent de nombreuses questions parmi lesquelles :

- Quelles sont les limites physico-chimiques (température, pH, salinité, pression) et géographiques de la vie ?
- Quelle est la diversité phylogénétique et métabolique des micro-organismes vivant dans cet écosystème ?
- Comment sont colonisés les nouveaux sites hydrothermaux actifs ?

Dans un second temps, grâce aux développements des approches de biologie moléculaire avec l'utilisation des gènes codant les ARNr 16S et les gènes de fonction, c'est la dynamique, l'activité et la structure des communautés microbiennes dans ces écosystèmes instables qui ont été étudiés. De même, les interactions entre les communautés microbiennes et les interactions géo-microbiologiques ayant lieu à haute températures ont été examinées. Ces thématiques soulevèrent des interrogations telles que:

- Comment interagissent les communautés microbiennes entre-elles ?
- Quels sont le rôle et l'impact des micro-organismes dans les cycles biogéochimiques en contexte hydrothermal?
- Quelles sont les interactions Biosphère-Géosphère-Hydrosphère dans ces systèmes hydrothermaux ? ou comment le biotope contrôle l'activité et la diversité microbienne et inversement comment les micro-organismes impactent sur leurs environnements?

Le développement de nouvelles techniques de microbiologies moléculaires et culturelles et de géochimies comme l'utilisation des isotopes stables ainsi que le couplage des méthodes de microbiologie et de l'écologie microbienne, de géochimie et de minéralogie, permettent maintenant

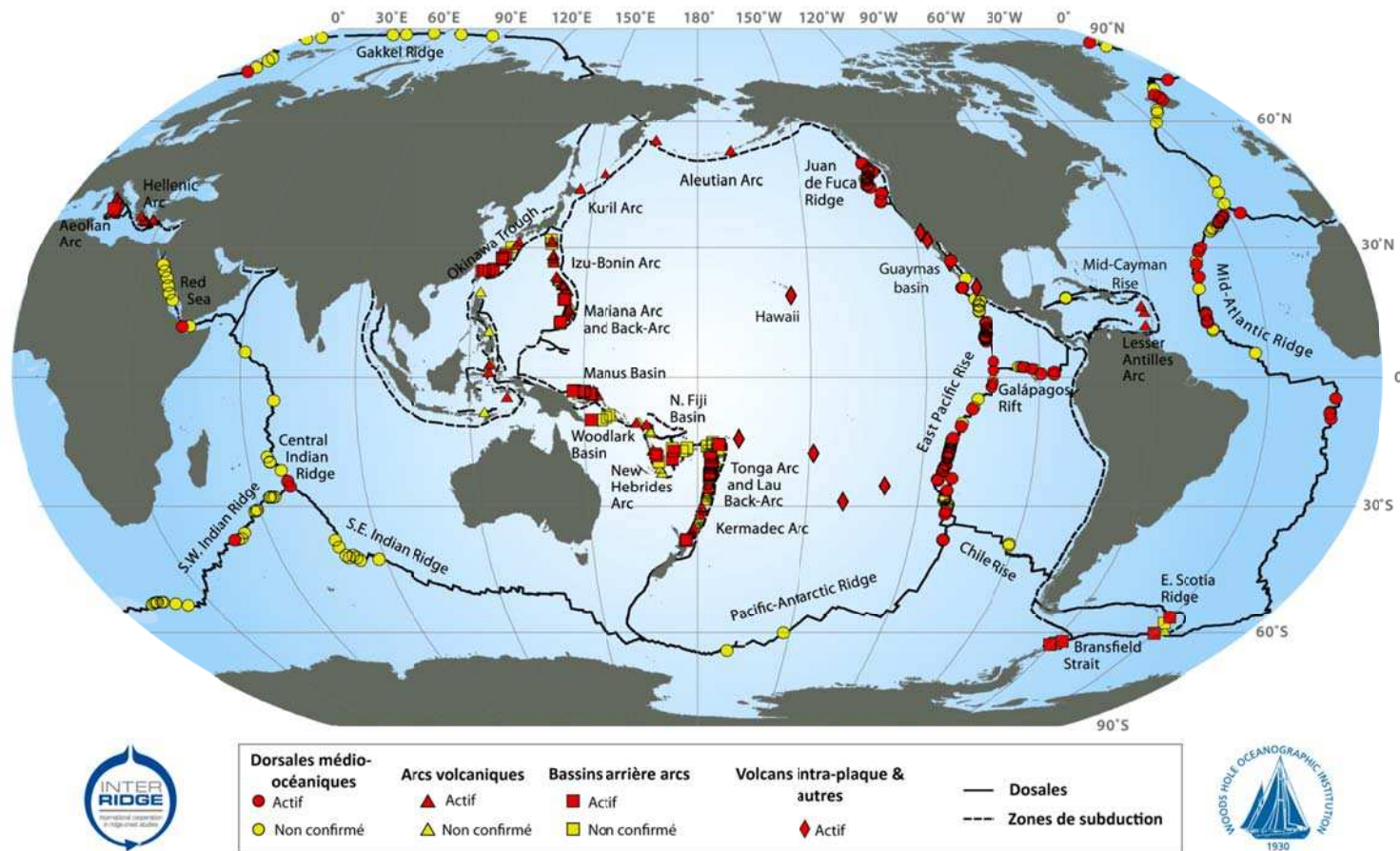


de mieux appréhender ces interactions et de retracer le fonctionnement des cycles biogéochimiques dans cet écosystème.

## **1. Contexte de l'étude : les systèmes hydrothermaux océaniques profonds**

### **1.1. Contexte géographique**

Les sources hydrothermales océaniques profondes sont situées à une profondeur moyenne de 2600 m, de 865 m pour le site hydrothermal océanique le moins profond (Menez Gwen, Ride médio-atlantique (Fouquet et al. 1994)) jusqu'à 4960 m pour le site hydrothermal le plus profond (Piccard, Ride des Caïmans (Mid-Cayman Rise)(German et al. 2010)). Elles sont localisées au niveau de zones tectoniquement actives que sont les dorsales médio-océaniques, les bassins arrière-arcs et les zones océaniques de volcanismes de points chauds. La carte (figure I-1), indique les zones d'accrétion et de subduction ainsi que de façon non-exhaustive, la localisation des sites hydrothermaux abyssaux étudiés à ce jour et pour lesquels une macrofaune associée a été observée. Ainsi, comme l'illustre la figure I-1, depuis 1977, de nombreuses campagnes océanographiques d'exploration et d'échantillonnage de sites hydrothermaux ont eu lieu au niveau de la dorsale Est Pacifique, de la dorsale médio-atlantique, et de l'océan indien ; au niveau des zones de subduction dans les bassins arrière-arcs du Pacifique ouest (Bassin de Lau, Bassin de Manus et Bassin Nord-Fidjien) ainsi que dans des bassins sédimentaires affectés par des circulations hydrothermales (Bassin de Guaymas).



**Figure I-1:** Localisation des dorsales océaniques, zone de subduction et bassins arrière-arcs, des sources hydrothermales actives et suspectées\*, des arcs volcaniques actifs et suspectés\* ainsi que les volcans intra-plaque actifs modifiés d'après : [http://www.interridge.org/irvents/files/Ventmap\\_2009.jp](http://www.interridge.org/irvents/files/Ventmap_2009.jp)  
 \*suspectés selon des anomalies de température, anomalies de la colonne d'eau, des dépôts hydrothermaux mais sans confirmation visuelle que les sources soient actives.

## 1.2. Contexte géologique

Lors des mouvements tectoniques de divergence et donc d'expansion océanique, du magma en fusion est émis au niveau des dorsales, formant la croûte océanique volcanique. De par les contraintes géodynamiques qui existent au niveau des dorsales océaniques, et d'autre part la nature et le type de roches volcaniques formé, la croûte océanique va se rétracter, se fissurer, créant ainsi des réseaux de failles et fractures dans lesquelles, l'eau de mer froide, dense et oxygénée va pouvoir s'infiltrer jusqu'à plusieurs kilomètres de profondeur (2 à 3 km). A cette profondeur, la température (1 200°C) ainsi que la pression, sont plus importantes qu'au niveau du plancher océanique, augmentant le pouvoir de solubilisation de l'eau (Kelley et al. 2002) lors des interactions eau-roches. Pendant son parcours dans la lithosphère, et sous l'effet conjoint de la température et de la pression, la composition de l'eau de mer va changer, elle va petit à petit se transformer en fluide hydrothermal. En effet, lors de son passage, l'eau de mer va lessiver et interagir avec les roches crustales : basaltes, gabbros (Bach et al. 2004) et gaz dissous qu'elle rencontre. Ainsi, l'eau de mer va s'acidifier, perdre certains de ces éléments :  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^{2-}$  ou  $PO_4^{2-}$ ; se charger en ions métalliques tels que :  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$  et en gaz dissous :  $H_2S$ ,  $H_2$ ,  $CH_4$ ,  $CO_2$ ,  $CO$  (Von Damm 1990; Von Damm 1995). Ce fluide hydrothermal va alors remonter jusqu'au plancher océanique, où il va jaillir en des points focalisés pour former les sources hydrothermales. Entrant en contact avec l'eau abyssale froide, oxygénée et légèrement alcaline, le fluide chaud et réducteur va former des précipités polymétalliques de sulfures de fer, de zinc, de cuivre mais aussi de sulfate de calcium, de baryum. En fonction de leur stabilité dans les conditions physico-chimiques de l'environnement, ces minéraux vont participer à la formation des édifices hydrothermaux (Figure I-2).

La composition géochimique des fluides émis : riche en sulfure, hydrogène, méthane ou en fer ; ainsi que la minéralogie des édifices varient d'un site à l'autre en fonction de la nature et du type de roches : substrats basaltiques, felsiques (ex andésites), roches mantelliques (ex péridotites serpentinisées) rencontrés par le fluide lors de son trajet sous le plancher océanique.

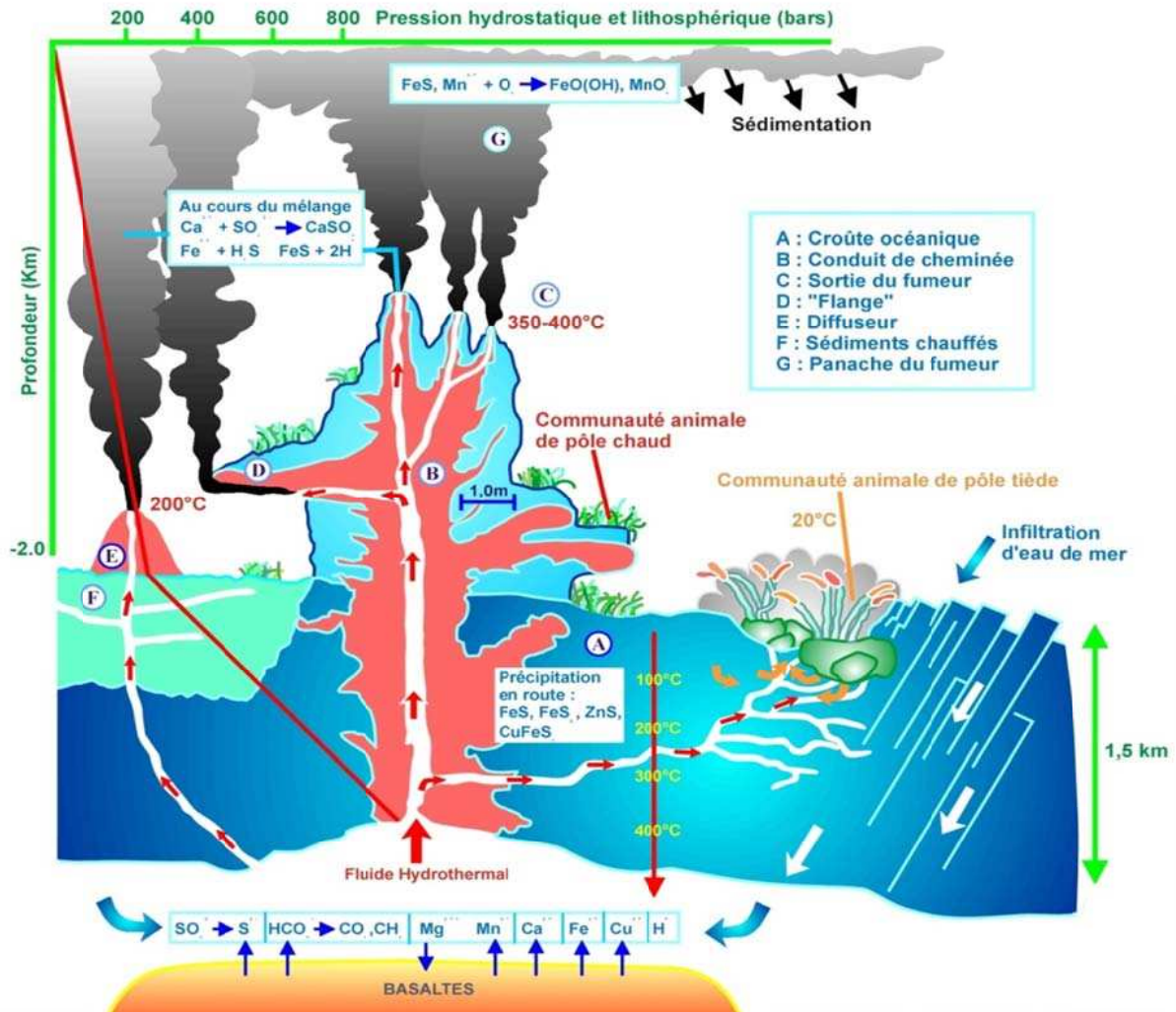


Figure I-2: Représentation schématique d'une source hydrothermale océanique modifiée de Jannasch et Mottl, 1985 par Erauso, 1994 (Jannasch and Mottl 1985; Erauso 1994)

### 1.3. Habitats des communautés microbiennes

Les micro-organismes vivant dans les écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds, sont très diversifiés en termes d'espèces, de métabolismes et de préférences (thermique, salinité et de pH). Malgré les caractéristiques intrinsèques aux systèmes hydrothermaux : instabilité des émissions de fluide, gradients physico-chimiques abrupts, variabilité intra-site ; des types d'habitats théoriques des micro-organismes, ont été décrits (Karl 1995), (sans pour autant qu'ils y soient obligatoirement inféodés). Ces habitats sont :

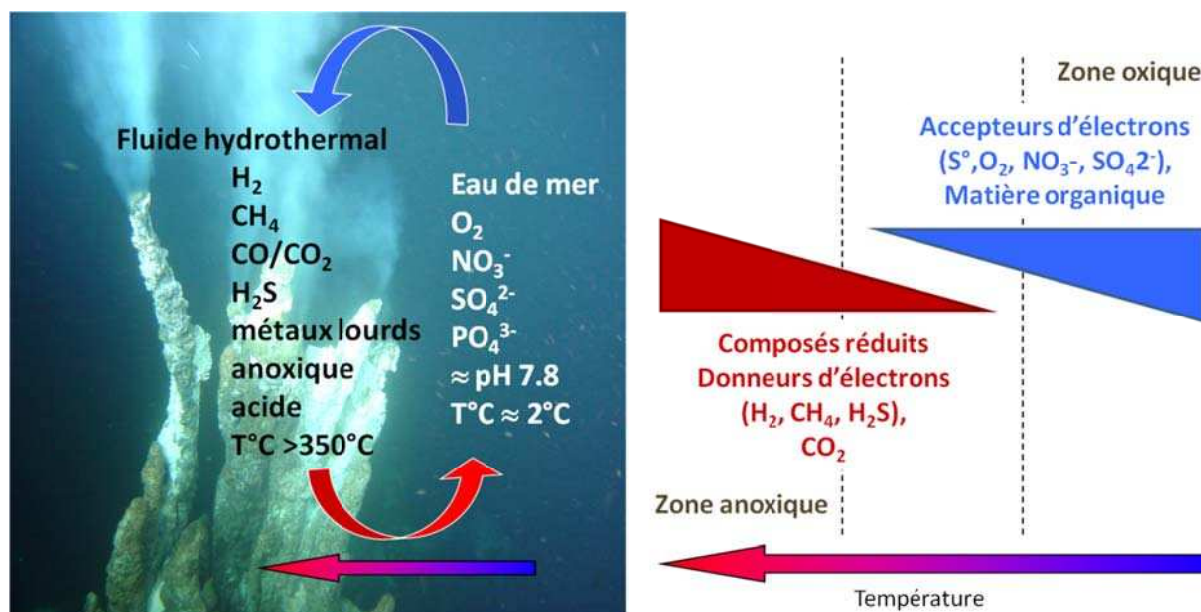
- **le fluide hydrothermal** où les populations microbiennes vivent sous forme libre ou attachées aux particules émises. Selon certaines études ces micro-organismes seraient

- issus d'une biosphère souterraine, présente sous les cheminées hydrothermales (Gold 1992; Deming and Baross 1993; Takai et al. 2004)
- **la structure minérale poreuse des édifices** où les micro-organismes peuvent vivre fixés (Harmsen et al. 1997; Takai et al. 2001; Schrenk et al. 2003)
  - **la surface des édifices, des animaux ou des sédiments** exposés au fluide où les micro-organismes peuvent se développer de façon libre ou au sein de biofilm ou tapis microbiens (Jannasch et al. 1989; Moyer et al. 1995; Emerson et al. 2007; Gerasimchuk et al. 2010; Crépeau et al. 2011; McKay et al. 2012)
  - **le panache hydrothermal** « nuage » d'eau de mer chaude enrichie en minéraux présents dans le fluide, se disperse dans l'océan profond depuis une source hydrothermale, où des communautés microbiennes peuvent vivre sous forme libre ou attachées à des particules (Winn et al. 1986; Sunamura et al. 2004; Dick et al. 2006; Dick and Tebo 2010; Sylvan et al. 2012)
  - **les sédiments hydrothermaux** au travers desquels, le fluide hydrothermal diffuse ; comme au niveau du Bassin de Guaymas (Teske et al. 2002; Dhillon et al. 2003; Biddle et al. 2012; Bowles et al. 2012)
  - **la faune hydrothermale via la colonisation de la surface des métazoaires ou via des associations symbiotiques** (ectosymbiose, endosymbiose ou épibiose), avec par exemple des siboglinidés [ex *Riftia pachyptila* (De Cian et al. 2003)], des polychètes [ex *Alvinella pompejana* (Campbell et al. 2003)], des bivalves [ex *Bathymodiolus thermophilus*, *B. azoricus*; *Calyptogena magnific* (Arndt et al. 2001; Duperron et al. 2006)], des gastéropodes [ex *Ifremeria nautilei* (Borowski et al. 2002)], des crustacés [ex *Rimicaris exoculata* (Zbinden and Cambon-Bonavita 2003; Guri et al. 2011)] ou des ciliés [ex *Folliculinopsis* sp. (Kouris et al. 2007)].

#### **1.4. Diversité métabolique et phylogénétique des micro-organismes des édifices hydrothermaux actifs**

Hormis certaines zones de l'océan, il est largement admis que moins de 5% du carbone organique d'origine photosynthétique parvienne au-delà de 2000m de profondeur (Suess 1980). Considérant cette faible proportion de la production primaire photosynthétique atteignant le plancher océanique et qu'à ces profondeurs, une grande partie du carbone organique dissout est difficilement assimilable, voire réfractaire (Karl 1995), le premier maillon de la chaîne alimentaire de

l'écosystème hydrothermal est la chimiosynthèse microbienne (Jannasch 1985). A l'inverse des micro-organismes phototrophes qui utilisent la lumière comme source d'énergie, les procaryotes chimiotrophes vont utiliser des composés chimiques, *via* des réactions d'oxydo-réduction, comme sources d'énergie. Du fait du mélange entre un fluide hydrothermal réduit, riche en gaz dissous ( $H_2S$ ,  $H_2$ ,  $CH_4$ ) et en métaux (Fe, Mn) et une eau de mer oxygénée contenant des sulfates et des nitrates une grande variété de donneurs et d'accepteurs d'électrons est disponible pour alimenter divers métabolismes microbiens (Figure I-3).



**Figure I-3 :** Schéma illustrant le mélange entre le fluide hydrothermal réduit, riche en gaz dissous ( $H_2S$ ,  $H_2$ ,  $CH_4$ ) et en métaux (Fe, Mn) et l'eau de mer oxygénée qui contient des sulfates et des nitrates. Ces donneurs et d'accepteurs d'électrons sont disponibles pour les communautés microbiennes.

Les métabolismes microbiens connus ou susceptibles d'exister dans les écosystèmes hydrothermaux marins sont listés dans le tableau ci-dessous (Tableau I-1). Seuls les métabolismes dissimilatifs énergétiques faisant intervenir le soufre, le fer, et l'azote sont présentés. Des micro-organismes impliqués dans une ou plusieurs des voies métaboliques listées, ont été isolés des écosystèmes hydrothermaux à l'exception de ceux impliqués dans l'AOM (oxydation anaérobie du méthane) et dans la réaction ANAMMOX (oxydation anaérobie de l'ammonium). En effet, à ce jour, seules des signatures moléculaires (gènes codant les ARNr 16S ou gènes de fonction), l'identification de lipides spécifiques (ladderane pour l'ANAMMOX) et des mesures d'activité ont permis de détecter ces métabolismes dans divers systèmes hydrothermaux :

- **ANAMMOX** au niveau de la dorsale médio-atlantique (site Rainbow, Menez-Gwen, TAG et Lucky Strike) *via* l'étude de la diversité moléculaire, l'analyse de lipides typiques des micro-organismes ANAMMOX : les ladderanes et par des mesures d'activité (production

de N<sub>2</sub>) (Byrne et al. 2009) et au niveau du Bassin de Guaymas via des signatures moléculaires de gènes codant pour l'hydrazine synthase (*hzsA*) une des enzymes clé du métabolisme ANAMMOX et l'analyses des ladderanes (Russ et al, 2013 soumis)

- **AOM** au niveau de la dorsale médio-atlantique (sur le site Lost City) *via* des signatures moléculaires (ADNr 16S) (Schrenk et al. 2004; Brazelton et al. 2006) et au niveau du Bassin de Guaymas *via* des mesures d'activité (Kallmeyer and Boetius 2004) et de diversité moléculaire (ADNr 16S et *mcrA*) (Teske et al. 2002; Dhillon et al. 2003; Holler et al. 2011; Biddle et al. 2012).

**Tableau I-1 :** Métabolismes microbiens connus et suspectés, associés aux sources hydrothermales océaniques adapté de Karl, 1995 ; Madigan et Martinko, 2002 et Orcutt et al., 2011 (Karl 1995; Madigan and Martinko 2007; Orcutt et al. 2011)

Métabolisme	Donneur d'électron	Accepteur d'électrons	Source de carbone	Organismes	Groupes microbiens représentatifs
Respiration aérobie	[CH <sub>2</sub> O] <sub>n</sub>	O <sub>2</sub>	[CH <sub>2</sub> O] <sub>n</sub>	Hétérotrophes aérobie	<i>Aeropyrum sp.</i> , <i>Thermus sp.</i> <i>Rhodothermus sp.</i>
Oxydation de l'hydrogène	H <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Hydrogène-oxydants	<i>Persephonella sp.</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Nitrospira</i> , <i>Thaumarchaeoata</i> (groupe 1a)
Nitrification	NH <sub>3</sub> , NO <sup>2-</sup>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Nitrifiants	<i>Proteobacteria</i> , <i>Nitrospira</i> , <i>Thaumarchaeoata</i> (groupe 1a)
Méthanotrophie, méthylothrophie	CH <sub>4</sub> , CO et autres composés en C1	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Méthanotrophe, méthylothrophe	<i>Gamma-</i> (Type I) et <i>Alpha-</i> (Type II) <i>proteobacteria</i>
Oxydation de composés soufrés	HS <sup>-</sup> , S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup> HS <sup>-</sup> , S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	O <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>	Sulfo-oxydants	<i>Gamma-</i> , <i>Epsilon-proteobacteria</i> , <i>Aquificales</i> ( <i>Persephonella</i> )
Oxydation du fer ferreux	Fe(II)	O <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>	Fer-oxydants	<i>Zeta-</i> , <i>Alpha</i> , <i>Beta-proteobacteria</i>
Oxydation du manganèse	Mn(II)	O <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub>	Manganèse-oxydants	<i>Alpha-</i> , <i>Gamma-proteobacteria</i>
Denitrification	[CH <sub>2</sub> O] <sub>n</sub> , H <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub> ou [CH <sub>2</sub> O] <sub>n</sub>	Denitrifiants	<i>Epsilon-proteobacteria</i> , <i>Aquificales</i> , <i>Caldithrix</i> , <i>Firmicutes</i>

Métabolisme	Donneur d'électron	Accepteur d'électrons	Source de carbone	Organismes	Groupes microbiens représentatifs
Oxydation anaérobie l'ammonium	de $\text{NH}_4^+$	$\text{NO}_3^{2-}$ ( $\text{NO}_2^-$ , $\text{Fe(III)?}$ )	$\text{CO}_2$	ANAMMOX	Planctomycetes ANAMMOX
Sulfo-réduction	$[\text{CH}_2\text{O}]_n$ , $\text{H}_2$	$\text{S}^\circ$	$\text{CO}_2$ ou $[\text{CH}_2\text{O}]_n$	Sulfo-réducteurs	<i>Desulfobacteriales</i> , <i>Epsilon-proteobacteria</i> , <i>Ignicoccales</i> , <i>Desulfurococcales</i>
Sulfato-réduction (Thiosulfate-réduction)	$[\text{CH}_2\text{O}]_n$ , $\text{H}_2$	$\text{SO}_4^{2-}$ , ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ )	$\text{CO}_2$ ou $[\text{CH}_2\text{O}]_n$	Sulfato-réducteurs	<i>Deltaproteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Archaeoglobus sp.</i>
Méthanogénèse	$\text{H}_2$	$\text{CO}_2$ , composés en C1, acétate	$\text{CO}_2$	Méthanogènes	<i>Méthanoarchaea</i> ( <i>Methanococcus sp.</i> , <i>Methanopyrus sp.</i> )
Oxydation anaérobie méthane	du $\text{CH}_4$	$\text{SO}_4^{2-}$ , ( $\text{NO}_3^{2-}$ , $\text{Fe(III)?}$ )	$\text{CO}_2$ ou $\text{CH}_4$	Méthanotrophes	ANME avec ou sans syntrophes
Réduction du ferrique	du Fer $[\text{CH}_2\text{O}]_n$ , $\text{H}_2$	$\text{Fe(III) oxide}$	$\text{CO}_2$ ou $[\text{CH}_2\text{O}]_n$	Ferri-reductrices	<i>Geoglobus sp.</i> , <i>Deferribacter sp.</i> , <i>Aciduliprofundum sp.</i>
Réduction manganèse	du $[\text{CH}_2\text{O}]_n$	$\text{MnO}_2$	$\text{CO}_2$	Manganèse-réductrices	<i>Deferribacter sp.</i>
Fermentation	$[\text{CH}_2\text{O}]_n$	$[\text{CH}_2\text{O}]_n$	$[\text{CH}_2\text{O}]_n$	Hétérotrophes anaérobie et fermentaires	<i>Thermococcales</i> , <i>Thermotogles</i> , <i>Pyrodictium sp.</i> , <i>Firmicutes</i>
Dismutation soufre	du $\text{S}^\circ$ dismuté en sulfure et en thiosulfate		$\text{CO}_2$	Disproportionateur	<i>Thermosulfurimonas dismutans</i> , <i>Dissulfuribacter thermophilus</i>

Des inventaires moléculaires réalisés à partir d'échantillons de systèmes hydrothermaux actifs (cheminées, fluides, sédiments, macrofaune), ont révélé une importante diversité phylogénétique. Ainsi, parmi les *Archaea*, les groupes les plus souvent détectés à la fois, dans les édifices, fluides et sédiments hydrothermaux, sont les *Thermococcales*, *Archaeoglobales*, *Desulfurococcales*, *Ignicoccales*, et les *Methanoarchaea*: *Methanococcales* et *Methanopyrales* (Huber et al. 1989; Takai and Horikoshi 1999; Takai et al. 2001; Teske et al. 2002; Schrenk et al. 2004; Nunoura et al. 2010; Roussel et al. 2011; Takai and Nakamura 2011). D'autres groupes, tels que les *Halobacteriales*, les *Thaumarchaeota*, les DHVE2, ou encore les MCG, sont aussi généralement détectés dans ces écosystèmes (Takai et al. 2001; Orcutt et al. 2011; Roussel et al. 2011; Flores et al.



2012). Concernant les *Bacteria*, ce sont les *Epsilonproteobacteria* qui sont le plus communément détectées et ce, dans des habitats très variés : zone de mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer, sédiments hydrothermaux, tapis microbiens, dans des tubes de polychètes (*Paralvinella*) ou encore en association symbiotique ou non avec la macrofaune (Reysenbach et al. 2000; Alain et al. 2002; Teske et al. 2002; Huber et al. 2003; Page et al. 2004; Suzuki et al. 2005; Campbell et al. 2006; Gerasimchuk et al. 2010; Crépeau et al. 2011; Sylvan et al. 2012). De nombreuses études de diversité microbienne ont également détecté fréquemment des groupes bactériens tels que les *Delta-* et *Gamma-protéobacteria*, les *Aquificales*, les *Firmicutes*, les CFB (*Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes*), les *Acidobacteria*, les *Verrumicrobia* ou encore les *Planctomycetes* (Alain et al. 2002; Reysenbach et al. 2002; Teske et al. 2002; Huber et al. 2003; Page et al. 2004; Stott et al. 2008; Crépeau et al. 2011; Orcutt et al. 2011; Sylvan et al. 2012; Sylvan et al. 2012; Wei et al. 2013).

Beaucoup de souches d'*Archaea* et de *Bacteria* (à ce jour, plus de 150 souches ont été décrites formellement ou non), aux métabolismes et aux caractéristiques physiologiques variés : des psychrophiles aux (hyper)thermophiles, des neutrophiles aux acidophiles voire des halophiles modérées, ont été isolées des sources hydrothermales océaniques profondes. Souvent aussi bien chez les *Bacteria* que chez les *Archaea*, ces nouveaux isolats sont des nouveaux taxons ainsi, la diversité des métabolismes, des propriétés physiologiques des microorganismes de ces écosystèmes s'accompagnent d'une grande diversité phylogénétique (20 phylum, 80 genres) (Annexes 1 et 2).

## **2. Cycles biogéochimiques du Soufre et du Fer et interactions géo-microbiologiques en condition hydrothermale**

Les communautés microbiennes des sources hydrothermales océaniques sont impliquées dans les grands cycles biogéochimiques du Carbone, de l'Azote, du Fer ou encore du Soufre. Dans cette section, nous présenterons le fonctionnement des cycles biogéochimiques du Soufre et du Fer à haute température ; leur fonctionnement aux températures plus basses sera évoqué quand cela sera nécessaire à la compréhension du fonctionnement de ces cycles dans l'écosystème hydrothermal. Les caractéristiques métaboliques, les températures optimales de croissance ainsi que l'origine géographique de la totalité des souches isolées des sources hydrothermales océaniques profondes, citées dans ce chapitre sont répertoriées dans les tableaux présentés en annexes [annexes 1 et 2].

Afin de préciser le cadre de la description des cycles biogéochimiques du Soufre et Fe, la notion d'isotopie et de fractionnement isotopique sera également introduite. Le fractionnement isotopique correspond à la répartition inégale de deux ou plusieurs isotopes d'un élément entre deux

réservoirs. Ainsi, différents processus (réaction d'oxydation ou de réduction abiotique ou microbienne) peuvent induire une différence dans le rapport isotopique d'un élément entre deux composantes ou deux phases. La différence de composition entre une phase X1 et phase X2 (Figure I-4) est communément rapportée sous la forme d'un facteur de fractionnement isotopique et est défini par :

$$\alpha_{X1-X2} = ({}^B X_1 / {}^A X_1) / ({}^B X_2 / {}^A X_2)$$



**Figure I-4 :** Schéma illustrant le fractionnement isotopique entre deux compartiments 1 et 2 (molécules, minérale, organismes etc...), ou la variation d'abondance entre les isotopes A et B, de l'élément X au cours d'une réaction.

Toute réaction d'oxydo-réduction (biologique et abiotique), d'absorption de phase, de précipitation d'un élément chimique qu'elle soit d'origine biologique ou non, induit un fractionnement de l'élément concerné.

Selon le métabolisme microbien, à chaque étape (réduction, oxydation, transport dans la cellule) un fractionnement isotopique peut se produire ; par exemple la réduction du fer se produit en une seule étape alors que la sulfato-réduction en fait intervenir plusieurs (dont le nombre varie en fonction des voies métaboliques mises en œuvre). Le fractionnement peut être également influencé par différents facteurs tels que :

- la température,
- la source et/ou la concentration en carbone,
- la source et/ou la concentration en donneurs d'électrons,
- la source et/ou la concentration en accepteurs d'électrons,
- l'espèce microbienne impliquée.

Afin de pouvoir rapporter les compositions isotopiques sous la forme d'une notation unique, il convient d'utiliser la notation « delta » :

$$\delta^{B/A}X = 1000 * [({}^B X / {}^A X) / ({}^B X_{STD} / {}^A X_{STD}) - 1]$$

où  ${}^B X_1 / {}^A X_1$  est le rapport des isotopes B/A (B étant l'isotope le plus lourd et/ou le plus abondant) de l'élément X dans un échantillon donné. STD dénomme le standard que tout laboratoire doit utiliser pour « normaliser » les valeurs isotopiques.

$$\text{Ainsi } \delta^{B/A} X_1 - \delta^{B/A} X_2 = \Delta^{B/A} X_{1-2} \sim 1000 * \ln (\alpha_{X1-X2})$$

## 2.1. Cycle du soufre

Le soufre, sous diverses formes, est un élément très répandu sur Terre : sous forme native (cristaux de couleur jaune) dans les zones volcaniques, dans de nombreux minéraux sous forme de sulfures (pyrite, sphalérite, galène), de sulfates (anhydrite, barytine, gypse) ou encore chez les êtres vivants, dans les acides aminés : méthionine, cystéine et donc dans des protéines. Le soufre a aussi un rôle environnemental très important. Dans les couches supérieures de l'océan, lors de la dégradation du phytoplancton, du soufre organique comme le DMS (diméthylsulfure), est produit et s'échappe dans l'atmosphère où il est oxydé en sulfate. D'autres composés soufrés, comme le dioxyde de soufre, sont rejetés dans l'atmosphère lors d'éruptions volcaniques mais aussi lors d'activités humaines (combustion du pétrole, charbon), où ils sont oxydés en sulfate. Ces aérosols de sulfate servent ensuite de « noyaux » de nuages et du fait de leur albédo, les nuages influencent le rayonnement solaire et thermique et donc la température sur Terre (Charlson et al. 1987).

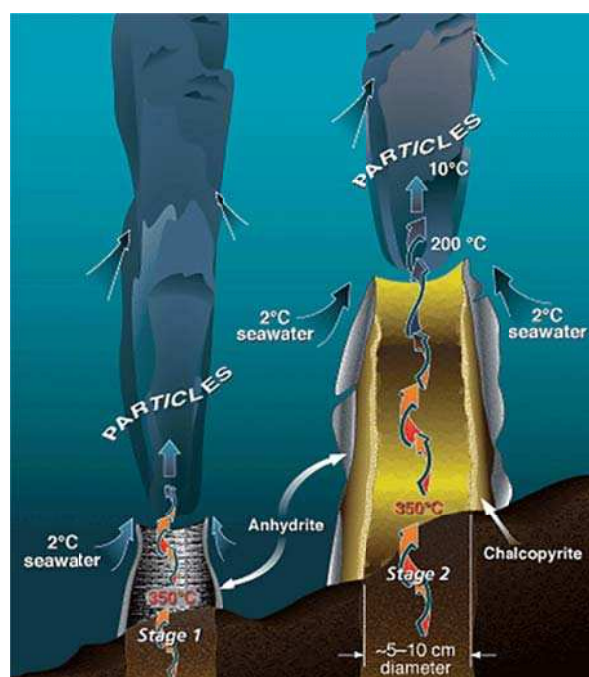
De par sa présence dans certains acides aminés, dans certaines protéines telles que les protéines contenant des agrégats fer-soufre ou [ferredoxines], dans certains cofacteurs, et dans des vitamines, le soufre est un des éléments indispensable à la vie. Les acides aminés et les protéines soufrées sont présents chez tous les procaryotes, qu'ils vivent en aérobiose ou en anaérobiose. Par ailleurs selon l'état d'oxydation du soufre, les composés soufrés peuvent être utilisés comme donneurs ou accepteurs d'électron. Ainsi, le soufre peut être impliqué *via* des métabolismes assimilatifs<sup>1</sup> et ou dissimilatifs<sup>2</sup> chez tous les micro-organismes.

---

<sup>1</sup> **Le métabolisme assimilatif** concerne tous les éléments qui vont être réduits dans le but d'être utilisés dans les voies de biosynthèses et être assimilés dans des protéines, des cofacteurs. Au cours de l'assimilation, une partie du pool d'accepteurs d'électrons est réduite pour satisfaire les besoins cellulaires.

### 2.1.1. Réservoir de composés sulfurés en contexte hydrothermal

Le plus grand réservoir du soufre dans la lithosphère est le sédiment (ex schistes et évaporites), où le soufre est présent sous forme de minéraux sulfurés (principalement sous forme de pyrite), sous forme de minéraux sulfaté (gypse) ou dans la matière organique en voie de dégradation. De même, le plus grand réservoir de sulfate sous forme dissoute est l'eau de mer où le sulfate est un des principaux anions constitutifs de l'eau de mer. Dans les écosystèmes hydrothermaux, le soufre se rencontre sous divers états d'oxydo-réduction et sous diverses formes dissoutes ou solides. Les cheminées hydrothermales contiennent des minéraux sulfurés tels que la pyrite, la marcasite, la chalcopryrite, la pyrrotite, la sphalérite, la galène ; ou sulfaté tels l'anhydrite ou la barytine. La proportion entre ces minéraux sulfurés et sulfatés, varie selon la localisation dans la cheminée : extérieur *versus* intérieur et selon la maturité (âge) de la cheminée. Classiquement, une cheminée se forme en deux étapes (Figure I-5).



**Figure I-5 :** Schéma représentant les deux stades de formation des cheminées hydrothermales. Au cours de l'étape 1 de la croissance de la cheminée, le fluide hydrothermal chaud, anoxique et réduit, se mélange avec l'eau de mer froide et oxygénée, entraînant la précipitation de sulfate de calcium (anhydrite) formant les parois de l'édifice. Des sulfures de métaux et d'oxydes transportés dans le fluide chaud précipitent aussi rapidement au cours du processus de mélange, la formation d'un panache de particules sombre au-dessus de l'évent. Au cours de l'étape 2 de la croissance de la cheminée, une couche de sulfure de cuivre et de fer va précipiter à l'intérieur de la cheminée sur la paroi de la cheminée initialement composée d'anhydrite. Par advection et diffusion, l'eau de mer pénètre à travers la paroi poreuse de la cheminée et se mélange avec le fluide hydrothermal entraînant la précipitation et le dépôt de sulfure de zinc, de cuivre et de fer dans les pores de la paroi, rendant la cheminée de moins en moins poreuse. <https://www.whoi.edu/oceanus/viewArticle.do?id=2400&archives=true>

<sup>2</sup> Le métabolisme dissimilatif correspond au métabolisme énergétique. Il concerne les éléments qui vont être réduits dans le but d'obtenir de l'énergie. Au cours de la dissimilation, contrairement à l'assimilation, une grande partie des accepteurs d'électrons va être réduite et les produits réduits (les produits finaux du métabolisme) sont excrétés hors de la cellule.

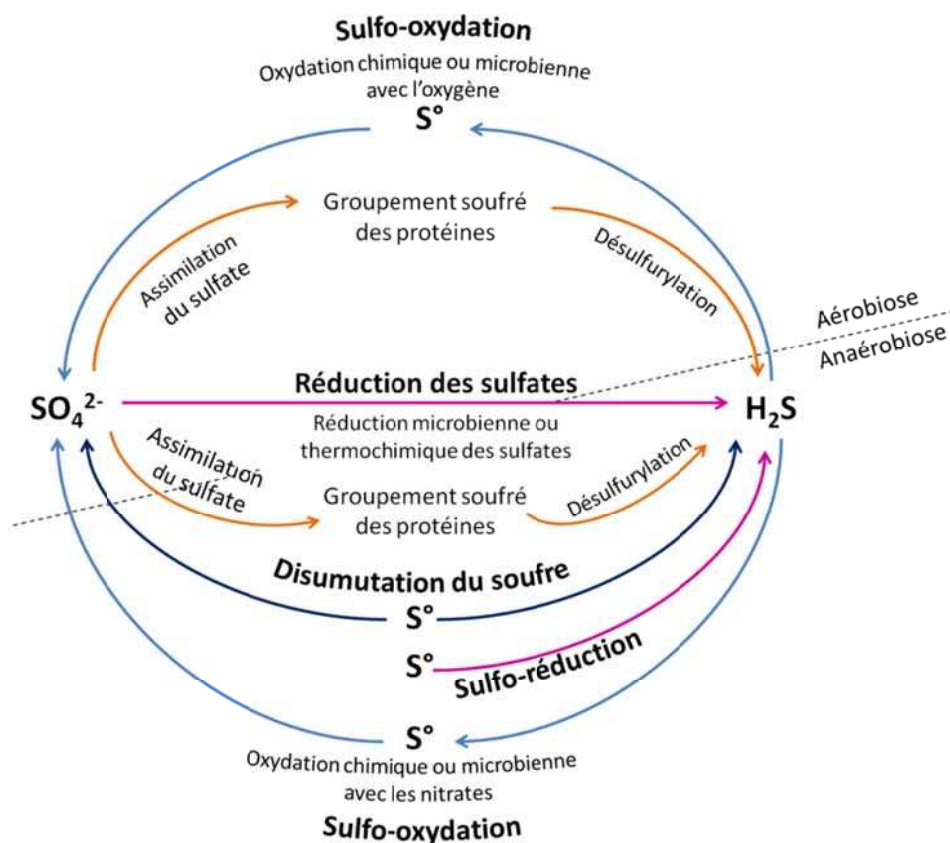
Lors du premier stade de sa formation, le fluide chaud expulsé réagit au contact de l'eau de mer et une matrice poreuse de sulfates, (essentiellement de l'anhydrite), se forme à partir des sulfates de l'eau de mer. La paroi de l'édifice va croître verticalement par précipitation et dépôt, de sulfures de zinc, de cuivre et de fer (chalcopyrite, pyrrhotite, pyrite et sphalérite) le long de la paroi interne du conduit. Le second stade débute lorsque la porosité de la paroi diminue jusqu'à séparer physiquement le fluide hydrothermal et l'eau de mer. La température augmente au centre de la cheminée formée. Une couche de sulfures de cuivre et de fer (ex chalcopyrite isocubanite) précipitent et se déposent sur la paroi interne de l'édifice formant un conduit central. La cheminée croît ensuite latéralement, par remplacement de l'anhydrite et par précipitation de sulfures stables à plus basse température (pyrite, marcassite, sphalérite). Dans le gradient de température ainsi créé, les minéraux s'organisent de manière plus ou moins concentrique, stabilisant ainsi la structure de la cheminée. Du soufre élémentaire peut également être présent dans les édifices hydrothermaux, où il est généralement formé lors de l'altération secondaire des sulfures primaires (pyrrhotite) par l'eau de mer. Dans certains cas, le soufre élémentaire primaire peut être présent en grande concentration dans les systèmes hydrothermaux d'arrière-arc avec une forte contribution magmatique. Les fluides hydrothermaux classiques des dorsales médio-océaniques, quant à eux, contiennent seulement de l'hydrogène sulfuré dissous ( $\text{HS}^-$ ) dans le fluide « end-member ». En contexte de dorsale sédimentée, la composition en soufre dissous : sulfates et sulfures, des eaux interstitielles contenues dans les sédiments est le reflet du degré de mélange entre 1) le fluide hydrothermal, 2) l'eau de mer qui s'infiltré dans les sédiments et 2) des processus microbiens qui s'y déroulent (sulfato-réduction, sulfo-réduction, oxydation anaérobie du méthane couplée à la réduction des sulfate). Ainsi, le rapport sulfate/sulfures est variable selon la localisation géographique (position par rapport) et selon la profondeur sous le plancher océanique.

### **2.1.2. Géochimie et métabolismes microbiens du soufre**

Le soufre, possède plusieurs états d'oxydo-réductions : -2, 0, +2, +4 et + 6. Sa forme la plus oxydée étant représentée par le sulfate :  $\text{SO}_4^{2-}$  correspondant à l'état redox +6 ; et sa forme la plus réduite, l'hydrogène sulfuré :  $\text{H}_2\text{S}$  rapporté à l'état d'oxydo-réduction -2 (Tableau I-2). La réduction du sulfate en hydrogène sulfuré implique ainsi une perte de 8 électrons. Le soufre élémentaire est stable et insoluble sous forme  $\text{S}_8$ .

**Tableau I-2 :** Degrés d'oxydation des composés soufrés. L'état d'oxydation de l'atome est celui de l'atome de soufre de la molécule ; de Madigan et Martinko, 2002 (Madigan and Martinko 2007).

Composés	Formule	Etat d'oxydation
Sulfate	$\text{SO}_4^{2-}$	+6
Sulfite	$\text{SO}_3^{2-}$	+4
Dioxyde de soufre	$\text{SO}_2$	+4
Tétrathionate	$\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$	+2,5 (0 pour les soufres "internes" et +5 pour les deux soufres "externes")
Thiosulfate	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	+2
Soufre élémentaire	$\text{S}^0, \text{S}_8$	0
Polysulfure	$\text{S-S}_{(n)}\text{-S}$	0 pour les soufres "internes" et -1 pour les deux soufres "externes"
Pyrite	$\text{FeS}_2$	-1
Monosulfure de fer	$\text{FeS}$	-2
Sulfure d'hydrogène	$\text{H}_2\text{S}$	-2



**Figure I-6 :** Principales réactions du cycle biogéochimique du soufre modifié d'après Madigan et Martinko, 2002 (Madigan and Martinko 2007).

Les flèches orange représentent le métabolisme assimilatif et les voies de désulfurylation des protéines ; les flèches bleues claires, les voies d'oxydation ; les flèches mauves, les voies de réduction et les flèches bleues foncées les voies de dismutations du soufre élémentaire.

### 2.1.2.1. Oxydation des composés soufrés

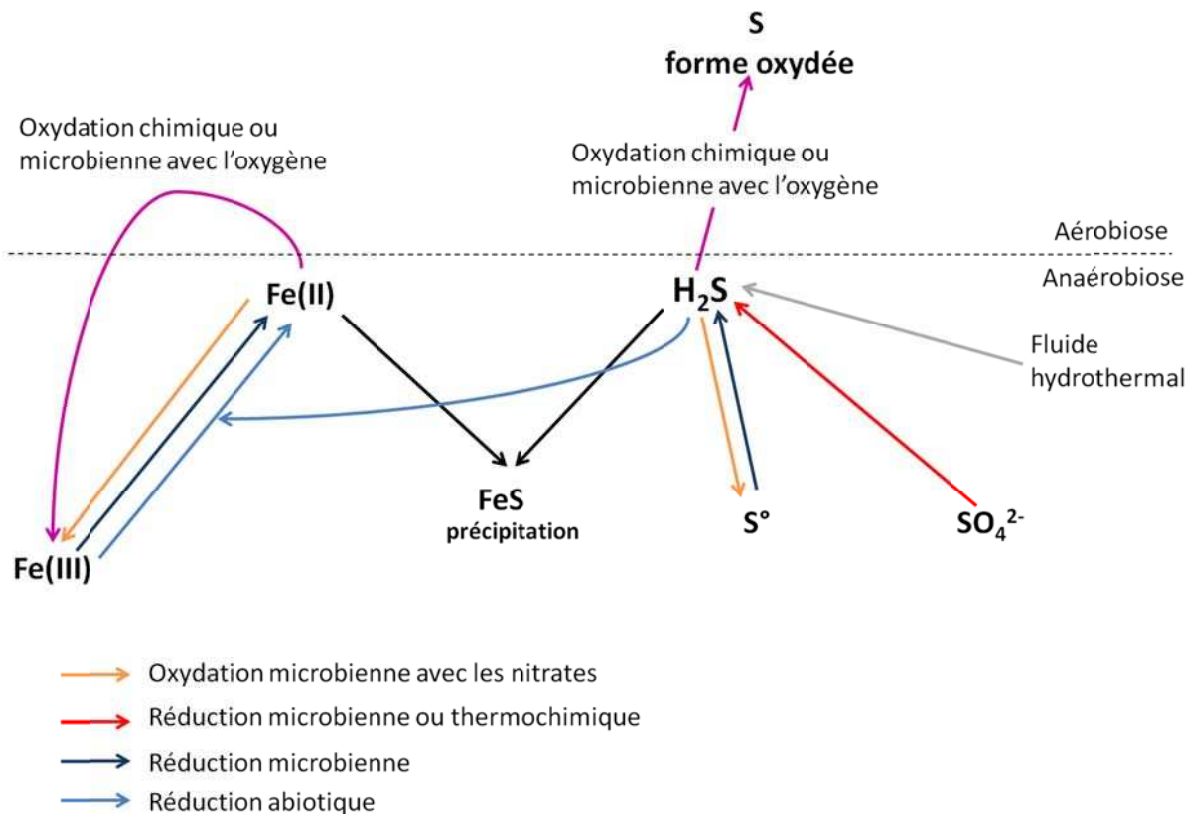
La sulfo-oxydation est l'oxydation de diverses formes de composés soufrés :  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  (sulfures),  $\text{S}^0$  (soufre élémentaire),  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  (thiosulfate),  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  (tétrathionate); le plus souvent le produit de l'oxydation de ces composés soufrés est le sulfate (parfois sous forme de  $\text{S}^0$ , qui peut être accumulé dans les cellules de certaines bactéries filamenteuses de type *Beggiatoa* (Nelson et al. 1989; Preisler et al. 2007)) (Figure I-6). L'oxydation abiotique de l'hydrogène sulfuré et l'oxydation microbienne des composés soufrés ont généralement lieu dans la zone de transition oxic/anoxique (OATZ : oxic-anoxic transition zone) entre l'eau de mer oxygénée et un fluide anoxique contenant des sulfures. Des études ont démontré que l'oxydation abiotique de l' $\text{H}_2\text{S}$  dans l'eau de mer est dépendante de la température, du pH, de la force ionique et de la présence de métaux trace (Millero et al. 1987; Vazquez et al. 1989; Luther et al. 2011). En présence de métaux trace : Fe(II), Mn(II), la vitesse d'oxydation de l' $\text{H}_2\text{S}$  par l'oxygène dans l'eau de mer est augmentée. Ainsi, par exemple en aérobiose, le taux d'oxydation de l' $\text{H}_2\text{S}$  en  $\mu\text{M}\cdot\text{jour}^{-1}$  est de :

- 1  $\mu\text{M}\cdot\text{jour}^{-1}$  dans une solution ne contenant pas de métaux trace (Luther et al. 2011)
- 87,6  $\mu\text{M}\cdot\text{jour}^{-1}$  en présence de 8  $\mu\text{M}$  Mn(II) (Vazquez et al. 1989)
- 832  $\mu\text{M}\cdot\text{jour}^{-1}$  en présence de 0.3  $\mu\text{M}$  Fe(II) (Vazquez et al. 1989)

alors qu'en condition biologique (expérience d'oxydation de l' $\text{H}_2\text{S}$ , réalisée à 30°C, à pH 5 et à 27,5 Mpa, dans un milieu contenant : 5 mM de carbone inorganique, 650  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{S}$ , 110  $\mu\text{M}$  d'oxygène ; par des micro-organismes libres, chimiolithotrophes collectés au niveau de ride de Juan de Fuca), il est de 49800  $\mu\text{M}\cdot\text{jour}^{-1}$  (Luther et al. 2011).

Dans l'eau de mer, l' $\text{H}_2\text{S}$  peut aussi être oxydé abiotiquement par des oxydes de Fe(III) (Yao and Millero 1996; Poulton et al. 2004) (Figure I-7).

En anaérobiose, les nitrates peuvent être utilisés comme accepteurs d'électrons par certains micro-organismes pour oxyder certains composés soufrés (Figures I-6 et I-7).



**Figure I-7 :** Principales réactions biogéochimiques impliquant l' $H_2S$  dissous en aérobiose et en anaérobiose, couplées au cycle du fer.

Les flèches orange représentent l'oxydation microbienne avec les nitrates comme accepteurs d'électron, en anaérobiose. Les flèches mauves correspondent à l'oxydation chimique par l'oxygène ou microbienne (utilisant l'oxygène comme accepteur d'électron) de l' $H_2S$  ou de  $Fe(II)$ . La flèche rouge correspond à la réduction du sulfate : réduction dissimilative microbienne ou thermochimique. Les flèches bleues foncées représentent la réduction microbienne du  $Fe(III)$  et du  $S^{\circ}$ . Les flèches bleues claires correspondent à la réduction du  $Fe(III)$  par l' $H_2S$ . La flèche grise correspond à l'apport d' $H_2S$  par le fluide hydrothermal. Les flèches noires correspondent à la précipitation du  $FeS$  entre le  $Fe(II)$  et l' $H_2S$ .

Dans les écosystèmes hydrothermaux, les micro-organismes sulfo-oxydant, sous forme libre ou en associations symbiotiques, occupent un rôle écologique important. En effet, beaucoup de ces procaryotes sulfo-oxydant sont chimiolithotrophes ; et l'oxydation de composés soufrés réduits est, dans le biotope hydrothermal, l'une des principales réactions de production d'énergie nécessaire à la fixation du  $CO_2$ . Parmi les procaryotes sulfo-oxydant connus, certains vivent en associations symbiotiques avec des métazoaires invertébrés hydrothermaux tels que le polychète *Riftia pachyptila* ou les bivalves *Bathymodiolus thermophilus* ou *B. azoricus* et *Calyptogena magnifica*; et sont nommés symbiontes thiotrophes (Arndt et al. 2001; Duperron et al. 2006).

Des bactéries filamenteuses sulfo-oxydantes telles que les *Beggiatoa sp.*, les *Thiotrix sp.* ou les *Thiomicrospira sp.*, appartenant à l'ordre des *Thiotrichales* (*Gammaproteobacteria*), s'établissent aux interfaces oxiques-anoxiques, selon leur gradient préférentiel entre l'oxygène et les sulfures dissous, où elles forment d'épais tapis microbiens à la surface de substrats (cheminées hydrothermales,



sédiments, coquilles de bivalves) (Ruby et al. 1981; Jørgensen and Revsbech 1983; Nelson et al. 1986; Nelson et al. 1989; McHatton et al. 1996; Preisler et al. 2007; McKay et al. 2012). Ces procaryotes oxydent, en deux étapes, les sulfures dissous en sulfate en utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électron en aérobiose. La première étape consiste à oxyder les sulfures en soufre élémentaire (qui sera stocké dans la cellule sous forme de globules); la seconde consiste à oxyder le soufre élémentaire en sulfates (Preisler et al. 2007). Ces micro-organismes sont aussi capables de vivre en anaérobiose; dans ces conditions l'oxydation des sulfures est couplée à la réduction des nitrates (McHatton et al. 1996; Preisler et al. 2007).

Des micro-organismes mésophiles sulfo-oxydants ont aussi été isolés d'édifices hydrothermaux actifs. Parmi eux, certaines *Epsilonproteobacteria*, oxydent le soufre et le thiosulfate en aérobiose ou en anaérobiose. Ainsi, *Sulfurimonas autotrophica* utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons (Inagaki et al. 2003), *Sulfurimonas paralvinellae*, anaérobie facultative, utilise l'oxygène ou les nitrates (Takai et al. 2006) tout comme *Sulfurovum lithitrophicum* qui est microaérophile (Inagaki et al. 2004). Des *Gammaproteobacteria* comme des espèces appartenant au genre *Thiomicrospira*; ainsi que la *Betaproteobacteria Thiobacillus hydrothermalis*, sont aussi capable d'oxyder en aérobiose le soufre élémentaire, le thiosulfate ou des sulfures (Ruby and Jannasch 1982; Jannasch et al. 1985; Durand et al. 1993; Wirsen et al. 1998; Takai et al. 2004).

De même, trois espèces de *Bacteria* thermophiles ont été isolées à ce jour de cheminées hydrothermales actives. L'une d'entre elles est une *Alphaproteobacteria*: *Piezobacter thermophilus* (température optimale 50°C), capable d'oxyder, avec l'oxygène ou des nitrates, une large gamme de composés soufrés: du soufre élémentaire, du thiosulfate-, de la cysteine, du tétrathionate et du sulfite. Les deux autres appartiennent à l'ordre des Aquificales: *Persephonella guaymasensis* et *Persephonella marina* (Gotz et al. 2002). Toutes deux sont microaérophiles (température optimale 70°C), capables d'oxyder le soufre élémentaire et le thiosulfate.

#### **2.1.2.2. Réduction des sulfates**

En contexte hydrothermal ainsi que dans tout système diagénétique à haute température (sédiments), une réduction abiotique dite thermochimique du sulfate peut avoir lieu (Machel et al. 1995; Machel 2001). Cette réaction, se déroule à des températures comprises entre 100 et 140°C voire parfois à 160-180°C (Figure I-6).

La réduction assimilative du sulfate permet aux micro-organismes d'assimiler le soufre organique produit sous forme de groupement sulfhydryle (R-SH) dans des acides aminés soufrés (Rabus et al. 2006) (Figure I-6). Cette réduction a lieu en aérobiose et en anaérobiose et ne

réduit qu'une partie du pool d'accepteurs d'électrons pour satisfaire les besoins cellulaires et ne produit donc que de petites quantités d'H<sub>2</sub>S.

Contrairement à l'assimilation, la réduction dissimilative du sulfate ou respiration anaérobie des sulfates a lieu uniquement en anaérobiose et conduit à la réduction d'une grande partie du pool d'accepteurs d'électrons et donc produit beaucoup d'H<sub>2</sub>S qui sera expulsé hors de la cellule. Cet H<sub>2</sub>S produit, avec celui contenu dans le fluide hydrothermal, sont impliqués dans de nombreuses réactions biogéochimiques telles que la précipitation du Fe(II), du Mn(II), du Cu<sup>2+</sup>, du Zn<sup>2+</sup>, oxydation chimique ou microbienne, réduction du Fe(III) etc... (Figure I-7).

Dans les écosystèmes hydrothermaux, les micro-organismes, *Bacteria* et *Archaea*, sulfato-réducteurs sont principalement mésophiles et thermophiles. Chez les *Bacteria*, les sulfato-réducteurs appartiennent aux *Thermodesulfobacteria* (genres : *Thermodesulfobacterium* (Jeanthon et al. 2002) et *Thermodesulfatator* (Moussard et al. 2004; Alain et al. 2010) et aux *Deltaproteobacteria* (avec les genres : *Desulfovibrio* (Alazard et al. 2003), *Desulfonauticus* (Audiffren et al. 2003), *Desulfothermus* (Rueter et al. 1994)). Chez les *Archaea*, ils sont tous thermophiles et appartiennent principalement au *Archaeoglobales* avec les espèces du genre *Archaeoglobus* (*Archaeoglobus profundus* (Burggraf et al. 1990), *A. veneficus* (Huber et al. 1997) et *A. infectus* (Mori et al. 2008)) mais également aux *Thermococcales*, ordre au sein duquel l'espèce *Palaeococcus pacificus*, capable de réduire les sulfates, a récemment été isolée de sédiments hydrothermaux du Pacifique (Zeng et al. 2012). Certains de ces procaryotes sont capables de croître en chimiolithotrophie utilisant l'H<sub>2</sub> comme donneur d'électrons comme *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* (Jeanthon et al. 2002), *Thermodesulfatator indicus* (Moussard et al. 2004) ou *T. atlanticus* (Alain et al. 2010). D'autres sont chimioorganotrophes utilisant des composés organiques (ex hydrocarbures) comme sources d'énergie tel que *Desulfothermus naphthae* souche TD3 (Rueter et al. 1994). Certaines comme *Desulfovibrio hydrothermalis* (Alazard et al. 2003) ou *Desulfonautilus submarinus* (Audiffren et al. 2003) sont mixotrophes. Certaines souches parmi lesquelles des *Deltaproteobacteria*, sont aussi capables d'utiliser le thiosulfate, le sulfite ou le soufre élémentaire comme accepteur terminal d'électrons. Aussi, chez les *Deltaproteobacteria*, deux groupes ont été distingués : celles du groupe I qui oxydent leur donneur d'électrons (lactate, éthanol...) jusqu'à l'acétate et celles du groupe II qui oxyde leur source d'énergie (succinate, acétate...) jusqu'au CO<sub>2</sub> (Widdel and Hanson 1992; Rabus et al. 2006).

### 2.1.2.3. Réduction du soufre

En contexte hydrothermal, la réduction du soufre est un métabolisme anaérobie et le produit final de cette réaction est l' $H_2S$  (Figure I-6) (qui, comme celui provenant de la réduction dissimilative du sulfate et du fluide hydrothermal, peut participer à des processus géochimiques, Figure I-7). Beaucoup d'espèces de micro-organismes décrites, peuvent réduire le soufre élémentaire en  $H_2S$ . Parmi eux, deux groupes de micro-organismes sulfo-réducteurs ont été différenciés :

- **Les chimiolithotrophes**, pour lesquels le soufre sert d'accepteur terminal d'électrons. Ces procaryotes, aux métabolismes variés, sont aussi capables de réduire d'autres composés comme les nitrates ou le fer ferrique. Dans les écosystèmes hydrothermaux, les procaryotes sulfo-réducteurs sont rencontrés dans différentes niches écologiques (mésophiles à (hyper)thermophiles), chez les *Archaea* mais surtout chez *Bacteria* où ils sont répartis dans différents groupes. Ainsi les bactéries sulfo-réducteurs mésophiles appartiennent principalement au groupe des *Epsilonproteobacteria* (et aux genres *Thioreductor* (Nakagawa et al. 2005) et *Thiofractor* (Makita et al. 2012)) ; tandis que les (hyper)thermophiles sont distribués au sein : des *Aquificales* (aux genres : *Phorcysia* (Pérez-Rodríguez et al. 2011), *Thermosulfidibacter* (Nunoura et al. 2008)), des *Desulfobacteriales* (aux *Desulfurobacterium* (L'Haridon et al. 1998; Alain et al. 2003), *Balnearium* (Takai et al. 2003) et *Thermovibrio* (L'Haridon et al. 2006)), des *Acidobacteria* (*Thermotomaculum hydrothermale* (Izumi et al. 2012)), des *Deferribacteres* (Miroshnichenko et al. 2003; Takai et al. 2003; Slobodkina et al. 2009) , des *Deltaproteobacteria* (*Deferrisoma camini* (Slobodkina et al. 2011)) et des *Epsilonproteobacteria* (appartenant aux genres *Caminiibacter* (Alain et al. 2002), *Nautilia* (Miroshnichenko et al. 2002) et *Lebetimonas* (Takai et al. 2005)).

Chez les *Archaea*, c'est dans le phylum des Crenarchaeota, que les sulfo-réducteurs hyperthermophiles ont principalement été isolés, notamment au sein des *Desulfurococcus* (Jannasch et al. 1988), des *Ignicoccus* (Huber et al. 2000), des *Staphylothermus* (Fiala et al. 1986) et des *Pyrodictium* (Pley et al. 1991). Au sein des *Euryarchaeota*, *Aciduliprofundum boonei*, appartenant aux DHVE2, est aussi capable de sulfo-réduction à haute température (Reysenbach et al. 2006).

- **Les organotrophes fermentaires**, pour lesquels le soufre sert à oxyder l'hydrogène, produit lors de la fermentation, en  $H_2S$ . En règle générale, la réduction du soufre ne leur est pas indispensable, cependant, elle stimule fréquemment leur croissance. Ceci concerne les *Thermococcales* (Godfroy et al. 1996; Godfroy et al. 1997; Canganella et al.

1998; Jolivet et al. 2004) et les *Thermotogales* (Wery et al. 2001; Alain et al. 2002; Postec et al. 2005). Toutefois, certaines *Thermotogales* sont capable de réduire le thiosulfate (Ravot et al. 1995) ou le fer ferrique (Vargas et al. 1998; Slobodkin et al. 2001).

### 2.1.3. Dismutation du soufre (du thiosulfate et des sulfites)

La dismutation, ou disproportionation, consiste en la séparation d'un composé initial en deux autres composés : l'un plus réduit et l'autre plus oxydé que le composé initial. Dans le cas des composés soufrés : le soufre élémentaire, le thiosulfate et les sulfites peuvent être oxydés en sulfate et réduits en sulfure (H<sub>2</sub>S) lors de leur dismutation par des micro-organismes (Figure I-6). Ce n'est que très récemment que les deux premières souches réalisant la disproportionation du soufre à haute température ont été isolées, de cheminées hydrothermales. Ces deux souches sont des *Bacteria*, l'une : *Thermosulfurimonas dismutans*, qui appartient à l'ordre des *Thermodesulfobacteria*, dismute uniquement le soufre (Slobodkin et al. 2011) ; et l'autre *Dissulfuribacter thermophilus*, affiliée au *Deltaproteobacteria*, est capable de dismuter le soufre élémentaire, le thiosulfate et les sulfites (Slobodkin et al. 2012).

#### 2.1.3.1. Isotopie du soufre

Le soufre possède quatre isotopes stables : le <sup>32</sup>S, le <sup>33</sup>S, le <sup>34</sup>S et le <sup>36</sup>S. Le <sup>32</sup>S est le plus abondant (94,93%), ensuite vient le <sup>34</sup>S, représentant 4,29% des isotopes du soufre, puis le <sup>33</sup>S (0,76%) et enfin le <sup>36</sup>S (0,02%). Les variations isotopiques du soufre sont exprimées selon l'équation suivante :

$$\delta^xS = \left( \frac{[^xS/^{32}S]_{\text{de l'échantillon}}}{[^xS/^{32}S]_{\text{référence (VCDT)}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ (‰)}$$

où <sup>x</sup>S correspond au <sup>33</sup>, <sup>34</sup> ou <sup>36</sup>S.

Le système isotopique du soufre dit traditionnel s'est surtout focalisé sur les isotopes du <sup>32</sup>S et <sup>34</sup>S. A l'équilibre, la distribution des isotopes du soufre dans un composé est déterminée par la différence de masse relative de chaque isotope selon :  $\delta^{33}S \approx 0,52 \times \delta^{34}S$  et  $\delta^{36}S \approx 1,9 \times \delta^{34}S$  (Hulston and Thode 1965; Ono et al. 2006). Cependant, ces dernières décennies, le développement des méthodes d'analyses basées sur l'utilisation des isotopes multiple du soufre (le <sup>32</sup>S, <sup>33</sup>S, <sup>34</sup>S et le <sup>36</sup>S), a mis en évidence que le fractionnement isotopique dépendant de la masse, pouvait suivre différentes lois de fractionnement de masse qui décrivent différentes relations dans un diagramme  $\delta^{34}S$ -  $\delta^{34}S$  (Farquhar et al. 2003; Ono et al. 2006). A noter que ce type de variations ne correspond donc pas aux processus de fractionnement isotopique indépendant de la masse qui ont été observés dans certains cas pour les isotopes du soufre (Farquhar et al., 2000). Ainsi, par exemple, Farquhar et collaborateurs

(Farquhar et al. 2003) et Johnston et collaborateur (Johnston et al. 2005) ont montré que lors de métabolismes microbiens : sulfato-réduction et dismutation du sulfite, le fractionnement dépendant de la masse mesurée était différent du fractionnement théoriquement attendu, tel que  $^{33}\alpha = ^{34}\alpha^{0,512}$  au lieu de  $^{33}\alpha = ^{34}\alpha^{0,515}$  ( $\alpha$  correspond au facteur de fractionnement entre deux réservoir A et B :  $^x\alpha = ^xR_A/^xR_B$ ). Ono et collaborateurs en 2006 (Ono et al. 2006), ont montré dans des échantillons naturels ayant le même  $\delta^{34}\text{S}$ , des variations entre le  $\Delta^{33}\text{S}$  et le  $\Delta^{36}\text{S}$  (avec  $\Delta^{33}\text{S} = \delta^{33}\text{S} - 0,515 \times \delta^{34}\text{S}$  et  $\Delta^{36}\text{S} = \delta^{36}\text{S} - 1,90 \times \delta^{34}\text{S}$ ). Ces types de variations ont ainsi permis de mettre en évidence l'existence de processus microbiens (réduction de sulfates) lors de l'altération de la croûte océanique (Rouxel et al., 2008).

Les études précédentes menées en laboratoire ont confirmé (Farquhar et al. 2003; Johnston et al. 2005), que l'utilisation des isotopes multiples du soufre est un outil puissant pour étudier les voies métaboliques de réductions du sulfate et de dismutation du soufre et donc les métabolismes microbiens basés sur le cycle du soufre. Aussi, grâce à l'utilisation des isotopes multiples du soufre, il est possible, pour une même valeur de  $\delta^{34}\text{S}$ , de discriminer des signatures isotopiques de différents métabolismes du soufre (Ono et al. 2006), ou de différentes souches microbiennes.

La variabilité du facteur de fractionnement ( $\epsilon$ ) est due à plusieurs facteurs tels que (Detmers et al. 2001; Habicht et al. 2005; Canfield et al. 2006) (Tableau I-3):

- la température
- la source de carbone
- la source et la concentration du donneur d'électron et s'il est complètement oxydé en  $\text{CO}_2$  ou non, par exemple la disponibilité en  $\text{H}_2$  : pour de faibles débits en  $\text{H}_2$ , le fractionnement est plus important que pour de plus importants débits (Hoek et al. 2006)
- la concentration en sulfate
- le csSRR (taux de réduction des sulfates par cellule) qui dépend généralement de la température et des conditions de cultures
- la souche microbienne

**Tableau I-3:** Tableau comparant les facteurs de fractionnement ( $\epsilon$ ) en fonction de la souche microbienne, du taux de réduction des sulfates par cellules, du donneur d'électrons et de sa concentration de Detmers et al, 2001 (Detmers et al. 2001).

Microorganism	Isolated from:	Electron donor(mM)	csSRR(fmol/cell/day)	$\epsilon$ (‰)
<b>Complete oxidizing</b>				
<i>Desulfonema magnum</i>	Marine mud	Benzoate (3)	5.9	42.0
<i>Desulfobacula phenolica</i>	Marine mud	Benzoate (3)	125.0	36.7
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	Marine mud	Butyrate (20)	64.8	32.7
<i>Desulfobacula toluolica</i>	Marine mud	Benzoate (3)	40.3	28.5
<i>Desulfotomaculum gibsoniae</i>	Freshwater mud	Butyrate (20)	13.0	27.8
<i>Desulfospira joergensenii</i>	Marine mud	Pyruvate (20)	0.9	25.7
" <i>Desulfarculus baarsii</i> "	Lake mud	Butyrate (20)	11.5	23.2
<i>Desulfotignum balticum</i>	Marine mud	Butyrate (20)	4.2	23.1
<i>Desulfofrigus oceanense</i>	Arctic sediment	Acetate (20)	7.6	22.0
<i>Desulfobacter</i> sp. ASv20	Arctic sediment	Acetate (20)	6.6	18.8
<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	Anaerobic sludge	Acetate (20)	17.0	18.0
<i>Desulfococcus</i> sp.	Marine mud	Pyruvate (20)	41.8	16.1
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	Marine mud	Benzoate (3)	11.1	15.0
<b>Incomplete oxidizing</b>				
<i>Desulfonatronum lacustre</i>	Alkaline lake mud	Ethanol (20)	16.2	18.7
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> strain Z †	Submarine hot spring	Lactate (20)	63.8	17.0
<i>Thermodesulfobivrio yellowstonii</i>	Thermal vent water	Lactate (20)	24.0	17.0
" <i>Desulfobotulus sapovorans</i> "	Freshwater mud	Lactate (20)	26.0	16.5
<i>Desulfotomaculum thermocisternum</i>	Oil reservoir	Lactate (20)	310.0	15.0
<i>Desulfomicrobium baculatum</i>	Manganese ore	Lactate (20)	4.8	12.7
<i>Desulfotomaculum geothermicum</i>	Aquifer	Lactate (20)	8.1	12.5
<i>Desulfohalobium redbaense</i>	Saline sediment	Lactate (20)	434.0	10.6
<i>Desulfocella halophila</i>	Great salt lake	Pyruvate (20)	10.2	8.1
<i>Desulfobulbus "marinus"</i>	Marine mud	Propionate (20)	28.9	6.8
<i>Desulfotalea arctica</i>	Arctic sediment	Lactate (20)	4.2	6.1
<i>Desulfobulbus elongatus</i>	Digester	Propionate (20)	35.3	5.5
<i>Desulfobivrio</i> sp. strain X	Hydrothermal vent	Lactate (20)	36.0	5.4
<i>Thermodesulfobacterium commune</i>	Thermal spring	Lactate (20)	45.4	5.0
" <i>Desulfobivrio oxyclinae</i> "	Hypersaline mat	Lactate (20)	69.1	4.5
<i>Desulfotalea psychrophila</i>	Arctic sediment	Lactate (20)	6.3	4.3
<i>Desulfobivrio profundus</i>	Deep sea sediment	Lactate (20)	17.0	4.1
<i>Desulfobivrio halophilus</i>	Hypersaline microbial mat	Lactate (20)	33.1	2.0
<b>Hydrogen and formate</b>				
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	Marine mud	H <sub>2</sub> (10 <sup>5</sup> Pa)	34.8	14.0
<i>Desulfonatronovibrio hydrogenovorans</i>	Lake mud	Formate (20)	12.7	5.5

†correspond aux souches thermophiles

## 2.2. Cycle du Fer

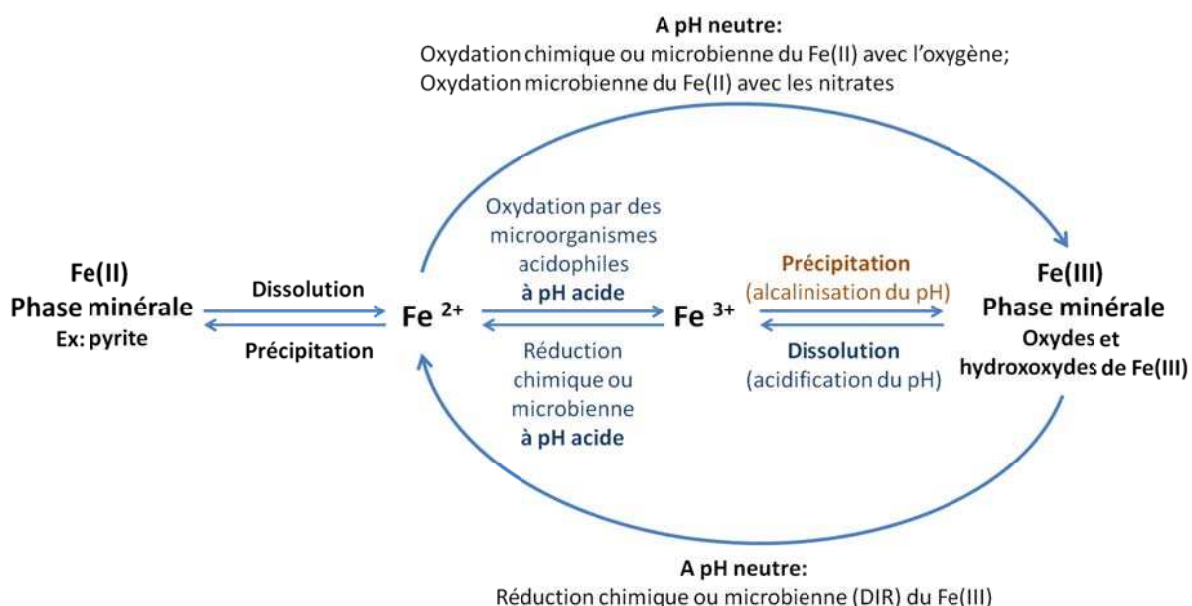
Le fer (Fe) est le quatrième élément le plus abondant sur Terre (après O, Si, Al) et le métal le plus important dans les écosystèmes redox actifs au niveau des interfaces eau-environnements de subsurface, (Edwards et al. 2004). Composant essentiel de certaines métallo-enzymes, cofacteurs ou protéines tels que : les protéines fer-soufre ou [ferredoxines], , cytochromes, nitrogénases, hydrogénases, catalases, peroxydase ou des oxygénases (Konhauser et al. 2011); le fer, fait partie des éléments indispensables à la vie. Ces métallo-protéines et cofacteurs étant présents à la fois chez les procaryotes vivant en aérobie et en anaérobie, le fer est donc aussi un élément essentiel des métabolismes aérobie et anaérobie. Au-delà du métabolisme assimilatif, le fer est par ailleurs impliqué dans les métabolismes énergétiques en tant que donneur ou accepteur d'électrons.

### 2.2.1. Réservoir du fer en contexte hydrothermal

En contexte hydrothermal, le fer ferreux se rencontre essentiellement sous forme dissoute dans les fluides hydrothermaux, ou sous forme solide, dans les minéraux constitutifs des édifices hydrothermaux : pyrite, chalcopryrite, marcasite ou pyrrhotite. Dans les sédiments, différentes formes intermédiaires de sulfures de fer peuvent être présentes, tels que la mackinawite, greigite, pyrrhotite et pyrite. Dans de rares cas, des carbonates de Fe(II) (sidérite) et minéraux mixtes Fe(II)Fe(III) (magnetite) peuvent être observés dans les minéralisations hydrothermales. Le fer ferrique Fe(III), quant à lui sera rencontré sous forme minérale dans les cheminées : oxyde-hydroxyde de fer, ferrihydrite, goethite, hématite. Dans les sédiments hydrothermaux ou roches volcaniques, une grande variété de minéraux alumino-silicatés riches en Fe(II)-Fe(III) peut être observée, tels que les smectites (nontronite, saponite) ou micas (celadonite).

### 2.2.2. Géochimie et métabolismes microbiens du fer

Le fer existe naturellement à deux niveaux d'oxydation dans les systèmes naturels de surface: le fer ferreux ou Fe(II) et le fer ferrique ou Fe(III). La réduction du fer ferreux et l'oxydation du fer ferrique peuvent se faire à la fois en condition biologique (réduction et oxydation microbienne) et en condition abiotique ou chimique (Figure I-8).



**Figure I-8 :** Cycle biogéochimique du Fer modifié d'après Kapler et Staub, 2005 et Taylor et Konhauser, 2011 (Kappler and Straub 2005; Taylor and Konhauser 2011) ; DIR signifie Dissimilatory Iron reduction ou réduction dissimilative du Fe(III)

### 1.1.1.1.1. Oxydation et précipitation du fer ferreux

A des pH proches de la neutralité, en aérobiose, le fer ferreux est instable et est rapidement oxydé chimiquement par l'oxygène: il est si rapidement oxydé de façon abiotique, que les microorganismes ne peuvent rivaliser (Taylor and Konhauser 2011). A des pH plus acides, la stabilité du Fe(II) augmente et est ainsi plus disponible pour les microorganismes. A des pH inférieurs à 4, le Fe(II) se trouve principalement sous forme dissoute. Le Fe(II) étant rapidement oxydé chimiquement à pH neutre par l'oxygène, les microorganismes oxydant le Fe(II) sont trouvés essentiellement dans des milieux acides (cas des acidophiles tel *Acidithiobacillus ferroxidans*), dans des zones de faible concentration d'oxygène (microaérophile, tel *Mariprofundus ferrooxydans*) ou en anaérobiose (tel *Ferroglobus placidus*)(Druschel et al. 2008; Konhauser et al. 2011). En effet, dans les deux premières conditions, la cinétique de l'oxydation abiotique est très lente laissant la possibilité aux microorganismes d'exploiter cette voie métabolique pour leur croissance (Konhauser et al. 2011). Cependant, l'oxydation du Fe(II) génère peu d'énergie : les procaryotes utilisant ce métabolisme doivent donc oxyder de grande quantité de fer ferreux pour leur croissance. Classiquement à pH neutre et à pH acide, le fer ferreux peut être utilisé par les procaryotes comme donneur d'électrons en aérobiose : dans ce cas, l'accepteur terminal d'électrons sera l'oxygène ; ou en anaérobiose, dans ce cas, les accepteurs d'électrons seront les nitrates (Figure I-8).

En contexte hydrothermal, deux processus abiotiques impliquant le Fe(II) se produisent :

- le premier a lieu immédiatement à la sortie du fluide hydrothermal, le Fe(II) ainsi que d'autres éléments chalcophiles vont co-précipiter et former des sulfures (poly)métalliques ; ainsi, en présence d'H<sub>2</sub>S, le fer ferreux va rapidement précipiter sous la forme d'un précipité insoluble de FeS (Vazquez G et al. 1989; Rickard 1995; Breier et al. 2012) (Figure I-7) ;

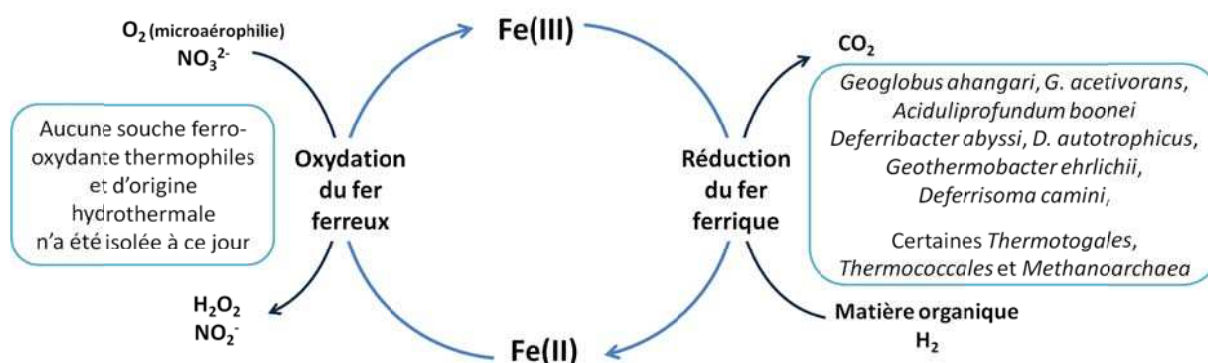
- le second, a lieu lors du mélange entre le fluide hydrothermal réduit et l'eau de mer ambiante et oxygénée, conduisant à l'oxydation du Fe(II) et à la formation de précipités d'oxyde-hydroxyde de fer (ou Fe(III)) (Statham et al. 2005; Breier et al. 2012).

D'un autre côté, *via* des processus d'altération abiotique (eau de mer, réaction chimique) (Staudigel and Hart 1983; Wheat and Mottl 2000) et/ou microbien (Bach and Edwards 2003; Rouxel et al. 2003), certain minéraux contenant du Fe(II) peuvent être altérés et ainsi libérer du fer ferreux. Ce phénomène est connu notamment au niveau des basaltes de la croûte océanique.



A ce jour, une seule *Archaea* hyperthermophile (optimum 85°C) anaérobie et neutrophile, *Ferroglobus placidus*<sup>3</sup>, isolée d'une source hydrothermale côtière en Italie est connue pour être capable d'oxyder le fer ferreux en utilisant les nitrates comme accepteur d'électrons (Hafenbradl et al. 1996). A de plus faibles températures (entre 10 et 30°C), Emerson et al ont isolé d'un tapis riche en fer du volcan sous marin Loihi, une bactérie ferro-oxydante : *Mariprofundus ferrooxydans PV-1*, première représentante du nouveau groupe des *Zetaproteobacteria* (Emerson and Moyer 2002; Emerson et al. 2007). Elle est capable d'oxyder le Fe(II) en micro-aérophilie et à pH neutre.

Des séquences affiliés à *Ferroglobus placidus* ont aussi été détectées dans des échantillons issus d'un module de colonisation (vent cap) déployé pendant 5 jours au niveau d'un édifice hydrothermal du site Snake Pit sur la dorsale médio-atlantique (Reysenbach et al. 2000). Des séquences affiliées aux *Zetaproteobacteria* ont également été trouvées dans les sédiments hydrothermaux du Bassin de Guaymas (Dhillon et al. 2003) ; dans des sédiments hydrothermaux des Tonga (Forget et al. 2010), dans des tapis microbiens d'édifices hydrothermaux des Mariannes (Kato et al. 2009) ou encore dans les zones riches en fer du volcan sous-marin Loihi (Rassa et al. 2009; Singer et al. 2013). Des études récentes ont également mis en évidence la présence de *Zetaproteobacteria* associée à des dépôts d'oxyde de fer, dans la cavité branchiale de la crevette *Rimicaris exoculata* (Jan 2012) (Jan et al., 2013 soumis). Toutefois, malgré leur présence dans les banques de clone d'environnements hydrothermaux, aucun micro-organisme ferro-oxydant thermophile n'a été isolé à ce jour (Figure I-9).



**Figure I-9 :** Cycle du Fer et souches (hyper)thermophiles isolées d'environnements hydrothermaux, impliqués dans ce cycle.

<sup>3</sup> D'autres études ont démontré que *Ferroglobus placidus* est également capable de réduire le fer ferrique **Tor, J. M., K. Kashefi and D. R. Lovley** (2001). Acetate oxidation coupled to Fe(III) reduction in hyperthermophilic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(3): 1363-1365.

### 2.2.2.2. Réduction du fer ferrique

La réduction du fer ferrique est un processus anaérobie pouvant être réalisé lors de processus abiotiques ou microbiens, à pH neutre ou acide (**Figure I-X**). En milieu hydrothermal, le Fe(III) peut être réduit de façon abiotique par l'H<sub>2</sub>S (issu du fluide hydrothermal ou de processus microbien) (Coleman et al. 1993; Yao and Millero 1996; Poulton et al. 2002; Weber et al. 2006). Il a aussi été démontré, hors contexte hydrothermal, que la matière organique, les acides humiques (en l'absence de processus microbien) pouvaient réduire le fer ferrique et que le taux de réduction est pH-dépendant (il est plus élevé à des pH acides)(Chen et al. 2003).

Le potentiel d'oxydo-réduction du couple Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> est électropositif : à pH 7 ; le E<sub>0</sub>' est de +0.2V. En conséquence, la réduction dissimilative du Fe(III) (ou DIR) peut être couplée à l'oxydation de nombreux donneurs d'électrons organiques : acides organiques courts, à longues chaînes ou aromatiques, des composés peptiques, ... ou inorganiques : H<sub>2</sub>. Ainsi, en condition anoxique, la réduction dissimilative du Fe(III) est énergétiquement favorable.

Dans les habitats hydrothermaux, les dépôts de Fe(III), en particulier d'oxyde-hydroxyde de fer, proviennent de l'oxydation du fer ferreux par l'eau de mer. Les microorganismes capables d'utiliser le fer ferrique comme accepteur d'électrons appartiennent à la fois au domaine des *Archaea* et des *Bacteria* et sont répartis au sein de ces domaines dans différents groupes phylogénétiques. Ces procaryotes sont chimioorganotrophes capables d'oxyder différentes molécules organiques telles que : des acides organiques à plus ou moins longue chaîne (acétate, pyruvate, formate, butyrate, propionate), des sucres (maltose, fructose, amidon), des composés peptidiques (peptone, tryptone, alanine, arginine, glutamine histidine) ou des alcools (éthanol, méthanol, isopropanol);et/ou chimioolithotrophes oxydant le dihydrogène. Parmi les quatre *Bacteria* thermophiles isolées de cheminées hydrothermales et formellement décrites, deux appartiennent au *Deferribacteres* : *Deferribacter abyssi* (Miroshnichenko et al. 2003) et *D. autotrophicus* (Slobodkina et al. 2009) ; quant aux deux autres ce sont des *Deltaproteobacteria* : *Geothermobacter erhlichii* (Kashefi et al. 2003) et *Deferrisoma camini* (Slobodkina et al. 2011) (Figure I-9). La capacité des *Thermotogales*, à réduire le Fe(III) a également été mise en évidence notamment chez *Thermotoga maritima* (Vargas et al. 1998) et chez d'autres espèces (Slobodkin et al. 2001). Au sein des *Archaea* (hyper)thermophiles, seules deux souches appartenant à l'ordre des *Archaeoglobales* : *Geoglobus ahangari* (Kashefi et al. 2002) et *G. acetivorans* (Slobodkina et al. 2009) ainsi qu'une souche affiliée aux DHVE2 : *Aciduliprofundum boonei* (Reysenbach et al. 2006); sont capables d'utiliser seulement le

fer ferrique comme accepteurs d'électrons. *Ferroglobus placidus*<sup>4</sup>, quant à elle est aussi capable d'oxyder l'acétate ou certains composés aromatiques (benzoate, phénol) en CO<sub>2</sub>, en utilisant comme seul accepteur d'électrons le fer ferrique (Tor et al. 2001; Tor and Lovley 2001). Il a aussi été démontré que certaines *Thermococcales*, des souches appartenant au genre *Thermococcus* dont la souche PK, sont capables de réduire le fer ferrique (Slobodkin et al. 1999; Slobodkin et al. 2001; Davidova et al. 2012). D'autre part, certaine *Methanoarchaea* telles que *Methanopyrus kandleri*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanococcus voltaei* ou encore *Methanococcus thermolithotrophicus* sont aussi capables de réduire le Fe(III) (Vargas et al. 1998; Bond and Lovley 2002; van Bodegom et al. 2004) (Figure I-9).

A part des séquences affiliées aux DHVE2, très peu de séquences affiliées à ces espèces ou genres connus pour réduire le Fe(III) ont été détectées dans des échantillons hydrothermaux.

### 2.2.3. Isotopie du fer

Le fer est constitué de quatre isotopes stables : le <sup>54</sup>Fe abondant à 5,84%, le <sup>56</sup>Fe le plus abondant à 91,76%, le <sup>57</sup>Fe dont l'abondance est de 2,12% et le moins abondant, le <sup>58</sup>Fe à 0,28% (Anbar and Rouxel 2007; Johnson et al. 2008). Classiquement, ce sont les isotopes <sup>56</sup>Fe et <sup>54</sup>Fe qui sont utilisés pour mesurer les variations isotopiques selon l'équation suivante :

$$\delta^{56}\text{Fe} = \left( \frac{^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}_{\text{de l'échantillon}}}{^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}_{\text{IRMM-014}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ (‰)}$$

Ce système isotopique est qualifié de « non traditionnel » et est caractérisé par des variations de composition isotopique relativement faible en comparaison de celui des isotopes stables dits « traditionnels » tels les isotopes stables de l'oxygène, du carbone, de l'azote, de l'hydrogène et du soufre. Ainsi, la mesure isotopique du fer est relativement récente (milieu des années 1990) et n'est réellement possible que depuis la mise au point de nouvelles générations d'outils de mesures comme les MC-ICP-MS<sup>5</sup>. Depuis ces dix dernières années, les isotopes du Fe ont été très utilisés dans différentes études : systèmes biologiques et organismes, différenciation du système solaire ou encore traçage de son cycle biogéochimique dans les environnements marins modernes et anciens (réactions biologiques et abiotiques, changement redox) (Anbar and Rouxel 2007; Johnson et al.

<sup>4</sup> Initialement décrite comme une Archaea couplant l'oxydation du fer ferreux à la réduction des nitrates **Hafenbradl, D., M. Keller, R. Dirmeier, R. Rachel, P. Rosnagel, S. Burggraf, H. Huber and K. O. Stetter** (1996). *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe<sup>2+</sup> at neutral pH under anoxic conditions. *Archives of Microbiology* **166**(5): 308-314.

<sup>5</sup> Multi-Collector Inductively Coupled Mass Spectrometer

2008). C'est aussi depuis les années 2000, que les isotopes du Fe sont considérés comme des bio-signatures potentiels des écosystèmes microbiens naturels (Beard et al. 2003).

Les expériences réalisées en laboratoire avec de la ferrihydrite en condition biologique avec des cultures de micro-organismes qui réalisent la réduction dissimilative du Fe(III) montrent, une production de Fe(II) et un  $\delta^{56}\text{Fe}$  du Fe(II) produit différent de celui de la ferrihydrite (Tableau I-4).

**Tableau I-4:** Tableau comparant les valeurs de  $\delta^{56}\text{Fe}$  du Fe(II) en fonction des réactions abiotiques et métabolismes microbiens d'après Dauphas et Rouxel 2006 (Dauphas and Rouxel 2006).

Species	Reactions	$\delta^{56}\text{Fe}$	References
<b>Aqueous species fractionation factor</b>			
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Fe(III)}_{\text{aq}}$	Abiotic oxidation 22C (equilibrium)	-2.9 +/- 0.2	Welch et al. (2003)
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Fe(II)} > \text{Fe(III)-oxides}$	Abiotic adsorption	-0.8	Teutsch et al. (2005)
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Fe(II)} > \text{Fe(III)-oxides}$	Abiotic adsorption	-2.1	Icopini et al. (2004)
		(calculated)	
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Fe(II)} > \text{Fe(III)-oxides}$	Adsorption in DIR experiment	-0.9 to -0.4	Crosby et al. (2005)
$\text{Fe(III)}_{\text{aq}} - ([\text{Fe}(\text{bipy})_3]^{2+})$	Ligand dissociation (kinetic)	-1.7 to -11.7	Matthews et al. (2001)
<b>Fluid-mineral fractionation factor during mineral precipitation</b>			
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Fe(III)-oxides}$	Abiotic precipitation (kinetic)	-0.9 +/- 0.2	Bullen et al. (2001)
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Fe}_3\text{O}_4$ (magnetite)	Dissimilatory Fe reduction (kinetic)	-1.3 +/- 0.1	Johnson et al. (2005)
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{FeCO}_3$ (siderite)	Abiotic precipitation (equilibrium)	0.4 to 0.6	Wiesli et al. (2004)
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{FeCO}_3$ (siderite)	Dissimilatory Fe reduction (kinetic)	0.0 +/- 0.1	Johnson et al. (2005)
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{FeS}$ (greigite)	Abiotic precipitation (kinetic)	0.9 to 0.2	Butler et al. (2005)
$\text{Fe(III)}_{\text{aq}} - \text{Fe}_2\text{O}_3$ (hematite)	Abiotic precipitation (equilibrium)	0.1 +/- 0.2	Skulan et al. (2002)
$\text{Fe(III)}_{\text{aq}} - \text{Fe}_2\text{O}_3$ (hematite)	Abiotic precipitation (kinetic)	Up to 0.8	Skulan et al. (2002)
<b>Fluid-mineral fractionation factor during Fe(III) reduction</b>			
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Fe(III)-oxides}$	Dissimilatory Fe reduction (kinetic)	-2.6 to -1.3	Beard et al. (1999, 2003); Johnson et al. (2005)
<b>Fluid-mineral fractionation factor during Fe(II) oxidation</b>			
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Fe(III)-oxides}$	Photosynthetic Fe oxidation	-1.5 +/- 0.2	Croal et al. (2004)
$\text{Fe(II)}_{\text{aq}} - \text{Fe(III)-oxides}$	Abiotic Fe oxidation	-0.9 +/- 0.2	Bullen et al. (2001)

Il est maintenant bien établi que les isotopes du fer sont fractionnés au cours de réactions redox, que ce soit lors de réactions biotiques ou abiotiques telles que (Anbar and Rouxel 2007):

- réduction microbienne dissimilative du Fe(III) (Beard et al. 1999; Crosby et al. 2005; Crosby et al. 2007)
- l'oxydation anaérobie du Fe(II) (Kappler et al. 2010) ; l'oxydation anaérobie du Fe(II) par des bactéries acidophiles (Balci et al. 2006) ou pendant la photosynthèse anaérobie couplée à l'oxydation du Fe(II) (Croal et al. 2004)
- l'oxydation abiotique du Fe(II) et précipitation sur des hydroxydes de Fe(III) (Bullen et al. 2001) ou pendant la photo-oxydation (par les UV) (Staton et al. 2006)
- adsorption du Fe(II) sur des hydroxydes de Fe(III) (Icopini et al. 2004; Crosby et al. 2005; Johnson et al. 2005; Crosby et al. 2007; Percak-Dennett et al. 2011).

Il a aussi été établi qu'un fractionnement isotopique du fer avait lieu en conditions purement abiotiques (chimiques) même sans changement de l'état redox du Fer, lors de chromatographies échangeuses d'ions notamment par la formation de complexes fer-chlore (Anbar et al. 2000; Roe et al. 2003) ; ou lors de précipitations de sulfures de Fer (Butler et al. 2005).

Dans les écosystèmes océaniques profonds, il est aussi prouvé que l'altération des basaltes à basse température fractionne les isotopes du fer (Rouxel et al. 2003). Les isotopes du fer sont également fractionnés dans les systèmes hydrothermaux en fonction des interactions fluide hydrothermal-roches (Rouxel et al. 2008; Bennett et al. 2009) et lors de sa précipitation sous forme de sulfure de fer (chalcopyrite, pyrite etc...) (Sharma et al. 2001; Rouxel et al. 2004; Rouxel et al. 2008).

Cependant, à ce jour, l'origine microbienne ou abiotique des signatures isotopiques du Fer dans les roches sédimentaires datant de l'archéen reste une question activement discutée dans la communauté scientifique (Rouxel et al. 2004; Archer and Vance 2006; Johnson et al. 2008; Rouxel et al. 2008; Guilbaud et al. 2011).

### **3. Relations microorganismes-biotope hydrothermal, à haute température**

Dans les écosystèmes hydrothermaux dynamiques, soumis à des gradients thermiques et chimiques, qui à la fois sélectionnent et supportent la vie microbienne, existe-t-il des relations entre la nature minérale de la cheminée, sa maturité, la température et la composition du fluide et la structure des communautés microbiennes ?

#### **3.1. Relation procaryotes-localisation dans la cheminée**

Dans les édifices hydrothermaux, la distribution spatiale des procaryotes est directement liée aux gradients de température : les micro-organismes mésophiles et légèrement thermophiles sont présents à l'extérieur, ou dans la paroi externe des cheminées alors que les micro-organismes plus thermophiles et hyperthermophiles colonisent les couches internes des édifices (Takai et al. 2001; Schrenk et al. 2003; Nakagawa et al. 2005; Page et al. 2008).

Il a aussi été montré que la densité des micro-organismes est variable selon la localisation dans la cheminée ; ainsi la zone supérieure de l'édifice et la paroi interne de la cheminée semblent contenir la plus grande quantité de micro-organismes (Harmsen et al. 1997; Takai et al. 2001; Schrenk et al. 2003). Ces études montrent aussi une différence d'abondance entre *Archaea* et

*Bacteria* dans l'édifice, sans règle générale. En effet, Schrenk et collaborateurs indiquent dans leur étude, que les *Archaea* se trouvent majoritairement à l'intérieur, dans des zones plus chaude, alors que les *Bacteria* sont plutôt dans la paroi extérieure de la cheminée où les températures sont plus faibles (Schrenk et al. 2003). Dans son étude, Harmsen et collaborateurs dénombrent plus de *Bacteria* à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cheminée (Harmsen et al. 1997). Il a aussi été montré, *via* une étude couplant l'utilisation de gènes de fonction, de puces à ADN et de PCR quantitative (sur des protocheminées déployées de la dorsale de Juan de Fuca), que la diversité microbienne (phylogénétique et métabolique) est plus importante dans la partie externe (Wang et al. 2009). Des analyses de diversité microbienne d'édifices à différents stades de maturité provenant du même site hydrothermal, montrent une dynamique des communautés microbienne selon les stades de croissance de la cheminée (Page et al. 2008; Wang et al. 2009). L'étude de la diversité microbienne d'un même édifice échantillonné à différents temps (cheminée à différent stade de maturité), sur le site Lucky Strike met en lumière une faible diversité microbienne dans les échantillons « jeunes » par rapport à celle obtenue dans des échantillons de cheminées matures (Le Roy 2009). Elle indique aussi qu'au cours de la croissance de la cheminée, le nombre de genres au sein d'un même groupe augmente et souligne la présence des Thermococcales à tous les stades de l'édification de la cheminée.

De même, l'augmentation du nombre de gènes de fonction détectée, impliquée dans les métabolismes du carbone, de l'azote et du soufre, a aussi été notée, par comparaison de deux édifices à différents stades de maturité (Wang et al. 2009). Ainsi, la modification et la succession des communautés microbiennes et les variations des gènes de fonctions détectés, impliquées dans les cycles biogéochimiques du carbone, azote et soufre, sont reliées aux conditions physiques (évolution minéralogique de la structure de l'édifice au cours du temps) et géochimiques présentes au sein de chaque cheminée (Takai et al. 2001; McCliment et al. 2006; Page et al. 2008; Takai et al. 2008; Wang et al. 2009). Enfin, en raison des gradients physico-chimiques abrupts s'établissant au sein des édifices, qui génèrent des conditions extrêmement variées de températures, pH, de composés redox, de composés chimiques, présence ou non d'oxygène, chaque cheminée est constituée de multiples micro-niches abritant des communautés microbiennes variées selon leur préférence.

### **3.2. Relation procaryotes-chimie du fluide**

A ce jour, comparativement aux nombreuses études de diversité réalisées à partir d'échantillons d'édifices hydrothermaux actifs, peu d'études se sont focalisées sur la diversité microbienne des panaches hydrothermaux. Toutefois, l'oxydation microbienne du manganèse a été

détectée, associée à la précipitation de bio-oxydes de manganèse (Cowen et al. 1986; Dick et al. 2006; Dick et al. 2009). Récemment, l'utilisation de pièges à particules pour collecter les particules issues du panache hydrothermal, a permis d'observer une hétérogénéité des communautés bactériennes au cours du déploiement, que les communautés bactériennes associées aux particules sont spécifiques du point d'émission du fluide. Cette étude a également montré une différence significative entre les concentrations en éléments majeurs et traces et les communautés microbiennes observées (Sylvan et al. 2012).

### **3.3. Relation procaryotes-minéraux**

Des études ont démontré que les micro-organismes interagissent avec leur environnement notamment en modifiant la minéralogie de la cheminée en favorisant la dissolution ou la précipitation de certains minéraux et la composition du fluide hydrothermal (Ehrlich 1999; Holden and Adams 2003; Schrenk et al. 2003; Edwards et al. 2005; Houghton et al. 2007; Page et al. 2008; Houghton and Seyfried Jr 2010). En effet, lors d'une culture d'enrichissement, des changements significatifs dans la composition du milieu, ont été associés aux interactions entre les micro-organismes et certains minéraux de la cheminée : anhydrite et pyrrhotite (Houghton et al. 2007). Aussi, certaines souches microbiennes sont capables de produire des bio-minéraux au cours de leur croissance. Certaines souches ferri-réductrices comme *Geothermobacter ehrlichii*, et probablement *Geoglobus ahangari*, sont capables de produire des grains de magnétite au cours de leur croissance (Kashefi et al. 2002; Kashefi et al. 2003). D'autres procaryotes ferri-réducteurs tels *Geoglobus acetivorans*, produisent des précipités noirs de Fe(II) magnétiques (Slobodkina et al. 2009). *Mariprofundus ferrooxydans PV-1*, quant à elle, produit lors de sa croissance des « stalk » ou filaments d'oxyde-hydroxyde de fer ferrique (Emerson et al. 2007)

## **4. Le Bassin de Guaymas : un site d'étude particulier ?**

### **4.1. Caractéristiques du Golfe de Californie**

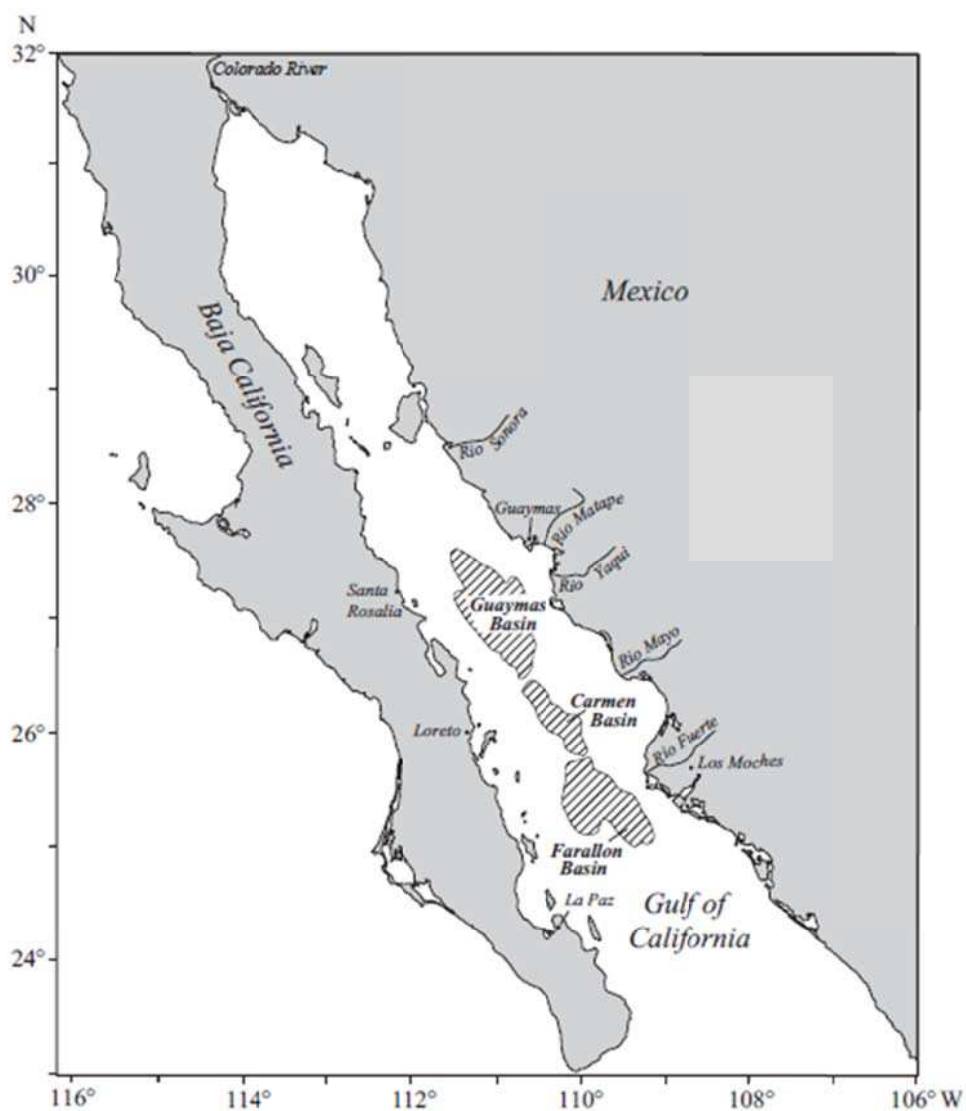
Le Golfe de Californie, long d'environ 1500 km et large d'environ 150 km, est situé au nord-ouest du Mexique, où il borde à l'est les états de Sonora et de Sinaloa et à l'ouest la péninsule de Basse Californie (Figure I-10).



**Figure I-10 :** Carte du nord-ouest mexicain, montrant la localisation du Golfe de Californie entre les états de Sonora, de Sinaloa et de la péninsule de Basse Californie. La dorsale oblique traversant du nord au sud le golfe de Californie est aussi illustrée (modifié d'après Mayer and Vincent 1999).

Le Golfe de Californie est abondé d'apports terrigènes *via* cinq fleuves majeurs (Figure I-11): le Rio Sonora, le Rio Matape, le Rio Yaqui le Rio Mayo et le Rio Fuerte, qui drainent la côte ouest de la Sierra Madre occidentale et se chargent lors de leurs trajets de particules terrigènes et volcaniques, couplés au transport éolien de particules provenant du désert de Sonora (Dean et al. 2004); et aussi *via* le fleuve Colorado qui se jette au nord du Golfe.



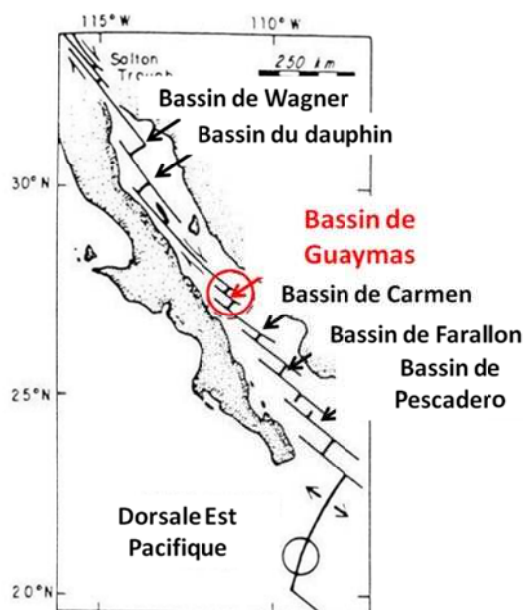


**Figure I-11** : Carte de l'ouest du continent mexicain, de la péninsule de basse Californie et du Golfe de Californie, localisant le Bassin de Guaymas et illustrant les principaux fleuves qui alimentent le Golfe de Californie en apports terrigènes (modifié d'après Dean, 2004 Dean et al. 2004).

Au niveau du plancher océanique une stratification de couches sédimentaires, correspondant à l'alternance de couches sombres et claires, est observée. Le couple strate foncée-strate claire équivaut à la sédimentation sur un an. La couche foncée est composée de débris clastiques correspondant à la sédimentation des apports terrigènes en été et la couche claire d'opale, correspond à la sédimentation des diatomées de la fin de l'automne au printemps (Calvert 1966; Thunell 1998).

Topographiquement, le fond du golfe de Californie est divisé du nord au sud par une dorsale oblique en échelons orientée nord-est sud-ouest, qui constitue l'extension nord de la dorsale Est-pacifique (figures I-10 et I-12). Cette dorsale présente des centres d'accrétions séparés les uns des autres par des failles transformantes (Figure I-X). Le fond du Golfe de Californie est aussi cloisonné

par une succession de petits bassins semi clos et de profondeur croissante du nord au sud. Ces petits bassins sont séparés les uns des autres par le système de faille transformante (Figure I-12). Parmi ces bassins, dans la partie centrale du Golfe de Californie, se trouve le Bassin de Guaymas.



**Figure I-12 :** Carte du Golfe de Californie, localisant le Bassin de Guaymas, les autres bassins ainsi que la dorsale oblique traversant le golfe de Californie du nord au sud (modifié d'après Lonsdale and Lawver 1980; Lonsdale et al. 1980).

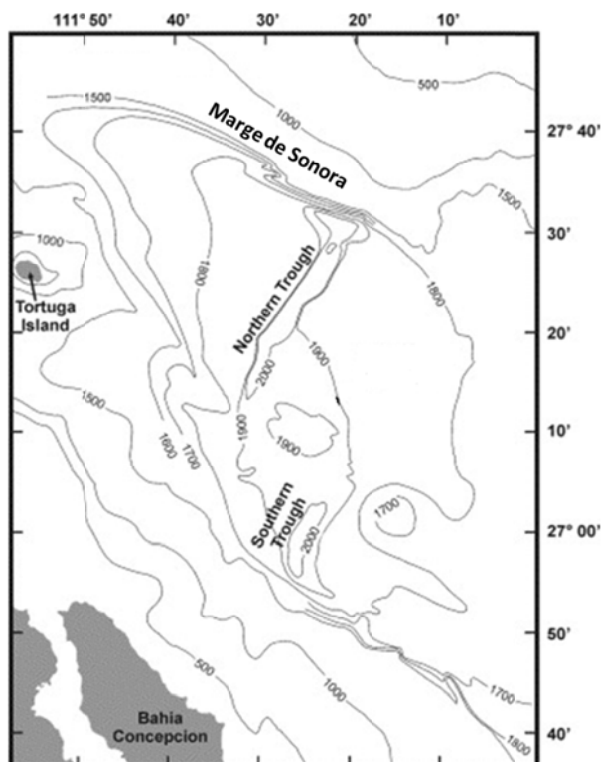
## 4.2. Le bassin de Guaymas : contexte géologique

Localisé dans la partie centrale du Golfe de Californie, le bassin de Guaymas fait environ 250 km de long, 50 km de large et est profond d'environ 2000 mètres (Lawver et al. 1973). Sa vitesse d'accrétion est estimée à  $6 \text{ cm.an}^{-1}$  (Curry and Moore 1982). Le fond du Bassin de Guaymas est recouvert d'une épaisse couche sédimentaire de 400 à 500 m d'épaisseur. Ces sédiments ont une double origine : continentale et principalement pélagique. Les fleuves, dont le Rio Yaqui (Figure I-x haut), abondent le Bassin de Guaymas d'apports terrigènes. La production biologique de surface, quant à elle, est très importante. Elle génère un flux de carbone organique particulaire vers le fond de  $0,24 \text{ g.m}^2.\text{j}^{-1}$ , associé à un taux de sédimentation très élevé :  $2,7\text{m}/1000 \text{ ans}$ , rendant ces sédiments très riches en matière organique et en diatomées (de 2 à 4 % de carbone organique ; 30 à 50 % de diatomées ; tableau I-5) (Curry and Moore 1982; Von Damm et al. 1985; De la Lanza-Espino and Soto 1999; Dean et al. 2004; Thunell et al. 2007).

**Tableau I-5** : Composition des sédiments du Bassin de Guaymas ; de Curray et al., 1982 (Curray and Moore 1982)

Pourcentage	Composition
30 - 50%	Diatomées (dont radiolaires et silicoflagellés)
30 - 45%	Minéraux argileux détritiques
10 - 15%	Nanofossiles calcaires (avec des foraminifères)
4 - 15%	Feldspath
3 - 10%	Quartz
1 - 2%	Métaux lourds
2 - 4%	Carbone organique

Une des particularité du bassin de Guaymas est la présence simultanée de zones hydrothermales actives, une au sud : la Dépression Sud (20 km de long et 3 à 4 km de large) et une au nord : la Dépression Nord (40 km de long et 3 à 4 km de large) (Lonsdale and Becker 1985) ; et d'une zone d'émission de fluide froid au niveau d'une faille transformante sur la Marge de Sonora (Simoneit et al. 1990). Ces zones tectoniquement actives sont distantes les unes des autres de quelques kilomètres (Figure I-13) ; ainsi, une soixantaine de kilomètres séparent la zone hydrothermale de la Dépression Sud, de la zone d'émission de fluide froid de la marge de Sonora.



**Figure I-13** : Localisation des zones hydrothermales (Southern Trough et Northern Trough) et de la zone d'émission de fluide froid (Marge de Sonora) dans le Bassin de Guaymas (modifié d'après Otero, 2003) ;

### 4.3. Les systèmes hydrothermaux de la Dépression Sud

Le contexte géologique, minéralogique, la géochimie ainsi que la diversité microbienne de la zone hydrothermale la plus explorée et étudiée est celle de la Dépression Sud. Cette zone se caractérise par :

- la présence d'édifices hydrothermaux riches en sulfures et en carbonates avec des fluides émis jusqu'à 315°C (Lonsdale et al. 1980; Von Damm et al. 1985; Peter and Scott 1988)
- des zones sédimentaires « chaudes » affectées par des circulations de fluides hydrothermaux, la température mesurée à 30 cm de profondeurs sur le site MegaMat, peut varier de 30 jusqu'à 200°C selon le lieu de mesure (McKay et al. 2012).

Dans ces sédiments hydrothermaux riches en matières organiques, les réactions diagénétiques entre les fluides hydrothermaux ascendants à haute température et les couches sédimentaires entraînent la pyrolyse de la matière organique ainsi que la précipitation de sulfures (par exemple, la pyrrhotite FeS). Les principaux produits de la pyrolyse sont : des hydrocarbures, du méthane des acides organiques à courtes chaînes, de la matière organique particulaire et de l'ammoniac (Bazylinski et al. 1988; Welhan 1988; Didyk and Simoneit 1990; Martens 1990).

### 4.4. Compartiment microbien de la zone hydrothermale de la Dépression Sud

Les zones sédimentaires percolées de fluides hydrothermaux sont recouvertes d'épais tapis microbiens blancs et/ou orange (en général les tapis orange sont entourés de tapis blancs) de 2 à 4 m de diamètre. Ces tapis sont principalement constitués de bactéries filamenteuses de type *Beggiatoa* (*Gammaproteobacteria*) (Jannasch et al. 1989; Nelson et al. 1989; McHatton et al. 1996; McKay et al. 2012). Le gradient thermique à l'intérieur des sédiments recouverts de tapis microbien est très important (McKay et al. 2012). Aussi, l'un des facteurs contrôlant l'activité microbienne semble être la température (Elsgaard et al. 1994; Kallmeyer and Boetius 2004). Ces sédiments hébergent une grande diversité d'*Archaea* (ex : ANME, *Archaeoglobales*, *Thermoplasmatales*, etc) et de *Bacteria* (ex : *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *CFB division* (*Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes*), etc) (les souches isolées sont répertoriées dans les tableaux en annexes 1 et 2); certains phylotypes détectés sont affiliés à des phyla sans représentant cultivé à ce jour (OP1, OP3, OP11, JS1 ou WS3 pour les bactéries ; Korarchaeota, Guaymas Euryarchaeotal group, MCG (Miscellaneous Crenarchaeotic Group) ou MBG-B (Marine Benthique Group B) pour les archées) (Teske et al. 2002; Dhillon et al. 2003; Dhillon et al. 2005; Biddle et al. 2012; Bowles et al. 2012). Des micro-organismes

impliqués dans l'oxydation anaérobie du méthane et dans la sulfato-réduction sont fréquemment détectés dans les inventaires moléculaires réalisés à partir du gène codant pour l'ARNr 16S et à partir de gène de fonction (*mcrA* et *dsrAB*) (Teske et al. 2002; Dhillon et al. 2003; Dhillon et al. 2005; Holler et al. 2011; Biddle et al. 2012) ainsi que lors de mesures d'activité (Jorgensen et al. 1990; Elsgaard et al. 1994; Kallmeyer and Boetius 2004).

A partir d'échantillons d'édifices hydrothermaux actifs, beaucoup de souches ont été isolées (les isolats décrits formellement sont répertoriés dans les tableaux en annexes 1 et 2). Parmi ces souches, citons par exemples les *Thermococcales* : *Thermococcus guaymasensis* (Canganella et al. 1998), *T. gammatolerans* (Jolivet et al. 2003) ; les Archaeoglobales : *Archaeoglobus profundus* (Burggraf et al. 1990) et *Geoglobus ahangari* (Kashefi et al. 2002); la *Methanopyrales* : *Methanopyrus kandleri* (Kurr et al. 1991) ou encore les bactéries *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* (Jeanthon et al. 2002) et *Persephonella guaymasensis* (Gotz et al. 2002).

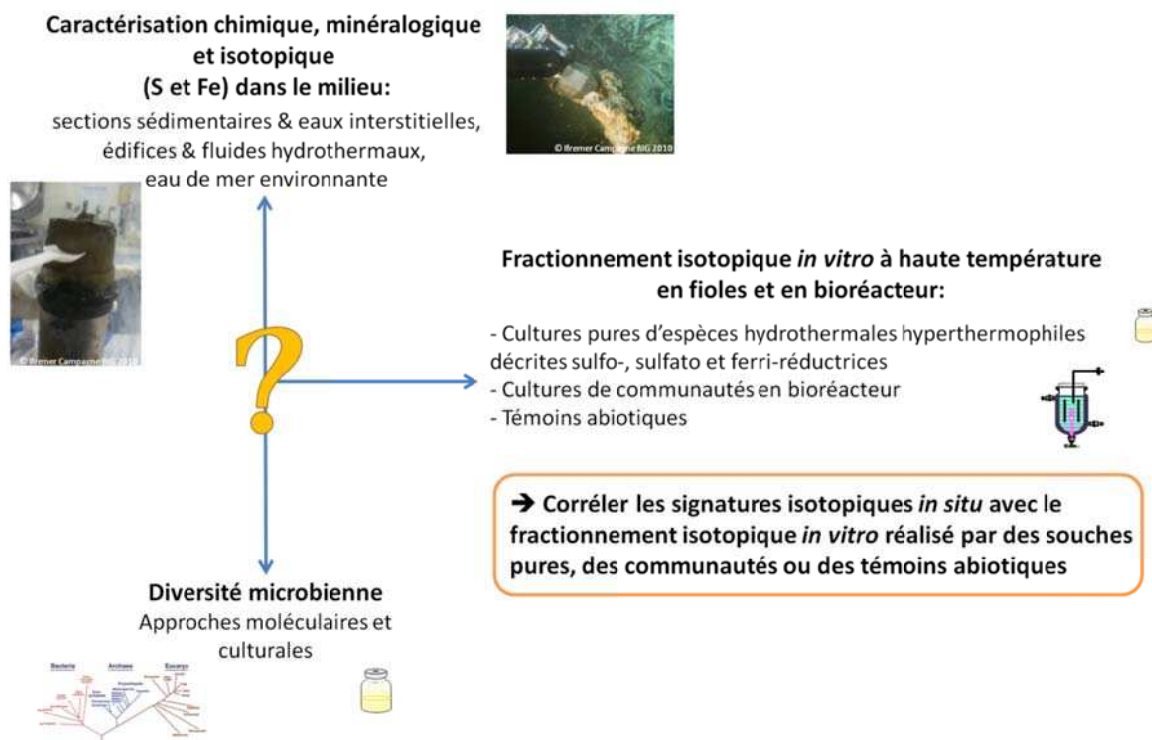
## 5. Objectifs du projet

Depuis la découverte des écosystèmes hydrothermaux, de nombreuses questions concernant le fonctionnement des communautés microbiennes et les interactions entre les micro-organismes et leurs biotopes à haute température restent d'actualité.

- Quelle est la diversité phylogénétique et métabolique des micro-organismes vivant dans les écosystèmes hydrothermaux ?
- Quels sont le rôle et l'impact des micro-organismes dans les cycles biogéochimiques en contexte hydrothermal ?
- Quelles sont les interactions Biosphère-Géosphère-Hydrosphère dans les édifices hydrothermaux et sédiments environnants ? Ou comment les micro-organismes impactent leurs environnements (altération de phases minérales) et inversement comment le biotope (température, pH, disponibilité en sources de carbone, d'énergie, d'accepteur d'électron, etc....) influence l'activité et la diversité microbienne ?

Afin de répondre à ces questions, une approche pluridisciplinaire mettant en œuvre des techniques de microbiologie et de géochimie, a été mise en place. Elle avait pour but d'identifier et d'établir des liens entre la structure, l'activité et les signatures isotopiques des communautés microbiennes et les caractéristiques physico-chimiques des systèmes hydrothermaux à haute température (>60°C) du Bassin de Guaymas.

Le fil conducteur des différentes études réalisées, est le développement et l'utilisation de l'outil isotopique pour tracer les cycles biogéochimiques du soufre et du fer à haute température (pour les micro-organismes) (Figure I-14).



**Figure I-14 :** Schéma expérimental mis en place reposant d'une part pour un même échantillon d'étudier sa diversité microbienne par approches moléculaires et culturales et de le caractériser minéralogiquement, chimiquement (et isotopique lorsque c'est possible) ; et d'autre part, d'étudier le fractionnement isotopique à haute température, de cultures pures, de communautés microbiennes et de témoins abiotiques afin de corréler les signatures isotopiques *in situ* avec celui obtenu *in vitro* par des souches pures, des communautés ou des témoins abiotiques.

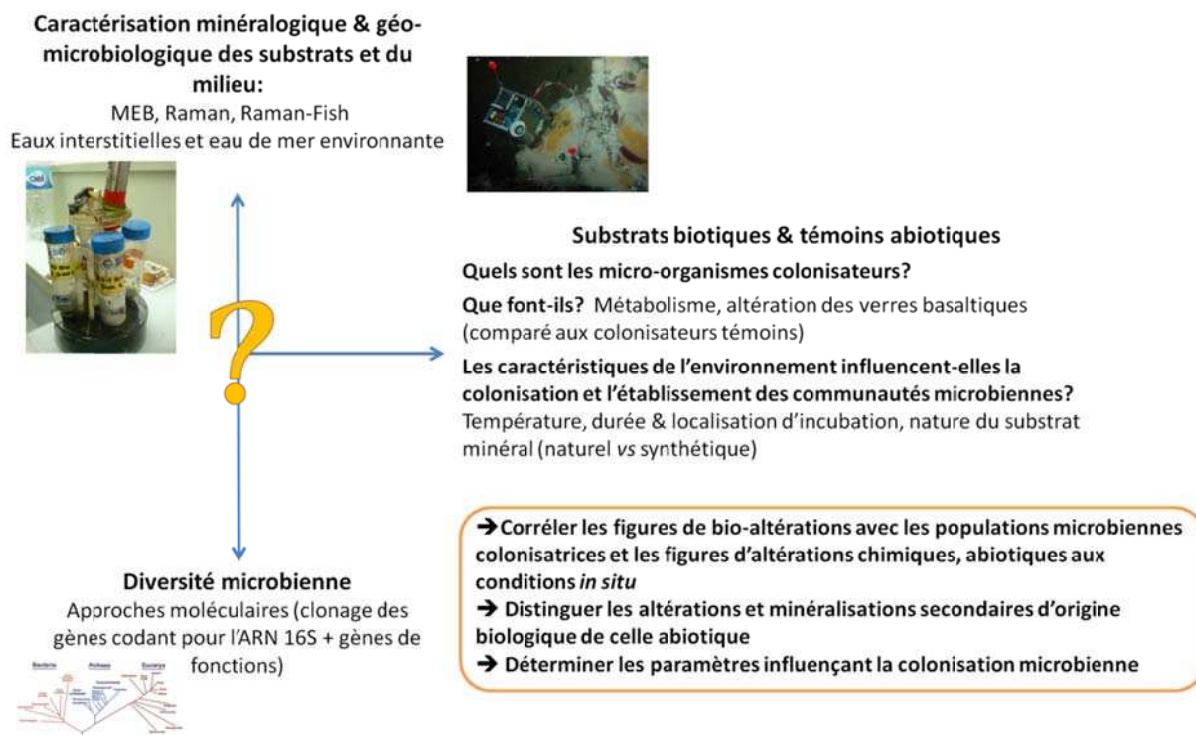
Ainsi, le fonctionnement des cycles biogéochimiques du soufre et du fer et de leurs signatures isotopiques a été considéré à trois échelles, une *in situ* et deux autres *in vitro* c'est-à-dire à partir de cultures biotiques ou abiotiques en fioles ou en bioréacteurs :

- **à l'échelle de l'écosystème :** à partir de l'échantillon brut, pour lequel la diversité microbienne active a été étudiée, la minéralogie et la géochimie de la fraction solide ont aussi été décrites de même que la composition chimique (et isotopique lorsque cela est possible) des fluides a été analysée.
- **à l'échelle de la communauté microbienne en conditions culturales *in vitro* :** à partir de cultures d'enrichissements réalisées en bioréacteur, pour lesquelles la diversité microbienne active, la composition du milieu de culture et la minéralogie avant et après culture ont été étudiées

- **à l'échelle d'une espèce également en condition *in vitro***: à partir de cultures en fioles de souches pures sulfo-réductrices, sulfato-réductrices et ferri-réductrices décrites (détermination des signatures isotopiques de ces souches pures selon différentes conditions de cultures) et de leurs témoins abiotiques respectifs. Des cultures et des isolements de souches microbiennes (hyper)thermophiles ont aussi été réalisés à partir des échantillons collectés.

L'étude de ces cycles à ces différentes échelles, a pour objectif de mieux comprendre leur fonctionnement « à haute température » pour les micro-organismes (hyper)thermophiles, notamment d'identifier les acteurs microbiens impliqués et de les corrélés aux caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon dont ils sont issus. De plus, l'étude des signatures isotopiques à ces 3 échelles permettront à terme de corrélés les signatures isotopiques *in situ* avec le fractionnement isotopique *in vitro* réalisé par des souches pures, des communautés microbiennes ou des témoins abiotiques et aussi, de différencier les signatures isotopiques issues de processus microbiens de celles issues de processus abiotiques.

Une autre approche a été mise en œuvre pour établir *in situ* 1) des liens entre la colonisation microbienne, la diversité microbienne et les conditions environnementales (substrats, géochimie) et 2) le rôle des micro-organismes dans l'altération des basaltes et production de minéraux secondaires en condition hydrothermale. Ces études portent sur la colonisation et l'altération de verres basaltiques, grâce au déploiement de différents modules de colonisation déployés soit à la surface du sédiment, soit dans les sédiments pendant différentes périodes (Figure I-15).



**Figure I-15 :** Schéma expérimental mis en place lors de l'étude des modules de colonisation. Il repose sur l'étude de la diversité microbienne par approches moléculaires, sur l'identification de textures d'altération et de dépôt minéral secondaire et sur l'analyse de fluides (eau de mer, fluide traversant le module déployé dans le sédiment) afin de déterminer si les conditions *in situ* contrôlent la colonisation microbienne et si ces procaryotes ont un rôle dans l'altération des basaltes ou dans la production de phases minérales secondaires.

Ainsi, afin de répondre à ces questions, plusieurs études et plusieurs approches mettant en œuvre des techniques de microbiologie et de géochimie, ont été mises en place. Elles avaient pour but d'identifier et d'établir des liens entre la structure, l'activité et les signatures isotopiques des communautés microbiennes et les caractéristiques physico-chimiques des systèmes

Deux compartiments de l'écosystème hydrothermal du Bassin de Guaymas: les édifices hydrothermaux actifs et les sédiments riches en matière organique, percolés par le fluide chaud ont été étudiés. L'utilisation de modules de colonisation déployés dans et à la surface de sédiment hydrothermaux a permis évaluer le rôle des micro-organismes dans l'altération des basaltes et dans la production de phases minérales secondaires en milieu hydrothermal.

Après un chapitre « matériel et méthodes » décrivant les sites d'études et exposant les méthodes utilisées, les résultats seront exposés et suivis d'un chapitre synthèse et perspective.

Les principaux résultats obtenus sont présentés sous forme de sept études organisés selon une progression allant de la surface du plancher océanique, aux sédiments et selon trois échelles de



tailles: celle du biotope et de l'écosystème ; celle de la communauté microbienne et enfin celle de la souche pure.

La première étude porte sur la description minéralogique des édifices et la géochimie des fluides des sites hydrothermaux de la Dépression Sud du Bassin de Guaymas.

Les études 2 et 3 portent sur la colonisation et altération de verres basaltiques placés dans des modules de colonisation in situ déployés à la surface ou dans des sédiments hydrothermaux.

La quatrième étude traite des interactions micro-organismes / minéraux lors d'une culture d'enrichissement en continu utilisant du fluide hydrothermal dilué comme milieu de culture et un fragment de cheminée hydrothermale comme inoculum.

La cinquième a pour but d'étudier le fractionnement isotopique du fer par des microorganismes thermophiles lors de cultures de communautés microbiennes (culture d'enrichissement en continu) et cultures de souches pures ferri-réductrices.

La sixième étude présente des résultats de culture et d'isolement de micro-organismes hyperthermophiles.

La septième étude, traite du fractionnement isotopique du soufre par des microorganismes thermophiles sulfo- et sulfato-réducteurs.

Le dernier chapitre expose les principales conclusions obtenues lors de ces études.

## **II. De l'échantillonnage dans le Bassin de Guaymas aux analyses au laboratoire : Matériel et Méthodes**

---

Préambule

1. Fond océanique du Bassin de Guaymas : localisation et description des sites d'études
2. Méthodes d'échantillonnage et conditionnement à bord
3. Analyses microbiologiques, géochimiques, isotopiques et minéralogiques au laboratoire



## **Préambule**

Ce chapitre traite des sites d'études et des échantillons collectés et conditionnés en juin-juillet 2010, dans le Bassin de Guaymas, lors de la campagne océanographique française BIG acronyme de *Biodiversité et Interaction à Guaymas* (chef de mission A. Godfroy) et de leurs analyses au laboratoire.

La campagne océanographique BIG, qui s'est déroulée à bord du navire océanographique *L'Atalante*, mettait en œuvre le submersible habité *Nautilo* pour : l'exploration des sites (des sites d'études et de nouveaux sites), les déploiements de modules de colonisation *in situ* et pour les différents prélèvements de roches, de sédiments, d'animaux ou de fluides.

Une des caractéristiques majeures du Bassin de Guaymas réside en la présence simultanée en contexte sédimentaire et en l'absence de barrière biogéographique de deux écosystèmes basés sur la chimiosynthèse microbienne que sont les zones hydrothermales et les zones d'émissions de fluides froids, séparées l'une de l'autre par quelques dizaines de kilomètres. Au niveau de chaque zone, des sites actifs, visibles sur le plancher océanique créent une mosaïque de petits habitats fragmentés caractéristiques de ces écosystèmes (monts hydrothermaux, tapis microbien, buisson de *Siboglinidae*, assemblage de *Vesicomidae*,...) ont été observés et échantillonnés au niveau de la « Dépression Sud » du bassin de Guaymas ainsi que le long d'une faille transformante de la marge de Sonora.

Le but de cette campagne était de comparer, dans une zone géographique considérée comme réduite, les communautés microbiennes et animales (distribution, diversité et structure en fonction des gradients physico-chimiques), de ces deux écosystèmes sédimentaires et de les comparer avec des sédiments considérés comme référence car prélevés dans une zone non active (du point de vue hydrothermal et d'émission de fluides froids). Les deux principales zones d'études ciblées étaient donc : une zone hydrothermale (sites hydrothermaux et sédiments affectés par des circulations de fluides hydrothermaux) située au niveau de la ride de la Dépression Sud du Bassin et une zone d'émission de fluide froid située au niveau de la Marge de Sonora ; la zone de référence, quant à elle, se situe au milieu du Bassin de Guaymas (Figure II-1).



**Figure II-1** : Cartes satellites du Bassin de Guaymas avec la localisation de la zone hydrothermale au niveau de la Dépression Sud, de la zone d'émission de fluide froid au niveau de la marge de Sonora et de la zone de référence située hors axe des zones actives d'hydrothermalisme ou d'émission de fluide (Google earth, Data SIO, NOAA, U.S.Navy, NGA, GEBCO ; Data FDEO-Columbia, NSF, NOAA ©2012 Cnes/Spot Image).

Notre objectif, était d'établir des liens entre la structure, l'activité et les signatures isotopiques de communautés microbiennes et les caractéristiques physico-chimiques des systèmes hydrothermaux du Bassin de Guaymas.

Ainsi, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la zone hydrothermale composée à la fois de cheminées hydrothermales actives et de sédiments affectés par des circulations de fluides hydrothermaux et sur une zone de référence.

Les sites sédimentaires « chauds » échantillonnés ont été choisis car :

- la surface de ces sédiments était recouverte de tapis microbiens blancs et/ou orange, plus ou moins denses et épais selon les sites ;
- des percolations de fluides chauds étaient parfois visibles à la surface du sédiment dans les tapis microbiens ;

- les mesures de températures *in situ* effectuées à différentes profondeurs par la sonde de température du *Nautile* montraient un gradient thermique important dans les 40 premiers centimètres de profondeur (gradient variant entre le centre et la périphérie des zones à tapis microbiens).

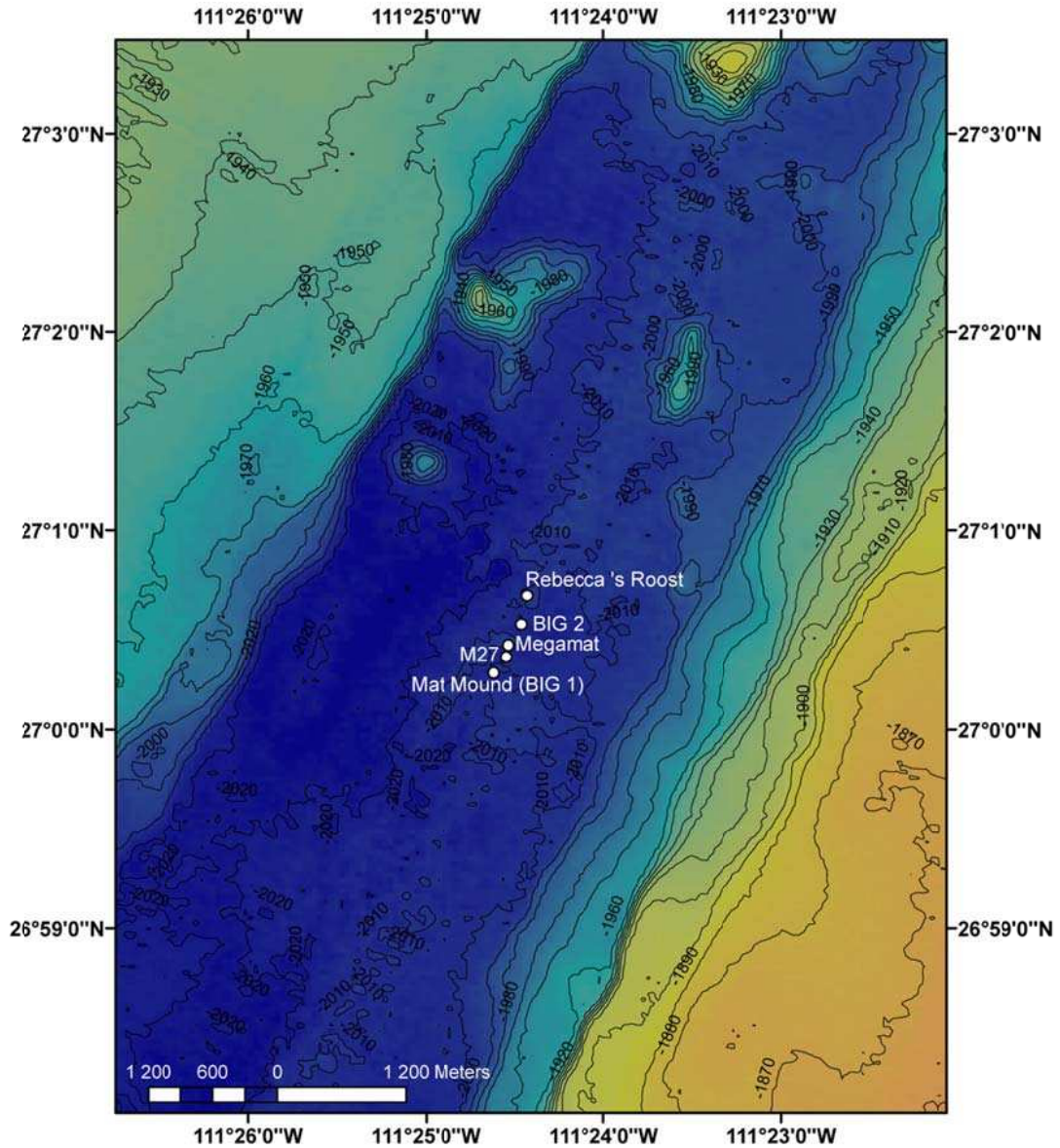
Le site de référence, zone non active du point de vue d'émissions de fluides froids ou hydrothermaux, a été choisi, hors axe dans la plaine abyssale. Dans ce cas, du sédiment nu a été collecté.

Ne sont présentés dans ce chapitre, que les sites et échantillons qui ont servi à nos études.

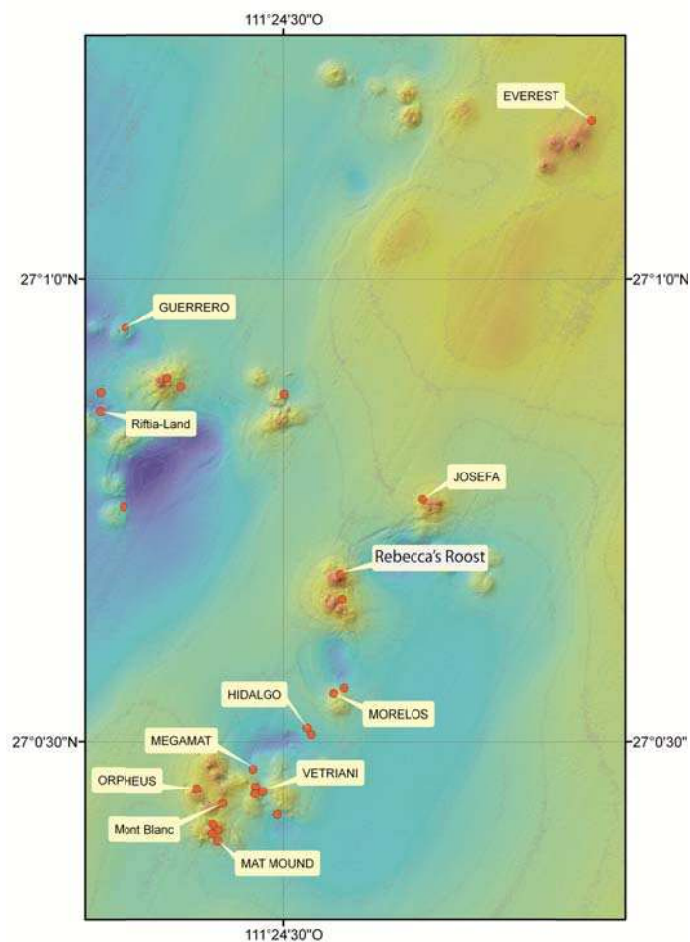
## **1. Fond océanique du Bassin de Guaymas : localisation et description des sites d'études**

### **1.1. Les sites hydrothermaux de la ride de la Dépression Sud**

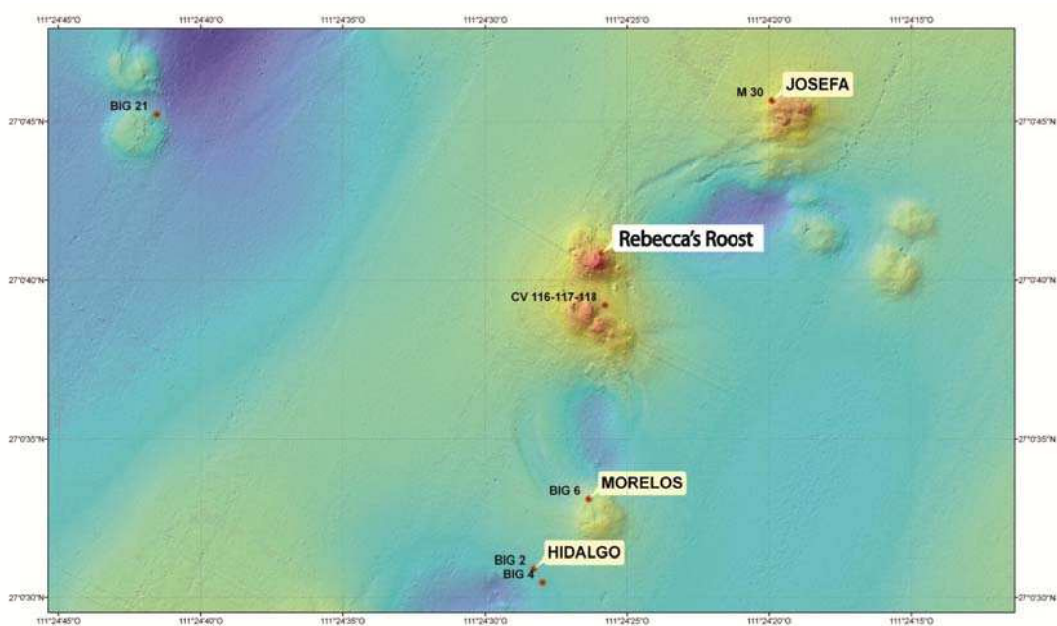
Les sites hydrothermaux de la ride de la Dépression Sud se caractérisent par la présence de petits monts surmontés d'édifices hydrothermaux actifs ou non, présentant ou non des « flanges » et par des zones sédimentaires percolées par des fluides hydrothermaux chauds et caractérisés par la présence de tapis microbiens épais blancs et orange à la surface du sédiment avec parfois des phénomènes visibles d'émission de fluides chauds chargés en hydrocarbures au sein de ces tapis (Figures II-2 à II-5).



**Figure II-2 :** Carte bathymétrique représentant la ride Sud du Bassin de Guaymas avec les cinq sites hydrothermaux : édifices hydrothermaux : Rebecca's Roost et BIG 2, et sédiments percolés de fluides hydrothermaux : Megamat, M27 et Mat Mound (BIG 1) échantillonnés lors de la campagne BIG (carte réalisée par C. Decker).

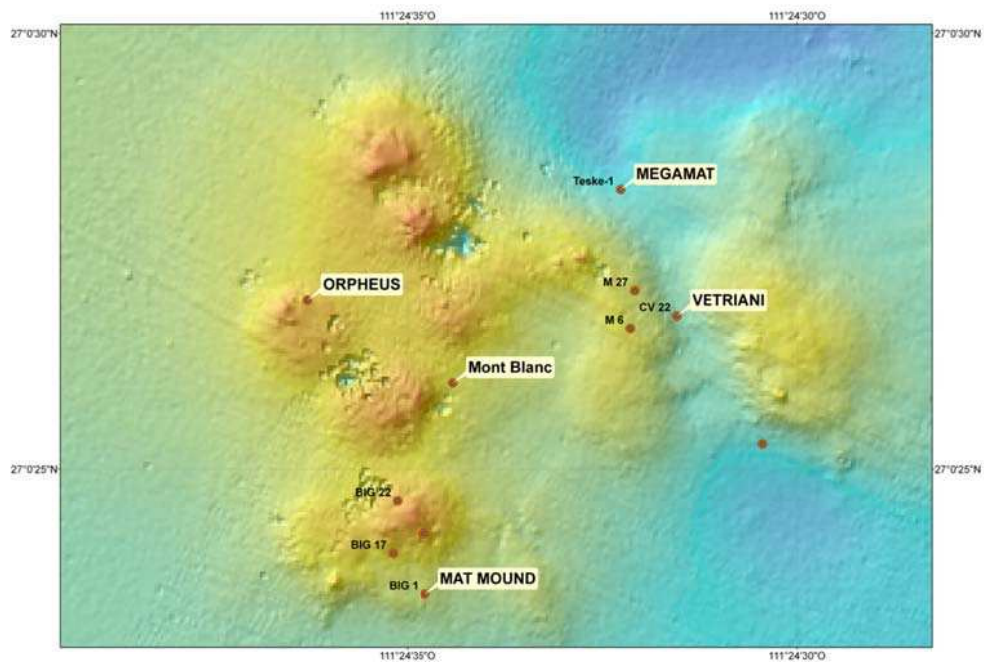


**Figure II-3 :** Carte bathymétrique représentant les sites de la Dépression Sud du Bassin de Guaymas, sont représentés les sites explorés et échantillonnés lors de la campagne BIG (Données AUV AsterX, Ondreas, H., Normand, A. ; carte réalisée par P. Briand).



**Figure II-4 :** Carte bathymétrique détaillant les sites hydrothermaux localisés au nord de la ride de la Dépression Sud (Données AUV, Ondreas, H., Normand, A. ; carte réalisée par P. Briand).

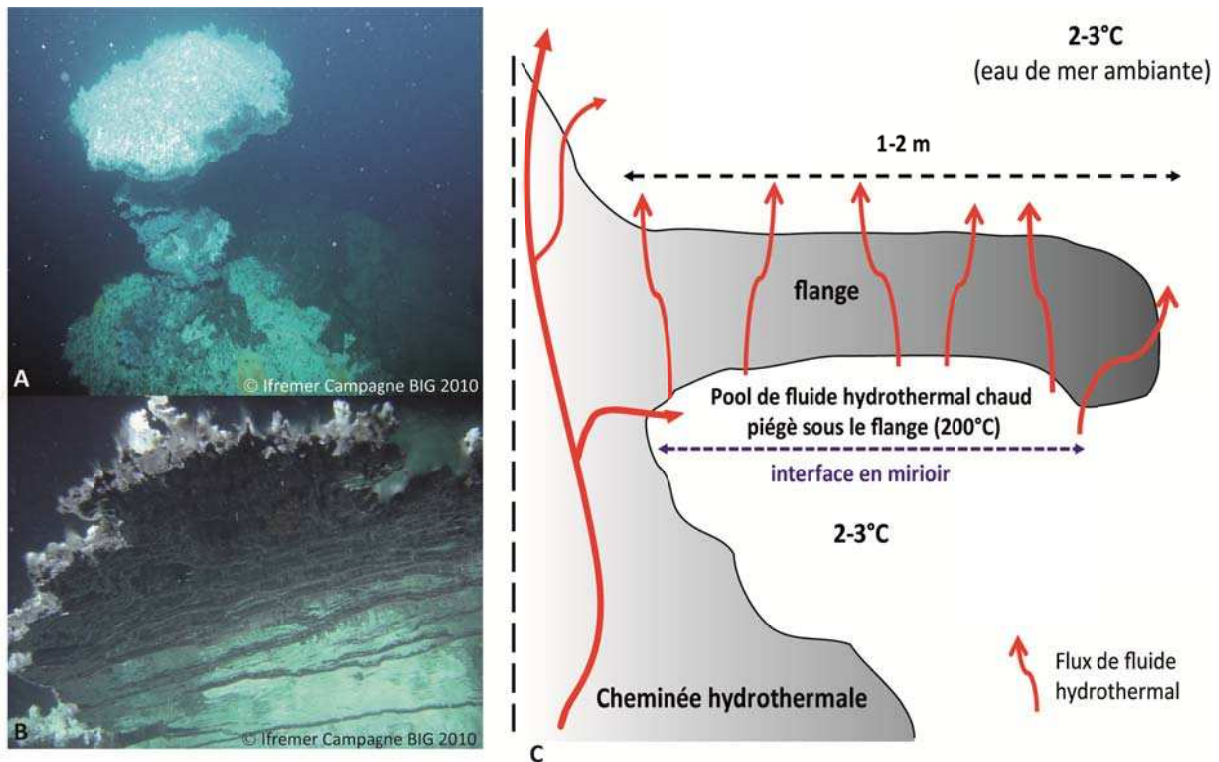




**Figure II-5 :** Carte bathymétrique détaillant les sites hydrothermaux et sédimentaires percolés par des fluides hydrothermaux localisés au niveau du rift de la Dépression Sud (Données AUV, Ondreas, H., Normand, A. ; carte réalisée par P. Briand).

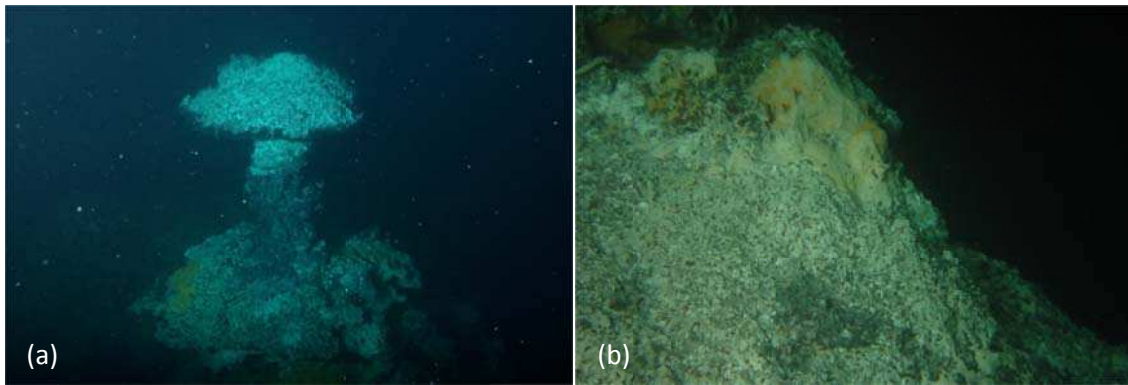
### 1.1.1. Le site hydrothermal Rebecca's Roost

Le site hydrothermal de Rebecca's Roost, situé à 1998 m de profondeur (27°00,634'N et 111°24,405' W) (Figures II-2 à II-4) est composé de plusieurs cheminées actives. Certains des édifices sont de structures classiques, d'autres, présentent des flanges (surplombs ou excroissances horizontales grandissant latéralement) (Figure II-6). Sous les flanges, le fluide hydrothermal chaud piégé va réagir avec l'eau de mer ambiante froide pour former une interface en miroir fluide-eau de mer (Figure II-6b et c). Une partie du fluide piégé, va traverser les couches poreuses du flange pour y percoler à sa surface ; une autre va remonter le bord extérieur de la flange et se mélanger à l'eau de mer ambiante.



**Figure II-6 :** (a) Photographie d'une flange (b) photographie de dessous de la flange avec le fluide hydrothermal piégé et montrant l'interface en miroir fluide-eau de mer ; photographies prises avec le submersible Nautile durant la campagne BIG (plongée 1745) sur le site Rebecca Roost; (c) schéma illustrant une flange avec le fluide hydrothermal piégé sous elle, interface en miroir se formant entre le fluide chaud et l'eau de mer froide et la percolation du fluide à travers la matrice minérale poreuse de la flange (adapté de Tivey 1986; 1999; Kerr 1997 et Fouquet, communication personnelle).

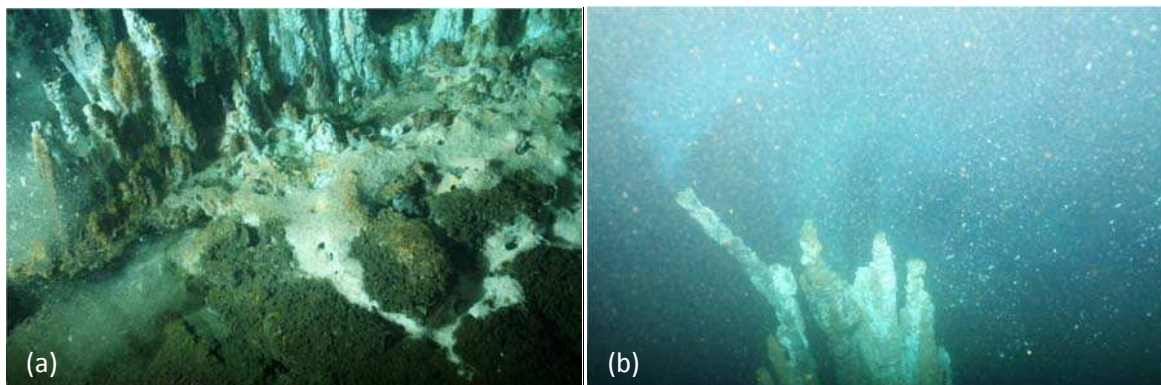
Lors de la campagne, un morceau de « flange » a été collecté sur un édifice hydrothermal actif. Cette structure mesurant près de 13 m, présente latéralement des « flanges ». Cette cheminée s'est développée sur un surplomb sédimentaire (Figure II-7a) et est enracinée dans une couche épaisse de sédiments de près de 40 m (Ondreas et al. 2011). Le sommet de l'édifice ainsi que le petit mont servant de support sont colonisés par des tapis microbiens blancs et orange. Des assemblages de polychètes, de type *Polynoidae* et *Alvinelidae*, ont également été observés sur ces structures (Figure II-7b).



**Figure II-7** : Photographies du site Rebecca's Roost prises avec le submersible Nautille durant la campagne BIG (plongée 1747) ; (a) vue d'ensemble de l'édifice actif échantillonné (b) tapis microbiens blancs et orangés et polychètes ayant colonisé le petit mont servant de support à l'édifice.

### 1.1.2. Le site hydrothermal BIG 2

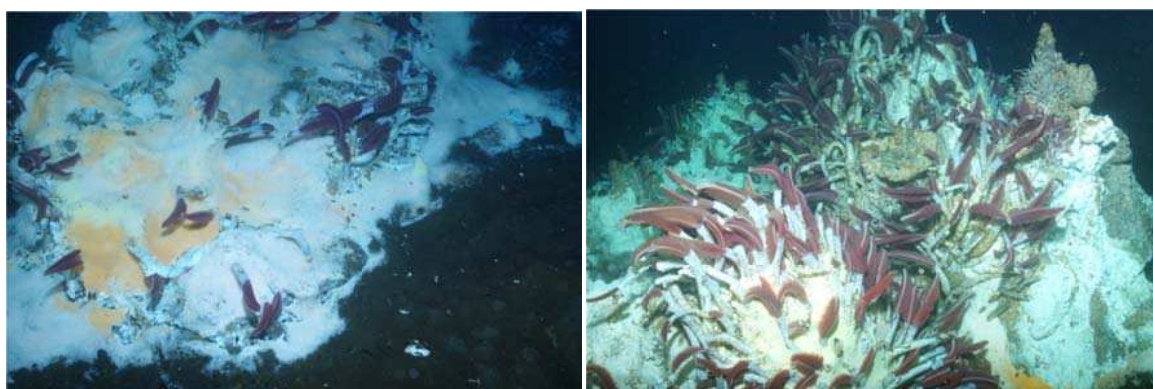
Le site hydrothermal BIG 2 est situé à 2015 m de profondeur (27°00,491'N et 111° 24,467'W) (Figures II-2 et II-4). Ce site est composé d'un ensemble de petites cheminées actives et inactives, de différentes tailles, édifiées sur des encroutements de type carbonate. Les structures inactives, sont présentes en périphérie et sont composées majoritairement de carbonate recouvert d'oxyde de fer. Aucun assemblage faunistique ou microbien (tapis) n'a été observé sur les parois des cheminées. Cependant, à la base des édifices des tapis microbiens blancs et quelques petits buissons de *Siboglinidae* de type *Riftia* se sont développés (Figure II-8). La température de sortie de fluide mesurée au niveau d'un des diffuseurs, par la sonde de température du *Nautille*, était d'environ 85°C avec une mesure maximale à 115°C.



**Figure II-8** : Photographies du site BIG 2 (images Nautille, campagne BIG; plongée 1746) ; (a) vue d'ensemble du site BIG 2 (b) vue du sommet de fumeurs.

### 1.1.3. Le site sédimentaire Mat Mound ou BIG 1

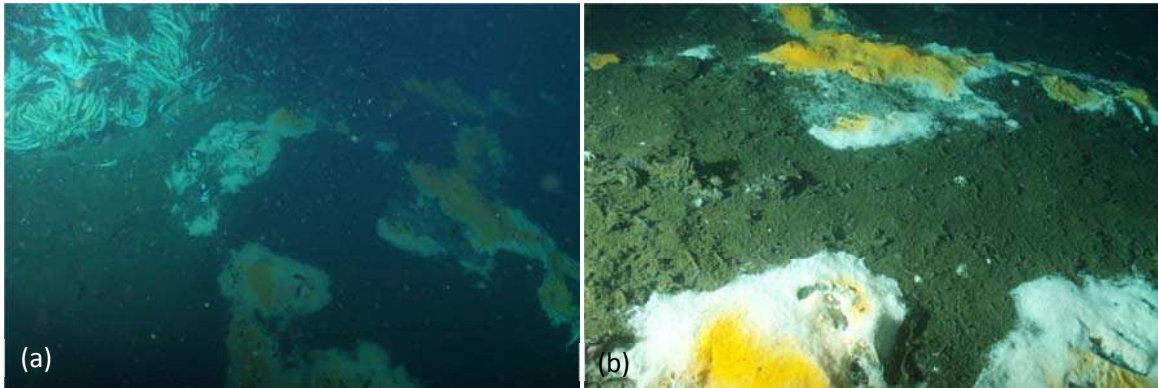
Le site Mat Mound (marqueur BIG 1, 27°00,388'N et 111°25,47'W) (Figures II-2, II-3 et II-5), situé à 2004 m de profondeur, est un site sédimentaire percolé par des fluides hydrothermaux chauds. Ce site présente des encroutements carbonatés et est surplombé par un petit mont hydrothermal (Figure II-9). La température (mesurée *in situ* par la sonde de température du *Nautile*) dans les sédiments recouverts de tapis blanc à 10, 20, 30 et 40 cm au-dessous du plancher océanique est de respectivement à 36,5°C, 68°C, 84,5°C et 103°C. L'ensemble du site, recouvert de tapis microbiens blancs et orange est colonisé par des *Siboglinidae* (*Riftia*) et des *Alvinellidae*, *Amphinomidae* et *Polynoidae* (Decker 2011) (Figure II-9).



**Figure II-9 :** Photographies du site Mat Mound (images *Nautile*, campagne BIG plongée 1745).

### 1.1.4. Le site sédimentaire Marker 27 (M27)

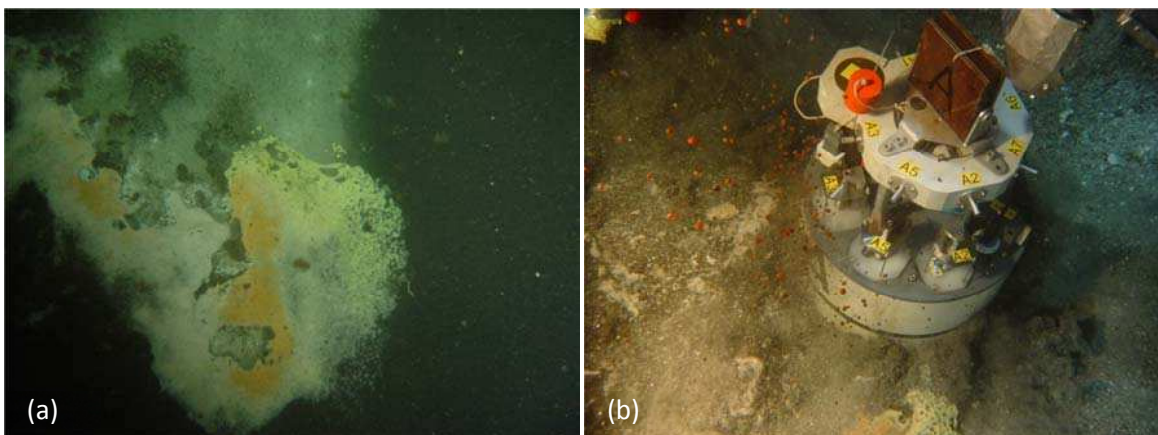
Le site Marker 27 ou M27 (27°00,444'N et 111°25,531'W) (Figures II-2, II-3 et II-5), situé à 2003 m de profondeur est un site sédimentaire percolé par des fluides hydrothermaux chauds : de 50°C à plus de 150 °C à 30 cm de profondeur selon où la température a été mesurées (tapis blanc ou orange, centre ou périphérie du patch) (Figure II-10). Ce site est constitué de petits monts carbonatés colonisés par une macrofaune de type *Riftia* (Figure II-10). Autour de ces encroutements carbonatés, le sédiment est recouvert par des patchs de tapis microbiens blancs et orange (Figure II-10a).



**Figure II-10 :** (a et b) Photographies du site Marker 27 prises avec le submersible Nautille durant la campagne BIG (plongée 1766).

### 1.1.5. Le site sédimentaire MegaMat

Le site MegaMat (27°00,459'N et 111°25,530'W) (Figures II-2, II-3 et II-5), situé à 2010 m de profondeur est un site sédimentaire percolé de fluides hydrothermaux chauds de 40°C à 90°C à 30 cm de profondeur. Uniquement recouvert de tapis microbiens blancs et orange, ce site est riche en hydrocarbures (la perturbation du sédiment provoque l'émission de bulles d'hydrocarbures, Figure II-11b) (Figure II-11).



**Figure II-11 :** (a et b) Photographies du site MegaMat prises avec le submersible Nautille durant la campagne BIG (plongée 1764) ; (b) montre des bulles d'hydrocarbures s'échappant du sédiment pendant le déploiement de la chambre benthique CALMAR.

### 1.2. Site sédimentaire de la zone de référence, hors zone active

Le site sédimentaire de la zone de référence a été choisi en position hors axe (1850 m de profondeur, 27°07,513'N et 111°30,210'W). C'est une zone dans laquelle *a priori* aucune activité hydrothermale ou d'émission de fluide n'est présente sur laquelle aucun tapis microbiens ou

assemblage faunistique caractéristique des zones d'émission de fluide froid ou des systèmes hydrothermaux n'a été observés (Figure II-12).



**Figure II-12:** Photographie du site de référence prise avec le submersible Nautille durant la campagne BIG (plongée 1771).

## 2. Méthodes d'échantillonnages et conditionnement à bord

### 2.1. Echantillonnage et conditionnement des édifices hydrothermaux

Trois structures hydrothermales actives ont été échantillonnées pendant la campagne. Deux d'entre elles l'ont été pour des analyses microbiologiques et la troisième, uniquement pour des analyses géochimiques et minéralogiques (Tableau II-1).

**Tableau II-1 :** Tableau répertoriant les trois cheminées hydrothermales échantillonnées selon leur numéro de plongée, le site de prélèvement, le type de structure et leurs conditionnements

Echantillon	Plongée	Site	Type de structure	Type d'échantillonnage	
				Analyses microbiologiques	Analyses géochimiques et minéralogiques
<b>BIG01E02</b>	1746	BIG 2	Cheminée	x	x
<b>BIG01E03</b>	1747	Rebecca's Roost	Flange	x	x
<b>1772</b>	1772	Rebecca's Roost	Cheminée		x

Les échantillons microbiologiques correspondent à un fragment d'une cheminée active du site BIG 2 (plongée 1746) et à un morceau de « flange » prélevé sur une cheminée active du site

Rebecca's Roost (plongée 1747). L'échantillon réservé aux analyses géochimiques, est une cheminée active collectée sur le site Rebecca's Roost lors de la plongée 1772.

Les échantillons destinés aux analyses microbiologiques ont été prélevés avec la pince du *Nautilé* puis placés dans une boîte de prélèvement hermétique (afin d'éviter le lessivage de l'échantillon par la colonne d'eau lors de la remontée) préalablement décontaminée et remplie à bord d'eau douce stérile. A bord, les fragments de cheminée ont été broyés (grains de taille inférieur à 1 mm jusqu'à 1 cm pour les plus gros) et sous échantillonnés dans une enceinte anaérobie sous une atmosphère de N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90:5:5) puis répartis et conditionnés de la façon suivante:

- **Pour les analyses de diversité moléculaire** : une partie du broyat a été conservé directement à -80°C; une autre partie a été reprise dans une solution d'éthanol 96% (1.5 volume de solution pour 1 volume de broyat) puis conservée à -20°C.
- **Pour les cultures** : le broyat a été transféré et repris dans une solution de NaCl à 23g.L<sup>-1</sup> en fioles pénicilline stériles fermées par des bouchons et des capsules serties ou en flacons Schott stériles fermés par des bouchons caoutchouc et des bouchons Schott percés puis conservés à 4°C sous une atmosphère de N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90:5:5).
- **Pour le FISH (fluorescent in situ hybridization)**: une partie du broyat a été fixée pendant 2h dans une solution de formaldéhyde à 2% (préparée avec de l'eau de mer stérile), rincée trois fois avec de l'eau de mer stérile puis conservée à -20°C dans un grand volume d'éthanol à 96%. Une autre partie du broyat été fixée de la même façon puis conservée dans une solution PBS /éthanol (50:50 ; vol /vol) à -20°C.
- **Pour les analyses minéralogiques et géochimiques** : une partie du broyat a été conservée à directement à -20°C et une autre à -80°C.

Le fragment de cheminée actif échantillonné pour les analyses géochimiques et minéralogiques a quant à lui été remonté dans le panier du sous-marin. A bord, il a été sous échantillonné en fonction de sa nature minérale puis séché à température ambiante.

## 2.2. Echantillonnages et conditionnement des carottes sédimentaires


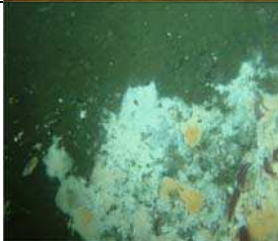


Les carottes sédimentaires ont été prélevées en utilisant des carottiers tubes de 30 cm. Ils étaient en PVC pour l'échantillonnage du sédiment hors site actif (zone de référence) et en polycarbonate pour les prélèvements en zone hydrothermale. Des carottiers tubes de plus grande taille, 60 cm, en aluminium ont également été utilisés pour les échantillonnages de sédiments sur la dépression sud (sédiments « chauds ») recouverts de tapis microbiens. Des marqueurs de

températures (marqueurs haute température Tempstrip™) ont été collés à trois niveaux sur les carottiers tubes : en bas, au milieu et en haut du carottier ; 3 marqueurs par niveau (1 par gamme de température i.e. 40-71 ; 77-116 et 121-160°C) afin d'avoir une information sur les températures *in situ* dans le sédiment,



### I.2.1. Sous-échantillonnages et conditionnement des carottes « géomicrobiologie »

Plusieurs carottes sédimentaires, collectées dans différents sites recouverts de tapis microbiens (ou non pour la zone de référence), ont été conditionnées pour les analyses de géomicrobiologie, présentées dans le tableau ci-après (Tableau II-2).

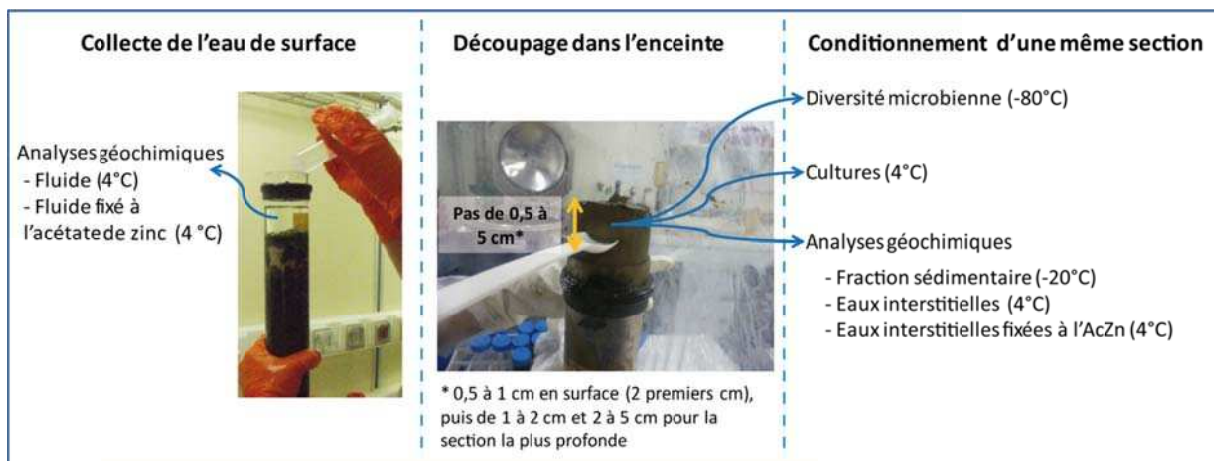
**Tableau II-2 :** Tableau des prélèvements et des sous-échantillonnages des carottes « géomicrobiologie ».

Site de prélèvement	Code de l'échantillon	Lieu de prélèvement et description de la carotte	Photographie de la zone échantillonnée	
<b>Sédiments hydrothermaux de la Dépression Sud</b>				
<b>Mat Mound</b> marqueur BIG 1	PI1764-20 CT3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carottage sur une zone de tapis microbien orange</li> <li>- Taille de la carotte : 22 cm</li> </ul>		
	PI1770-26 CT10	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carottage sur une zone de tapis microbien blanc</li> <li>- Taille de la carotte : 8,5 cm</li> </ul>		
<b>Marker 27</b>	PI1766-22 CT2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carottage dans un tapis microbien blanc</li> <li>- Taille de la carotte : 21,5 cm</li> </ul>		
	PI1767-23 CT12	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carottage dans un tapis microbien blanc</li> <li>- Taille de la carotte : 18 cm</li> </ul>		



Site de prélèvement	Code de l'échantillon	Lieu de prélèvement et description de la carotte	Photographie de la zone échantillonnée
<b>Sédiments hydrothermaux de la Dépression Sud</b>			
<b>Megamat</b>	PI1765-21 CT6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carottage dans un tapis microbien blanc peu dense</li> <li>- Taille de la carotte : 15 cm</li> </ul> <i>Remarque : Fond du carottier était fondu</i>	
<b>Sédiments de la zone de références, hors zone active</b>			
<b>Hors axe</b>	PI1771-27 CT4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Carottage sur une zone hors tapis microbien</li> <li>- Taille de la carotte : 21 cm</li> </ul>	

Avant leur découpage et leur conditionnement dans une boîte à gant anaérobie continuellement flushée d'azote (Figure II-13), l'eau de surface recouvrant chaque carotte a été prélevée avec une seringue prélavée à l'acide et immédiatement filtrée sur 0,45 µm (Filtre Millex, Millipore) puis conditionnée pour les analyses chimiques. Une partie a été directement aliquotée en bouteille LDPE<sup>6</sup> et l'autre a été filtrée sur 0,45 µm (Filtre Millex, Millipore) puis transférée en bouteilles LDPE.



**Figure II-13** : Découpage et conditionnement des carottes « géomicrobiologie ».

<sup>6</sup> Toutes les bouteilles LDPE contenant les échantillons destinés aux analyses chimiques, en particulier des métaux traces, ont été préalablement lavées à l'acide.

Dans la boîte à gant (Captair® Pyramid Glove Bag, Cole-Parmer, Figure X) , les carottes ont été découpées, en anaérobiose, sous N<sub>2</sub>, à l'aide de spatules en plastique stérile à usage unique, en section de 0,5 à 5 cm (sections fines de 0,5 à 2 cm pour les 2 premiers cm échantillonnés, puis sections de 2 cm et en sections plus épaisse de 2 à 5 cm pour l'échantillon le plus profond) (Figures II-13, II-14 et Tableau II-2). Ensuite chaque section a été sous-échantillonnée et conditionnée comme suit :

- **Pour les analyses de diversité moléculaire** : une fraction du sédiment été conservé directement à -80°C.
- **Pour les cultures** : une fraction de sédiment a été placée en fiole pénicilline stérile puis bouchée. A l'extérieur de l'enceinte, 2 volumes d'eau de mer stérile pour un volume de sédiment ont été ajoutés.

L'eau de mer à pH7 était composée (pour 1L) de NaCl, 18g ; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 4g ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 3,45g ; NH<sub>4</sub>Cl, 0,25g ; KCl, 0,33g ; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,14g ; NaHCO<sub>3</sub>, 5g et K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,14 g. Cette base d'eau de mer a été portée à ébullition puis refroidie sous un mélange gazeux N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90 :10); pendant le refroidissement pour la rendre anoxique, 0,5g de L-Cysteine-HCl ont été ajoutés. Le milieu a ensuite été réparti en bouteilles dans lesquelles l'atmosphère gazeuse a été remplacée par un mélange gazeux de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90 :10) puis stérilisé.

- **Pour les analyses géochimiques des eaux interstitielles et des sédiments** : une fraction plus importante de sédiment a été aliquotée en Falcon de 50 ml. Afin d'extraire les eaux interstitielles, les sédiments ont été centrifugés à 5000 tr.min<sup>-1</sup> pendant 10 à 20 min à 10°C, puis conditionnés à l'intérieur de l'enceinte anaérobie. La fraction liquide a été filtrée sur 0,45 µm (Filtre Millex, Millipore) puis distribuée soit (1) en fioles LDPE pour la détermination de sa composition chimique (concentration en éléments majeurs et traces) ; soit (2) fixée par précipitation sous forme de ZnS, dans des fioles pénicillines contenant 0,1g d'acétate de zinc et dans lesquelles un vide partiel a été préalablement réalisé ; pour la détermination des concentrations en H<sub>2</sub>S ainsi que la composition isotopique du soufre. Les échantillons solides ont été conservés pour déterminer leur composition minéralogique et élémentaire (éléments majeurs). Les échantillons liquides ont été conservés à 4°C et les fractions solides à -20°C.

*A noter que cette technique a été privilégiée à la technique des « Rhizon » (micro-préleveur associé à un dispositif de collecte qui sert à collecter les eaux interstitielles) afin de réaliser une étude à la fois des eaux interstitielles mais également microbiologiques et géochimiques sur la phase solide associée.*



**Figure II-14 :** Photographie de la boîte à gants anaérobie utilisée lors du découpage et du traitement des carottes «géomicrobiologie».

### **I.2.2. Sous-échantillonnages et conditionnement des carottes « microbiologie »**

Plusieurs carottes sédimentaires ont été prélevées dans différents sites (soit recouverts de tapis microbiens soit caractérisés par la présence de vésicomiydés) de la Dépression Sud. Ces carottes ont été sous échantillonnées en chambre froide en utilisant une spatule métallique et un guide en métal d'un pas de 2 ou 3 cm pour les premiers centimètres ou de 5 à 7 cm pour la dernière section. Pour ces carottes, seules les eaux interstitielles ont été échantillonnées et collectées dans le cadre de ce travail. Ainsi, pour chaque section échantillonnée, environ 5 à 10 ml de sédiments ont été distribués en Falcon de 50 ml, centrifugés à  $5000 \text{ tr.min}^{-1}$  pendant 10 à 20 min à  $10^{\circ}\text{C}$ , puis les eaux interstitielles et la fraction sédimentaire solide ont été conditionnées de la même façon que les carottes « géomicrobiologie » mais à atmosphère ambiante.

Il s'agit des carottes :

- PI 1763-GCT et PI 1764-CT4, collectées dans un tapis microbien du site Mat Mound.
- PI 1766-CT3 et PI 1766-GCT, échantillonnées dans un tapis microbien du site Marker 27.
- PI 1768-CT2 et PI 1770-CT8, prélevées dans une zone à vésicomiydés (site Morelos, marqueur BIG 10).

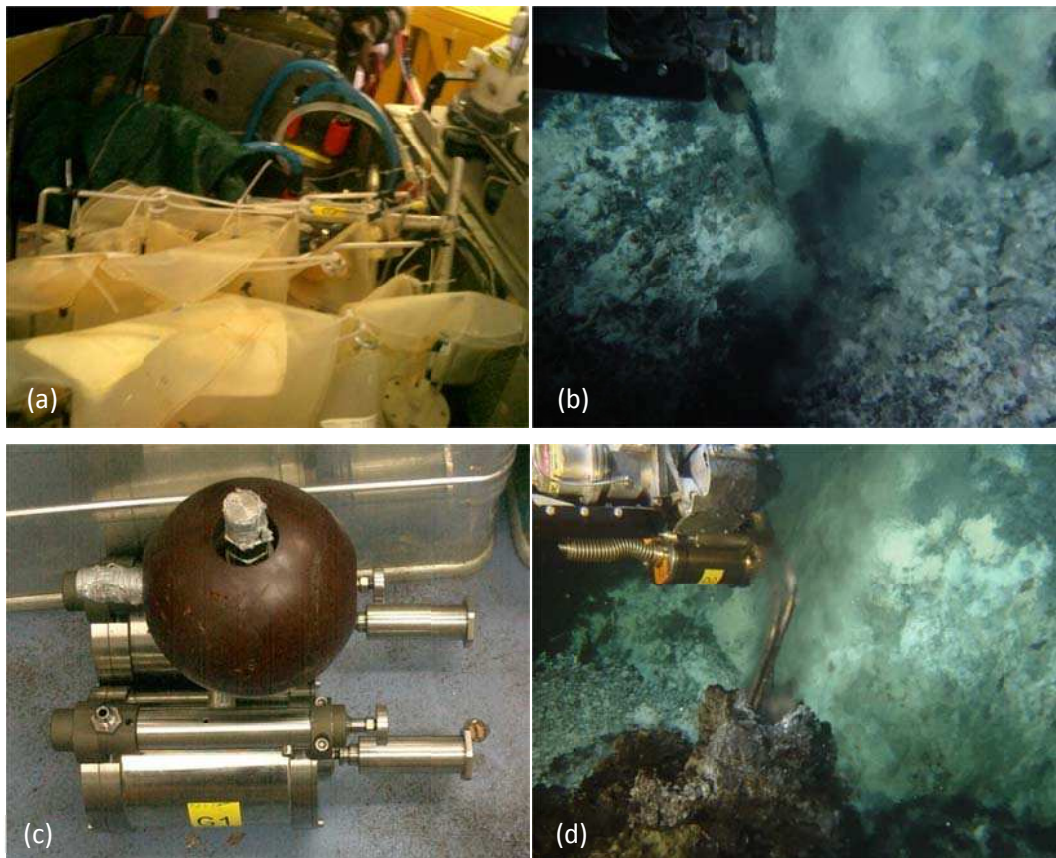
### **I.3. Prélèvement de fluides et conditionnement**

*Le conditionnement des fluides collectés avec le système de prélèvement PEPITO a été réalisé à bord par Pierre-Marie Sarradin, Matthieu Waeles et Olivier Rouxel.*

Les fluides : fluides hydrothermaux, fluides de la zone de mélange fluide hydrothermal-eau de mer et eau de mer, ont été collectés pour des analyses géochimiques, soit par le système de

prélèvement de fluide PEPITO (Sarrazin et al. 2006) qui permet un échantillonnage multiple et indépendant de fluide par pompage dans des poches de prélèvement (de volume allant de 100 mL à 5 L), soit en utilisant des seringues Titane (Figure II-15).

A bord, les bouteilles Titane ont préalablement été rincées plusieurs fois à l'eau Milli-Q. Les poches de prélèvement PEPITO, étant à usage unique seuls les tubes de prélèvement ont été rincés à l'eau Milli-Q.



**Figure II-15 :** Les outils de prélèvement de fluide : (a) système de prélèvement PEPITO avec ses poches de collectes ; (b) Prélèvement de fluide hydrothermal avec le système de prélèvement PEPITO (canule de prélèvement dans le mélange eau de mer - fluide hydrothermal), (image Nautilie campagne BIG, plongée 1747) ; (c) Couple de bouteilles Titane et (d) Prélèvement de fluide hydrothermal avec les bouteilles Titane, (image Nautilie campagne BIG, plongée 1772).

Le système de prélèvement de fluide PEPITO a permis d'échantillonner lors de la plongée :

- PI 1747, du fluide hydrothermal dilué avec de l'eau de mer, prélevé dans la zone de mélange à environ 100°C (température minimale 60°C et maximale 190,1°C) au niveau du flange échantillonné sur le site Rebecca's Roost.
- PI 1772, sur le site Rebecca's Roost, des fluides prélevés dans la zone de mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer (température des fluides collectés de 2,8 à 160°C) ; ainsi que l'eau environnant une zone à *Alvinellidés* (température du fluide collecté : 2,6 à 4°C)

- PI 1765, la pleine eau surplombant le site MegaMat.
- PI 1770, sur le site BIG 10, en plusieurs prélèvements, l'eau de mer environnant une zone à *Vesicomiydés*.

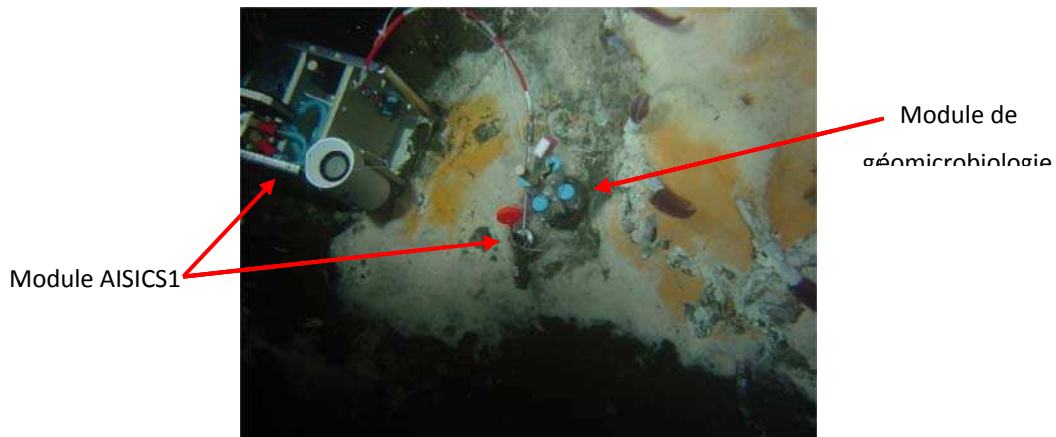
Les bouteilles Titane, ont permis d'échantillonner du fluide hydrothermal du site Rebecca's Roost lors des plongées 1747 (au niveau de la flange collectée) et 1772 (au niveau d'un autre fumeur noir). Ce système a également été utilisé pour collecter de l'eau de mer (échantillon 1770-SSW).

Tous les échantillons de fluides ont été conditionnés à bord à température ambiante comme suit : (1) une fraction prélevée à l'aide d'une seringue connectée directement aux poches d'échantillonnage a été filtrée à 0,45 µm et aliquotée dans une bouteille en LDPE (entre 30 ml et 400 ml) ; (2) une autre fraction a été directement transférée dans une bouteille en LDPE. Ces deux fractions ont été conservées à 4°C/-20°C avant leur acidification au laboratoire pour la détermination de leurs compositions chimiques (concentration en éléments majeurs et traces). Un autre sous-échantillon de fluide hydrothermal filtré, prélevé grâce à une seringue, a été filtré sur 0,45 µm (Millex®, Millipore) puis fixé par addition de 0,1g d'acétate de zinc dans une fiole, dans laquelle un vide partiel a été préalablement réalisé. La précipitation de l'H<sub>2</sub>S sous forme d'un précipité de ZnS permet la préservation et la détermination ultérieure de la concentration en H<sub>2</sub>S ainsi que les compositions isotopiques du soufre de l'H<sub>2</sub>S et du SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (contenu dans la phase liquide). Tous les échantillons ont été conservés à 4°C.

#### **I.4. Déploiements et conditionnements de modules de colonisation *in situ***

*Les analyses des modules de colonisations ont été réalisées en collaboration avec Céline Rommevaux-Jestin (IPGP).*

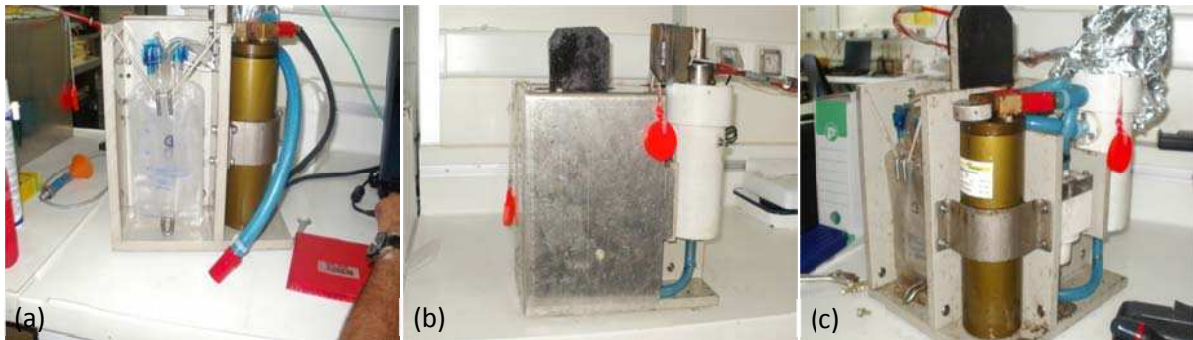
Des modules de colonisation *in situ*, ont été déployés, dans le sédiment (modules AISICS), ou à la surface du sédiment (module de géomicrobiologie) à la base du site Mat Mound (BIG 1). Tous les modules ont été déployés dans une zone, restreinte de 20-30 cm de diamètre, (Figure II-16) ; l'un après l'autre, afin d'éviter la perturbation du sédiment et des eaux interstitielles lors des étapes de déploiements et de récupérations des modules.



**Figure II-16 :** Photographie de module AISICS1 et du module de géomicrobiologie, déployés à proximité l'un de l'autre, sur le site Mat Mound (image Nautilie, campagne BIG (plongée 1745).

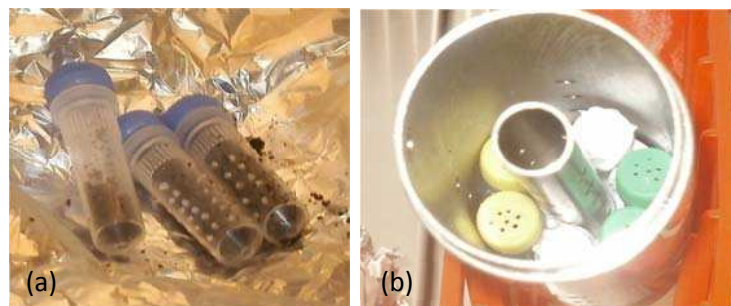
#### **I.4.1. Modules de colonisation *in situ* AISICS**

Le module de colonisation *in situ* **AISICS** (acronyme de **Autonomous In Situ Instrumented Colonization System**) est un colonisateur microbien instrumenté et autonome, constitué de 2 parties : l'incubateur et son socle (partie fixe) (Figure X). L'incubateur est constitué d'un corps en titane, long de 180 mm et de 42 mm diamètre, percé de nombreux trous, à l'intérieur duquel, en son centre, on trouve un étui en titane également percé de trous. Cet étui sert de logement à une sonde de température de type Micrel reliée à la partie fixe et à une canule de prélèvements de fluide reliée, dans la partie fixe, à des poches de prélèvements. La partie fixe contient toute la partie électronique du module : une carte électronique et une pile enfermées dans un cylindre étanche, le système électronique de la sonde de température, le système de pompage des fluide de type PEPITO qui possède 4 voies indépendantes alimentant 4 poches de prélèvements. Ce système automatisé permet de configurer et de programmer avant le déploiement, à bord, le déclenchement des 4 voies de prélèvement de façon indépendante. La partie fixe contient également le réceptacle de l'incubateur, étui étanche et hermétique, où est placé l'incubateur lors de sa descente et de sa remontée afin d'éviter le lessivage du module lors de la remontée du submersible (Figure II-17).



**Figure II-17** : Photographie de module AISICS 1 prise à bord pendant sa mise en œuvre : (a) socle du module AISICS avec ses poches de prélèvement de fluide et son cylindre étanche contenant l'interface électronique ; (b) socle du module AISICS recouvert et colonisateur AISICS dans son étui étanche ; (c) socle du module AISICS avec ses poches de prélèvement de fluide, son cylindre étanche contenant l'interface électronique, son système de pompage de fluide et l'incubateur AISICS dans son réceptacle étanche.

A l'intérieur de chaque module, des petits incubateurs contenant les substrats, ont été répartis sur 3 niveaux. Chaque niveau est séparé des autres par une rondelle de Téflon percée de trous de 0,5 cm. Les petits incubateurs biotiques sont constitués de micro-tubes de 2 ml percés de trous de 1 mm sur toute leur hauteur et de bouchons percés de trous de 1mm ; tandis que les incubateurs abiotiques sont des tubes de 2 ml non percés bouchés par une membrane filtrante de 0.22 $\mu$ m (Figure II-18).



**Figure II-18** : Photographie des petits incubateurs biotiques et abiotiques contenus dans le colonisateur AISICS : (a) Avant stérilisation et mise en place dans le colonisateur AISICS : microtube non percé correspondant à l'incubateur abiotique et les 2 microtubes percés avec leurs bouchons percés correspondant aux futurs incubateurs biotiques ; (b) Après stérilisation, mise en place des incubateurs dans la colonisateur AISICS. Pour les témoins abiotiques, le bouchon a été stérilement remplacé par une membrane filtrante stérile de 0.22 $\mu$ m.

Les trous du corps de l'incubateur en titane, des lamelles en Téflon et des mini-incubateurs biotiques, permettent les échanges de fluide entre intérieur-extérieur du module mais également dans le module en permettant la circulation du fluide entre les 3 étages.

Les substrats basaltiques choisis sont les suivants :

- Verres basaltiques synthétiques

- Verres basaltiques synthétiques enrichies en  $^{57}\text{Fe}$  dans le but de réaliser des analyses isotopiques et déterminer l'origine de la mobilisation du fer lors de l'altération des verres : fluide hydrothermal, eau interstitielle ou verre lui-même)
- Verres basaltiques naturels provenant du site Lucky Strike (Ride Médio Atlantique, MAR)

Chaque étage contient 4 petits incubateurs biotiques et 2 petits incubateurs abiotiques. Chaque petit incubateur été rempli au tiers ou au deux tiers avec les verres basaltiques.

#### **I.4.1.1. Mise en place et déploiement du module AISICS1**

Initialement, le module AISICS1 devait être déployé pour une courte période de 8 jours sur le site Mat Mound ; or le retour sur zone à la date prévue a été annulé (pour cause de mer forte), de ce fait la durée totale de son déploiement a été de 22 jours.

Les mesures de température ont été fixées à une fréquence de 30 secondes. Le système de pompage a été programmé pour collecter les fluides interstitiels toutes les 24 heures pendant la première semaine.

Pour chaque étage du module AISICS1, les mini-incubateurs biotiques ont été remplis comme suit :

- 1 avec des verres basaltiques synthétiques
- 1 avec des verres basaltiques synthétiques dopés en  $^{57}\text{Fe}$
- 2 avec des verres basaltiques naturels provenant du site Lucky Strike (Ride Médio Atlantique)

et les mini-incubateurs abiotiques avec :

- 1 avec des verres basaltiques synthétiques
- 1 avec des verres basaltiques naturels provenant du site Strike de l'Atlantique

#### **I.4.1.2. Mise en place et déploiement du module AISICS2**

Le module AISICS2 a été déployé pour une durée de 8 jours, à côté de la zone de mouillage d'AISICS1, à la jonction d'un tapis microbien blanc et orange.

Les mesures de température ont été réalisées toutes les secondes. Le système de pompage a été programmé pour collecter les fluides toutes les 48 heures pendant la durée du déploiement.

Pour chaque étage du module AISICS2, les mini-incubateurs biotiques ont été remplis comme suit :

- 2 avec des verres basaltiques synthétiques enrichis en  $^{57}\text{Fe}$
- 2 avec des verres basaltiques naturels provenant du site Lucky Strike (Ride Médio Atlantique)



et pour les mini-incubateurs abiotiques :

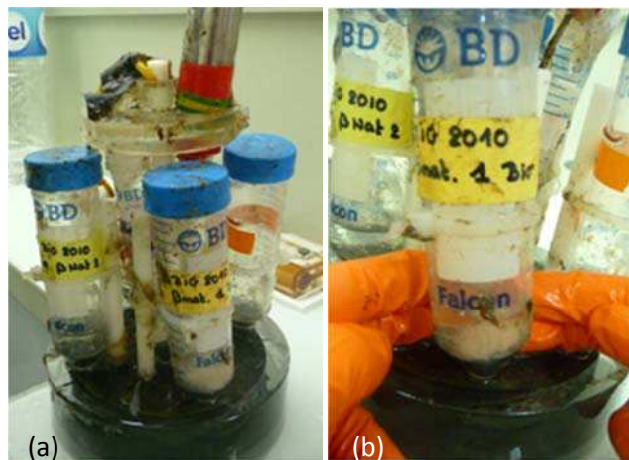
- 1 avec des verres basaltiques synthétiques dopés en  $^{57}\text{Fe}$
- 1 avec des verres basaltiques naturels provenant du site Strike de l'Atlantique

*Un troisième module AISICS (AISICS3), configuré à l'identique du module AISICS2, a été déployé dans la même zone de mouillages que les modules AISICS1 et AISICS2. Pour cette étude, seul le corps en titane (uniquement l'incubateur) a été déployé. Il a été déployé pour une longue durée (plusieurs années) et devrait permettre d'observer d'autres communautés microbiennes que celles détectées dans les deux autres modules ainsi que d'autres précipitations minérales secondaires et des figures d'altération des verres basaltiques.*

#### **I.4.2. Module de colonisation géomicrobiologie**

Le module de géomicrobiologie est un colonisateur microbien de surface déployé à la surface du plancher océanique. Il a été mis au point par Céline Rommevaux-Jestin (IPGP) et a été déployé sur différents sites hydrothermaux de la dorsale médio-atlantique. Ce module de géomicrobiologie, contrairement aux modules AISICS, ne possède pas de système de pompage d'eau.

Il est composé d'un support sur lequel sont placés les 6 incubateurs et en son centre, d'une sonde de température de type Micrel. Ce module est composé de deux types d'incubateurs : 4 biotiques et 2 abiotiques. Les incubateurs biotiques sont faits de tubes Falcon de 50 ml percés sur toutes leurs hauteurs, fermés par leurs bouchons également percés de trous de 1mm. Les incubateurs abiotiques sont des tubes Falcon de 15 ml intacts (non percés), dont le bouchon a été remplacé par une membrane filtrante de  $0.22\mu\text{m}$  (Figure II-19) de façon à laisser les fluides circuler.



**Figure II-19 :** Photographie du module de colonisation géomicrobiologie après son déploiement (A) Module géomicrobiologie dans son ensemble : posés sur leur socle, les colonisateurs biotiques (tubes Falcon de 50 ml percés) et colonisateurs abiotiques (tubes Falcon de 15 ml non percés recouverts d'une membrane filtrante) entourant la sonde de température ;(B) Photographie d'un des colonisateurs biotiques.

Dans le fond de chaque incubateur quelques grammes de verres basaltiques ont été déposés.

Les substrats basaltiques choisis sont les suivant :

- Verres basaltiques synthétiques
- Verres basaltiques synthétiques enrichis en  $^{57}\text{Fe}$ <sup>7</sup>
- Verres basaltiques naturels provenant du site Strike de l'Atlantique

Ainsi, les colonisateurs biologiques ont été constitués comme suit :

- 1 colonisateur contenant des morceaux de verres basaltiques synthétiques
- 1 colonisateur contenant des morceaux de verres basaltiques synthétiques enrichis en  $^{57}\text{Fe}$
- 2 colonisateurs contenant des morceaux de verres basaltiques naturels provenant du site Lucky Strike (Ride Médio Atlantique)

Ce module de colonisation a été déployé à la surface d'un tapis microbien blanc, pour une durée de 24 jours, à proximité de la zone de mouillage d'ALSICS 1 et 2.

Afin d'éviter de potentielles contaminations et lessivage par la colonne d'eau, le module de colonisation de géomicrobiologie a été placé, avant et après déploiement dans une boîte de prélèvement hermétique et aseptique remplie d'eau de mer stérile.

### **I.4.3. Conditionnement des modules de colonisation**

#### **I.4.3.1. Conditionnement des verres basaltiques**

A bord, pour tous les modules de colonisation : ALSICS 1, 2 et du module de Géomicrobiologie, des sous échantillonnages des substrats minéraux ont été effectués. Ainsi, différentes fractions ont été conditionnées pour l'étude de la diversité microbienne et de la l'altération de verres. Ces sous échantillonnages ont été réalisés et conditionnés de la façon suivante:

- ***Pour les analyses de diversité moléculaire*** : une fraction des substrats basaltiques a été conservée directement à -80°C; une autre partie a été reprise dans une solution d'éthanol 96% (1.5 volume de solution pour 1 volume de broyat) puis conservée à -20°C.

---

<sup>7</sup> Pour déterminer l'origine de la mobilisation du fer lors de l'altération des verres : fluide hydrothermal, eau interstitielle ou verre lui-même

- **Pour les cultures** : quelques morceaux de verres basaltiques ont été transférés en fioles pénicilline puis recouverts avec de l'eau de mer artificielle stérile, puis balayés à l'azote pour les échantillons provenant des modules AISICS ou non pour les échantillons du module de géomicrobiologie, puis conservés à 4°C.
- **Pour le FISH** : une partie des verres basaltiques a été fixée au formaldéhyde. C'est à dire que l'échantillon a été fixé pendant 2h dans une solution de formaldéhyde à 2% (préparé avec de l'eau de mer stérile), rincé trois fois avec de l'eau de mer stérile puis conservé dans un grand volume d'éthanol à 96% -20°C ; une autre partie a directement été fixée et conservée dans une solution éthanol 50%/PBS 1X à -20°C.
- **Pour les analyses minéralogiques, géochimiques et isotopiques (isotopie du fer)**: une fraction des substrats a été conservée directement à -20°C et une autre directement à -80°C.

#### **1.4.3.2. Conditionnement des fluides**

A bord, les poches de prélèvements de fluide des modules AISICS1 et 2, ont été échantillonnées et conditionnées de la façon suivante (quand le volume collecté le permettait):

- **Pour les cultures** : 10 ml de fluide ont été aliquotés sous vide en fioles pénicilline de 25 ml stériles anoxiques puis balayées par de l'azote et conservées à 4°C.
- **Pour les analyses géochimiques** : 60 ml (quand cela était possible) ont été filtrés sur 0.22µm et conservés comme suit :

*La fraction liquide a été conditionnée pour :*

- **Isotopie du Soufre et concentration en H<sub>2</sub>S**: 10 ml de fluide ont été filtrés sur 0,45 µm (Millex®, Millipore) puis fixés par addition de 0,1g d'acétate de zinc dans une fiole pénicilline dans laquelle un vide partiel a été préalablement réalisé
- **Pour les analyses géochimiques** : 50 ml de fluide ont été distribués en fioles LDPE pour la détermination de sa composition chimique (concentration en éléments majeurs et traces) et conservés à température ambiante.

*Le filtre a été conservé, découpé et conditionné pour :*

- **Les analyses de diversité moléculaire** : une fraction du filtre a été conservée directement à -80°C; une autre partie a été reprise dans une solution d'éthanol 96% (1.5 volume de solution pour 1 volume de broyat) puis conservée à -20°C.
- **Le FISH** : une partie du filtre a été fixée au formaldéhyde, l'échantillon a été fixé pendant 2h dans une solution de formaldéhyde à 2% (préparée avec de l'eau

de mer stérile), rincé trois fois avec de l'eau de mer stérile puis conservé dans un grand volume d'éthanol à 96% -20°C ; une autre partie du filtre a directement été fixée et conservée dans une solution éthanol 50%/PBS 1X à -20°C.

- **Pour les analyses minéralogiques** : une fraction du filtre a été conservée à directement à -20°C.

Les volumes de fluide récoltés dans les poches d'ALSICS 2 étant faibles, seul le conditionnement pour les analyses chimiques a pu être effectué et le filtre entier a été placé à -20°C.

### 3. Analyses microbiologiques, géochimiques, isotopiques et minéralogiques au laboratoire

#### 3.1. Analyses microbiologiques

##### 3.1.1. Approches moléculaires

###### 3.1.1.1. Extraction des acides nucléiques et des ADN totaux

Plusieurs méthodes d'extraction des acides nucléiques et des ADN totaux ont été utilisées. La méthode choisie, l'a été en fonction de la matrice et de la nature de l'échantillon à extraire mais également en fonction de la quantité d'échantillon disponible.

Ainsi, les acides nucléiques des échantillons de sédiments ont été extraits en utilisant **la méthode de Zhou modifiée**, alliant lyse thermique, chimique et enzymatique (des chocs thermiques : congélation à l'azote liquide et décongélation à 65°C, des détergents : SDS et sarkosyl et une enzyme protéolytique : protéinase K). Pour cette méthode d'extraction environ 2,5g de sédiments ont été resuspendus dans 6,8 ml de tampon de lyse TE-Na-1X (Tris-HCl 100 mM final pH8 ; EDTA 100 mM final pH8 ; tampon phosphate 100 mM final pH8 ; NaCl 1,5 mM et 1% final de CTAB). Après 3 cycles de congélation dans de l'azote liquide, décongélation au bain-marie à 65°C ; et lorsque l'échantillon a refroidi et est à 37°C environ, 25 µl de protéinase K à 20 mg.ml<sup>-1</sup> sont ajoutés. L'échantillon a ensuite été placé horizontalement à 37°C sous agitation (150 rpm) pendant 30 minutes. Ensuite, 750 µl de

SDS à 20% ont été ajoutés. Après une incubation de 2h à 65°C au bain-marie, l'échantillon a été centrifugé à température ambiante pendant 10 min. à 5700 rpm afin d'éliminer les débris particuliers et cellulaires. Le surnageant a ensuite été collecté dans des tubes refroidis et gardé dans la glace. Le culot sédimentaire a été remis en suspension dans du tampon d'extraction (dans 2,3 ml) auquel 250 µl de SDS 20% ont été ajoutés puis mis à incuber à 65°C au bain marie pendant 10 minutes. Ensuite l'échantillon a été centrifugé à température ambiante pendant 10 min à 5700 rpm et le surnageant a été ajouté à celui gardé sur glace. Le surnageant a ensuite été traité avec un volume égal d'une solution de phénol/alcool isoamylique (24/1, v/v). Après une centrifugation de 10 min. à 7500 rpm. La phase supérieure a été prélevée puis 0,6 volume d'isopropanol ont été ajoutés au surnageant et laissé reposer 1h à température ambiante. Après une centrifugation de 30 min. à 10 000 rpm, le surnageant a été éliminé. 10 ml d'éthanol à 80% froid ont été ajoutés au culot d'acide nucléique pour le laver. Enfin, après une centrifugation à 4°C de 15 min. à 10 000 rpm, le surnageant a été totalement éliminé, le culot et les acides nucléiques ont été repris dans 1 ml d'eau Milli-Q.

Les acides nucléiques des échantillons de cheminées hydrothermales, des cultures d'enrichissements en bioréacteurs et des souches pures (environ 1g de cheminée hydrothermale, un quart de filtre pour les échantillons de culture d'enrichissement ou culot cellulaire pour les souches pures) ont été extraits en utilisant **une méthode d'extraction basée sur une lyse chimio-enzymatique** (détergents : SDS et sarkosyl et enzyme protéolytique : protéinase K), suivie d'une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Cette méthode consiste à resuspendre l'échantillon dans 1 ml de tampon de lyse TE-Na-1X auxquels, 100 µl de Sarkosyl à 10%, 100 µl de SDS à 10% et 20 µl de protéinase K à 20 mg.ml<sup>-1</sup> ont été ajoutés. Après une incubation de 1h à 3h à 55°C au bain-marie, l'échantillon a été centrifugé pendant 20 min. à 8000 rpm afin d'éliminer les débris particuliers et cellulaires. Le surnageant a ensuite été traité avec un volume égal de PCI (25/24/1, v/v/v, pH 8,20). Après une centrifugation de 15 min. à 13000 rpm à 4°C, la phase supérieure a été prélevée puis traitée avec un volume égal de chloroforme et ensuite centrifugée 15 min. à 13000 rpm à 4°C. Ensuite, 0,7 volume d'isopropanol glacé ont été ajoutés au surnageant, puis placés 30 min. à -80°C. Enfin, les acides nucléiques culotés par une centrifugation de 10 min. à 4°C à 14000 rpm ont été repris dans 50 µl de tampon TE-1X (Tris-HCl 100 mM final pH8 ; EDTA 100 mM final pH8).

Les ADN totaux issus des échantillons de verres basaltiques (Module de colonisation *in situ*), ont été extraits avec le **kit d'extraction FastDNA® SPIN kit for soil** (MP Biomedicals), en suivant le protocole du fabricant et les modifications apportées par Webster et collaborateurs en 2003 (Webster et al. 2003). Cette méthode d'extraction combine une lyse mécanique (broyage de l'échantillon au broyeur «FastPrep® ») et chimique. Les modifications réalisées par Webster *et al.*,

(Webster et al. 2003) et Erwan Roussel consistent en l'ajout de 200 µg d'acide polyadénylique (PolyA) dans le « tube de lysing matrix » lors de la préparation de l'échantillon. Le temps d'homogénéisation avec la « binding matrix » a été augmenté (25 min. au lieu de 2 min), de même que la phase de repos (30 min. à 37°C à la place de 3 min. à température ambiante), ainsi que le temps d'élution de l'ADN extrait (1h à 37°C à la place de 3 min.).

### **3.1.1.2. Extraction des ARN et rétro-transcription en ADN complémentaires**

Afin d'accéder aux micro-organismes actifs dans un échantillon (cultures d'enrichissements, échantillons de sédiment), les ARN totaux ont été extraits et purifiés à partir des acides nucléiques extraits, en utilisant le kit NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II kit (MachereyNagel) en suivant les instructions du fabricant et en remplaçant le β-mercaptoethanol par de l'éthanol absolu. L'absence d'ADN dans les échantillons d'ARN a été contrôlée par des PCR directes sur le gène codant pour l'ARNr 16S des archaea et des bacteria.

La retrotranscription des ARN en ADN complémentaires a été effectuée en utilisant le kit qScript<sup>™</sup>cDNA SuperMix (Quanta) en suivant le protocole du fabricant. Ce kit contient tous les réactifs et enzyme nécessaires à la retrotranscription : des dNTPs, un tampon de réaction, du MgCl<sub>2</sub> à la concentration optimale de l'enzyme, une protéine recombinante inhibitrice de RNases, des amorces permettant d'amplifier aléatoirement le génome, l'enzyme de retrotranscription qScript transcriptase et un stabilisateur. Cette étape de transcription inverse permet la production de fragment d'ADN complémentaire d'une taille inférieure à 1kb.

### **3.1.1.3. Amplification des gènes par PCR : gènes codant pour l'ARNr 16S et gènes de fonction**

Cette technique d'étude de la diversité par approches moléculaires a été employée à plusieurs étapes et lors de plusieurs études et ce à partir :

- d'ADN totaux extraits de cheminées hydrothermales et des modules de colonisation *in situ* en vue d'étudier la diversité *via* la réalisation de banques de clones d'ADNr 16S et de gènes de fonctions.
- d'ADN totaux de souches isolées pour procéder à l'identification de la souche par séquençage des gènes codant les ARNr 16S ou sur l'ADN extrait de cultures

d'enrichissements afin de comparer l'évolution de leur composition à différents temps de culture par ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

- d'ADNc obtenus après RT-PCR pour les échantillons de sédiments, de cheminées hydrothermales et de cultures d'enrichissements en bioréacteurs en vue d'étudier la diversité active en comparant plusieurs échantillons issus de cultures d'enrichissements par DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et par la réalisation de banques de clones.

La diversité phylogénétique basée sur l'étude du gène codant pour l'ARNr 16S a été réalisée en utilisant le couple d'amorces A8F/A915R pour les *Archaea* et le couple d'amorces E8F/U907R pour les *Bacteria* (Tableau II-3).

Les populations de sulfato-réducteurs ont été investiguées en utilisant un couple d'amorces DSR1R/DSR1F (Tableau II-3), spécifique du gène *dsrAB* qui code pour une enzyme clé de la sulfato-réduction : la (di)sulfite réductase.

Les populations de méthanogènes et d'ANME (ANAerobic MEthane oxidizer) ont été étudiées avec le couple d'amorces ME1/ME2 (Tableau II-3), spécifique de la sous unité  $\alpha$  du gène encodant la méthyl co-enzyme M réductase (MCR), enzyme impliquée dans la dernière étape de la méthanogénèse.

Tous les gènes ont été amplifiés par PCR dans un volume réactionnel de 50  $\mu$ l qui contenait : 10  $\mu$ l de Tampon 5X spécifique de la polymérase ; 5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  à 7,5 mM ; 1  $\mu$ l de dNTP à 10 mM ; 0,2  $\mu$ l de chaque amorce à 100  $\mu$ mol ; x  $\mu$ l d'ADN d'intérêt (1 à 2  $\mu$ l afin d'avoir  $\approx$  100ng d'ADN) et x  $\mu$ l d'eau sans nucléase (pour obtenir un volume final de 50  $\mu$ l). Toutes les réactions ont été réalisées dans un Thermocycler GeneAmp PCR system 9700 Applied Biosystems en suivant ce programme: une dénaturation initiale de 5 min à 94°C, suivi de 30 cycles de dénaturation (1min à 94°C) – hybridation (1 min 30 à X°C (Tableau II-3)) – élongation (2 min à 72°C) puis d'une élongation finale de 7 min à 72°C et d'une conservation à 4°C.

En vue de la comparaison des échantillons issus de cultures d'enrichissement par DGGE, les ADNr 16S bactériens et archéens ont été amplifiés en utilisant des amorces spécifiques dont une possède un « GC-clamp » d'environ 40 paires de bases, évitant la séparation totale des 2 brins d'ADN lors de sa migration dans le gradient dénaturant (composé de 20 à 80% d'urée-formamide). Le couple d'amorces 344F-GC et 915R a été utilisé pour les *Archaea* (Casamayor et al. 2000) et 341F-GC et 907R pour les *Bacteria* (Muyzer et al. 1993; Muyzer and Smalla 1998) (Tableau II-3). Ces fragments de gènes ont été amplifiés par PCR dans un volume réactionnel de 25  $\mu$ l qui contenait : 5  $\mu$ l de Tampon 5X spécifique de la polymérase ; 2,5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  à 7,5 mM ; 0,5  $\mu$ l de dNTP à 10 mM ; 0,1  $\mu$ l de chaque amorce à 100  $\mu$ mol ; x  $\mu$ l d'ADN d'intérêt (1 à 2  $\mu$ l afin d'avoir  $\approx$  100 ng d'ADN) et X  $\mu$ l

d'eau sans nucléase (pour obtenir un volume final de 25 µl). Toutes les réactions ont été effectuées dans un Thermocycler GeneAmp PCR system 9700 Applied Biosystems en utilisant des cycles en « touchdown », selon le programme suivant: une dénaturation initiale de 5 min à 94°C, suivi de 30 cycle de dénaturation (1min à 94°C) – hybridation (1 min 30 à X°C (Tableau II-3)) – élongation (2 min à 72°C) où pendant les 20 premiers cycles, la température d'hybridation est abaissée d'un degré, et où les 15 derniers cycles sont réalisés à la température la plus basse c'est-à-dire à la température d'hybridation attendue puis enfin, une élongation finale de 7 min à 72°C et d'une conservation à 4°C. La gamme de température utilisée pour l'amplification des ADNr 16S archéens était de 71 à 61°C et de 65 à 55°C pour les ADNr 16S bactériens.

En vue de la comparaison des mêmes échantillons par ARISA, la partie terminale de l'ADNr 16S et de la région intergénique comprise entre ce gène codant pour l'ADNr 16S et le gène codant pour l'ADNr 23S ont été amplifiés en utilisant des amorces spécifiques: le couple 915F/71R spécifique de l'espace intergénique des archées et le couple ITSF/ITSREub spécifique de la région intergénique bactérienne. Ces amplifications ont été réalisées par PCR dans un volume réactionnel de 25 µl qui contenait: 5 µl de Tampon 5X spécifique de la polymérase; 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> à 7,5 mM; 0,5 µl de dNTP à 10 mM; 0,2 µl de chaque amorce à 100 µmol; x µl d'ADN d'intérêt (1 à 2 µl afin d'avoir ≈ 100 ng d'ADN) et X µl d'eau sans nucléase (pour obtenir un volume final de 25 µl). Ces réactions ont été réalisées dans un Thermocycler GeneAmp PCR system 9700 Applied Biosystems en suivant le programme suivant: une dénaturation initiale de 10 min à 95°C, suivi de 30 cycles de dénaturation (30 sec à 95°C) – hybridation (30 sec à 55°C (Tableau II-3)) – élongation (1 min 20 à 72°C) puis d'une élongation finale de 15 min à 72°C et d'une conservation à 4°C.

**Tableau II-3 :** Caractéristiques des amorces utilisées pour les PCRs.

Gène cible	Amorces Forward- Reverse	Séquence 5'-3'	Tm† (°C)	Fragment amplifié (pb)	Référence
ADNr 16S <i>Archaea</i>	A8F A915R	5' CGG TTG ATC CTG CCG GA 3' 5' CTG CTC CCC CGC CAA TTC CT 3'	52	900 pb	Kolganova et al. 2002 Casamayor et al. 2000
ADNr 16S <i>Bacteria</i>	E8F U907R	5'AGA GGT TGA TCA TGG CTC AG 3' 5' CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3'	58	900 pb	Lane 1991 ; Lane et al. 1985
<i>dsrAB</i>	DSR1F DSR1R	5' ACS CAC TGG AAG CAC G 3' 5' GTG TAG CAG TTA CCG CA 3'	55	Longueur total ≈ 1,9 kb	Wagner et al. 1998
<i>mcrA</i>	ME1 ME2	5' GCM ATG CAR ATH GGW ATG TC 3' 5' TCA TKG CRT AGT TDG GRT AGT 3'	49	Entre 464 et 491 pb [1]	Hales et al. 1996



Gène cible	Amorces Forward- Reverse	Séquence 5'-3'	Tm† (°C)	Fragment amplifié (pb)	Référence
ADNr 16S <i>Archaea</i> DGGE	344F-GC* 915R	5' ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA 3' 5' CTG CTC CCC CGC CAA TTC CT 3'	×	571	Casamayor et al. 2000
ADNr 16S <i>Bacteria</i> DGGE	341F-GC* U907R	5' CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' 5' CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3'	‡	566	Muyzer et al. 1993 ; Lane et al. 1985
ITS <i>Archaea</i>	915F 71R	5' AAA GGA ATT GGC GGG GGA GCA C 3' 5' TCG GYG CCG AGC CGA GCC ATC C 3'	55	‡	Ikeda et al. 2006
ITS <i>Bacteria</i>	ITSF ITSReub	5' GTC GTA ACA AGG TAG CCG TA 3' 5' GCC AAG GCA TCC ACC 3'	55	‡	Cardinale et al. 2004
Q-PCR 16S <i>Archaea</i>	ARC787f ARC1059r	5' ATT AGA TAC CCS BGT AGT CC 3' 5' GCC ATG CAC CWC CTC TC 3'	58	273	(Yu et al. 2005)
Q-PCR 16S <i>Bacteria</i>	BACT1369f BACT1492r	5' CGG TGA ATA CGT TCY CGG 3' 5' GGW TAC CTT GTT ACG ACT T 3'	60	142	(Suzuki et al. 2000)

R correspondant à A ou G ; Y à C ou T ; M à A ou C ; K à G ou T ; S à C ou G ; W à A ou T ; H à A, C ou T et D à A, G ou T ;

† Tm température d'hybridation ;

[1] (Luton et al. 2002)

\* amorces possédant un clamp GC en 5' : 5' CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G 3' ;

× cycles en touchdown : les 20 premiers cycles, la température d'hybridation est abaissée d'un degré, de 71°C à 61°C puis les 15 derniers cycles à 61°C ;

‡ cycles en touchdown : les 20 premiers cycles, la température d'hybridation est abaissée d'un degré, de 65°C à 55°C puis les 15 derniers cycles à 55°C ;

‡ dépendant de la longueur de la région intergénique

#### 3.1.1.4. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Cette technique d'empreinte moléculaire est basée sur la séparation par électrophorèse en gradient dénaturant, en fonction de leur composition nucléotidique, de fragments d'ADN de même taille amplifiés préalablement par PCR. Cette méthode a été utilisée pour comparer des échantillons issus de différents temps de culture des fermentations ciblant la ferri-réduction afin d'identifier des échantillons identiques (même profils) ou non, de les comparer aux profils ARISA (obtenus à partir des ADN), en vue de choisir les échantillons à cloner pour étudier la diversité phylogénétique et l'évolution des communautés au cours du temps.

Après amplification par PCR des ADNr complémentaires 16S archéens et bactériens avec des amorces spécifiques (amorces de DGGE), les amplicons ont été analysés par DGGE avec un système Dcode Universel Mutation Detection System (Biorad), sur gel de 1 mm d'épaisseur de polyacrylamide à 6% (acrylamide/bisacrylamide 40% ; 37,5 :1 ; Biorad) préparé dans du tampon TAE 1X (Eurobio). Ce gel, comportant un gradient dénaturant de 20 à 80% d'urée et de formamide (Tableau II-4), a été réalisé grâce à un formeur de gradient (Hoefler SG30) : système à deux colonnes permettant la dilution de la solution la plus concentrée, la plus dénaturante avec la moins concentrée soit la moins dénaturante de façon à ce qu'un gradient dénaturant se forme entre le bas (zone la plus concentrée donc la plus dénaturante) et le haut du gel (zone la moins concentrée, la moins dénaturante). Ainsi, chaque colonne contenait 12 ml de solution dénaturante à 20 ou 80%, 12 µl de TEMED (N,N,N',N'-Tetraméthyl-éthylènediamine, BioRad) et 120 µl d'APS (persulfate d'ammonium, Biorad) à 100 mg.ml<sup>-1</sup>. Ce gel est coulé entre deux plaques en verre grâce à l'utilisation d'une pompe péristaltique réglée à une vitesse de 5 ml.min<sup>-1</sup>. La surface du gel dénaturant a ensuite été largement recouverte par une solution de butanol saturée en eau afin de permettre la polymérisation du polyacrylamide (qui ne polymérise pas au contact de l'air). Suite à cette polymérisation effectuée pendant 4h à température ambiante ou une nuit à 4°C, la solution de butanol est éliminée et la surface du gel a été rincée plusieurs fois à l'eau MilliQ. Ensuite, un gel de concentration de polyacrylamide à 6% (0% de dénaturation Tableau II-4) a été coulé à la pipette, à la surface du premier. Ce gel de concentration a été réalisé par le mélange de 6 ml de solution dénaturante à 0%, de 60 µl d'APS à 100 mg.ml<sup>-1</sup> et 60 µl de TEMED. C'est dans ce gel que le peigne pour former les puits de dépôts des échantillons (30 µl) a été inséré. Ce gel de concentration permet de faire pénétrer les amplicons PCR de façon identique et synchrone dans le gel dénaturant. La polymérisation a été réalisée pendant 20 à 30 minutes à température ambiante. Une fois le gel polymérisé, le peigne a été ôté et les puits rincés avec du tampon TAE 1X. Les produits PCR (entre 20 et 25 µl) ont été déposés dans les puits (directement si le tampon de PCR est coloré ou mélangé à 5 µl de tampon de charge si le tampon de PCR est incolore). Les migrations : une première de 10 min. à 80V puis une seconde de 5h à 200V, ont ensuite été effectuées dans une cuve remplie de TAE 1X préalablement chauffée à 60°C. Cette cuve est associée à une pompe et à un système d'agitation magnétique l'ensemble assurant l'homogénéisation de la température et de la circulation du tampon. Le gel a été révélé après coloration, pendant 15 min. dans l'obscurité et sous agitation, dans un bain contenant 10 µl de SYBR Gold 1X (Invitrogen) et 60 ml de TAE 1X ; le gel a ensuite été abondamment rincé avec du TAE 1X puis a été observé sur un transilluminateur (Dark Reader transilluminator).

**Tableau II-4 :** Compositions des solutions dénaturantes utilisées pour les gels de DGGE à 6% d'acrylamide/bisacrylamide.

% dénaturant	0	20	50	80	100
acrylamide/bisacrylamide 40% (ml)	15	15	15	15	15
TAE 50X (ml)	1	1	1	1	1
Formamide desionisé (ml)	0	8,4	21	33,6	42
Urée (g)	0	8,4	21	33,6	42
H <sub>2</sub> O MilliQ (QSP) (ml)	100	100	100	100	100

### 3.1.1.5. ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

Cette technique de typage moléculaire est basée sur le polymorphisme de la longueur de la région intergénique (ITS) située entre la petite sous unité (16S) et la grande sous unité (23S) de l'opéron de l'ARN ribosomique. Cette technique a été utilisée pour comparer plusieurs échantillons, afin de cribler et d'identifier les échantillons identiques (mêmes profils) ou non, issus des fermentations ciblant la ferri-réduction, de les comparer aux profils DGGE (obtenus à partir des ADN complémentaires), dans le but de sélectionner les échantillons à cloner pour étudier la diversité phylogénétique et l'évolution des communautés au cours du temps.

Après amplification par PCR (utilisation d'amorces spécifique de l'ARISA), les produits PCR ont été analysés par ARISA après dépôt sur une puce à ADN du Kit DNA 7500 LabChip® Kit (Agilent). Ce kit consiste en l'utilisation de puce à ADN contenant 16 puits. Dans l'un d'entre eux, le Gel-dye Mix a été déposé puis, par pression, le gel a été diffusé dans l'ensemble de la puce. Une fois ce gel mis en place, il est de nouveau déposé dans deux autres puits. Ensuite, dans les 12 puits destinés à recevoir les échantillons ainsi que dans celui où le marqueur de taille est distribué, un marqueur a été déposé. Ensuite, le marqueur de taille (de 50 à 10380 pb) puis les échantillons ont à leur tour été chargés dans leur puits respectif. Après homogénéisation de la puce (par vortex 1 minute à 2400 rpm), elle est analysée dans le bionalyzer Agilent 2100 avec le logiciel Agilent 2100 Expert Software. Ainsi, les amplicons sont séparés en fonction de leurs tailles. Grâce au logiciel, les pics des électrophérogrammes enregistrés sous forme d'un chromatogramme, ont été convertis en bandes d'électrophorèse (tel un gel d'électrophorèse ou de DGGE) (Roesch et al. 2009). Ainsi, les profils ITS archéens ou bactériens générés, sont comparés dans un premier temps, en terme de taille avec le marqueur de taille puis analysés identiquement aux profils de DGGE en terme de présence ou d'absence de bande (ou pic d'électrophorèse). Cependant, il est à noter que l'hétérogénéité de la taille de la région intergénique est à la fois intra- et inter-spécifique car dépendante du nombre de

copies du gène codant pour l'ARNr (opéron multiple), ainsi une même espèce peut générer plusieurs pics différents (ITS de différentes longueurs).

### 3.1.1.6. Clonage, séquençage

Avant clonage, tous les produits PCR (gène codant pour l'ARNr 16S et gène de fonctions) ont été purifiés sur gel d'agarose à 1% avec le kit NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel), en suivant les instructions du fabricant.

Les banques de clones ont été construites en utilisant par transformation de cellules compétentes avec les vecteurs de clonage pGEM<sup>®</sup>-T du kit de clonage pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector cloning kit (Promega) ou TOPO-XL du kit de clonage TOPO-XL cloning vector kit (Invitrogen). Les gènes de fonction ainsi que les ARNr 16S extraits de cultures d'enrichissements en bioréacteur, ont tous été clonés en utilisant le kit de clonage pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector cloning kit. Les banques de clones d'ARNr 16S issus d'échantillons bruts (sédiments et verres basaltiques des modules de colonisation *in situ*), ont été réalisées en utilisant le kit de clonage TOPO-XL cloning vector kit.

Avant l'envoi au séquençage, la qualité du clonage (présence de l'insert de la bonne taille, vérification de l'absence de clones faux positifs) a été vérifiée par la réalisation de PCR sur clones en utilisant des amorces M13R (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') et M13F (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3') (température d'hybridation : 55°C). Ces amorces, localisées en amont et en aval du gène inséré dans le vecteur, permettent après PCR, de vérifier la taille de l'insert par électrophorèse sur gel d'agarose.

L'extraction et la purification des plasmides ainsi que le séquençage des gènes d'intérêts ont été réalisés par GATC Biotech (Konstanz, Germany) ; en utilisant l'amorce M13 forward.

### 3.1.1.7. Analyses des séquences et phylogénie

Les séquences obtenues après séquençage ont été identifiées par comparaison avec celles disponibles sur le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) du service internet NCBI (National Center for Biotechnology Information)) afin de déterminer leurs positions phylogénétiques (Altschul et al. 1990). Le traitement, l'alignement et l'édition des séquences ont été réalisés avec la version Pro du logiciel Geneious 5.6 (Kearse et al. 2012). L'alignement a été effectué avec l'algorithme de CLUSTALW (Thompson et al. 1994). Les analyses phylogénétiques des séquences codant pour l'ARNr 16S et pour les séquences codant pour la sous unité  $\alpha$  du gène *mcrA* ont été effectuées directement avec le logiciel MEGA 5 (Kumar et al. 2008) en utilisant l'algorithme de neighbour joining (Saitou and Nei 1987) et la correction à deux paramètres de Kimura (Kimura 1980).

Les arbres phylogénétiques des séquences du gène *dsrAB* ont été réalisés avec les mêmes logiciels et algorithme après conversion des séquences ADN en séquences d'acides-aminés (table 11) avec la correction PAM. La robustesse des embranchements a été testée par bootstrap (1000 au minimum). Les séquences ayant plus de 97% de similitude entre elles, ont été regroupées au sein d'un même phylotype (OTU, Operational Taxonomic Unit) (Schloss and Handelsman 2004).

### 3.1.1.8. PCR quantitative (Q-PCR)

Afin de quantifier de façon relative les communautés d'archées et de bactéries d'un même échantillon (échantillon brut de cheminée hydrothermale) ou entre plusieurs échantillons (suivi de la densité cellulaire au cours du temps dans les cultures d'enrichissement en bioréacteur), des PCR quantitatives ont été réalisées.

Le nombre de copies de gène codant pour l'ARNr 16S archéen ou bactérien dans un échantillon est déterminé en utilisant la technologie du SYBR<sup>®</sup> Green Supermix, ROX<sup>™</sup> à partir de l'ADN total extrait. Pour cela, les matrices d'ADN à analyser ont toutes été diluées afin d'obtenir des échantillons contenant tous la même quantité d'ADN : 1ng.µl<sup>-1</sup>.

Afin de quantifier les gènes d'intérêts, des gammes standards, spécifiques des archées ou des bactéries, ont été réalisées à partir de quantité d'ADN connu, diluée au 1/10<sup>ème</sup> (dilution 10<sup>0</sup> à 10<sup>-5</sup>) de souches pures afin de construire des courbes standards, selon l'équation suivante :

$$[ADN]ng.\mu l^{-1} = \frac{\text{nombre de copie } \mu l \times 660 \text{ g. mol}^{-1} \times \text{taille du fragment amplifié} \times 10^9}{6,02214. 10^{23}}$$

Où 660 g.mol<sup>-1</sup> correspond à la masse molaire de l'ADN double brin ; 6,02214.10<sup>23</sup> est la constante d'Avogadro ; la taille du fragment d'ADN d'*Archaea* amplifié est de 273 pb ; celle du fragment d'ADN de *Bacteria* amplifié est de 142 pb

L'ADN de *Citricella thiooxidans* (Sorokin et al. 2005) a servi de standard pour l'établissement de la courbe standard des bactéries, et *Methanoculleus marisnigri* (Maestrojuan et al. 1990) pour celle des archées. La détection et la quantification des ARNr 16S bactériens ou archéens a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques du domaine des bactéries : BACT1369f / BACT1492r (Tableau II-3) et des amorces spécifiques des archées : ARC787f / ARC1059r (Tableau II-3). Pour chaque réaction, le mélange réactionnel était le suivant : 500 nM de chaque amorce archée (125 µl) ou 600 nM pour les amorces bactériennes (150 µl); 6,25 µl de Perfecta<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix, ROX<sup>™</sup> (Quanta Biosciences) ; 5 µl de matrice d'ADN, auquel a été ajoutée de l'eau déionisée stérile et sans nucléase pour obtenir un volume final de 25 µl. Les amplifications ont été réalisées selon le

programme suivant : une dénaturation initiale de 2min. à 95°C, suivie de 35 cycles de dénaturation-élongation de 15 sec. à 95°C (dénaturation) puis 1 min. à 60°C pour les bactéries ou 58°C pour les archées (élongation).

Tous les échantillons et points de la gamme de la courbe standard ont été analysés en triplicat et les témoins négatifs en plus grand nombre (au moins 6 témoins par analyses). Toutes les réactions ont été réalisées dans des plaques de 96 puits dans un thermocycleur Applied Biosystems StepOnePlus™ instrument. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle, après l'étape d'élongation. Les données ont été traitées en utilisant le logiciel Applied Biosystems StepOnePlus™ software. Grâce à la gamme standard, la quantité d'ADN d'archées et de bactéries dans un échantillon peut être déterminée ainsi que la proportion relative des communautés d'archées et de bactéries.

### **3.1.2. Approches culturelles**

*Les travaux, de culture ont été réalisés avec le soutien technique de Françoise Lesongeur. Sonia Laigle, stagiaire de Master 1, en Sciences de la Mer et du Littoral mention Sciences Chimiques de l'Environnement Marin (IUEM-UBO-Brest), a participé pendant son stage de 2 mois, à l'étude du point de vue chimique et isotopique d'une partie des échantillons des cultures en bioréacteurs ciblant la ferri-réduction.*

#### **3.1.2.1. Approches culturelles en fioles**

##### **3.1.2.1.1. Les inocula**

Deux types d'inocula de nature hydrothermale : fragment d'édifice et sédiment percolés de fluide hydrothermaux, ont été utilisés pour réaliser des cultures d'enrichissement et des isollements en fioles pénicilline ou en tube (de Hungate ou Belco).

Les échantillons de structure hydrothermale : un fragment de cheminée active du site BIG 2 et un fragment de flange actif du site Rebecca's Roost, ont servi d'inocula à diverses cultures visant à enrichir des micro-organismes réalisant la sulfato-réduction, la sulfo-réduction, la sulfo-oxydation, la ferri-réduction ou l'hétérotrophie en condition aérobie.

Des sédiments, riches en matières organiques, percolés de fluides hydrothermaux ont également servi d'inocula. Ces inocula correspondent à des sections sédimentaires provenant de

carottes collectées sur trois sites : le site Mat Mound (marqueur BIG 1), le site Marker 27 et le site Megamat. Diverses sections ont été choisies pour réaliser différents types d'enrichissements ciblant la sulfato-réduction, la sulfo-réduction, la sulfo-oxydation en anaérobie, la ferri-réduction ainsi que l'hétérotrophie en condition aérobie, ont été répertoriées dans le tableau ci-dessous (Tableau II-5).

**Tableau II-5 : Inocula, sections sédimentaires et métabolisme ciblé lors de l'enrichissement.**

Site	Carotte sédimentaire	Métabolisme cible	Sections sédimentaires utilisées		
BIG 1	PI 1764-20 CT3	Sulfato-réduction	S1 – S2 – mélange S3/S4		
		Sulfo-réduction	S2 – mélange S3/S4 – S4 – S8 – S10		
		Sulfo-oxydation anaérobie	S1 – S2		
		Ferri-réduction	S1		
		Hétérotrophie aérobie	S1 – S2		
Marker 27	PI 1766-22 CT2	Sulfato-réduction	S0 – S1 – S3		
		Sulfo-réduction	S1 – S3		
		Sulfo-oxydation anaérobie	S0		
		Ferri-réduction	S4		
		Hétérotrophie aérobie	S0 – S1		
	PI 1767-23 CT12	Sulfato-réduction	S1 – S2		
		Sulfo-oxydation anaérobie	S1 – S2		
		Hétérotrophie aérobie	S1		
		Méga Mat	PI 1765-21 CT6	Sulfato-réduction	S1
				Sulfo-réduction	S7
Sulfo-oxydation anaérobie	S1 – S2				
Hétérotrophie aérobie	S1				

### 3.1.2.1.2. Milieux et conditions de culture

Plusieurs milieux de culture ont été choisis dans le but de tenter d'enrichir et d'isoler des souches réalisant des métabolismes impliqués dans les cycles du Soufre et du Fer à haute température. Ces cultures d'enrichissement ont été réalisées en fioles pénicillines de 50 ml, tube de Hungate ou sur boîte de Pétri. Les inoculations et le premier repiquage de chaque culture d'enrichissements positifs en milieu liquide ont été effectués à 1% (0,2 ml de culture dans 20 ml de milieu).

Pour les milieux liquides, le pH a été arbitrairement fixé à 6,5 (pH proche des conditions *in situ*, (fluide hydrothermal dilué et des eaux interstitielles), mesuré pendant la campagne) et a été ajusté avant autoclavage. Les solutions de poly-vitamines (Balch et al. 1979) (5 ml sauf milieux SME et *Geoglobus* modifié où 1 ml a été ajouté) et d'éléments traces (Balch et al. 1979) (5 ml également), ont été ajoutés à froid dans les milieux, après autoclavage. Ces enrichissements étant réalisés en anaérobiose, les milieux ont été réduits dans l'enceinte anaérobie soit par ajout de 10 ml/L de

$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  à 5% (m/v) soit au moment de la préparation du milieu par addition de L-Cystéine-HCl (préciser ci-dessous).

Afin d'enrichir et d'isoler des **micro-organismes réalisant la réduction du soufre**, le milieu SME modifié, le milieu GYPS-S ainsi que le milieu BIG-S ont été choisis.

Le **milieu SME**, à pH 6,5, contenait pour 1L d'eau Milli-Q : 23g de NaCl; 10 ml d'une solution de magnésium (pour 1 L d'eau Milli-Q: 180g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 140g de  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ; 1 ml de chaque solution A, B, C et D (composition pour chaque solution, pour 1L d'eau Milli-Q; **solution A** : 9g de  $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ; 2,5g de  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 2,5g de  $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,3g de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ; 0,3g de  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,15g de  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , **solution B**: 5,6g de  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 25g de NaBr ; 16 g de KCl; 10g de KI ; 4g de  $\text{SrCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , **solution C**: 50g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 7,5g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ; 3,3g de  $\text{Na}_2\text{WO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; 0,15g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; 0,005g de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  et **solution D** pour 1L d'acide chlorhydrique à 1M : 10g de  $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 1 g d'extrait de levure, 3,46g de tampon PIPES, 10g de soufre élémentaire et 0,5 ml de résazurine (acide piperazinediéthane-sulfonique-1,4) à  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Avant autoclavage, le pH a été ajusté à 6,5 ensuite, à froid, 1 ml d'une solution de poly-vitamines a été ajouté.

Le **milieu GYPS** avec du soufre (**milieu GYPS+S°**) était constitué, pour 1L d'eau Milli-Q de : 0,5g d'extrait de levure, de 1g de peptone, de 5g de glucose, de 30g de sea-salt, de 3,46g de tampon PIPES, de 10g de soufre élémentaire et de 0,5 ml de résazurine à  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Le **milieu BIG-S** était composé, pour 1L d'eau Milli-Q: 23g de NaCl ; 0,5g de  $\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,5g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,5g de  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,5g de KCl ; 3g de  $\text{MgSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 3,46g de tampon PIPES, 10g de soufre élémentaire. Le milieu a ensuite été porté à ébullition et ce pendant 10 min. sous un flux continu de  $\text{N}_2$  ; puis réduit avec  $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de L-Cystéine HCl tout en étant refroidi sous flux d'azote. Ensuite, après autoclave et à froid la solution de poly-vitamines, d'éléments traces, de phosphates (5 ml d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 5% et 5 ml d'une solution de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à 5%) et 0,5 ml de sélénite-tungstate (Widdel and Bak 1992), ont été ajoutés. De même que soit une solution d'extrait de levure à 0,05 % final (w/v), soit un mélange acétate/pyruvate à 20 mM de concentration finale chacun ou une surpression de 2 bars de  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80 :20) ont été ajoutés.

#### Concernant les **populations sulfo-oxydantes** :

Le milieu SME supplémenté en nitrates (**SME+NO<sub>3</sub>**) a été utilisé. Il s'agit du même milieu (même composition et pH à 6,5) que celui utilisé pour l'enrichissement des sulfo-réducteurs, auquel une solution de nitrates à 10 mM de concentration finale a été ajoutée.

Un second **milieu BIG-Sox**, a également été utilisé ; il contenait pour 1L d'eau milli-Q : 23g de NaCl ; 0,5g de  $\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,5g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,5g de  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,5g de KCl ; 3g de  $\text{MgSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 3,46g de tampon PIPES. Le milieu a ensuite été porté à ébullition pendant 10 min. sous un flux continu de  $\text{N}_2$  ; puis réduit avec  $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de L-Cystéine HCl tout en étant refroidi sous flux d'azote. Ensuite, après



autoclavage et à froid la solution de nitrates à 10 mM de concentration finale, la solution de poly-vitamines, d'éléments traces, de phosphates (5 ml d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 5% et 5 ml d'une solution de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à 5%), de sélénite-tungstate (0,5 ml), ont été ajoutés. Les sources de soufre additionnées étaient : soit du soufre élémentaire (préalablement stérilisé par tyndallisation) soit de l' $\text{H}_2\text{S}$  à partir d'une solution de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (0,5 ml d'une solution à 5 % (w/v)) et les sources de carbone étaient : une solution d'extrait de levure à 0,05 % final (w/v), soit un mélange acétate/pyruvate à 20 mM final chaque ou une surpression de 2 bars de  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80 : 20).

En vue de tenter de cultiver des **procaryotes réalisant la sulfato-réduction**, différents milieux ont été utilisés.

Le premier, le **milieu BSR BIG**, contenait pour 1L d'eau Milli-Q : 23g de NaCl ; 0,5g de  $\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,5g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ; 0,5g de  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,5g de KCl ; 3g de sulfate de sodium ; 3,46g de tampon PIPES. Le milieu a été porté à ébullition pendant 10 min. sous un flux continu de  $\text{N}_2$  ; puis réduit avec  $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de L-Cystéine HCl tout en étant refroidi sous flux d'azote. Après autoclavage et à froid les solutions de poly-vitamines, d'éléments traces, de phosphates (5 ml d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 5% et 5 ml d'une solution de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à 5%) et de sélénite-tungstate, ont été ajoutés. Ensuite une solution d'extrait de levure à 0,05 % final (w/v), ou un mélange acétate/pyruvate à 20 mM de concentration finale chacun ou une surpression de 2 bars de  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80 :20) ont été ajoutés. Deux autres milieux ont également été utilisés. La base de ces milieux est le milieu GYPS auquel, pour l'un d'entre eux du sulfate ( $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sulfate de sodium) (**milieu GYPS+ $\text{SO}_4^{2-}$** ) et pour l'autre du thiosulfate ( $4,96\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de thiosulfate de sodium) (**milieu GYPS+ $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$** ) ont été ajoutés.

Les cultures d'enrichissement de **populations ferri-réductrices** ont été réalisées sur milieu *Geoglobus* modifié (milieu de culture de la souche *Geoglobus ahangari* (Kashefi et al. 2002) avec quelques modifications dont la concentration en NaCl) et sur milieu pour BIG-Fe(III). Le **milieu *Geoglobus* modifié** contenait pour 1L d'eau Milli-Q : 23g de NaCl, 9g de  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 3g de  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; 0,5g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 0,05g de KBr, 0,02g de  $\text{SrCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,15g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0,33g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ; 0,50g de KCl, 1,1g d'acide pyruvique et 0,1g d'extrait de levure. Le milieu a ensuite été porté à ébullition pendant 10 min. sous un flux d'azote, puis réduit avec  $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de L-Cystéine HCl tout en étant refroidi toujours sous flux d'azote. Après autoclavage, ont été adjointes, au milieu et à froid, les solutions de poly-vitamines, d'éléments traces, de poly-phosphates (5 ml d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 5% et 5 ml d'une solution de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à 5%), de sélénite-tungstate (0,5 ml), 30 ml d'une solution de bicarbonates à 1 M et 100 ml par litre d'une solution de Fer(III).

Le **milieu BIG-Fe(III)** contenait pour 1L d'eau Milli-Q : 23g de NaCl ; 0,5g de  $\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,5g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ; 0,5g de  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ; 0,5g de KCl ; 3g de sulfate de sodium ; 3,46g de tampon PIPES. Après

ébullition et maintien à ébullition pendant 10 min. sous un flux continu de  $N_2$  ; puis réduction avec  $0,5g.L^{-1}$  de L-Cystéine HCl tout en étant refroidi sous flux d'azote, comme pour le milieu Geoglobus, les solutions suivantes: solutions de poly-vitamines, d'éléments traces, de phosphates (5 ml d'une solution de  $KH_2PO_4$  à 5% et 5 ml d'une solution de  $K_2HPO_4$  à 5%), de sélénite-tungstate et  $100ml.l^{-1}$  de la solution de Fer(III) ; puis soit une solution d'extrait de levure à 0,05 % final (w/v), soit un mélange acétate/pyruvate à 20 mM de concentration finale chacun ou une surpression de 2 bars de  $H_2/CO_2$  (80 :20) ont été ajoutées à froid au milieu après autoclavage.

**Préparation de la solution d'oxyde de Fer(III) (poorly cristaline Fe (III) oxide) :** pour cela, le protocole mis au point par Lovley et Phillips (Lovley and Phillips 1986; Lovley and Phillips 1986)), a été utilisé (Byrne 2008; Le Roy 2008). Lors de la préparation de cette solution d'oxyde de Fer(III), tous les béchers et bouteilles de stockage utilisés ont été recouverts de papier aluminium afin que la solution soit au maximum à l'obscurité, dans le but d'éviter la photolyse et la photo-réduction du Fe(III) (Faust and Hoigné 1990; Feng and Nansheng 2000). Pour réaliser cette solution, 59.4g de  $FeCl_3.6H_2O$  ont été dissous dans 550 ml d'eau distillée. De cette solution, 50 ml ont été prélevés et réservés pour une potentielle utilisation (en cas de réajustement du pH de la solution de Fe(III), si lors de sa préparation, une alcalinisation trop importante se produit). Ensuite, petit à petit, et sous agitation continue, le pH des 500 ml de la solution de Fe(III) est ajusté aux environ de 7, par ajout régulier d'une solution de NaOH au départ à 6N, puis à 1N quand le pH de la solution mesurée est supérieur à 5. Avant ajout des premières gouttes de NaOH, le pH de la solution de Fe(III) est proche de 1. Pendant la phase d'ajustement du pH, celui-ci doit être mesuré régulièrement et le pH-mètre doit également être rincé très fréquemment (la solution de fer est très collante et adhère fortement à l'électrode), cette étape est cruciale à la fois pour la préparation de la solution et pour la croissance des micro-organismes ferri-réducteurs qui ont une croissance optimale proche d'un pH 7. En effet, si le pH s'alcalinise de trop et si après ajout de la solution de  $FeCl_3$  réservée pour le ramener proche de la neutralité, le pH est toujours trop basique (pH > 8) alors, la préparation est gâchée et est irrécupérable. Lorsque le pH est aux environ de 7 et qu'après 30 min., il est toujours à cette valeur, la solution peut être « lavée » des ions chlorures au cours de plusieurs centrifugation. Pour cela, la solution a été répartie dans 2 bouteilles de centrifugation de 1L remplies aux deux-tiers et centrifugée à température ambiante pendant 20 min. à 5000g. Après élimination du surnageant, le culot (rouge foncé à marron) a été remis en suspension par ajout d'eau distillée afin, de remplir les bouteilles aux deux-tiers et de nouveau, les centrifuger à température ambiante pendant 20 min. à 5000g. Le nombre de cycles de remise en suspension à l'eau distillée suivi d'une centrifugation peut être variable (en général cette étape est répétée 2 à 3 fois). La dernière centrifugation a eu lieu quand le surnageant éliminé est plus orange que les fois précédentes, que des petites taches noires apparaissent sur le culot et que celui-ci est plus collant et plus rouge que les fois précédente (si une

étape de remise en suspension– centrifugation de trop est effectuée, et que d’importantes taches noirâtres apparaissent à la surface du culot, alors la préparation est à recommencer du début). La dernière étape consistait à rassembler les culots dans une même bouteille, à y ajouter de l’eau distillée afin de la remplir au 4/5<sup>ème</sup>. La bouteille a ensuite été remuée vigoureusement afin d’homogénéiser la solution, mise sous agitation pendant une heure, puis conservée à 4°C à l’abri de la lumière.

Un milieu gélosé nommé **Iron Sulfite Agar** (Sigma) a également été utilisé en vue de tenter des **populations aérobies hétérotrophes**. Ce milieu riche en matière organique est composé, pour 1L d’eau distillée : 15 g d’un mélange de caséine/peptone ; 10 g d’extrait de levure ; 0,5 de sulfite de sodium et 15 g d’agar.

Les cultures en fioles ont été incubées à 50-60-70-85-85-90 ou à 100°C selon les échantillons choisis; les cultures en boîte de Pétri ont quant à elle été incubées à 30, 40 et 50°C (Tableau II-6).

**Tableau II-6 :** Echantillons, métabolismes ciblés, milieux de cultures utilisés\* et températures d’incubations lors des cultures d’enrichissements :

Echantillon site	Métabolisme cible	Milieu de culture	Températures d’incubation (°C)
Cheminée hydrothermale BIG 2	Sulfato-réduction	BSR-BIG	60, 70, 85
	Sulfo-réduction	BIG-S	60, 70, 85
	Sulfo-oxydation anaérobie	BIG-Sox	60, 70, 85
	Hétérotrophie aérobie	Iron sulfite agar	30, 40 et 50
Cheminée hydrothermale Rebecca’s Roost	Sulfato-réduction	BSR-BIG	70, 80, 90 et 100
		GYPS + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , GYPS + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	50, 60 et 70
	Sulfo-réduction	SME	70, 80, 85, 90 et 100
		GYPS+S°	50, 60 et 70
	Sulfo-oxydation anaérobie	SME+NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	70, 80, 85 et 90
	Ferri-réduction	<i>Geoglobus</i> modifié, BIG-Fe(III)	70, 80, 90 et 100
Carottes sédimentaires	Hétérotrophie aérobie	Iron sulfite agar	30, 40 et 50
	Sulfato-réduction	BSR-BIG	70, 80, 90 et 100
		GYPS + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , GYPS + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	50, 60 et 70
	Sulfo-réduction	SME	70, 80, 85, 90 et 100
		GYPS+S°	50, 60 et 70
	Sulfo-oxydation anaérobie	SME+NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	70, 80, 85 et 90
	<i>Geoglobus</i> modifié, BIG-Fe(III)	70, 80, 90 et 100	
	Hétérotrophie aérobie	Iron sulfite agar	30, 40 et 50

### **3.1.2.1.3. Isolement par série de dilution**

A partir des repiquages des cultures d'enrichissement positives, des isolements ont été réalisés. Pour cela, la technique de dilution jusqu'à extinction a été utilisée. Ainsi, des séries de 10 dilutions au 10<sup>ème</sup> (9 ml de milieu de culture inoculé avec 1 ml de culture d'enrichissement), ont été effectuées en fioles pénicilline, en utilisant le même milieu que celui d'enrichissement. En général, après 4 à 5 séries de dilutions, la souche isolée était considérée comme pure et l'ADN était extrait pour amplifier et séquencer les gènes codant l'ARNr 16S.

### **3.1.2.2. Approches culturelles en bioréacteur gaz-Lift**

L'intérêt de la réalisation de culture en continu en bioréacteur est multiple. Tout d'abord, ce système permet de réaliser des cultures en conditions contrôlées et ainsi de mieux se rapprocher au laboratoire, des conditions environnementales *in situ*. Un des autres avantages de la culture en continu est de se placer en condition non limitante *via* un apport continu ou semi-continu de milieu associé à un soutirage équivalent permettant un renouvellement du milieu de culture et l'élimination de métabolites dont l'accumulation dans le milieu pourrait être toxique, ceci permet également un échantillonnage quotidien sans perturbation du volume de culture. De plus, la présence d'un balayage gazeux continu permet une homogénéisation du milieu (sans faire appel à une agitation mécanique) et d'éliminer les produits finaux et volatiles issus du métabolisme microbien potentiellement toxique. De récentes cultures réalisées en bioréacteurs gaz-lift au laboratoire, travaux d'Anne Postec et de Nathalie Byrne, ont aussi démontré que des espèces présentes en faible nombre dans l'échantillon brut et des espèces nouvelles pouvaient être cultivées grâce à cette méthode (Postec et al. 2005; Postec et al. 2007). Enfin, ces cultures en continu en bioréacteurs gaz-lift, ont aussi permis de démontrer l'existence d'une dynamique au sein des populations cultivées (permettant par exemple d'accéder à des micro-organismes à croissance plus lente, de stratégie qualifiée de « r » procaryotes qui ne seraient pas ou faiblement détectés en culture en batch par rapport aux procaryote à croissance rapide de stratégie dite « k » (Alain and Querellou 2009; Vartoukian et al. 2010)) (Postec et al. 2005; Postec et al. 2007; Byrne et al. 2009). Ainsi, comparé à des cultures d'enrichissements réalisées en batch utilisant le même milieu et le même inoculum, le mode de culture en continu et en bioréacteur, permet d'accéder à une diversité cultivable plus importante, à la dynamique des populations microbiennes au sein des communautés cultivées et d'étudier *in vitro* l'influence des variations de paramètres environnementaux sur les communautés microbiennes (Postec et al. 2005; Postec et al. 2007; Byrne et al. 2009). L'utilisation du bioréacteur permet de réaliser des cultures de volume important (de 850 ml et de 2L pour les bioréacteurs du

laboratoire) en conditions de température et de pH régulés et de suivre la dynamique des populations microbiennes qui s’y développent.

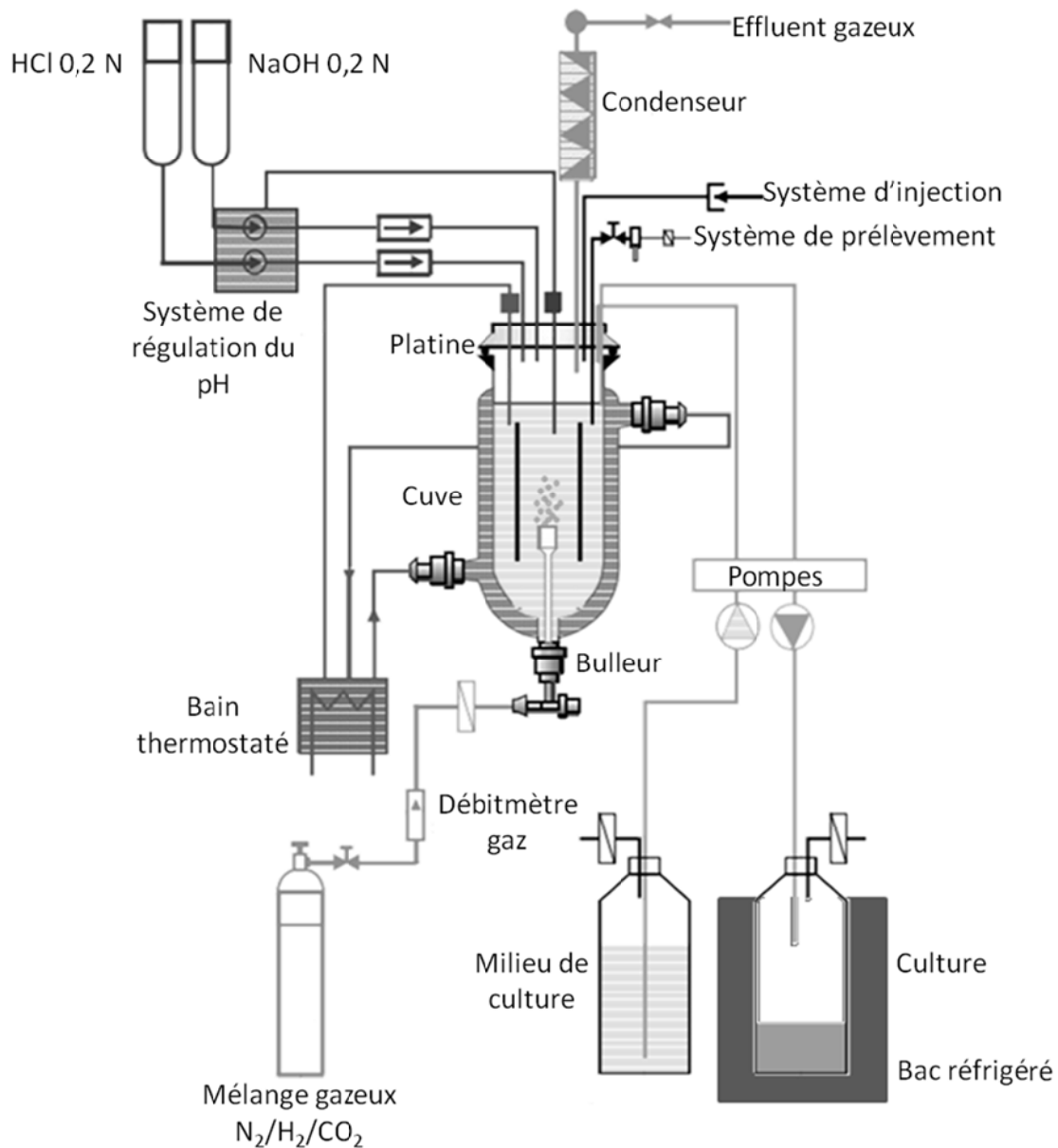
### **3.1.2.2.1. Méthodologie de l’approche culturale en bioréacteur**

**Préambule** : trois cultures d’enrichissement en bioréacteur ont été effectuées ; la première réalisée en bioréacteur baby gas-lift, à bord du navire océanographique *L’Atalante*, pendant 23 jours, lors de la campagne BIG en juin-juillet 2010, avait pour objectif d’appréhender la diversité et de suivre la dynamique des communautés microbiennes en conditions le plus proche possible des conditions *in situ* en utilisant uniquement le fluide hydrothermal non filtré, prélevé dans la zone de mélange comme milieu de culture et un broyat de flange hydrothermal comme inoculum. Les deux autres, réalisées en bioréacteur de 2L, pendant 27 jours, avaient pour objectif de comprendre les relations entre la composition et la structure des communautés microbiennes avec le comportement du fer : production de Fe(II) et son fractionnement isotopique et ce en utilisant deux inocula différents : un fragment d’édifice hydrothermal actif et un échantillon de sédiments hydrothermaux percolés du fluide chaud. Ces données obtenues en condition biologique ont été comparées à celles obtenues avec les témoins abiotiques (c'est-à-dire le comportement du milieu avec le Fe(III) dans les bioréacteurs sous balayage gazeux et à 80°C, avant les inoculations).

### **3.1.2.2.2. Description du système de culture utilisé pour la culture en continu au laboratoire**

Le système de culture en bioréacteur en continu, utilisé dans ces études, a été initialement développé par le Dr N. Raven (UK) afin d’optimiser les conditions de culture de *Pyrococcus furiosus* en absence de soufre, grâce à l’élimination par le balayage gazeux efficace de l’hydrogène, produit par la souche et inhibant sa croissance (Raven et al. 1992). Cet outil a aussi été utilisé pour la production de biomasse ( *Pyrococcus abyssi* (Godfroy et al. 2000), *Thermococcus hydrothermalis* (Postec et al.)) mais également pour la culture des communautés microbiennes de structures hydrothermales actives (édifices provenant des sites hydrothermaux Rainbow, TAG, Lucky Strike de la dorsale Médio-Atlantique (Postec et al. 2005; Postec et al. 2007; Byrne et al. 2009)) ou de populations sulfo-oxydantes (mise en culture de tapis microbien recouvrant des modioles du site hydrothermal Lucky Strike (Crépeau 2010)).

Le bioréacteur gas-lift, se compose de plusieurs éléments (figure II-20):



**Figure II-20** : Schéma représentant le bioréacteur gas-lift et ses équipements (modifié d'après Postec (Postec 2005)).

- **Une cuve en colonne** en verre borosilicaté de 2 L de volume utile, de 425 mm de hauteur et de 98 mm de diamètre interne fabriquée par la société Radley's (UK). Cette cuve est constituée par une double enveloppe, qui permet, *via* la circulation d'eau chaude produite par un bain thermostaté (Julabo), de maintenir la culture à la température souhaitée. A l'intérieur, au fond de la cuve, autour de la sortie du balayage gazeux, est placé un cylindre en verre ou « draft-tube » de 200 mm de hauteur et de 64 mm de

diamètre interne. Il permet par la génération de courant de convection, d'homogénéiser le bullage gazeux dans la culture.

- **Le balayage gazeux** a pour principal but d'établir et de maintenir les conditions d'anaérobiose au sein de la culture, d'apporter des gaz comme l' $H_2$  et du  $CO_2$  potentiellement utilisables par les micro-organismes, mais aussi de favoriser l'homogénéisation du milieu de culture et l'élimination de produits volatils issus du métabolisme microbien (ex :  $H_2S$ ) éventuellement toxique pour les micro-organismes. La distribution du mélange gazeux, sous la forme de petites bulles, dans le milieu de culture est assurée par un diffuseur en verre fritté à la porosité optimisée (Rotaflo, UK) positionné au fond de la cuve du fermenteur. Ce bulleur est fixé à la cuve par un bouchon à vis en téflon. Ce diffuseur, par l'intermédiaire d'un tuyau Masterflex et d'un filtre de  $0,22\ \mu m$  Acro50 relié à l'arrivée du mélange gazeux, est connecté à un débitmètre à bille (Aalborg). Les mélanges gazeux, de composition définie, utilisés dans ces études étaient des mélanges de  $N_2/H_2/CO_2$  en proportion variable selon l'étude :
  - 70/20/10 pour les cultures ciblant la ferri-réduction, mélange réalisé dans une centrale de mélange de gaz, grâce à des débitmètres massiques (EL-FLOW, Air Liquide, France)
  - 75/20/5 pour la culture réalisée avec le fluide hydrothermal dilué comme milieu de culture. Ce mélange provient d'une bouteille de gaz dont le mélange est standard.
- **Une platine en téflon** fixée sur la partie supérieure de la cuve grâce à un collier en inox, est percée de 9 ports ayant différents diamètres permettant les entrées suivantes :
  - Une entrée centrale de 12 mm destinée à l'électrode de pH
  - Deux entrées de 8 mm attribuées respectivement à la sonde de température et à la sortie de l'effluent gazeux via un condenseur en verre.
  - Huit entrées de 5 mm utilisées, *via* des tubes en verres, pour l'addition d'acide ou de base, l'ajout de milieu, le soutirage de la culture, les prélèvements quotidiens et l'inoculation.

L'étanchéité des entrées est assurée par l'empilement de cinq joints toriques. Quand elles ne sont pas utilisées, les entrées sont condamnées par des tiges en verre pleines.

- **Les lignes d'entrée de milieu et de soutirage de culture**, ont été réalisées en tuyau Tygon® Silicone (Masterflex, Norton). Ces lignes assurent la liaison entre le bioréacteur et

les bidons en polypropylène (Nalgène). Ces bidons de 750 ml ou de 10 litres de contenance, sont équipés de bouchons vissant percés de trois entrées dont une est fermée par un filtre 0,22  $\mu\text{m}$  (Gelman), une autre est reliée à un tuyau Tygon® Silicone (Masterflex, Norton) afin d'ajouter le milieu ou de soutirer la culture ; la dernière entrée est condamnée. Les entrées et sorties de milieu sont assurées par des pompes péristaltiques (Masterflex). La pompe d'ajout de milieu permet de fixer le débit d'addition du milieu et ainsi le taux de dilution de la culture. Le bidon de soutirage de culture de 750 ml est conservé dans un système réfrigéré à 10°C.

Ce système d'entrée et de sortie de milieu a été utilisé uniquement pour la culture réalisée à bord, avec le fluide hydrothermal dilué comme milieu de culture ; pour les cultures ciblant la ferri-réduction, l'apport de milieu s'est effectué de façon séquentielle.

- **Le système de régulation de la température** est constitué d'une sonde PT 100 recouverte de Teflon PTFE (Radley, UK), connectée au système de bain thermostaté programmable (Julabo), permettant de maintenir la température de la cuve à la température de culture désirée.
- **Le système de régulation de pH** est composé d'une électrode stérilisable à gel (Mettler Toledo) et de solution d'acide (HCl à 0,2 N) et de base (NaOH à 0,2 N) stérilisées par filtration et stockées dans des flacons en polypropylène (Nalgène) de 750 ml fermés avec un bouchon vissant à trois entrées, dont une, en tuyau Tygon® Silicone (Masterflex, Norton), sert de ligne d'addition d'acide ou de base en reliant le flacon à la platine, une autre est fermée par un filtre 0,22  $\mu\text{m}$  (Gelman) et la dernière est condamnée. La régulation du pH était assurée par des systèmes analogiques de contrôle :
  - soit le système Infors HT (Bottmingen, Suisse) relié à un ordinateur et au logiciel IRIS V software qui permet l'acquisition, la collecte et le stockage des mesures de pH et également de commander les pompes péristaltiques d'ajout d'acide et de base afin d'ajuster les valeurs de pH à la valeur de consigne. Ce système a été utilisé pour la culture en continu réalisée avec le fluide hydrothermal dilué comme milieu de culture et aussi pour la culture ciblant les micro-organismes ferri-réducteurs, inoculée avec le sédiment.
  - soit le système NBS Biocommand Interface (4-20 mA controller) connecté à un ordinateur et associé au logiciel NBS Local Controller (tous deux conçus par la société New-Brunswick, Nijmegen, Pays-Bas) qui permet de collecter les mesures

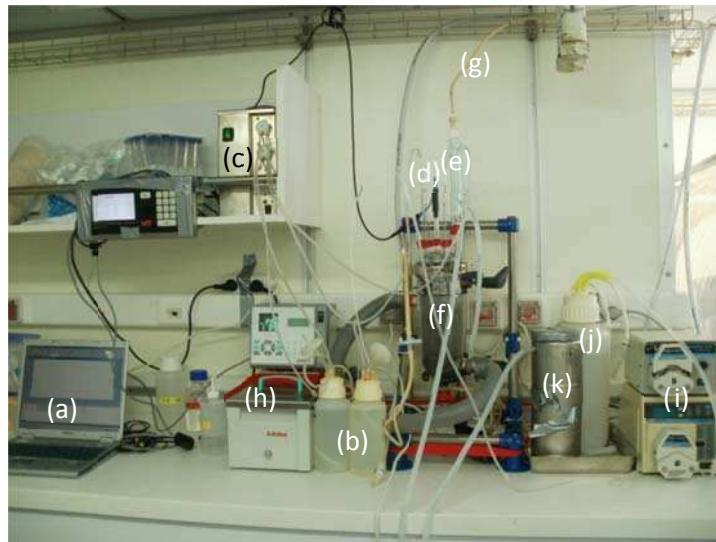


de pH et de commander les pompes péristaltiques d'ajout d'acide et de base afin d'ajuster les valeurs de pH à la valeur souhaitée. Ce système a été utilisé pour la culture ciblant, les micro-organismes ferri-réducteurs, inoculée avec un broyat de structure hydrothermale.

- **Le condenseur** (Radleys) en verre, est un condenseur classique de chimie. Il est relié à un bain réfrigéré (Julabo) contenant de l'eau refroidie à 10°C et un antigel, dont la circulation en continu, permet la condensation des vapeurs d'eau de l'effluent gazeux en sortie de cuve, du fait des températures de cultures élevées (80 et 85°C). La sortie du condenseur est raccordée :
  - soit directement à un tuyau d'évacuation des gaz (pour la culture réalisée à bord).
  - soit à un tuyau Masterflex relié à un flacon en polypropylène de 1 L (Nalgène) contenant une solution de soude à 10 N (pour piéger l'H<sub>2</sub>S) lui-même relié à un autre flacon en polypropylène de 10 L (Nalgène) contenant de l'eau et associé à un tuyau d'évacuation des gaz (pour les cultures ciblant la ferri-réduction).

### 3.1.2.2.3. Description du le bioréacteur « Baby Gas-Lift »

Conçu spécialement pour pouvoir être embarqué et utilisé à bord des navires océanographiques, le bioréacteur « Baby Gas-Lift » présente le même principe de fonctionnement et les mêmes caractéristiques que le bioréacteur de laboratoire. De 850 ml de volume utile, il conserve les mêmes proportions hauteur/diamètre et diamètre du draught tube que le bioréacteur de laboratoire afin de préserver les conditions optimales de balayage gazeux de la cuve. Ce bioréacteur a été employé lors de la culture d'enrichissement réalisée à bord de *L'Atalante* (Figure II-21), utilisant le fluide hydrothermal dilué comme milieu de culture.



**Figure II-21 :** Photographie du baby bioréacteur gas-lift à bord de L'Atalante pendant la campagne BIG : (a) gestion informatisée de régulation du pH et de la température, (b) réservoirs d'acide et de base, (c) pompes péristaltiques d'ajout d'acide ou de base, (d) débitmètre à bille, (e) condenseur, (f) cuve du bioréacteur, (g) évacuation du gaz en sortie de cuve, (h) bain-marie chaud associé à la cuve, (i) pompes péristaltiques d'ajout de milieu et de soutirage de culture, (j) bidon de milieu frais, (k) bidon de soutirage de culture dans son fourreau réfrigérant, (le bain réfrigérant n'apparaît pas sur cette photographie).

La platine, en verre borosilicaté, est percée de seulement 8 entrées de 6, 8 ou 22 mm de diamètre:

- Une entrée centrale de 6 mm est destinée à l'électrode de pH (Cole Palmer)
- Une entrée de 8 mm pour la sonde de température
- Une entrée de 22 mm destinée à la sortie de l'effluent gazeux via un condenseur en verre connecté à la platine par un bouchon vissant
- 4 entrées de 5 mm utilisées comme pour le bioréacteur de laboratoire, *via* des tubes en verres, pour l'addition d'acide ou de base, l'ajout de milieu, le soutirage de la culture, les prélèvements quotidiens et pour l'inoculation.

Les lignes d'ajout d'acide ou de bases sont similaires à celles décrites pour le bioréacteur de laboratoire ; par contre, la ligne d'ajout de milieu a été réalisée en tuyau Tygon® Silicone (Masterflex, Norton) de plus petit diamètre.

#### 3.1.2.2.4. Les inocula et les milieux de culture

**Culture d'enrichissement réalisée à bord, pendant la campagne BIG :** l'inoculum utilisé est un broyat (morceaux de cheminé de quelques  $\mu\text{m}$  à 1 cm pour les plus gros grains) d'un morceau de flange hydrothermale active (échantillon BIG03E01 de la plongée 1747-03) prélevé sur le site hydrothermal Rebecca's Roost. Le milieu de culture utilisé est le fluide hydrothermal dilué collecté

dans la zone de mélange à environ 100 °C, au niveau de la même cheminée échantillonnée. L'inoculation a été réalisée par l'ajout de 400 ml d'une suspension dans une solution de NaCl à 23g.L<sup>-1</sup> d'un broyat de la cheminée hydrothermale.

**Cultures d'enrichissements ciblant la ferri-réduction** : deux inocula ont été utilisés L'un d'eux est un broyat d'un morceau de flange hydrothermale active (échantillon BIG03E01 de la plongée 1747-03) prélevée sur le site hydrothermal Rebecca's Roost. Le second échantillon est une portion de section sédimentaire (section S4 correspond à l'intervalle 17,5 – 21,5 cm sous la surface du plancher océanique, de la carotte PI 1766-22 CT2 collectée lors de la plongée 1766) prélevée dans un tapis microbien blanc du site Marker 27. Les inoculations ont été réalisées par ajout de 150 ml (7.5%) de mélange constitué :

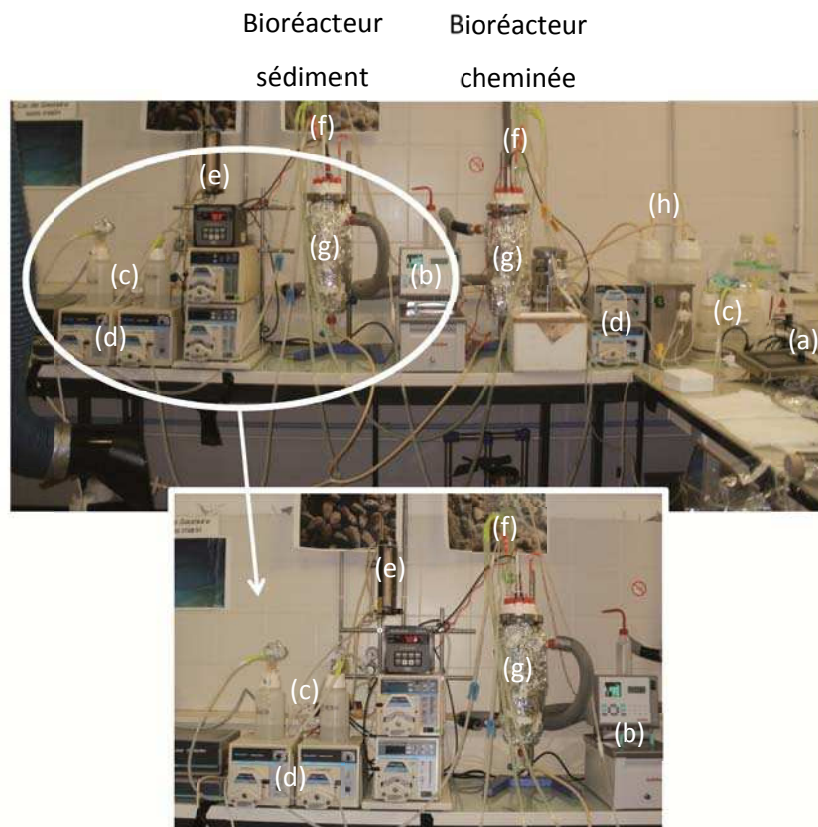
- (1) par le broyat de l'édifice hydrothermal repris dans une solution de NaCl à 23g.L<sup>-1</sup> stérile et non réduit pour la culture consacrée à l'enrichissement d'un fragment d'édifice hydrothermal actif ;
- (2) par du sédiment repris dans une solution de NaCl à 23g.L<sup>-1</sup> stérile réduite, pour la culture dédiée à l'enrichissement de sédiments hydrothermaux.

Le milieu de culture choisi est une base d'eau de mer artificielle sans sulfate, enrichie en substrats organique : (acétate et formate, 10 mM final, benzoate à 2 mM final, extrait de levure à 0,1g.L<sup>-1</sup>) et en Fer ferrique à 9 mM final au début de la culture (provenant d'une solution stock cristalline d'oxyde de Fe(III) insoluble, préparation détaillée cf. 3.1.2.1.2 Milieux et conditions de culture). Le milieu supplémenté en vitamines et en éléments traces sans chélateur (5ml de chaque à partir d'une solution stock (Balch et al. 1979)) et réduit avec 0,5g.L<sup>-1</sup> de L-Cystéine HCl. Cette base d'eau de mer artificielle contenait pour 1 litre d'eau desionisée: 23g de NaCl, 0,5g de KCl, 0,5g de NH<sub>4</sub>Cl, 0,5g de MgCl<sub>2</sub>, 0,5g de CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,25g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Le milieu est stérilisé par filtration sur 0,22 µm (Millex®GP, Millipore). Ce milieu sélectif, sans sulfate, a été conçu afin de tenter d'enrichir et de cultiver des micro-organismes réalisant la réduction dissimilative du fer ferrique en fer ferreux et de s'affranchir de l'enrichissement de procaryotes sulfato-réducteurs. Les deux cultures (flanges et sédiments) ont été effectuées dans les mêmes conditions à 80°C, à pH 7, sous un balayage gazeux de N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (70/20/10) à un débit d'environ 400ml.h<sup>-1</sup> (0,2 v.v.min<sup>-1</sup>) afin de maintenir l'anaérobiose, l'homogénéisation et la suspension des particules de fer ferrique. Les cultures ont également été réalisées dans l'obscurité afin d'éviter la photolyse (Faust and Hoigné 1990; Feng and Nansheng 2000) et la photo-réduction du fer ferrique qui peut notamment se produire en présence d'acides organiques tels que l'acétate (Fukushima and Tatsumi 1999; Zhang 2000). Chaque jour, l'ajout de milieu (sans la solution d'oxyde de fer, c'est-à-dire seulement la base minérale, la matière organique, l'agent réducteur, et les solutions de poly-vitamines, d'éléments traces) a été réalisé de

façon séquentielle afin de compenser la perte liée aux prélèvements (soit 40 ml par jour) et aussi, afin de renouveler le milieu.

Trois jours avant inoculation, le milieu de culture a été distribué dans les cuves puis la solution d'oxyde de Fer III a été ajoutée dans chaque bioréacteur à une concentration finale de 9 mM. Cette période de 3 jours en l'absence d'inoculum a été considérée comme notre témoin abiotique pour le comportement du fer : concentration en fer ferreux, ferrique, fractionnement isotopique du fer ferreux et du fer ferrique.

**Remarque sur les dispositifs de cultures d'enrichissements ciblant la ferri-réduction :** ces deux cultures d'enrichissement ont été réalisées dans les mêmes conditions et en même temps. Les circuits de refroidissement des condenseurs et de chauffage des cuves (en recouvrant les tuyaux d'une gaine isolante pour éviter les déperditions de chaleur) ont été réalisés en séries; les systèmes de contrôle de pH et d'alimentation en milieu, quant à eux, étaient propres et indépendants à chaque cuve (Figure II-22).



**Figure II-22 :** Photographies des deux bioréacteurs utilisés pour les deux cultures en condition de ferri-réduction réalisées au laboratoire : (a) gestion informatisée de régulation du pH, (b) système de régulation de la température, (c) réservoirs d'acide et de base, (d) pompes péristaltiques d'ajout d'acide ou de base, (e) débitmètre à bille, (f) condenseur, (g) cuve du bioréacteur, (h) évacuation du gaz en sortie de cuve, (i) bain-marie chaud associé à la cuve (le système informatique de régulation du pH du bioréacteur « sédiment » ainsi que le bain réfrigérant n'apparaissent pas sur cette photographie).

### 3.1.2.2.5. Suivi des cultures : prélèvements et conditionnements des échantillons

Quotidiennement, des prélèvements ont été effectués dans les cultures afin de déterminer les concentrations cellulaires et de réaliser divers types d'analyses : diversités microbiennes, chimiques, isotopiques et minéralogiques. Selon les différentes études réalisées, l'échantillonnage et le conditionnement ont été effectués différemment.

**Les prélèvements journaliers de la culture d'enrichissement réalisée à bord, pendant la campagne BIG, ont été réalisés comme suit, en fonction des analyses à effectuer :**

- **Estimation de la densité cellulaire par comptage** : 2x1 ml de cultures ont été fixés avec 10 µl de glutaraldéhyde et conservés à -20°C jusqu'au comptage sur cellule de Thoma (profondeur 0,02 mm) au microscope Olympus BX60 à contraste de phase (X 40).
- **Abondance cellulaire estimée par PCR quantitative et étude de la diversité microbienne active** : la totalité du volume de fluide collecté sur une période de 24 heures (c'est-à-dire 440 ml), dans le bidon de collecte conservée dans un bac réfrigéré (Figure XX) a été filtrée sur 0,22 µm (isopore™, Millipore) et le filtre a été conservé à -80 ° C jusqu'aux extractions des acides nucléiques.
- **Analyses des éléments majeurs et traces dissous** : 5 ml de culture ont été filtrés sur 0,45 µm (Millex®, Millipore), puis conservés à 4°C à bord. Au laboratoire, ces échantillons ont été acidifiés avec une solution à 8N d'acide nitrique distillée deux fois, et enrichie en indium à 10 ppm puis conservés à température ambiante jusqu'aux différentes analyses chimiques.
- **Concentration en H<sub>2</sub>S** : 10 ml de culture ont été filtrés sur 0,45 µm (Millex®, Millipore) et fixés sous la forme d'un précipité de ZnS par addition de 0,1g d'acétate de zinc dans une fiole, dans laquelle un vide partiel a été réalisé et conservées a 4°C jusqu'à analyse.
- **Concentration en sulfate** : 1 ml de culture filtré sur 0,45 µm (Millex®, Millipore) a été acidifié avec 10 µl d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) à 65% puis conservé à 4°C.
- **Concentration en acides organiques (acétate, lactate, formate et propionate)** : 1 ml de culture filtré sur 0,45 µm (Millex®, Millipore) a été directement conservé à -20°C.

**Les échantillonnages quotidiens des deux cultures d'enrichissements ciblant la ferri-réduction ont été réalisés comme suit, en fonction des analyses à effectuer :**

- **Estimation de la densité cellulaire par comptage** : 2 ml de culture ont été fixés avec 10 µl de glutaraldéhyde et conservés à -20°C jusqu'au comptage sur cellule de Thoma au microscope Olympus BX60 à contraste de phase (X 40).
- **Abondance cellulaire estimée par PCR quantitative et étude de la diversité microbienne active** : 20 ml de culture ont été centrifugés pendant 30 minutes à 8 000g à 15°C, le surnageant a été éliminé puis les culots ont été conservés à -80°C jusqu'à extraction des acides nucléiques.
- **Analyses des éléments majeurs et traces dissous** (notamment concentration par la méthode de la Ferrozine et isotopie du Fer ferreux et du Fer dissous): 15 ml de culture ont été filtrés sur 0,22 µm (Millex®, Millipore), acidifiés à pH2 et conservés à -20°C, jusqu'aux différentes analyses chimiques et isotopiques.
- **Analyses des éléments majeurs et traces non dissous** (notamment concentration par la méthode de la Ferrozine et isotopie en Fer total): 10 ml de culture non filtrées ont été acidifiés à pH2 et conservés à -20°C, jusqu'aux différentes analyses chimiques et isotopiques.

Des analyses minéralogiques ont également été menées sur tous les échantillons bruts ayant servi d'inoculum (cheminées hydrothermales et sédiments) et sur les échantillons récupérés à la fin de toutes les cultures (fermentation réalisée à bord et celles ciblant la ferri-réduction). Ces échantillon ont été conservés à -20°C jusqu'à leurs analyses.

## 3.2. Analyses géochimiques des fluides

### 3.2.1. Analyses de la concentration en sulfate et acides organiques par chromatographie

*Les mesures de concentrations en sulfate, acétate, lactate, propionate, formate des échantillons de la fermentation « Atalante » ont été réalisées par Patricia Pignet.*

Les concentrations en sulfates et en acides organiques (acétate, lactate, formate et propionate), ont été déterminées par chromatographie ionique (chromatographie cationique DX600, DIONEX). L'analyte, échantillon liquide constitué d'un mélange de composés, est injecté puis mis à migrer sur une colonne de chromatographie. Cette migration est réalisée grâce à un éluant (un ou

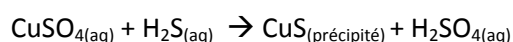
plusieurs solvants) spécifique des produits à doser, va « pousser » les composés hors de la colonne. Les différents produits progressent et sortent de la phase stationnaire (colonne) à différentes vitesses spécifiques de leurs tailles, polarités, affinités et interactions avec la phase stationnaire. Au cours de l'analyse, la concentration en éluant est augmentée (augmentation de la force éluante) afin d'éluier les composés ayant une plus grande affinité avec la phase stationnaire. A leurs sorties, différents détecteurs, spécifiques d'un produit, vont, par conductimétrie, enregistrer des signaux électriques et les convertir sous la forme de chromatogramme, dont la surface sous le pic est proportionnelle à la concentration du composé dosé. L'éluant utilisé pour la détermination de la concentration en acides organiques est le KOH et celui utilisé pour le sulfate est un mélange carbonates/bicarbonates. Des standards de différentes concentrations connues (concentrations proches de l'échantillon à analyser) ont été utilisés afin de calibrer les temps de rétention spécifique de chaque composé analysé ; ainsi, chaque un composé à doser, est identifié selon le temps de rétention avant l'apparition de son pic sur le chromatogramme. Des blancs d'eau Milli-Q ont également été analysés.

### **3.2.2. Analyse de la concentration en H<sub>2</sub>S d'échantillons environnementaux et issus de culture de microorganismes**

*Les mesures de concentration d'H<sub>2</sub>S en utilisant la méthode dite « de Cline » ont été réalisées avec le soutien de Carole Decker et Jean-Claude Caprais.*

La méthode de Cord-Ruwisch (Cord-Ruwisch 1985) a été employée pour déterminer la concentration en hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) dans des cultures de souches pures de sulfo- et de sulfato-réducteurs; la méthode de Cline (Cline 1969) a, quant à elle, été utilisée pour déterminer la concentration en H<sub>2</sub>S d'échantillons de fluides hydrothermaux collectés pendant la campagne BIG et d'échantillons issus de la culture d'enrichissement réalisée à bord collectés à différents temps de culture.

**Test de Cord-Ruwisch** (copper sulfide reaction) (Cord-Ruwisch 1985) : ce test colorimétrique est basé sur la réaction entre le sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub> à 5 mM dans de l'HCl à 50 mM) et l'H<sub>2</sub>S dissous. La réaction entre ces deux composés conduit à la formation d'un précipité brun de CuS selon la réaction suivante :



L'intensité colorimétrique du précipité, mesurée à 480 nm, est dépendante de la quantité en H<sub>2</sub>S dissout.

Les tests de Cord-Ruwisch ont été réalisés à partir de culture de sulfo- ou de sulfato-réducteur afin de déterminer la concentration d'H<sub>2</sub>S produit. Pour cela, un aliquot de culture (0,2 ml) a été mis en présence du réactif (2 ml), immédiatement un précipité brun de CuS se forme, caractéristique de la présence et de la quantité d'H<sub>2</sub>S dissous dans le milieu de culture.

**Méthode de Cline** (methylene blue method) (Cline 1969) : ce test colorimétrique est basé sur la réaction entre deux réactifs : une solution de N,N-diméthyl-p-phenylenediamine sulfate de chlorure à 19 mM et une solution de fer ferrique (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) à 100 mM, et l'H<sub>2</sub>S à doser. La réaction entre ces composés conduit à la teinte de la solution en bleu-mauve. Après environ une heure de réaction dans le noir (temps de réaction allongé par rapport à celui de la méthode initiale qui est de 20 min.), l'absorbance des échantillons a été mesurée à 670 nm (plus la solution est foncée plus il y a d'H<sub>2</sub>S).

La méthode de Cline a été utilisée pour déterminer la concentration en H<sub>2</sub>S dissous à partir des échantillons préalablement fixés et conservés sous forme d'un précipité de ZnS en solution. Pour cela, un aliquot (1 ml final, dépendant de la dilution à effectuer pour pouvoir doser l'échantillon) de cette solution a été prélevé (après remise en suspension et ré-homogénéisation du précipité) puis a été mis en présence des deux réactifs mentionnés ci-dessus (0,1 ml de chaque) ; immédiatement la solution se teinte en bleu-mauve, caractéristique de la présence et de la quantité d'H<sub>2</sub>S dissous dans le milieu de culture. Après une heure dans le noir, la lecture de l'absorbance a été réalisée à 670 nm.

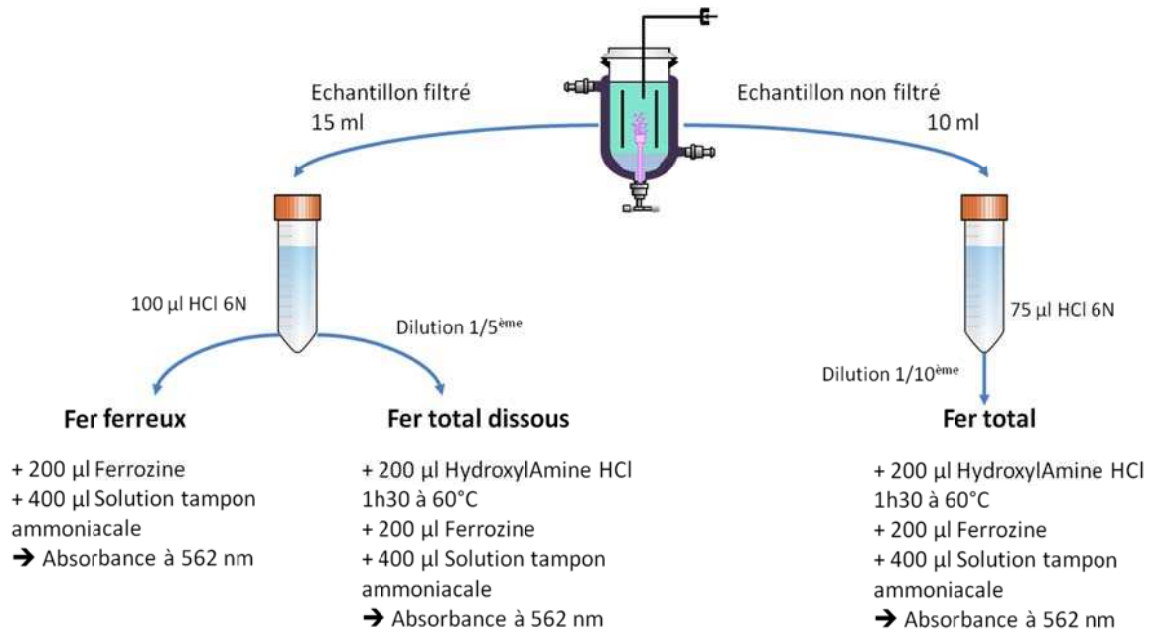
Pour ces deux méthodes de détermination de la concentration en H<sub>2</sub>S, des solutions de Na<sub>2</sub>S à différentes concentrations (de 5 à 100 µM, préparés dans de l'eau Milli-Q anoxique) ont été utilisées comme gamme étalon. Des blancs, eau Milli-Q anoxique, ont été dosés régulièrement au cours de chaque série analyse.

### **3.2.3. Analyse de la concentration en fer par la méthode de la Ferrozine**

Les concentrations en fer total, fer total dissous et en fer ferreux dans les échantillons de culture d'enrichissement ciblant la ferri-réduction, ont été mesurées par la méthode de la Ferrozine (Stookey 1970) (Figure II-23). Cette méthode de dosage colorimétrique est basée sur la formation d'un complexe stable et mesurable à des pH compris entre pH 4 et 9, de couleur magenta, soluble dans l'eau, entre les ions Fe<sup>2+</sup> (fer ferreux) et la Ferrozine. Ce complexe colorimétrique se développe après 5 min. de réaction à température ambiante et l'absorbance du complexe mesurée à 562 nm est dépendante de la quantité en fer ferreux.

Toutes les dilutions des échantillons ont été réalisées avec de l'eau Milli-Q acidifiée à pH 2-3.





**Figure II-23 :** Représentation schématique du protocole de dosage du fer ferreux, du fer total dissous et du fer total par la méthode de la Ferrozine.

**Préparation des échantillons pour la mesure de la concentration en fer ferreux dissous :** à partir des 15 ml d'échantillons collectés, filtrés sur 0,22 µm et distribués en tubes contenant environ 100 µl d'acide chlorhydrique 6 mol.l<sup>-1</sup>, un aliquot de 5 ml a directement été prélevé. A cet échantillon, 200 µl de Ferrozine (0,25 g de ferrozine dans 50 ml d'eau Milli-Q ; pH de environ 2,5) et 400 µl d'une solution tampon ammoniacale (40 g d'acétate d'ammonium dans 35 ml de solution d'ammonium et 65 ml d'eau Milli-Q ; pH de la solution proche de 10) ont été ajoutés. Après 5 min. de réaction l'absorbance a été mesurée à 562 nm.

**Préparation des échantillons pour la mesure de la concentration en fer total dissous :** à partir des 15 ml d'échantillon collectés, filtrés sur 0,22 µm et distribués en tube contenant environ 100 µl d'acide chlorhydrique 6 mol.l<sup>-1</sup>, un aliquot de 1 ml a directement été prélevé et dilué au 1/5<sup>ème</sup> dans 4 ml d'eau Milli-Q acidifiée à pH 2-3. A cet échantillon, 200 µl d'une solution d'hydroxylamine HCl à 1,4 mol.l<sup>-1</sup> (25g d'hydroxylamine dissous dans 125ml d'une solution d'acide chlorhydrique qualité trace métal (6 mol/L), auquel de l'eau Milli-Q a été ajoutée afin d'atteindre un volume final de 250 ml ; pH de la solution inférieur à 1) ont été adjoints. L'échantillon a ensuite été mis à chauffer pendant au moins 1h30 à 60°C dans un bloc chauffant. Une fois refroidi, 200 µl de Ferrozine et 400 µl d'une solution tampon ammoniacale à pH 5,5 ont été ajoutés ; puis après 5 min. de réaction l'absorbance a été mesurée à 562 nm.

**Préparation des échantillons pour la mesure de la concentration en fer total:** à partir des 10 ml d'échantillon collectés (non filtrés) et distribués en tube contenant environ 75 µl d'acide chlorhydrique 6 mol.l<sup>-1</sup>, un aliquot de 0,5 ml a directement été prélevé et dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans 4,5 ml d'eau Milli-Q acidifiée à pH 2-3. A cet échantillon, comme précédemment, 200 µl d'une solution d'hydroxylamine HCl à 1,4 mol.l<sup>-1</sup> ont été ajoutés. L'échantillon a ensuite été mis à chauffer pendant au moins 1h30 à 60°C dans un bloc chauffant. Puis, une fois refroidi, 200 µl de Ferrozine et 400 µl d'une solution tampon ammoniacale à pH 5,5 ont été ajoutés et après 5 min. de réaction, l'absorbance a été mesurée à 562 nm.

Des solutions de fer ferreux et de fer ferrique à différentes concentrations (de 5 à 60 µM, préparées dans de l'eau Milli-Q acidifiée) ont été utilisées comme gamme étalon. La gamme de concentration réalisée à partir du fer ferreux a été traitée et préparée identiquement aux échantillons dont la mesure de la concentration en fer ferreux dissous était dosée. La gamme de concentration réalisée à partir du fer ferrique a, quant à elle, été préparée comme les échantillons pour lesquels, le fer total était dosé.

Des blancs d'eau milli-Q à pH 2-3 ont été dosés quotidiennement en même temps que la série d'échantillons analysés.

### **3.2.4. Analyse des éléments majeurs par ICP optique (ICP-AES) et des éléments traces par HR-MS-ICP-MS (ICP-MS haute résolution)**

Les concentrations en éléments majeurs ont été mesurées avec un spectromètre d'émission atomique à source plasma à couplage inductif (ICP optique ou ICP-AES, Ultima 2, Horiba JobinYvon) et les éléments traces ont été dosés avec un spectromètre de masse à source plasma en haute résolution à couplage inductif (HR-ICP-MS, l'élément 2, ThermoFisher), tous deux opérés au Pôle spectrométrie océan de Brest (PSO). Les analyses effectuées par ICP-AES, ont permis de mesurer la concentration de 10 éléments majeurs (Al, Ba, Ca, Fe, Mg, Mn, P, Si, S, Sr et Ti) et 5 éléments traces (Co, Cu, Ni, V et Zn), et ont été réalisées pour tous les échantillons : échantillons de fluide et ceux de la culture en bioréacteur réalisée pendant la campagne<sup>8</sup> et ceux issus de la culture en bioréacteur ciblant la ferri-réduction. Les analyses réalisées par HR-ICP-MS, ont permis de doser 23 éléments traces (Al, Ba, Ca, C, Co, Cr, Cu, Fe, In, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Sb, Si, Sr, Ti, U, V et Zn) et ont été réalisées uniquement pour les échantillons de fluides récupérés lors de la mission BIG.

---

<sup>8</sup> Echantillons nommés ultérieurement dans cette section échantillons environnementaux

**Préparation des échantillons avant analyses :** au laboratoire, en salle blanche, tous les échantillons environnementaux, aliquotés en fioles LDPE en vue d'analyses géochimiques ont été acidifiés avec une solution à 8 mol/L d'acide nitrique (préparé à partir d'une solution ultra-pur HNO<sub>3</sub> concentré) et dopés en indium à 10 ng/g (ppb) puis conservés à température ambiante. L'acidification a été réalisée au moins 1 mois avant les analyses multi-élémentaires. Les échantillons issus de la culture en bioréacteur ciblant la ferri-réduction ont été immédiatement acidifiés (avec une solution d'HCl pur de qualité biologie moléculaire, pureté à 99%) après prélèvement.

**Préparation des échantillons pour les analyses multi-élémentaires:** préalablement à l'analyse élémentaire, tous les échantillons, filtrés et non filtrés, ont été préparés de la même façon. Ils ont tous été dilués au 1/100<sup>ème</sup> (échantillons environnementaux) dans une solution d'acide nitrique à 0,28 mol.l<sup>-1</sup> (préparée à partir d'une solution mère d'HNO<sub>3</sub> distillée deux fois), sauf ceux issus des cultures en bioréacteurs ciblant la ferri-réduction, qui eux, ont été dilués au 1/11<sup>ème</sup>.

Dans les mêmes conditions que celles de préparation des échantillons, même dilutions, des solutions étalons ont été préparées :

- à partir d'eau Milli-Q et d'une solution d'eau de mer de concentration connue (standard Cass 4, National Research Council Canada) pour tous les échantillons environnementaux.
- à partir du milieu servant à la culture d'enrichissement en condition de ferri-réduction, dilué dans de l'acide nitrique à 0,28 mol.l<sup>-1</sup> et d'une solution d'eau de mer de concentration connue pour les échantillons issus de cette culture.

Pour cette série de solutions étalons, un volume connu d'éléments traces et majeurs a été ajouté, selon le principe de la méthode des ajouts dosés (contient un volume fixe de la solution à doser et un ajout variable de solutions de référence, générant ainsi des variations de concentrations connues dans chaque solution étalon).

De la même façon, trois solutions standard préparées et diluées de la même façon ont été également analysées régulièrement. Ces trois standards correspondent à des eaux de mer de référence. Il s'agissait de Cass 4, eau de mer côtière de référence pour l'analyse

des métaux ; de Nass 5, eau de mer de référence pour l'analyse des métaux traces et de Slew 3, une eau estuarienne certifiée pour l'analyse des métaux traces (provenant du National Research Council of Canada, NRC)).

De nombreux blancs correspondant à la solution d'acide nitrique à  $0,28 \text{ mol.l}^{-1}$  utilisée pour les dilutions ont été préparés très régulièrement au cours de chaque série de dilution, ont été dosés en même temps que sa série d'échantillons analysés.

### **3.3. Analyses isotopiques**

#### **3.3.1. Isotopie du Soufre**

##### **3.3.1.1. Méthode directe d'analyse des isotopes du soufre de l'hydrogène sulfuré par la technique du « sparging » couplée au MC-ICP-MS**

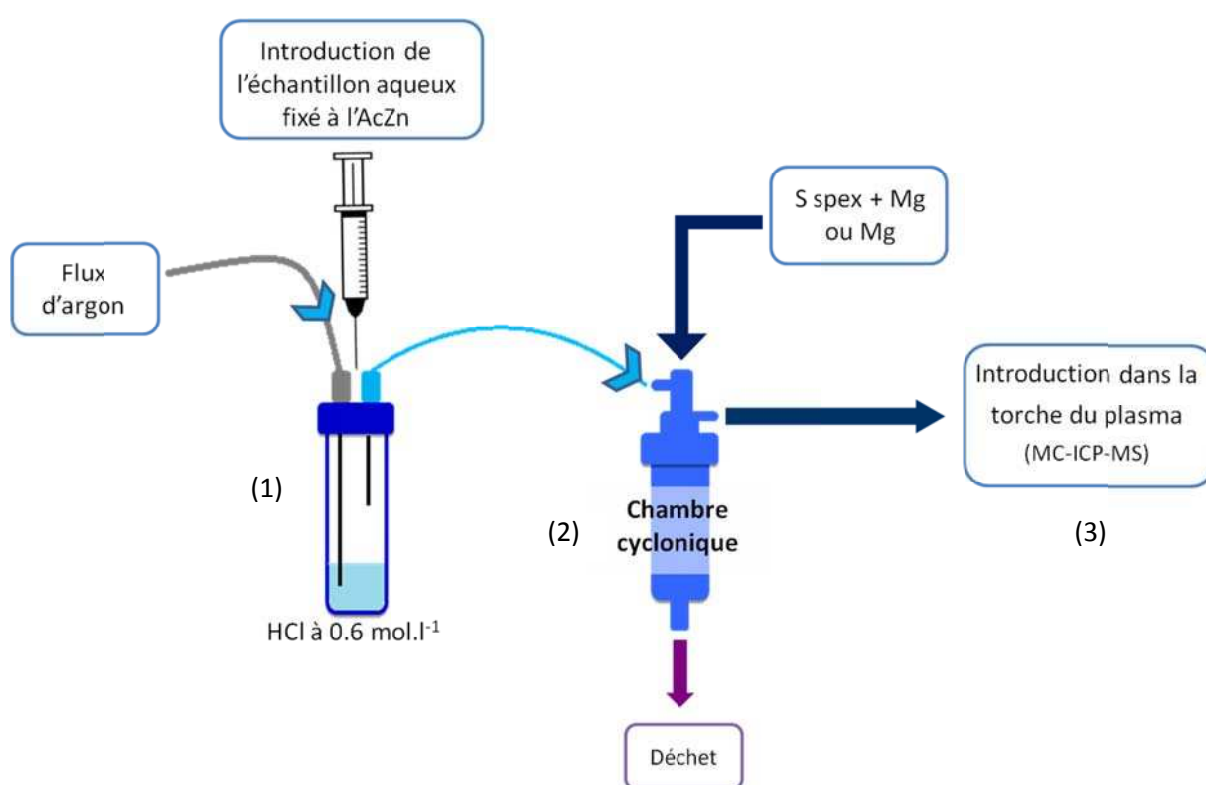
Cette méthode d'analyse directe des isotopes du soufre a fait l'objet d'un développement analytique (Annexes 3 (Callac et al. 2010)). Un article est en cours de préparation (non présenté ici).

Cette méthode permet de déterminer les rapports isotopiques du soufre de l'hydrogène sulfuré directement dans un échantillon environnemental aqueux. Avant l'analyse, l'échantillon (ou standard) doit être préalablement fixé sous forme d'un précipité de ZnS *via* la réaction entre 0,1g d'acétate de zinc et de l'échantillon filtré. L'acidification de l'échantillon lors de l'analyse permet de re-générer l'hydrogène sulfuré en espèce volatile ( $\text{H}_2\text{S}$ ) et permettre sa mesure directement par le MC-ICP-MS (spectromètre de masse à source plasma à couplage inductif à multi-collection). L'instrument utilisé est le *Neptune*, ThermoScientific installé au PSO, Pôle Spectrométrie Océan de Brest (Centre IFREMER).

Cette technique, qui n'avait jamais été utilisée jusqu'à présent, permet l'analyse isotopique sur des quantités de soufre inférieures à 100 ng soit des quantités de soufre très inférieures à celles des autres méthodes précédemment décrites par spectromètre de masse à source gazeuse qui requiert généralement une quantité de soufre  $>$  à 100  $\mu\text{g}$  (Mann et al. 2009). De plus, cette méthode

permet de s'affranchir de la matrice aqueuse de l'échantillon au moment de l'analyse, permettant des mesures fiables sans temps de préparation conséquent.

**Montage expérimental :** Le montage expérimental utilisé repose sur le couplage en ligne : (1) d'une fiole où l'hydrogène sulfuré est généré, (2) d'une chambre cyclonique permettant l'injection simultanée d'un traceur isotopique (Magnesium) et d'un standard isotopique ( $S_{Spex}$ ) en solution et (3) du MC-ICP-MS utilisé en mode de résolution « haute » suivant les conditions analytiques décrites dans Craddock et al., 2008. Dans ce montage en série, toutes les unités sont reliées par des lignes de tuyau Teflon et sont en permanence balayées par un flux gazeux d'argon (Figure II-24).



**Figure II-24 :** Représentation schématique du montage expérimental utilisé pour l'analyse directe des isotopes du soufre par Sparging développée au laboratoire ; (1) la fiole où sont générés les hydrures de soufre ; (2) la chambre cyclonique et (3) le MC-ICP-MS.

Ce montage est composé d'une fiole en verre de 40 ml hermétiquement fermée et contenant 5 ml d' $HCl$  à  $0,6 \text{ mol.l}^{-1}$ . Cette fiole est connectée à la chambre cyclonique qui est une chambre en téflon qui permet la séparation des liquides et des gaz. C'est cette chambre cyclonique qui est reliée au MC-ICP-MS. Ce spectromètre de masse comporte huit cages de Faraday déplaçables et une neuvième qui est fixe. Ces cages sont localisées de façon à collecter lors d'une même analyse à la fois les rapports isotopiques du soufre  $^{34}S^+ / ^{32}S^+$  et  $^{33}S^+ / ^{32}S^+$  et ceux du magnésium  $^{26}Mg^+ / ^{25}Mg^+$ .

Le fractionnement de masse instrumental est corrigé lors de chaque mesure des isotopes du soufre d'un échantillon ou du standard, en mesurant les rapports isotopiques d'une solution de standard isotopique du Mg (Mg PCall) selon les équations suivantes :

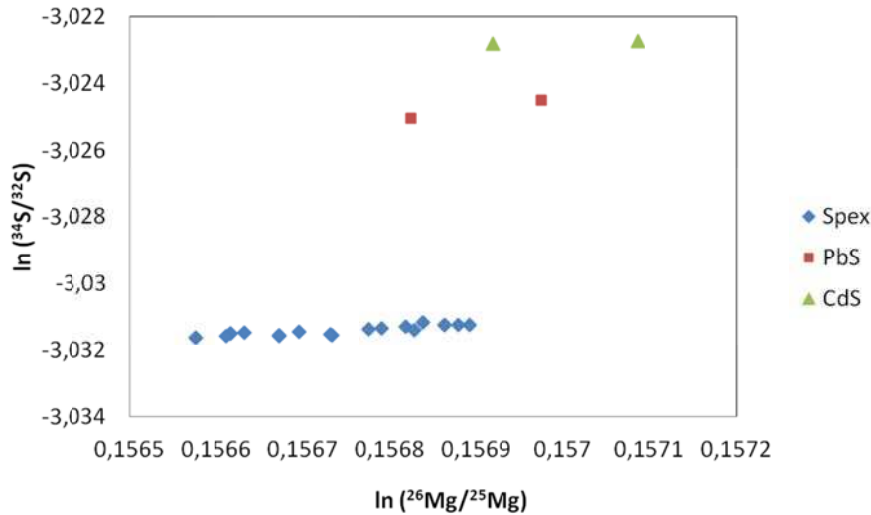
$$\left( {}^{34}\text{S}/{}^{32}\text{S} \right)_{\text{corrigé}} = \left( {}^{34}\text{S}/{}^{32}\text{S} \right)_{\text{mesuré}} \times \left( \frac{M_{34}}{M_{32}} \right)^{fMg}$$

$$\text{Où } fMg = \frac{\ln \left[ \frac{\left( {}^{26}\text{Mg}/{}^{25}\text{Mg} \right)_{IUPAQ}}{\left( {}^{26}\text{Mg}/{}^{25}\text{Mg} \right)_{\text{mesuré}}} \right]}{\ln(M_{26}/M_{25})}$$

Avec en indices  $_{IUPAQ}$  : valeur standard internationale du rapport isotopique du Mg,  $_{\text{mesuré}}$  : rapport isotopique brut mesuré sur le MC-ICPMS ;  $_{\text{corrigé}}$  : rapport isotopique corrigé du fractionnement isotopique instrumental. M : Mass isotopique ; mesuré : rapport isotopique.

En pratique, les rapports isotopiques du S et Mg sont mesurés indépendamment et successivement chacun leur tour : isotopes du S, puis ceux de Mg, ceux du S etc... . De plus, entre chaque analyse d'échantillons, un standard isotopique de composition connue « S Spex » est mesuré en solution, afin de pouvoir utilisé la notation « delta »  $\delta^{34}\text{S}$  et de s'affranchir de biais analytiques éventuels générés lors de la correction avec les isotopes du Mg. La Figure II-25 représente un séries de mesures des rapports bruts des isotopes du S et Mg pour le standard  $S_{\text{spex}}$  et 2 standards internes d'hydrogènes sulfurés (fixés sous la forme PbS et CdS). Il est important de noté que dans ce cas, la solution de standard isotopique ( $S_{\text{spex}}$  à 40 ppm) est introduite dans la chambre cyclonique par un nébuliseur alors que les standards ZnS et PbS sont introduits via la méthode de « sparging ».

Les échantillons d' $\text{H}_2\text{S}$  fixés sous la forme d'un précipité de ZnS sont introduits directement à la seringue dans la fiole dégazée qui contient l'HCl. Grâce au flux d'argon, le sulfure d'hydrogène gazeux généré par acidification du ZnS est transporté dans la chambre cyclonique où il est mélangé avec la solution standard de Mg PCall à 4 ppm. Ce mélange, toujours grâce au flux d'argon, va être introduit dans la torche plamsa du MC-ICP-MS.



**Figure II-25 :** Représentation graphique des rapports isotopiques en soufre  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  du standard  $S_{\text{Spex}}$ , du CdS et du PbS en fonction des rapports isotopiques en magnésium  $^{26}\text{Mg}/^{25}\text{Mg}$  mesuré en même temps que l'échantillon et montrant que les rapports du S et du Mg évoluent selon la même tendance pour une composition isotopique du S donné.

Afin de s'affranchir des interférences isobariques sur les masses des isotopes du soufre (le  $^{16}\text{O}_2$  sur le  $^{32}\text{S}$  ; les  $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$  et le  $^{33}\text{S}^{1}\text{H}$  sur le  $^{34}\text{S}$ ), toutes les mesures sont réalisées en haute résolution (Craddock et al. 2008). A cause des interférences avec l'argon en particulier avec l' $^{36}\text{Ar}$ , l'isotope du soufre  $^{36}\text{S}$  ne peut pas être mesuré par MC-ICPMS.

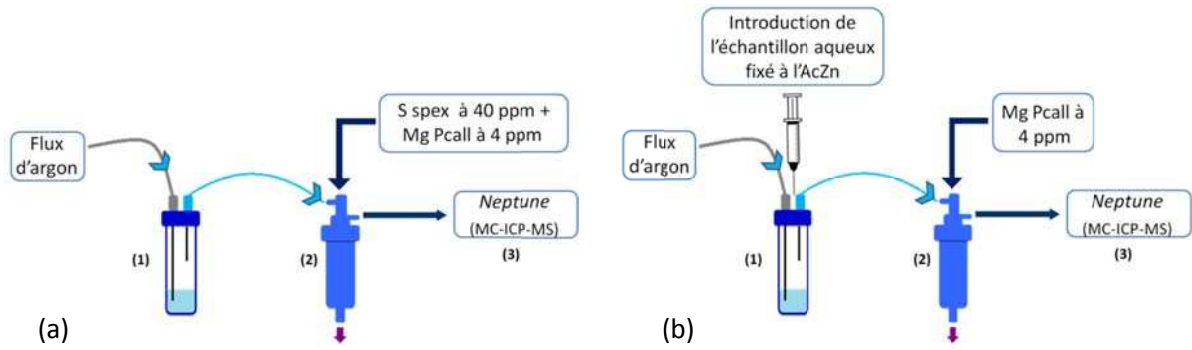
Les valeurs de la composition isotopique du soufre, notées  $\delta^{34}\text{S}$ , sont rapportées dans un premier par rapport au standard isotopique interne « Spex » correspondant à l'équation suivante :

$$\delta^{34}\text{S}_{\text{Spex}} = \left( \left[ \frac{^{34}\text{S}/^{32}\text{S}_{\text{échantillon}}}{^{34}\text{S}/^{32}\text{S}_{\text{Spex}}} \right] - 1 \right) \times 1000$$

Ensuite, les valeurs isotopiques sont rapportées selon la notation internationale  $\delta^{34}\text{S}_{\text{VCTD}}$  obtenue par la relation (Craddock et al., 2008)

$$\delta^{34}\text{S}_{\text{VCTD}} = \delta^{34}\text{S}_{\text{Spex}} - 3$$

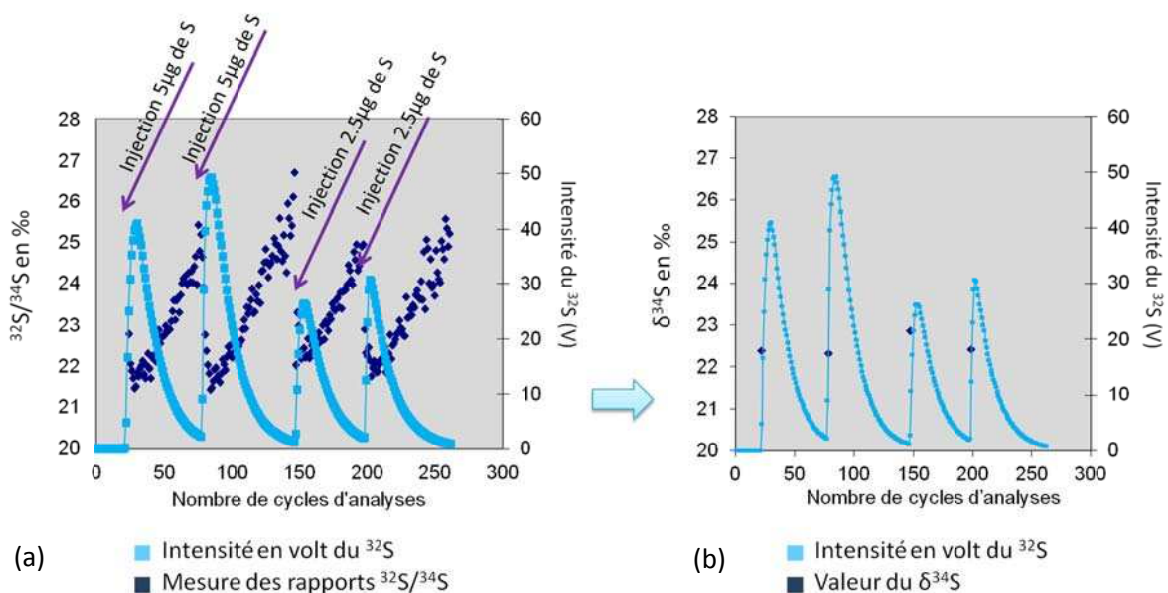
**Analyse des échantillons :** Avant chaque analyse d'un échantillon, la fiole contenant l'HCl est remplacée. L'analyse d'un échantillon consiste à mesurer les rapports isotopiques du S et du Mg dans la solution de standard isotopique puis dans l'échantillon auquel 4 ppm de Mg sont ajoutés dans la chambre cyclonique (Figure II-26).



**Figure II-26 :** Représentation schématique du montage lors de l'analyse d'un échantillon ; (a) à partir de la solution standard ; (b) dans l'échantillon ; (1) la fiole où sont générés les hydrures de soufre ; (2) la chambre cyclonique et (3) le MC-ICP-MS.

Ainsi, avant l'analyse du standard et, entre l'analyse du standard et de l'échantillon, la ligne de base (concentration en S dans le système) est vérifiée.

La mesure des rapports isotopiques en S d'un échantillon repose sur l'analyse d'un signal transitoire après acidification du précipité de ZnS et la génération de H<sub>2</sub>S. Ce signal transitoire, mesuré en intensité (Volt) au cours du temps correspond à l'arrivée progressive du H<sub>2</sub>S dans la torche du plasma, qui va atteindre son maximum, puis petit à petit diminuer jusqu'à atteindre une intensité proche de la ligne de base signifiant que la totalité des hydrures de soufre gazeux générés ont été introduits dans le plasma (Figure II-27a). Le calcul des rapports isotopiques est réalisé en faisant l'intégrale de toutes les valeurs mesurées pendant la phase ascendante du signal transitoire (Figure II-27b).



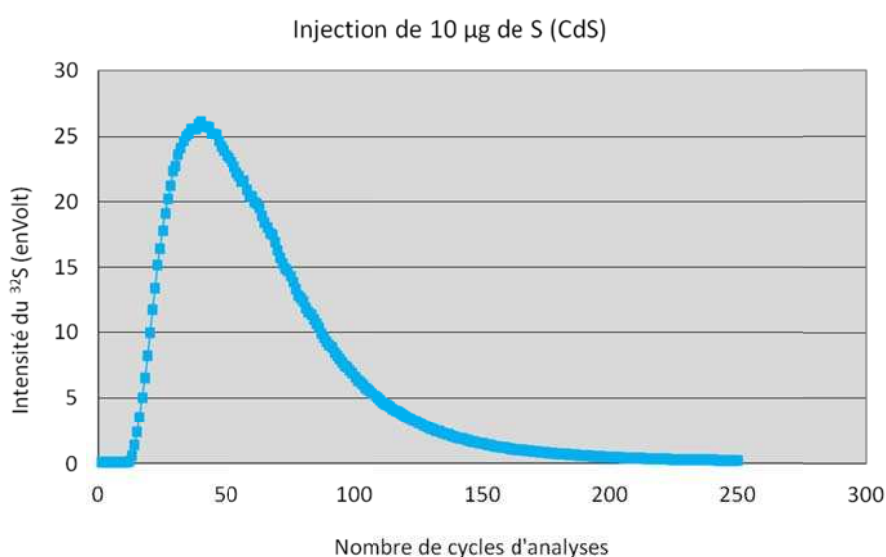
**Figure II-27 :** Cas d'injections multiples d'une solution de Na<sub>2</sub>S (à 50 ppm) fixées sous forme de ZnS : (a) chaque injection génère un signal transitoire dont l'intensité est mesurée en volt (courbes bleues claires); (a et b) calcul du rapport <sup>34</sup>S/<sup>32</sup>S en prenant l'intégrale de toutes les valeurs du rapport <sup>34</sup>S/<sup>32</sup>S mesurées lors de la montée du signal transitoire (points en bleus foncés sur les graphiques); (b) valeurs isotopiques (points bleus) des rapports <sup>34</sup>S/<sup>32</sup>S obtenues pour ces injections multiples.



**Validation de la méthode :**

- **Effet mémoire :**

L'effet mémoire, c'est-à-dire la vérification de l'absence de  $H_2S$  par les constituants du montage (tuyau, chambre cyclonique) ou de l'échantillon précédent a été vérifié avec différents échantillons. Comme le présente la figure II-28, ce système s'affranchit des effets mémoires après 250 cycles, soit 15 minutes et ne nécessite pas de « nettoyage » du montage entre chaque analyse d'échantillon.



**Figure II-28 :** Représentation graphique du signal transitoire en isotope 32 du S généré lors de l'acidification de 10 µg de S d'un échantillon de CdS. Au fil des cycles d'analyses, le signal en  $^{32}S$  diminue jusqu'à atteindre la ligne de base (0 volt).

- **Validation :**

Afin de valider cette méthode, des échantillons synthétiques d' $H_2S$  de compositions isotopiques connues ont été fixés sous la forme d'un précipité de ZnS. Ces échantillons synthétiques d' $H_2S$  ont été générés au laboratoire, par acidification à l'HCl de standards de différents minéraux dont la valeur isotopique du soufre a été déterminée par des méthodes conventionnelles. Ces standards inclus NBS 123 (ZnS), AMR 8 (ZnS), Maiza 1 (PbS), (Ward's pyrrhotite (FeS) et MERCK (CdS). Les solutions de précipité de ZnS ont été obtenues après génération de  $H_2S$  et piègeage dans un solutions d'acétate de zinc.

*Les échantillons ont été placés dans des fioles hermétiquement fermées, via un système de flux continu d'azote ; cette fiole a été reliée à une seconde fiole qui contenait une solution d'acétate de zinc à 1% ; après un dégazage des fioles, la première fiole contenant l'échantillon a été acidifié avec de l'HCl à 6 mol.l<sup>-1</sup> générant de l' $H_2S$  qui grâce au balayage gazeux va buller dans la seconde fiole où il est piégé sous forme d'un précipité de ZnS.*

Au cours de plusieurs sessions analytiques et régulièrement au cours d'une même session, ces standards fixés sous forme de ZnS ont été analysés. Comme l'illustre le tableau XXX, la mesure du  $\delta^{34}\text{S}$ , d'un standard naturel ici le NBS 123 est stable et précise, même pour de faibles quantités de soufre injecté (la différence de valeur isotopique entre notre NBS 123 fixé sous forme de ZnS et sa valeur certifiée, peut être due à la méthode d'extraction du soufre).

Les compositions isotopiques des standards isotopiques « CdS » et « PbS » sur la figures II-25, sont respectivement 8,48 ‰ ( $\pm 0,05$ ) et 2,5‰ ( $\pm 0,2$ ) (Tableau II-7).

**Tableau II-7 :** Tableau indiquant la valeur du  $\delta^{34}\text{S}$  du NBS 123 fixé sous forme de ZnS, en fonction de la quantité de soufre injecté et au cours de plusieurs séries analytiques et des valeurs obtenues pour le PbS et le CdS.

Analyses	Quantité de S en $\mu\text{g}$ injecté	$\delta^{34}\text{S}$ en ‰
<b>NBS 123 analyses N°</b>		
1	2	18,30
2	4	18,49
4	2	18,38
5	2	18,32
6	1	18,60
7	0,6	18,53
8	0,2	18,54
9	0,2	18,61
10	2	18,38
11	2	18,13
12	2	18,32
13	2	18,27
14	2	18,52
15	2	18,61
16	2	18,49
Moyenne		18,43 $\pm$ 0,14
<b>NBS 123 valeur certifiée</b>		17,44 $\pm$ 0,2
<b>PbS</b>		2,50 $\pm$ 0,2
<b>CdS</b>		8,48 $\pm$ 0,05

- **Exemple d'application à échantillons naturels :**

Plusieurs échantillons naturels issus de fluides hydrothermaux, d'eaux interstitielles de sédiments marins, ou d'activités microbiennes (sulfo- et sulfato-réduction) ont également été analysés. Un exemple des mesures du  $\delta^{34}\text{S}$  par rapport au  $S_{\text{Spex}}$  est reporté dans le tableau suivant (Tableau II-8).

**Tableau II-8 :** Tableau indiquant la valeur du  $\delta^{34}\text{S}$  de l' $\text{H}_2\text{S}$  provenant d'échantillons naturels (eaux interstitielles, fluide hydrothermal et de souches microbiennes) fixé sous forme de ZnS ; par rapport à la valeur de  $S_{\text{spex}}$  mesurée.

	$\delta^{34}\text{S}$	Erreur standard
<b>Eaux interstitielles de sédiments de zone d'émission de fluides froids</b>		
1755-CT2-S1	14,48	0,13
1755-CT2-S2	14,75	0,05
1755-CT2-S3	13,76	0,14
1755-CT2-S5	15,13	0,24
1755-CT2-S6	16,26	0,05
<b>Eaux interstitielles de sédiments hydrothermaux</b>		
1767-CT12-S3	6,97	0,01
1767-CT12-S4	8,75	0,22
1767-CT12-S5	7,42	0,05
1767-CT12-S6	6,45	0,05
1767-CT12-S7	5,42	0,09
1767-CT12-S8	5,40	0,31
1767-CT12-S9	4,72	0,04
<b>Fluides hydrothermaux</b>		
1747-3_Pep 1FA	2,97	nd
1747-3_Pep 2FA	2,35	nd
1747-3_Pep3FA	3,69	nd
<b><i>Archaeoglobus profundus</i> souche thermophiles sulfato-réductrice</b>		
<i>Archaeoglobus profundus</i> à 80°C T+24h	-0,59	0,16
<i>Archaeoglobus profundus</i> à 80°C T+48h	1,62	0,17
<b><i>Thermococcus guaymasensis</i> souche thermophiles sulfo-réductrice</b>		
<i>Thermococcus guaymasensis</i> à 85°C	21,58	0,18
<i>Thermococcus guaymasensis</i> à 60°C	21,87	0,04

Il en a résulté que ce procédé de génération du  $\text{H}_2\text{S}$  couplé directement au *Neptune*, est une méthode rapide, fiable et précise pour la mesure directe des isotopes du soufre de  $\text{H}_2\text{S}$  d'échantillons naturels fixés (ZnS). Il s'ensuit également que cette méthode d'analyse directe (sans étape de chimie), permet de s'affranchir des effets matrice *via* la mesure directe d'un gaz par MC-ICP-MS. De plus, nos différents tests ont démontré que cette technique ne requiert que de faibles quantités d'échantillons ( $\geq 100$  ng).

### 3.3.1.2. Analyses des isotopes multiples du Soufre

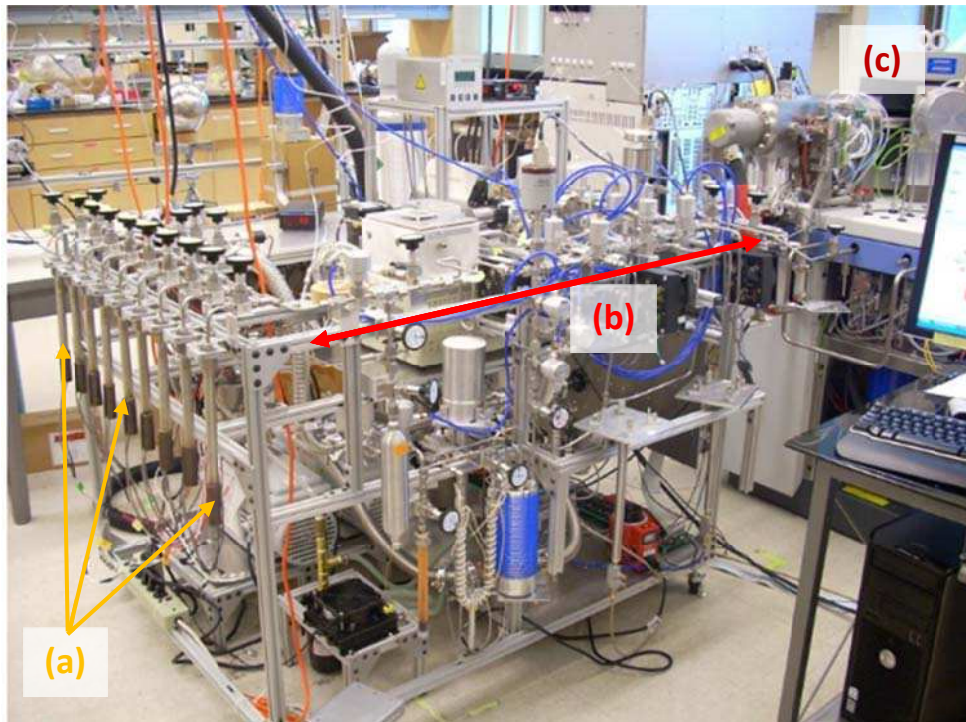
Les mesures des isotopes multiples du soufre ont été réalisées au MIT (Massachusetts Institute of Technology) Boston, Etats Unis, lors de mon séjour d'un mois dans le laboratoire de Shuhei Ono dans le département du EAPS (Earth, Atmospheric and Planetary Sciences).

L'analyse des isotopes multiples du soufre a été réalisée sur plusieurs types d'échantillons d' $H_2S$  fixés à l'acétate de zinc sous forme d'un précipité de ZnS ; les échantillons choisis étaient ceux contenant le plus d' $H_2S$ :

- des échantillons de souches pures de microorganismes réalisant la réduction du soufre ou du sulfate
- des échantillons de fluides hydrothermaux issus de la plongée 1747 et 1772 sur le site Rebecca's Roost : poche Pepito de la plongée 1747 (1747 Pep1FA et Pep3FA) et bouteille Titane de la plongée 1772 (1772 TiD2A)
- des échantillons d'eaux interstitielles provenant de sédiments de la Dépression Sud (site Mat mound PI 1764-CT3 section S4 ; site M27 PI 1767-CT12 sections S2, S4, S6 et S10 et PI 1766-CT2 section S2) et de la Marge de Sonora (PI 1755- CT4, échantillons S2, S7, S8 et S13)

Le système permettant l'analyse des isotopes multiples du soufre ( $^{32}S$ ,  $^{33}S$ ,  $^{34}S$  and  $^{36}S$ ) a été initialement mis au point par S. Ono et ses collaborateurs au laboratoire de Géophysique du Carnegie Institution à Washington puis a été développé et modifié dans le laboratoire de S. Ono dans le département EAPS du MIT (Department of Earth, Atmospheric, and Planetary Sciences au Massachusetts Institute of Technology).

Le système utilisé est composé de trois principales parties : des chambres de fluorination (ici au nombre de 9), d'un système de purification par chromatographie en phase gazeuse et d'un spectromètre de masse GC-MS (Finnigan MAT 253) (Figure II-29).

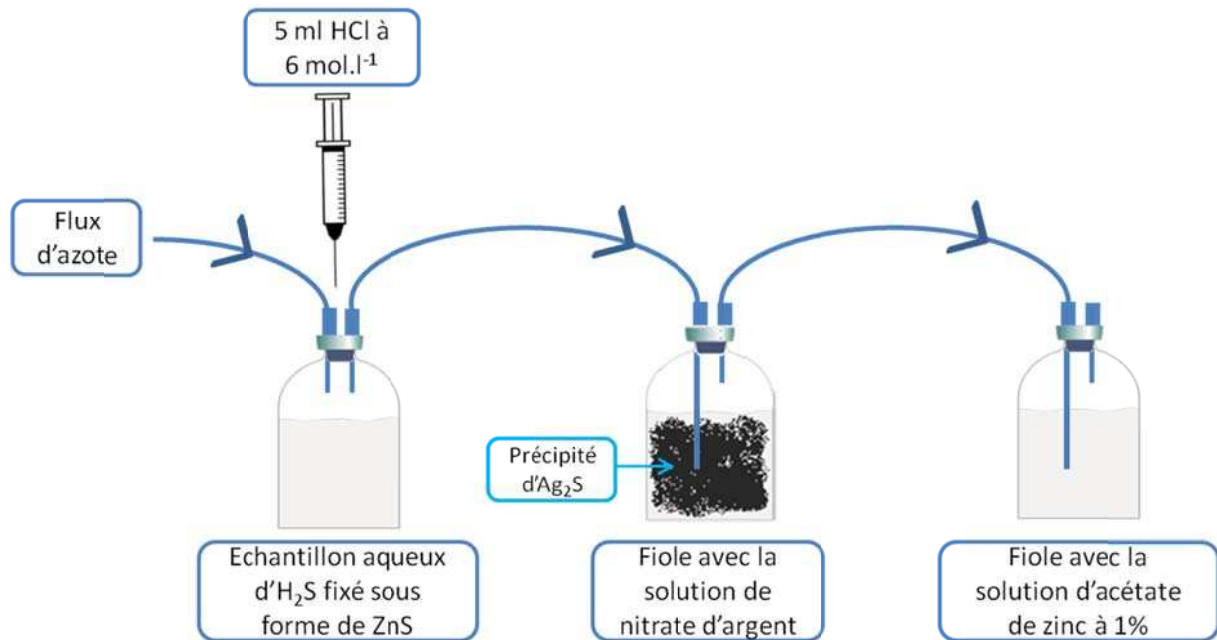


**Figure II-29** : Photographie du système utilisé pour les analyses des isotopes multiples du soufre (Photographie Ono, MIT : <http://eaps.mit.edu/ono/>): (a) les 9 chambres de fluorination, (b) la ligne de purification par la chromatographie en phase gazeuse et (c) le spectromètre de masse GC-MS (Finnigan MAT 253).

Ce système est proche de celui décrit, dans l'article de Ono et collaborateurs en 2006, intitulé «High precision analysis of all four stable isotopes of sulfur ( $^{32}\text{S}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  and  $^{36}\text{S}$ ) at nanomole levels using a laser fluorination isotope-ratio-monitoring gas chromatography–mass spectrometry » (Ono et al. 2006).

**Préparation des échantillons** : les échantillons aqueux d' $\text{H}_2\text{S}$  préalablement fixés sous la forme d'un précipité blanchâtre de  $\text{ZnS}$  ont été convertis sous forme d'un précipité de sulfure d'argent :  $\text{Ag}_2\text{S}$ . Pour cela, un montage en série, sous flux continu d'azote, a été utilisé. Il était constitué par une fiole contenant la solution aqueuse avec le précipité de  $\text{ZnS}$ , une fiole pénicilline (25 ml de contenance), contenant 15 ml d'une solution de nitrate d'argent à 0,04 M dans laquelle bulle l'azote et une dernière fiole pénicilline (25 ml de contenance) contenant 15 ml d'une solution d'acétate de zinc à 0,03 M également bullée à l'azote (Figure II-30). Après un dégazage de 5 min, la première fiole contenant la solution avec le précipité de  $\text{ZnS}$  a été acidifiée avec 5 ml d'acide chlorhydrique 6N (préparé à partir d'acide chlorhydrique concentré de qualité biologie moléculaire), libérant ainsi l' $\text{H}_2\text{S}$  sous forme gazeuse. L' $\text{H}_2\text{S}$  gazeux, grâce au flux continu d'azote et au bullage dans la seconde fiole contenant la solution de nitrate d'argent, va réagir avec le nitrate d'argent pour de nouveau précipiter, cette fois sous la forme d'un précipité brun noir de sulfure d'argent  $\text{Ag}_2\text{S}$  (selon la réaction  $\text{S}^{2-}_{(\text{gaz})} + 2\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}_2\text{S}$ ). La dernière fiole contenant la solution d'acétate de zinc permet,

quant à elle, de précipiter l'excédant d' $\text{H}_2\text{S}$  sous forme de  $\text{ZnS}$ , si éventuellement celui-ci n'a pas été entièrement piégé par le nitrate d'argent. Quand la totalité de l' $\text{H}_2\text{S}$  gazeux a été générée et piégée sous forme de sulfure d'argent, les précipités sont collectés en tube Falcon, rincés plusieurs fois à l'eau Milli-Q (5 fois en moyenne) puis mis à sécher à  $60^\circ\text{C}$ .



**Figure II-30** : Représentation schématique de la méthode utilisée pour convertir les précipités de  $\text{ZnS}$  en  $\text{Ag}_2\text{S}$ .

**Analyse des échantillons** : la poudre d' $\text{Ag}_2\text{S}$  a été pesée puis placée dans une petite nacelle en aluminium. Le tout a ensuite été introduit dans une chambre de fluorination. Les chambres étant au nombre de neuf, une série d'analyses (purification et mesure des rapports isotopiques) permettait de traiter au maximum 8 échantillons et un standard de composition isotopique connue (IAEA S-2). Une fois les échantillons placés dans les chambres, le vide a tout d'abord été appliqué délicatement et doucement dans chaque chambre, puis un vide plus important a été imposé à l'ensemble des chambres. Lorsque le vide était suffisant, les chambres ont été fermées puis refroidies à l'azote liquide. Ensuite, la fluorine (gaz) a été introduite chambre par chambre. Quand suffisamment de gaz (65 mbar environ) a été introduit par chambre, celles-ci sont chauffées à haute température pendant une nuit pour que la réaction de fluorination se réalise totalement et produise de l'hexafluorure de soufre  $\text{SF}_6$  ( $\text{S}_{(\text{solide})} + 3\text{F}_{2(\text{gaz})} \rightarrow \text{SF}_{6(\text{gaz})}$ ).

Les échantillons ont ensuite été purifiés par chromatographie en phase gazeuse puis introduit dans un piège refroidi à l'azote liquide et stockés à l'intérieur jusqu'à analyse.

Selon la masse de l'échantillon et donc la quantité d'hexafluorure de soufre produit et à analyser, deux techniques d'analyses existent :

- **Technique du multiport** : cette méthode a été utilisée pour analyser des échantillons (et standard) pesant entre 1,5 et 3 mg, ayant généré une quantité de gaz importante. Les analyses isotopiques ont été réalisées en mode automatique sur spectromètre de gaz et six répliques par analyses isotopiques ont été effectués par échantillons.

- **Technique des micro-volumes** : cette méthode a été utilisée pour analyser des échantillons et standards pesant entre 0,2 et 0,5 mg ayant produit peu de SF<sub>6</sub>. Dans ce cas, les échantillons ont été analysés manuellement sur le spectromètre de masse, après cryo-concentration dans une boucle d'injection (refroidie à l'azote liquide) et introduction de deux gaz de référence (dont l'un des deux, le volume introduit est ajusté en fonction de l'échantillon). Une moyenne de six répliques a également été analysée et généralement, les deux premières mesures ont été éliminées des calculs de rapport isotopique car le rapport échantillon – gaz de référence n'était pas adéquat.

Le fractionnement isotopique du soufre mesuré ici, correspond au rapport du <sup>3x</sup>S/<sup>32</sup>S de l'échantillon sur le rapport du <sup>3x</sup>S/<sup>32</sup>S du standard (VCTD), où x correspond au <sup>34</sup>S, <sup>33</sup>S ou au <sup>36</sup>S, et correspond à l'équation suivante :

$$\delta^{3xS} = \left( \frac{[^{3xS}/^{32S}]_{\text{de l'échantillon}}}{^{3xS}/^{32S}_{\text{VCTD}}} - 1 \right) \times 1000$$

### 3.3.2. Isotopie du Fer

*Les analyses isotopiques du fer ont été réalisées au Pôle Spectrométrie Océan (Ifremer) avec Olivier Rouxel et Emmanuel Ponzeverra en utilisant le Neptune (MC-ICP-MS) suivant la méthode décrite dans plusieurs manuscrits (Rouxel et al. 2005; Rouxel et al. 2008; Rouxel et al. 2008; Rouxel and Auro 2010).*

Plusieurs types d'échantillons ont été analysés pour en déterminer leur signature isotopique en fer particulaire et en fer dissous<sup>9</sup>:

- des échantillons filtrés et non filtrés issus de cultures de micro-organismes : souches pures ou de communautés
- des échantillons de fluides hydrothermaux : échantillons Pepito filtrés et non filtrés ainsi que les échantillons des bouteilles Titane non filtrés

<sup>9</sup> Le fer total des échantillons non filtrés est composé en très grande majorité de Fe (III), c'est pourquoi, dans ce cas, le fer total correspond au Fe (III) et le fer dissous au fer ferreux ou Fe (II) car d'après les résultats obtenus par la méthode de la Ferrozine, tout le fer dissous est du Fe (II)

Pour la préparation des échantillons en salle blanche (classe 1000) et séparation chromatographique, tous les acides (acide chlorhydrique et nitrique), ont été préparés à partir d'une solution stock concentrée distillée une fois.

Dans le but d'oxyder et de dissoudre totalement le Fer présent, les échantillons ont été acidifiés dans de l'acide chlorhydrique 10,4 mol/L (1 volume d'échantillon pour 1 volume d'acide chlorhydrique), puis une goutte de peroxyde d'hydrogène à 30% a été ajoutée. Dans le cas des échantillons non filtrés issus des cultures d'enrichissement ou de souches pures, ces échantillons ont été dilués au quart avec de l'eau Milli-Q, avant d'être acidifiés à l'acide chlorhydrique et oxydés au peroxyde d'hydrogène. Cette réaction s'est déroulée pendant une nuit à température ambiante.

Les échantillons ont ensuite été purifiés par passage sur une colonne de chromatographie contenant une résine anionique (1mL de résine AG1-8X Biorad), dans le but de séparer le fer de la matrice. Cette étape se fait après conditionnement de la résine qui consiste au passage successif de différentes solutions (10 mL HNO<sub>3</sub> 3 mol/L – 10mL H<sub>2</sub>O – 4mL HCl 6 mol/L), après élution complète de la précédente. Après cette étape, l'échantillon (4ml d'échantillon dans une solution finale d'HCl à 6 mol/L) a été chargé sur la colonne. Après élution complète de l'échantillon, le reste de la matrice a été élué par trois passages successifs de 5 ml d'acide chlorhydrique 6 mol/L. Ensuite, afin de détacher le fer adsorbé sur la résine, différentes solutions d'acide chlorhydrique de concentration décroissante, ont été successivement passées sur la colonne. Les passages suivant d'acide chlorhydrique à 0,24 mol/L (2 passages de 2,5 ml suivi d'un passage de 5 ml) ont permis l'élution de la fraction contenant le fer, qui a été collectée dans un bécher en Téflon. Les échantillons ont ensuite été mis à évaporer durant une nuit à 95-100°C sur une plaque chauffante. Après évaporation complète de la solution, les échantillons ont été repris dans 2,5 ml d'acide nitrique à 0,24 mol/L, puis conditionnés dans des tubes à ICP-MS et conservés à température ambiante jusqu'à leur analyse.

Classiquement, une série de passages sur colonne permet de purifier 24 échantillons en même temps. Habituellement, cette série se compose de 20 échantillons, d'un blanc (eau Milli-Q) et de 3 standards : une eau de mer GDI 87 Geotracés enrichie en fer SRM 3126a (4 µg) (standard de fer de composition isotopique connue) et une eau Milli-Q enrichie également en fer SRM 3126a (4 µg). Cette étape de passages sur colonne permet de purifier les échantillons afin de séparer complètement les interférences sur le fer (ex : <sup>54</sup>Cr sur le <sup>54</sup>Fe) et la matrice des échantillons tels que les cations majeurs pouvant impacter sur le rapport isotopique du Fer lors de l'analyse.

Avant leurs analyses isotopiques sur le MC-ICP-MS (Neptune, ThermoScientific du Pôle Spectrométrie Océan de Brest), les échantillons ont été dilués dans de l'acide nitrique à 0,24 mol/L afin d'obtenir, pour chaque analyte, une concentration finale en Fer de 200 ppb. Le standard choisi, l'IRMM-014, est une solution de référence dont la composition isotopique a été certifiée, a



également été diluée dans de l'acide nitrique à 0,24 mol/L afin d'obtenir une solution finale à 100 ppb.

Dans le but de corriger le biais instrumental du MC-ICP-MS (dérive instrumental au cours de la série d'analyse), du Nickel (solution de Nickel SRM 986 dont la composition isotopique est certifiée) a été ajouté, à une concentration finale de 200 ppb, dans chaque échantillon blanc et standard isotopique IRMM-014. Les mesures isotopiques ont été effectuées avec le Neptune en mode moyenne résolution de masse afin de séparer les interférences isobariques à base d'Argon (ex  $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}$  sur  $^{54}\text{Fe}$ ,  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$  sur  $^{56}\text{Fe}$  et  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{OH}$  sur  $^{57}\text{Fe}$ ).

Le fractionnement isotopique du fer correspond au rapport du  $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$  de l'échantillon sur le rapport du  $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$  du standard (IRMM-014), ceci correspond à l'équation suivante :

$$\delta^{56}\text{Fe} = \left( \frac{^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}_{\text{de l'échantillon}}}{^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}_{\text{IRMM-014}}} - 1 \right) \times 1000$$

### 3.4. Analyses minéralogiques et géochimiques des échantillons solides

#### 3.4.1. Préparations des échantillons

Les échantillons de cheminée hydrothermale et de sédiments avant et après mise en culture en bioréacteur ont été préparés pour des analyses géochimiques : minéralogie et composition multi-élémentaire. Les échantillons étudiés, hormis le flange hydrothermal, n'ont pas été conditionnés comme il est d'usage de le faire en minéralogie (séchage à l'air et conservation à température ambiante), et ce, afin que les fractions utilisées pour la minéralogie soit dans les mêmes conditions (composition minérale et élémentaire proches) que les inocula avant ensemencements. En effet, il a été démontré que le mode de conditionnement et de conservation des échantillons modifiait leur composition minérale et ce encore plus quand l'échantillon a été conditionné pour les cultures (à 4°C dans une eau de mer artificielle en anaérobiose) (Le Roy 2008).

Pour cela, ont été utilisés :

- un broyat de flange hydrothermale brut conservé directement à -80°C
- un broyat de flange hydrothermale conservé pour la culture dans une solution de NaCl à 23g.L<sup>-1</sup> à 4°C
- une fraction de l'échantillon « culture » du sédiment PI1766-22 CT2 S4 conservée à 4°C
- la fraction solide collectée à la fin de la fermentation réalisée à bord (fragment de la flange hydrothermale après culture), directement congelée à -80°C avant analyse

- la fraction solide sédimentée en fond de cuve, collectée à la fin de la fermentation ciblant la ferri-réduction inoculée avec le broyat de la flange hydrothermale (après culture), directement congelée à -80°C avant analyse
- la fraction solide sédimentée en fond de cuve, collectée à la fin de la fermentation ciblant la ferri-réduction inoculée avec le sédiment PI1766-22 CT2 S4 (après culture), directement congelée à -80°C avant analyse
- la fraction collectée à mi-hauteur de la cuve du bioréacteur, à la fin de la fermentation ciblant la ferri-réduction inoculée avec le broyat de la flange hydrothermale (après culture), directement congelée à -80°C avant analyse
- la fraction collectée à mi-hauteur de la cuve du bioréacteur, à la fin de la fermentation ciblant la ferri-réduction inoculée avec le sédiment PI1766-22 CT2 S4 (après culture), directement congelée à -80°C avant analyse

La préparation des échantillons a consisté à les rincer plusieurs fois à l'eau Milli-Q (3 à 4 rinçages) puis à les faire sécher à 60°C dans une étuve. Une fois secs, ils ont été broyés en une fine et homogène poudre dans un mortier en agate puis conservés à température ambiante dans des tubes hermétiques afin qu'ils n'adsorbent pas d'humidité.

### **3.4.2. Diffraction X (XRD)**

*Les analyses de diffraction aux rayons X ont été effectuées au laboratoire de Géochimie et de Métallogénie (Ifremer) par Sandrine Chéron.*

La diffraction X ou XRD permet de déterminer la composition minérale d'un échantillon cristallisé, par émission d'un rayon X sur celui-ci avec un certain angle d'incidence (cette technique ne permet pas l'analyse de structures amorphes). A cette fin, l'échantillon réduit en poudre a été déposé, soit en excès, quand cela est possible, sur un porte échantillon (support en plastique), soit, lorsque la quantité d'échantillon était réduite, sur une lame de silice amorphe. Puis, avec une lame de verre fortement appliquée sur le support ou la lame, la surface de l'échantillon a été aplanie et l'excès de poudre éliminé. Une fois l'échantillon prêt, il a été placé dans le diffractomètre puis bombardé de rayon X.

Arrivant sur l'échantillon, les rayons X incidents de longueur d'onde connue, vont être diffractés selon un angle caractéristique de la conformation spatiale du cristal, de la nature et de l'arrangement électronique de ses atomes (maillage du cristal qui dépend de la position et de la nature des atomes). L'intensité des rayons X réémis dans un certain angle est ensuite enregistrée par un détecteur, qui convertit ces signaux en pics donnant un diffractogramme. Grâce au logiciel EVA,

les profils générés par XRD ont ensuite été comparés à une banque de pics de minéraux connus et référencés. Ainsi, les pics obtenus vont être traités (selon leurs positions sur le diffractogramme) puis identifiés à des phases minérales. Le logiciel Topaz a, quant à lui, permis de déterminer l'abondance relative (pourcentage) de chaque minéral au sein d'un échantillon analysé.

### **3.4.3. Fluorescence X (XRF)**

*Des analyses de fluorescences X ont été effectuées au laboratoire de Géochimie et de Métallogénie (Ifremer) Joel Etoubleau (XRF).*

La fluorescence X ou XRF permet de déterminer qualitativement et quantitativement, la composition chimique élémentaire d'un minéral. La méthode utilisée ici pour analyser les échantillons est la WD-XRF (wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry) ou analyse dispersive en longueur d'onde. Cette méthode a été réalisée sur une perle d'échantillon. Une perle correspond à la conversion, à haute température, d'environ 200 mg de poudre minérale. Cette méthode repose sur le bombardement de rayons X de longueur d'onde connue sur l'échantillon qui va en retour émettre des rayonnements X (fluorescence X ou photon X) propres à chaque atome créant un spectre de rayons X réémis spécifique de la composition élémentaire de l'échantillon.

Cette méthode repose sur l'enregistrement des photons X, d'une longueur d'onde sélectionnée, émis lors du retour de l'atome à son état fondamental (désexcitation de l'atome). En effet, lors du bombardement de l'échantillon par des rayons X, les atomes constitutifs de celui-ci, vont être ionisés et un ou des électrons situé(s) sur l'orbitale atomique interne (couche électronique la plus proche du noyau, couche de plus faible énergie), sera(ont) expulsé(s), créant un (des) vide(s) sur l'orbitale. Afin que l'atome retourne à son état fondamental (stable), le vide laissé par l'électron éjecté devra être comblé. Ainsi, un électron d'une couche électronique supérieure (externe) de plus forte énergie va venir le remplacer et perdre son excédant d'énergie sous la forme d'un photon, qui sera mesuré. L'énergie émise des photons émis sera ensuite convertie en intensité électrique (intensité proportionnelle à l'énergie du photon) sous la forme d'un chromatogramme. Ces chromatogrammes sont calibrés grâce à l'utilisation de standards de références d'éléments purs ou composites (mélange de deux ou plusieurs éléments) reflétant la nature des perles analysées.

### **III. Sites hydrothermaux de la Dépression Sud du Bassin de Guaymas : Description minéralogique des édifices et géochimie des fluides**

---

Préambule

1. Description du site hydrothermal Rebecca's Roust et échantillonnage
2. Composition minéralogique des échantillons d'édifices hydrothermaux
3. Géochimie des fluides
4. Etude préliminaire des sédiments hydrothermaux
5. Conclusion

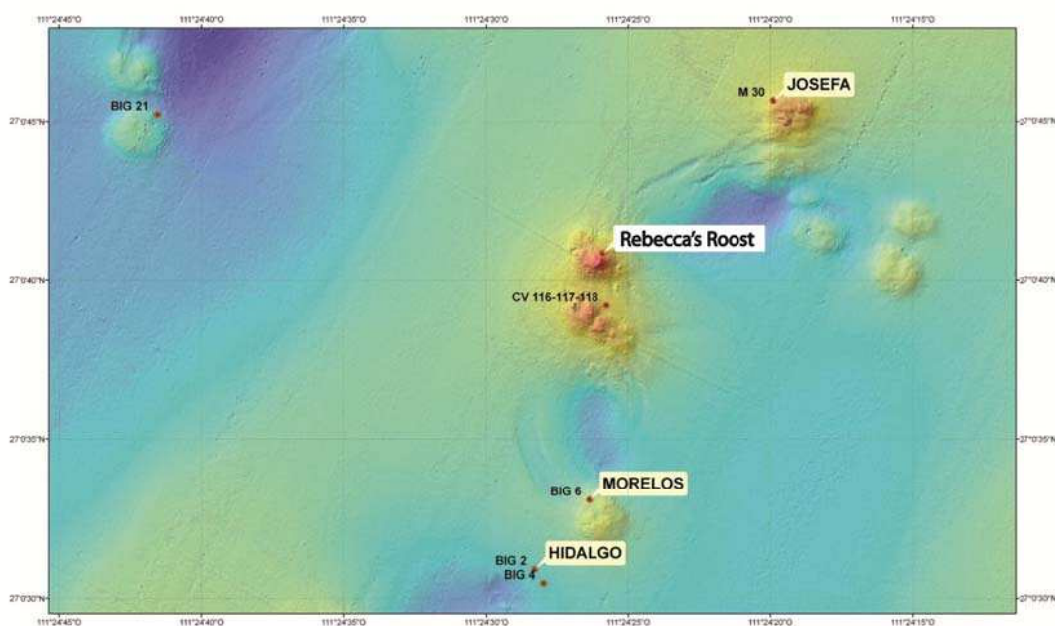


## Préambule

Le plancher océanique de la Dépression Sud du Bassin de Guaymas est soumis à des phénomènes hydrothermaux qui se visualisent en surface par la présence d'édifices hydrothermaux et de des tapis microbiens blancs et/ou oranges, plus ou moins dense et épais selon les sites d'où parfois, un fluide chaud percole. La couche sédimentaire recouvrant le Bassin de Guaymas étant très épaisse (jusqu'à 500 m) et riche en matière organique (2 à 4% carbone), les fluides hydrothermaux interagissent avec ces sédiments au cours de leurs ascensions, conduisant à des réactions biogéochimiques distinctes de la plupart des systèmes hydrothermaux en contexte océanique.

### 1. Description du site hydrothermal Rebecca's Roost et échantillonnage

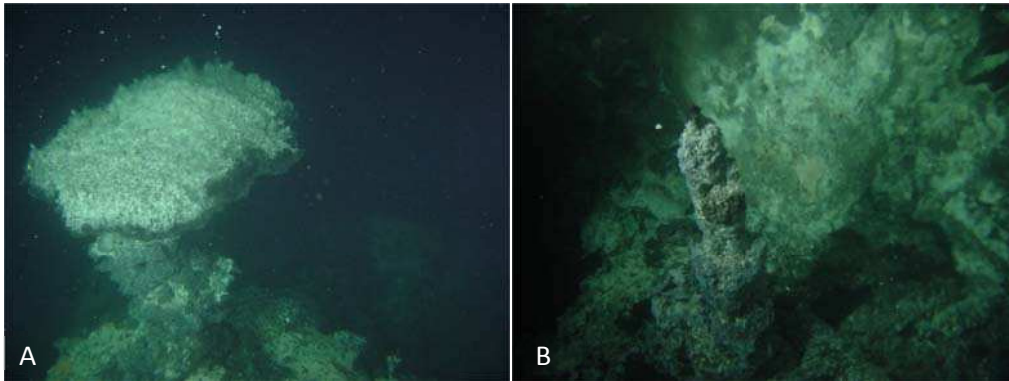
Le site hydrothermal de Rebecca's Roost (Figure III-1) est une zone hydrothermale composé de trois principaux édifices hydrothermaux actifs.



**Figure III-1** : Carte bathymétrique localisant les sites hydrothermaux dont Rebecca's Roost, situés au nord de la Dépression Sud (Données AUV, Ondreas, H., Normand, A. ; carte réalisée par P. Briand).

Ces édifices principaux, en forme de « pagode » (Peter and Scott 1988) haut d'une dizaine de mètres (environ 13 m pour le site échantillonné), se terminent par une flange (Figure III-2a) épaisse d'une dizaine de centimètre et qui grandit latéralement. Contrairement aux cheminées de type « fumeur noir », le fluide n'est pas émis par un orifice central mais traverse la structure poreuse du

flange *via* des trous et des canaux interconnectés. Au pied de ces structures principales, des cheminées plus petites (quelques mètres de hauteur), de types fumeurs « classiques » émettent, *via* un orifice central, un fluide hydrothermal chaud (Figure III-2b).

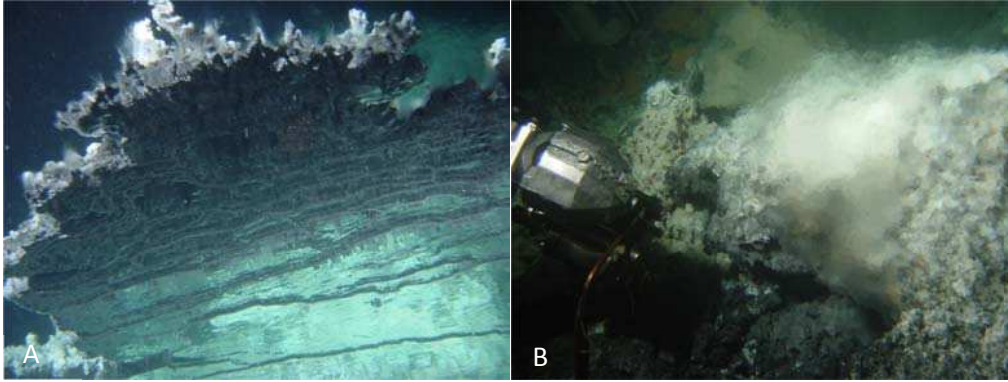


**Figure III-2 :** *Cheminées hydrothermales du site Rebecca's Roost : A) un des principaux édifices en forme de pagode ; B) une des petites cheminées localisée au pied des structures principales (image Nautilie, campagne BIG (plongées 1745 et 1772).*

Ce complexe hydrothermal : édifice principaux et petites cheminées, s'est développée sur des surplombs ou monts sédimentaires hydrothermaux (entre 5 et 25 m de haut (Peter and Scott 1988)) et est enraciné sous une épaisse couche de sédiments (environ 40 m) (Ondreas et al. 2011).

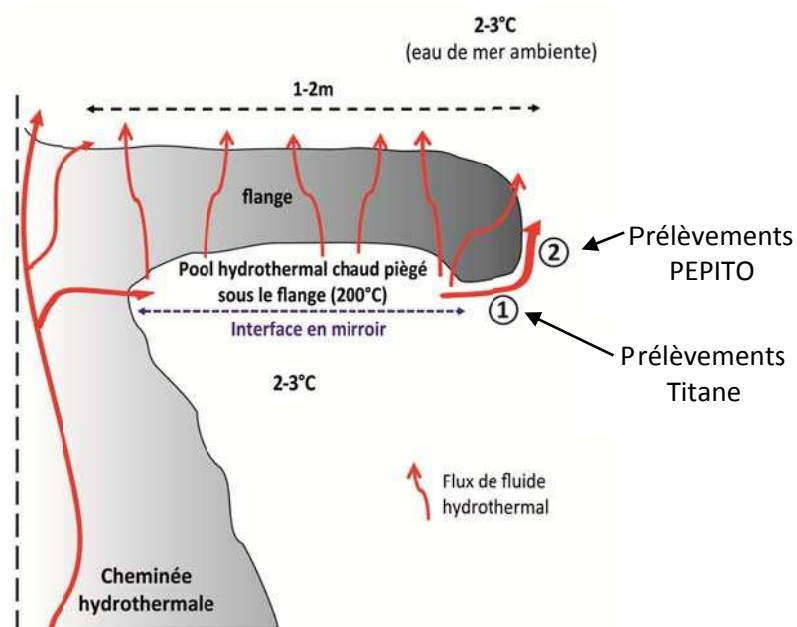
### 1.1. Structure hydrothermal de type « flange »

La surface de la « pagode » de l'édifice principal échantillonné au sommet de l'édifice est colonisée par des tapis microbiens blancs et oranges et par des assemblages de polychètes, de type *Polynoidae* et *Alvinelidae*. Au sommet de l'édifice, une partie du fluide hydrothermal émis (environ 200°C) est piégé sous la flange, où il va interagir avec l'eau de mer ambiante froide (2-3°C) pour former une interface en miroir fluide-eau de mer (Figures III-3a et III-4) ; l'autre percole au niveau du sommet de l'édifice (Figure III-3). Une partie du fluide piégée sous la flange, va traverser les couches poreuses du flange pour percoler à sa surface. Au cours de son trajet dans la flange, le fluide va réagir et précipiter, selon le gradient de température et de mélange avec l'eau de mer. Une autre partie du fluide piégé va sortir de sous la flange en longeant et en remontant le bord extérieur de l'édifice et diffuser dans l'eau de mer (Figures III-3a et III-4). La partie supérieure du flange, en contact avec l'eau de mer riche en silice et en sulfate, est colonisé par la macrofaune.



**Figure III-3 :** Flange hydrothermal échantillonnée lors de la plongée 1747 : A) effet miroir sous la flange ; B) fluide piégé sous la flange qui sort en longeant et en remontant le bord extérieur de la flange (image Nautilie, campagne BIG (plongées 1745 et 1747).

Le fluide échantillonné avec les bouteilles Titane lors de la plongée 1747 est celui qui sort directement de sous la flange et qui diffuse dans l'eau de mer (échantillons 1747 TiD2 et 1747 TiG2) (1 sur la Figure III-4). Les prélèvements PEPITO ont permis la collecte de fluide à une température d'environ 100°C (minimum à 60°C et maximum à 190,1 pendant le prélèvement), dans la zone de mélange entre le fluide hydrothermal qui sort de sous la flange et l'eau de mer (2 sur la Figure III-4). Un grand fragment de flange (échantillon 1747-BIG03E01) a été prélevé entre les deux prélèvements de fluide par bouteille Titane, juste après la collecte des poches PEPITO.

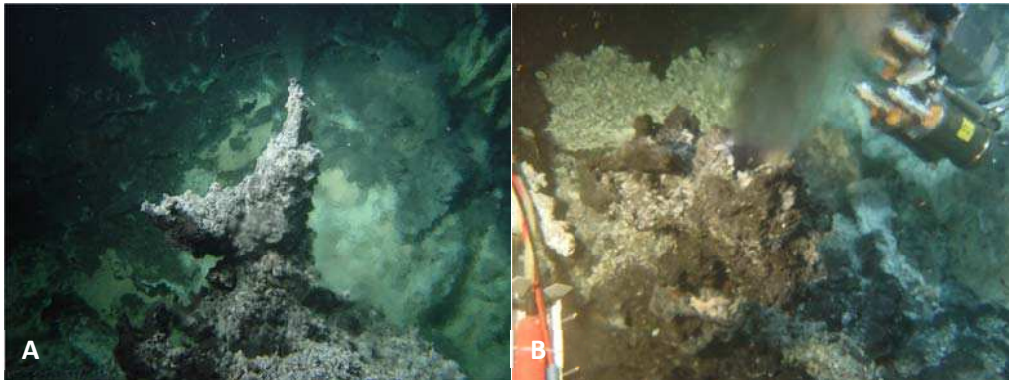


**Figure III-4 :** Localisation des échantillons prélevés par les bouteilles Titanes (1 sur le schéma) et par le système de collecte de fluide PEPITO (2 sur le schéma), au niveau du flange hydrothermal, lors de la plongée 1747 (image Nautilie, campagne BIG (plongée 1772). Ce schéma n'est pas à l'échelle.



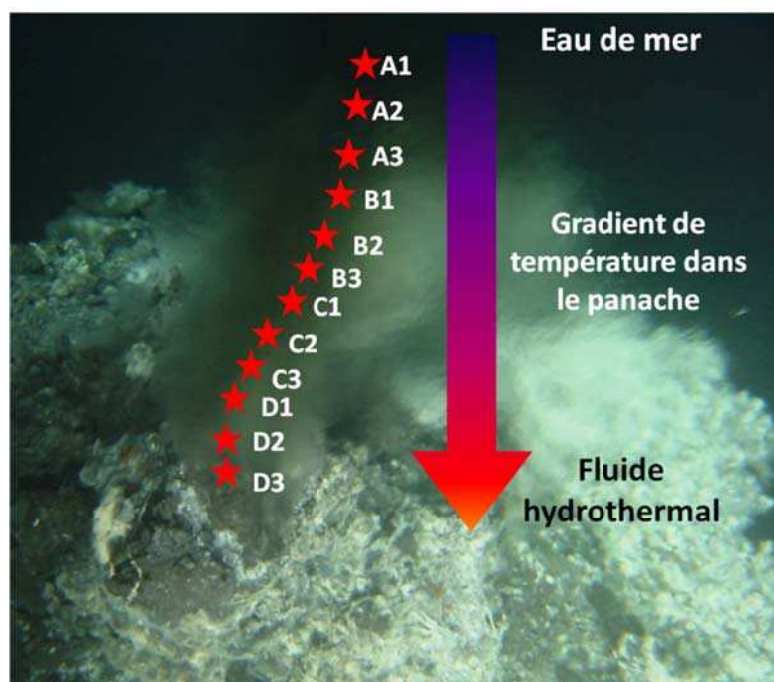
## 1.2. Structure hydrothermale de type cheminée

Une des petites cheminées présentant un orifice de sortie du fluide hydrothermal et édifée au pied de la structure principale a été choisie pour étudier la zone de mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer. L'orifice de sortie du fluide présentait un faible diamètre (ceci a déjà été observé précédemment pour les cheminées du Bassin de Guaymas (Bowers et al. 1985; Von Damm et al. 1985; Peter and Scott 1988)). Ainsi, afin de faciliter le prélèvement du fluide proche de la sortie de l'édifice, la partie supérieure de la cheminée a été cassée et échantillonnée pour les analyses. L'orifice de sortie plus large ainsi obtenu (Figure III-5), a permis de placer la canule de prélèvements des bouteilles Titanes quasiment à l'intérieur de la cheminée.



**Figure III-5 :** Cheminée hydrothermale échantillonnée lors de la plongée 1772 : A) avant qu'elle soit cassée pour faciliter l'échantillonnage ; B) après que la partie supérieure ait été cassée (image Nautilie, campagne BIG (plongée 1772).

Du fluide hydrothermal a donc été prélevé directement à sa sortie de l'orifice, avec les bouteilles Titanes. Ensuite, 12 prélèvements ont été réalisés avec le système PEPITO dans le gradient de mélange, en allant de la zone la plus diluée à la zone la moins diluée la température mesurée lors du prélèvement ayant servi d'indicateur de mélange et donc de contribution hydrothermale (Sarradin et al. 1998; Mullineaux et al. 2003; Le Bris et al. 2006) (Figure III-6 et Tableau III-1).



**Figure III-6** : Localisation des échantillons prélevés par le système de collecte de fluide PEPITO, dans le gradient de mélange fluide hydrothermal-eau de mer, (image Nautile, campagne BIG, plongée 1772).

**Tableau III-1** : Tableau associant l'échantillon à sa température

Echantillon	Température du fluide °C
1772 A1	2,8
1772 A2	15
1772 A3	30
1772 B1	45
1772 B2	49
1772 B3	73
1772 C1	65
1772 C2	83
1772 C3	100
1772 D1	115
1772 D2	121
1772 D3	133

## 2. Composition minéralogique des échantillons d'édifices hydrothermaux

La flange hydrothermale (échantillon 1747-BIG03E01) est essentiellement composée de calcite associée à des grains de sulfures : pyrrhotite, sphalérite et à des traces de minéraux sulfatés tel que l'anhydrite. L'analyse minéralogique par diffraction X (XRD) indique également que la flange contient de la barytine, en moindre quantité de la nontronite (potentiellement associée à de la silice amorphe), de la pyrrhotite et de faible proportion de sphalérite, galène, ferrihydrite et aragonite (Tableau III-2). La minéralogie du flange est similaire à la description réalisée par Lonsdale et collaborateur en 1980 et Peter et Scott en 1988 (Lonsdale et al. 1980; Peter and Scott 1988).

La composition minéralogique de la partie supérieure de la petite cheminée est différente de celle du flange (pour comparaison le Tableau III-2). Elle est principalement constituée d'anhydrite, de calcite et de pyrrhotite. De la barytine et de la sphalérite ont également été détecté ainsi que de la galène, de la pyrite et de la dolomite à l'état de trace.

**Tableau III-2 :** Tableau comparant les abondances relative de chaque phase minérale entre l'échantillon de flange hydrothermale (PI 1747) et de cheminée hydrothermale (PI 1772)

Minéral	Formule	Flange (échantillon PI 1747)	Cheminée (échantillon PI 1772)
Anhydrite	CaSO <sub>4</sub>	+	++
Calcite	CaCO <sub>3</sub>	+++	++
Barytine	BaSO <sub>4</sub>	++	+
Pyrrhotite	Fe <sub>(1-x)</sub> S	++	++
Sphalérite	ZnS	+	+
Galène	PbS	+	+
Ferrihydrite	(Fe <sup>3+</sup> ) <sub>2</sub> O <sub>3-0.5</sub> H <sub>2</sub> O	+	ND
Nontronite	(CaO <sub>0.5</sub> ·Na) <sub>0.3</sub> Fe <sup>3+</sup> <sub>2</sub> (Si·Al) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> ·nH <sub>2</sub> O	++	ND
Aragonite	CaCO <sub>3</sub>	+	ND
Pyrite	FeS <sub>2</sub>	ND	+
Dolomite	CaMg(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	ND	+

+++ très abondant (>50%) ; ++ abondant (5-49%) ; + mineur (<5%) ou à l'état de trace et ND non détecté

### 3. Géochimie des fluides

#### 3.1. Détermination des « End-Members » des fluides hydrothermaux

L'« end-member » correspond, en théorie, à la composition du fluide pur qui n'a pas subi de mélange avec l'eau de mer soit lors de l'échantillonnage soit dans la cheminée. Pour déterminer les end-members des différents éléments contenus dans le fluide, le magnésium est utilisé. En effet il a été déterminé qu'un fluide hydrothermal pur n'en contient pas ( $Mg = 0$ ) et que le magnésium présent dans le fluide provient de l'eau de mer ambiante (Bischoff and Dickson 1975; Von Damm 1990).

Ainsi, pour déterminer la composition end-member de chaque élément, une droite de régression entre la concentration de l'élément à déterminer et la concentration en Mg a été construite, pour chaque site et chaque plongée sur un même site car il a été démontré que la composition du fluide peut varier au cours du temps (Von Damm 2000; German and Von Damm 2006). L'end-member de l'élément est ensuite extrapolé en considérant que la concentration en Mg dans le fluide pur est égale à zéro (Von Damm 2000). Ainsi, pour le calcul des end-members du fluide collecté lors de la plongée 1772, les échantillons « chaud », pour lesquels la contribution hydrothermale est la plus importante (la température étant fréquemment utilisée comme indicateur de la contribution de fluides hydrothermaux (Le Bris et al. 2006)), ont été utilisés pour réaliser les droites de régression. Il s'agit des échantillons collectés avec les bouteilles Titanes et avec le système de prélèvement PEPITO (poches C3, D1, D2 et D3). Cette méthode est valable pour tous les éléments à l'exception du sodium du pH, de l'alcalinité et de l' $H_2S$ . Les concentrations en sodium mesurées sont fréquemment différentes de celles calculées (qui correspondent à la différence entre la somme des anions et des cations). Les courbes de pH et d'alcalinité en fonction du manganèse ne sont pas linéaires (courbe ayant l'allure d'une courbe de titration). L' $H_2S$  dissous dégaze avant le conditionnement des échantillons (Von Damm 2000) lors de la remontée dans des bouteilles non pressurisées. Ainsi la courbe  $H_2S$  en fonction du Mg, présente un plateau pour les faibles concentrations en Mg (proches du fluide pur), l'end-member peut donc être extrapolé à partir des valeurs obtenues dans la partie linéaire de la courbe ( $H_2S$  en fonction de Mg (Von Damm 2000)). Ainsi, pour les fluides collectés lors de la plongée 1772, seuls les échantillons les plus chauds collectés avec le système de prélèvement PEPITO (poches C3, D1, D2 et D3) ont été utilisés pour déterminer l'end-member de l' $H_2S$ .

Pour les fluides collectés au niveau du flange, lors de la plongée 1747 (Titane et PEPITO), la détermination des end-members n'a pu être réalisée car ce fluide prélevé sous la flange est déjà fortement dilué par l'eau de mer ambiante. En effet les concentrations en Mg ainsi que les rapports  $Mg/SO_4^{2-}$  sont proches de ceux de l'eau de mer. Dans ce cas, seules les concentrations multi-

élémentaires mesurées (et non pas celle des end-members) sont indiquées dans le Tableau III-4. L'analyse des acides organiques effectuée à partir des échantillons des poches PEPITO montrent la présence dans le fluide hydrothermal dilué d'acétate à une concentration comprise entre 3 et 5,3  $\mu\text{M}$  et de formate à une concentration comprise entre 16,9 et 19,5  $\mu\text{M}$  (Tableau III-4).

**Tableau III-4 :** Concentration en acides organiques, en sulfates et en éléments majeurs et traces dans l'eau de mer, dans les fluides hydrothermaux de la plongée 1747 collectés avec des bouteilles Titans et le système de prélèvement PEPITO

nd : non déterminé ; sd : sous la limite de détection

	Eau de mer	Fluide hydrothermal (PI1747-Titane TiD)	Fluide hydrothermal (PI1747-Titane TiG)	Pepito poche 1 (PI 1747 Pep1)	Pepito poche 2 (PI 1747 Pep2)	Pepito poche 3 (PI 1747 Pep3)
<b>Acétate <math>\mu\text{M}</math></b>	nd	nd	nd	3,8	5,2	5,3
<b>Formate <math>\mu\text{M}</math></b>	nd	nd	nd	16,9	18,5	19,5
<b>Lactate <math>\mu\text{M}</math></b>	nd	nd	nd	0	0	0
<b>Propionate <math>\mu\text{M}</math></b>	nd	nd	nd	0	0	0
<b>Sulfate mM</b>	34,9	nd	nd	20	19,9	20,1
<b>H<sub>2</sub>S mM</b>	sd	sd	sd	3,6	3,4	2,2
<b>Na mM</b>	477	496	478	448,8	447,0	446,3
<b>Ca mM</b>	10	17	14,5	15,8	15,5	15,7
<b>Ba <math>\mu\text{M}</math></b>	0,04	1,9	1,9	8,7	14,4	16,9
<b>Mg mM</b>	54,4	33,3	39,4	33,8	34,5	34,9
<b>Sr <math>\mu\text{M}</math></b>	0,1	0,1	0,1	121,5	122,2	122,0
<b>Fe <math>\mu\text{M}</math></b>	<0,1	6,5	13,9	2,7	2,7	2,6
<b>Mn <math>\mu\text{M}</math></b>	<0,1	49,8	32,8	45,3	42,0	41,2
<b>K mM</b>	10,5	25,6	19,9	21,0	20,0	19,9
<b>Si mM</b>	<0,01	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6

Les end-members obtenus pour les échantillons de la plongée 1772 sont présentés dans le tableau III-5 en comparaison avec ceux précédemment déterminés dans des échantillons collectés dans la Dépression Sud du bassin de Guaymas (Von Damm et al. 1985; Von Damm 1990). Pour des pH similaires et des températures proches, les concentrations obtenues montrent que les end-members en Na, Ca, K et Mn sont similaires ou très proches de ceux obtenus lors d'études antérieures alors que les concentrations en H<sub>2</sub>S, Sr, Fe, Si et Pb sont très inférieures et celles en Ba supérieure (Von Damm et al. 1985; Von Damm 1990).

**Tableau III-5 :** Tableau comparant les end-members obtenus à partir des fluides collectés lors de la plongée 1772 (en gras), ceux obtenus précédemment lors de l'étude de Von Damm (échantillons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9) (Von Damm et al. 1985; Von Damm 1990) et ceux obtenus à NGS (National Geographic Society) un site de la dorsale Est pacifique à 21°N (site où le fluide ne traverse pas une importante couche de sédiments).  
T température ; sd : sous la limite de détection

	<b>PI 1772</b>	1	2	3	4	5	6	7	9	NGS
<b>T°C</b>	<b>200</b>	291	291	285	315	287	264	300	100	273
<b>pH</b>	<b>5,9</b>	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	3,8
<b>H<sub>2</sub>S mM</b>	<b>2,5</b>	5,8	4	5,2	4,8	4,1	3,8	6	4,6	6,6
<b>Na mM</b>	<b>484</b>	489	478	513	485	488	475	490	480	510
<b>K mM</b>	<b>48,1</b>	48,5	46,3	37,1	40,1	43,1	45,1	49,2	32,5	25,8
<b>Ca mM</b>	<b>27,4</b>	29	28,7	41,5	34	30,9	26,6	29,5	30,2	20,8
<b>Sr µM</b>	<b>200</b>	202	184	253	226	211	172	212	160	97
<b>Ba µM</b>	<b>65,7</b>	>12	>20	>15	>54	>13	>13	>24	ND	>16
<b>Mn µM</b>	<b>123</b>	139	222	236	139	128	148	139	132	1002
<b>Fe µM</b>	<b>1,4</b>	56	49	180	77	33	17	37	83	871
<b>Si mM</b>	<b>1,6</b>	12,9	12,5	13,5	13,8	12,4	10,8	12,8	9,3	19,5
<b>Pb nM</b>	<b>sd</b>	265	304	652	230	<20	<20	<20	<20	183
<b>Co nM</b>	<b>sd</b>	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	22
<b>Cd nM</b>	<b>sd</b>	<10	<10	46	27	<10	<10	<10	<10	17

Le fluide hydrothermal PI 1772, ainsi que tous les fluides collectés dans la Dépression Sud du Bassin de Guaymas (campagne BIG et études précédentes (Von Damm et al. 1985; Von Damm 1990)) sont enrichis en calcium, en sodium et en manganèse par rapport à l'eau de mer.

La concentration en fer dissous dans le fluide hydrothermal issu de la plongée PI 1772 indique un faible enrichissement du fluide en comparaison des fluides précédemment analysés (Von Damm et al. 1985; Von Damm 1990): le fluide PI 1772 contient de 12 à 120 fois moins de fer dissous que dans les fluides décrits par Von Dam (Tableau III-5). Globalement, les fluides hydrothermaux du bassin de Guaymas semblent être moins enrichis en fer dissous que d'autres sites hydrothermaux, par exemple sur EPR 21°N (Von Damm et al. 1985; Von Damm 1990) ou sur la dorsale médio-atlantique (avec le site Rainbow dont les fluides peuvent contenir jusqu'à 24 mM de fer dissous (Charlou et al. 2002)). De même, en règle générale, les fluides hydrothermaux du bassin de Guaymas contiennent moins de métaux (Fe, Mn, Pb, Co ou Cd) que les sites hydrothermaux de la dorsale médio-atlantique, de la dorsale Est pacifique, de la Ride de Juan de Fuca ou de la ride de Galapagos (Von Damm 1990; Charlou et al. 2002).

L'end member du fluide PI 1772 (Titane) est anormalement pauvre en silice par rapport aux autres fluides du bassin de Guaymas. En effet même dans les échantillons et PEPITO (poches C3, D1, D2 et D3) ayant pourtant une grande contribution d'eau de mer les concentrations en Silice sont

faibles. De manière générale, la concentration en silice d'un fluide hydrothermal est liée à la solubilité du quartz qui est dépendante de la pression et de la température. Dans notre cas, la faible concentration résulte plutôt d'un artefact analytique impliquant la précipitation de silice amorphe dans l'échantillon. Afin de s'affranchir de ce problème, il est courant de diluer par 100 une fraction de l'échantillon immédiatement après récupération pour éviter cette précipitation.

La concentration en baryum dans le fluide PI 1772 semble supérieure à celle des fluides étudiées précédemment ; lors de son étude Von Damm a cependant, observé une précipitation du Baryum lors de l'échantillonnage des fluides du Bassin de Guaymas (Von Damm 1990).

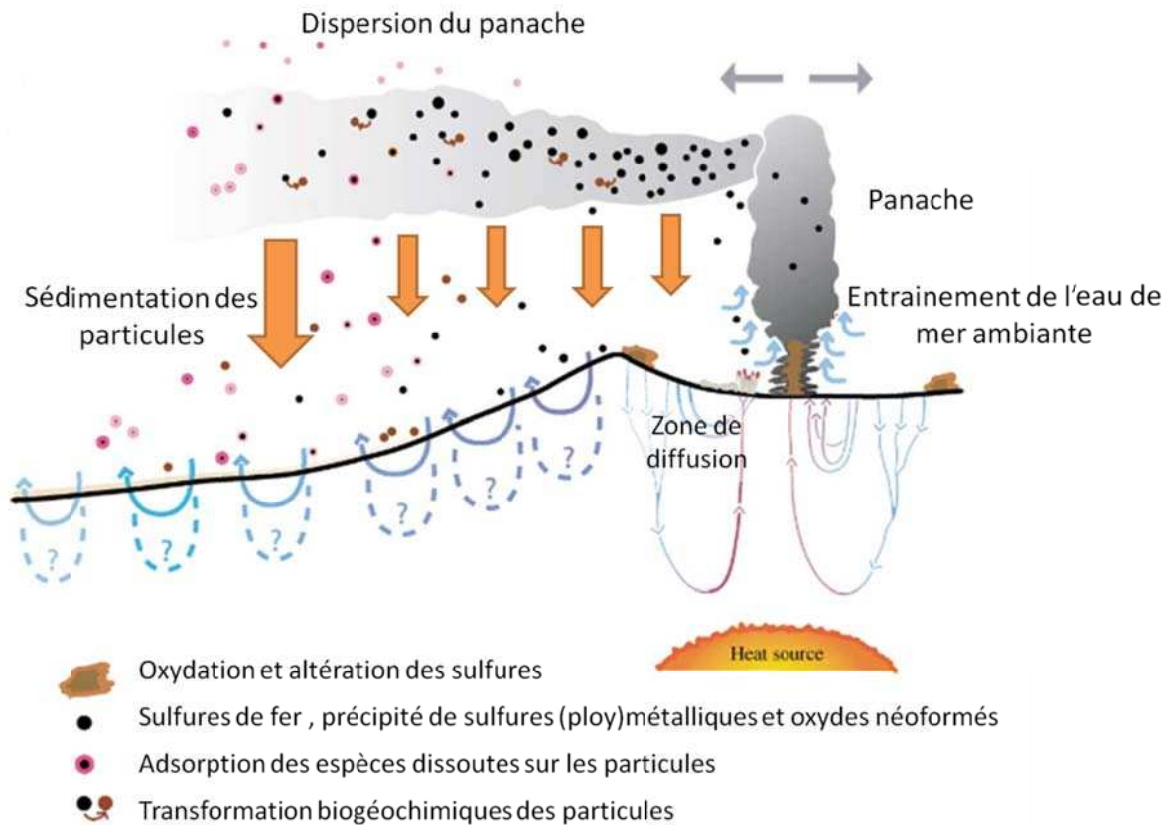
Certains éléments contenus dans le fluide PI 1772, n'ont pas un end-member proche de ceux déterminés précédemment par Von Damm ( $H_2S$ , Fe, Pb) (Von Damm et al. 1985; Von Damm 1990) ; ceci peut être la conséquence de l'influence de certains paramètres, tel que la température qui contrôle largement la solubilité des sulfures métalliques. Ainsi, une température plus basse due à un refroidissement conductif du fluide hydrothermal (ou lors d'un mélange avec l'eau de mer) favorisera la précipitation de sulfure en profondeur ou en subsurface.

## **3.2. Zone de mélange fluide hydrothermal - eau de mer**

### **3.2.1. Zone de mélange et processus chimiques**

La zone de mélange fluide hydrothermal-eau de mer, d'aspect moiré, correspond à la zone où le fluide hydrothermal chaud et réduit se mélange avec l'eau de mer ambiante froide et oxygénée. Au point d'émission du fluide dans l'eau de mer, des sulfures polymétalliques vont précipiter et former les parois des édifices hydrothermaux ainsi que le conduit interne de circulation de fluide dans la cheminée (Feely et al. 1990; Metz and Trefry 2000). Au cours de son ascension, le fluide hydrothermal continue de se mélanger avec l'eau de mer sur une hauteur de plusieurs mètres au-dessus du plancher océanique, où ensuite, il se propage et se disperse latéralement (Figure III-7). Ainsi, dès son émission dans l'eau de mer, le panache hydrothermal est de plus en plus dilué avec l'eau de mer.

La différence majeure entre les zones de mélanges au niveau du plancher océanique et dans les panaches concerne les taux de dilution. Dans un panache hydrothermal, l'entraînement de l'eau de mer environnante est très importante, produisant un facteur de dilution du fluide hydrothermal  $> 100$  (soit seulement 1% de fluide hydrothermal) à seulement 10m au-dessus de plancher océanique. Lorsque la densité du panache atteint celui de l'eau de mer (absence d'anomalie de température), le facteur de dilution est  $> 10^4$ . Au contraire, les zones de mélange au niveau du plancher océanique produisent généralement des fluides hydrothermaux diffus, de plus basse température que les fluides « end-members », mais avec une composante hydrothermale importante.



**Figure III-7 :** Schéma représentant le fonctionnement d'un système hydrothermal et son impact sur la colonne d'eau sus-jacente modifié d'après German et Von Damm 2006 (German and Von Damm 2006).

De part la circulation de l'eau de mer dans la croûte océanique, trois types de fluides ont été distingués : les fluides émis à haute température qui ont probablement réagi; les fluides chaud émis qui vont être mélangé avec l'eau de mer pour former le panache hydrothermal et les fluides qui ont réagi températures dites «intermédiaires» qui percolent le plancher océanique. A ces trois types de fluide s'ajoute les zones de diffusion, où les communautés animales s'établissent.

Lorsque les fluides sortent du plancher océanique, soit en tant que flux diffus ou au niveau d'une cheminée hydrothermal, le fluide émis se lève puis le panache hydrothermal se propage latéralement.

Dans le panache, des éléments peuvent précipiter avec l' $H_2S$  et former des sulfures polymétalliques, des oxyanions peuvent s'adsorber sur les particules telles que des oxydes et des transformations biogéochimiques peuvent aussi se produire. Petit à petit, au cours de la dispersion du panache, ces particules tombent et sédiment sur le plancher océanique formant des sédiments métallifères.

C'est aussi au niveau de cette zone de mélange associée aux fluides diffus que les communautés animales hydrothermales s'établissent par exemple : les siboglinidés *Riftia pachyptila* et des Alvinellidés dans le Bassin de Guaymas (Sarazin, Olu et Decker communications personnelles); des *Riftia pachyptila* et des *Alvinella pompejana* au niveau de la dorsale Est pacifique (Le Bris et al. 2003)). Les espèces chimiques présentes dans le gradient de mélanges : espèces réduites ( $H_2S$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $H_2$ ,  $CH_4$ ) venant du fluide et espèces oxydées ( $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^{2-}$ ,  $O_2$ ) de l'eau de mer, fournissent les composés requis pour les micro-organismes chimio-litho-autotrophes, producteurs primaires de l'écosystème, vivant sous forme libre ou en association symbiotique avec certain métazoaire (Childress and Fisher 1995).



Cette zone de mélange est un environnement très dynamique et fluctuant, caractérisée par d'importants gradients thermique et chimique, jouant un rôle non négligeable dans la dispersion des flux chimiques et thermiques dans les océans (Edmond et al. 1982; Mottl and McConachy 1990; German and Von Damm 2006; Sander and Koschinsky 2011). Les éléments traces et majeurs contenus dans la zone de mélange ont deux origines : le fluide hydrothermal initial ou l'eau de mer. La relation entre les paramètres physicochimiques (température, pH, éléments chimiques) et le % de mélange n'est pas trivial. Ainsi, il est possible que pour une même température, un fluide diffus possède différentes contributions de fluides hydrothermal considérant (1) un mélange simple avec l'eau de mer ; (2) un réchauffement conductif de l'eau de mer ; (3) un refroidissement conductif du fluide hydrothermal. Les relations  $T^{\circ}$ - pH - concentrations élémentaires et isotopiques (e.g. Sr) permettent de contraindre ces différents processus qui sont d'importance majeure pour la structuration des communautés hydrothermales.

Les éléments, d'origine hydrothermale ou de l'eau de mer, peuvent être transformés sous forme de particules ou dissoute lors du processus de mélange. Le principe de comportement « conservatif » ou « non conservatif » des éléments est un concept universel à tout processus de mélange, que ce soit par exemple dans les panaches hydrothermaux, zone diffuse ou estuaires en domaines côtier. Les processus peuvent être purement abiotiques (inorganiques), indirectement influencés par la biologie (composés organiques du milieu) ou directement influencé par les processus microbiens (German and Von Damm 2006; Breier et al. 2012):

- **Processus 1** : c'est un processus inorganique qui a lieu immédiatement au moment de l'émission de fluide hors de l'édifice. Le Fe(II) ainsi que les autres éléments chalcophiles (éléments chimiques qui ont une affinité pour le S et qui sont généralement associé à lui tels que : Cu, Zn, Sb, Se, Sn, Pb ou Cd) vont co-précipiter rapidement et former des sulfures (poly)métalliques qui vont s'accumuler sur le plancher océanique.
- **Processus 2** : est aussi un processus inorganique qui a lieu pendant le mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer ambiante. Ce mélange en milieu oxygène conduit à l'oxydation du Fe(II) et à la formation de précipités d'oxyde-hydroxyde de fer (ou Fe(III)). Ces précipités d'oxyde-hydroxyde de fer peuvent piéger ou adsorber des éléments de l'eau de mer. Ce processus conduit à la formation de fines particules minérales contenant du Fe(III).
- **Processus 3** : est un processus organique qui correspond à la formation de complexes avec des ligands organiques, d'agrégation avec des particules organiques (exopolymères, polysaccharides, protéines, lipides). Ce processus est connu pour les

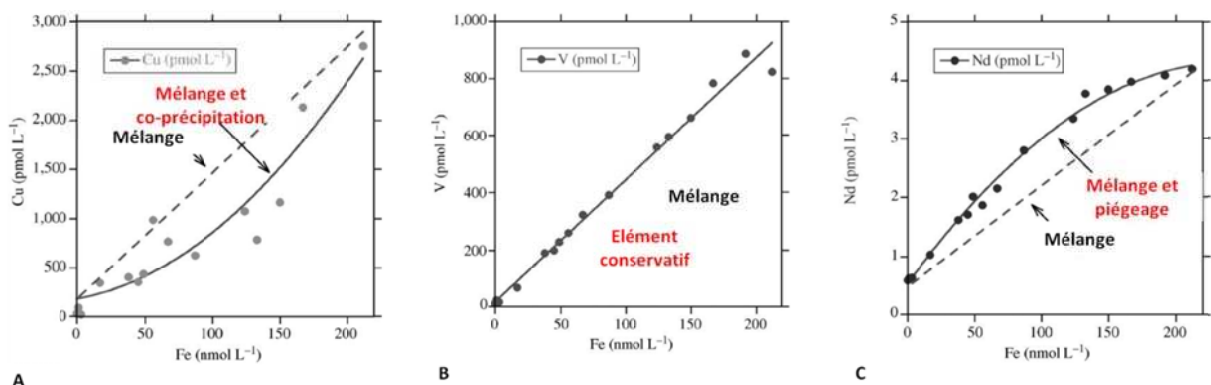
particules de Fe(II) enrichies en composés organiques (Toner et al. 2009; Breier et al. 2012; Toner et al. 2012).

Ainsi, le devenir du matériel hydrothermal, le transport, le temps de résidence dans le panache des éléments ainsi que leur sédimentation sur le plancher océanique sont influencés par plusieurs paramètres (German and Von Damm 2006; Breier et al. 2012)(Figure III-7) :

- par des réactions oxydation abiotique avec l'eau de mer amiante
- par des phénomènes de précipitation, d'adsorption
- par la surface réactive et la morphologie de la particule
- par les processus de complexation ou de ligation avec la matière organique dissoute ou particulaire
- par des interactions avec les micro-organismes vivant dans le panache (par exemple le manganèse dissout peut être oxydé par des micro-organismes (Dick et al. 2009; Dick and Tebo 2010)).

Ainsi, selon le devenir des éléments dans la zone de mélange, décrit initialement par rapport au comportement du fer (German and Von Damm 2006), trois types de comportements ont été distingués (Figure III-8):

- la co-précipitation affectant les éléments chalcophiles
- le comportement « linéaire » pour les éléments conservatifs
- le piégeage, la séquestration des éléments dissous par les oxydes, c'est-à-dire l'adsorption des éléments dissous sur les particules principalement sur les oxydes de fer.



**Figure III-8 :** Schémas illustrant les trois comportement possibles des élément lors d'un mélange fluide hydrothermal-eau de mer, modifié d'après German et Von Damm 2006 (German and Von Damm 2006)

A) Schéma illustrant le comportant d'un élément, qui au cours du mélange fluide hydrothermal eau de mer, va co-précipiter ; B) Schéma illustrant le comportement d'un élément qui au cours du mélange fluide hydrothermal eau de mer, restera conservatif ; C) Schéma illustrant le comportement d'un élément qui au cours du mélange fluide hydrothermal eau de mer, va être piégé et adsorbé sur des oxydes

Un élément dissous peut avoir un comportement conservatif alors que son pool particulaire peut être adsorbé ou précipité et inversement, un élément dissous peut être non conservatif alors que sa forme particulaire l'est.

L'utilisation de ces éléments sous forme dissoutes ou particulaires associés à leur pourcentage de mélange fluide hydrothermal-eau de mer, permet entre autre de tracer ces éléments dans le mélange et de déterminer 1) leurs sources : apport hydrothermal ou de l'eau de mer et 2) leur devenir dans le fluide : précipitation, adsorption.

### **3.2.2. Choix du manganèse comme traceur du taux de mélange fluide hydrothermal – eau de mer et détermination du taux de mélange**

Le manganèse a été choisi comme traceur du taux mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer car le Mn est l'un des deux métaux (avec le fer) les plus enrichis dans le fluide hydrothermal. Ainsi, lors de l'émission du fluide dans l'eau de mer, d'importantes quantités de manganèse dissous sont dispersées dans le panache et dans les océans profonds (Klinkhammer 1980; Baker et al. 1985; German and Von Damm 2006). Bien que le manganèse soit thermodynamiquement instable en condition oxygène, la cinétique d'oxydation abiotique du manganèse dans le panache est très lente, ainsi, il reste majoritairement sous forme dissoute (German and Von Damm 2006). Cependant cette vitesse d'oxydation peut-être augmentée *via* les processus d'oxydation microbiens, l'oxydation du manganèse dans le panache est connue dans les panaches hydrothermaux du Bassin de Guaymas (Dick et al. 2009; Dick and Tebo 2010).

Le manganèse dissous est donc considéré comme un élément conservatif dans le mélange fluide hydrothermal et l'eau de mer et est donc un indicateur clé pour étudier la dispersion des panaches hydrothermaux et des processus de mélange dans les fluides diffus.

Les relations linéaires obtenues entre les concentrations de Mn dissous et des métaux alcalins et les alcalino-terreux (Mg, Ca, Na, et Sr) confirment le comportement conservatif du Mn (Tableaux III-6 et III-7).

**Tableau III-6 :** Tableau répertoriant les concentrations en H<sub>2</sub>S, S, Fe, Cu, Cd, Pb, Zn, Mo, U Mn et Mg dissous dans les fluides collectés lors de la plongée 1772  
sd : sous la limite de détection

Echantillon	H <sub>2</sub> S μM	Sulfates mM	Fe nM	Cu nM	Cd nM	Pb nM	Zn μM	Mo nM	U nM	Mn μM	Mg mM
A1	32	26,77	0,11	22,25	1,02	sd	sd	sd	13,39	0,05	sd
A2F	214	26,24	2,23	13,07	sd	sd	2,49	97,01	12,46	4,97	52,75
A3F	667	26,19	5,91	24,09	sd	2,06	0,34	89,90	11,90	12,23	49,21
B1F	370	26,79	3,53	3,78	sd	sd	0,54	65,90	13,02	7,71	51,37
B2F	760	25,01	8,44	7,45	sd	sd	sd	76,89	11,04	19,46	46,85
B3F	1006	25,53	9,50	13,43	sd	1,92	0,59	78,25	11,36	22,75	46,88
C1F	1521	25,33	11,18	61,31	0,20	0,61	0,53	31,72	9,76	25,99	45,59
C2F	1310	23,39	8,30	7,75	sd	51,28	0,14	36,41	0,68	28,97	41,78
C3F	1620	23,79	11,20	61,90	0,41	22,12	sd	26,42	0,73	30,57	43,49
D1F	1649	22,21	7,67	sd	sd	17,74	sd	34,44	0,88	43,22	39,14
D2F	1667	22,03	7,15	sd	sd	10,52	sd	24,36	0,26	36,77	44,16
D3F	1831	21,73	5,66	11,33	sd	sd	sd	13,32	0,90	44,59	40,28

**Tableau III-7 :** Tableau répertoriant les concentrations en S, Fe, Cu, Cd, Pb, Zn, Mo, U Mn et Mg total dans les fluides collectés lors de la plongée 1772  
sd : sous la limite de détection

Echantillon	Sulfates mM	Fe nM	Cu nM	Cd nM	Pb nM	Zn μM	Mo nM	U nM	Mn en μM	Mg mM
A1	27,27	0,26	21,89	0,91	sd	2,33	103,70	13,69	0,26	54,14
A2	28,06	2,91	114,46	2,16	46,83	0,75	102,97	12,68	5,20	52,21
A3	26,69	7,70	266,96	3,95	107,60	1,23	94,58	12,12	12,53	51,65
B1	26,90	4,46	162,10	1,74	63,94	0,40	98,72	12,94	7,65	55,83
B2	25,25	11,17	448,63	4,29	170,53	1,34	91,03	11,13	19,67	46,67
B3	26,54	13,13	356,94	4,15	208,27	2,21	91,69	11,86	23,73	46,56
C1	24,96	14,55	592,59	4,79	214,13	1,83	87,60	10,79	25,85	45,10
C2	24,07	16,63	494,13	5,33	228,73	1,04	82,02	1,63	29,85	42,76
C3	23,65	16,26	434,85	5,72	236,16	1,11	82,75	0,97	30,39	42,54
D1	22,33	16,68	911,10	8,14	312,05	2,37	77,71	1,45	43,55	40,10
D2	21,47	10,31	472,07	6,10	187,82	0,66	73,46	0,38	36,01	39,55
D3	21,80	13,57	851,46	8,06	302,15	2,29	74,72	1,20	44,35	38,13

Le pourcentage de mélange avec le fluide hydrothermal a donc été calculé, pour tous les échantillons collectés dans le gradient de mélange avec le système de prélèvements PEPITO à partir de l'end-member du Mn déterminé pour le même fluide (Tableau III-8), selon la relation :  

$$\left( \frac{\text{Concentration en Mn mesuré dans la poche}}{\text{End member Mn}} \right) * 1000$$

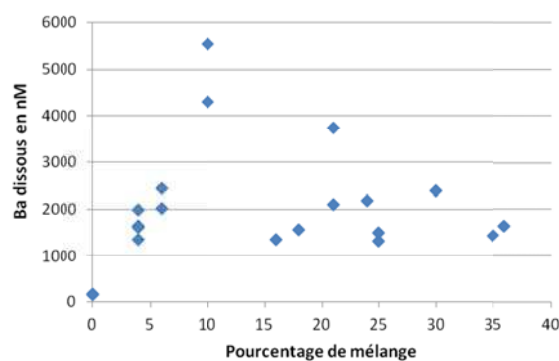
**Tableau III-8 :** Tableau associant chaque échantillon à sa température moyenne, son pH et sa contribution hydrothermale (en pourcentage de mélange avec le fluide hydrothermal).

Echantillon	Température du fluide °C	pH	Pourcentage (%) de mélange avec le fluide hydrothermal
1772 A1	2,8	7,3	0
1772 A2	15	6,4	4
1772 A3	30	6	10
1772 B1	45	6,3	6
1772 B2	49	6	16
1772 B3	73	5,9	18
1772 C1	65	5,9	21
1772 C2	83	5,9	24
1772 C3	100	5,9	25
1772 D1	115	5,9	35
1772 D2	121	5,9	30
1772 D3	133	5,9	36

Selon le pourcentage de mélange déterminé, les poches collectées dans le gradient contiendraient entre 0% et 36% de fluide hydrothermal. La poche A1, échantillonnée à la plus basse température, moyenne de 2,8°C, semble composée à plus de 99% d'eau de mer alors que la poche prélevée à la température la plus élevée, moyenne de 133°C, contient 36% de fluide hydrothermal et 64% d'eau de mer.

### 3.2.3. Comportement des éléments dissous et particulaire dans la zone de mélange

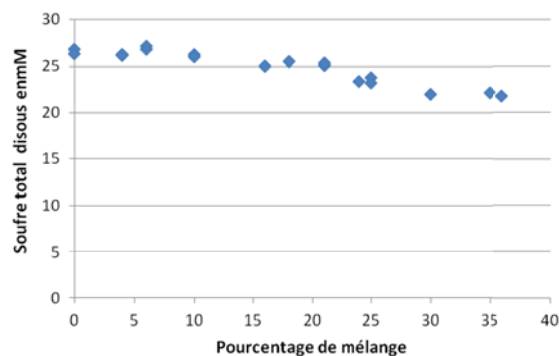
Le baryum est enrichi dans le fluide hydrothermal. En revanche il ne présente pas de comportement conservatif (linéaire) lors du mélange avec l'eau de mer due à la précipitation de barytine ( $\text{BaSO}_4$ ). Dans ce cas, le maximum de précipitation se produit proche du pôle le moins dilué où la concentration de Ba est supérieure au seuil de saturation du  $\text{BaSO}_4$  (Figure XX). Ce même phénomène se produit pour le profil de concentration de la silice qui montre une précipitation de silice amorphe pour un faible pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.



**Figure III-9 :** Diagramme illustrant, les concentrations en baryum dissous dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.

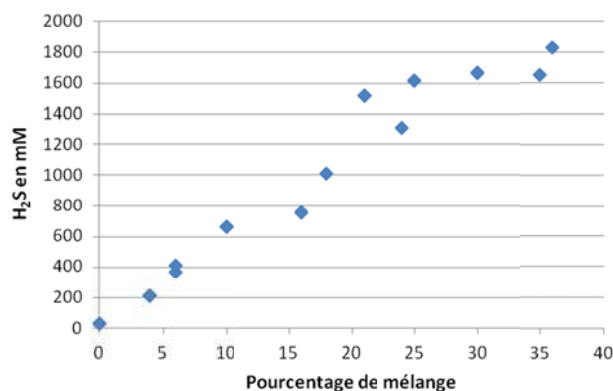
### Le soufre total (sulfate) et H<sub>2</sub>S:

Le soufre total et dissous peut être assimilé à la forme sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) puisque les échantillons ont été acidifiés au moins 1 mois avant les analyses. Ils ne contiennent donc aucune trace d'H<sub>2</sub>S ni sous forme dissoute, ni sous forme particulaire. Le pool dissous (sulfate) est plus ou moins conservatif avec un appauvrissement dans le pôle enrichi en fluide hydrothermal (Figure III-10 et Tableau III-6).



**Figure III-10 :** Diagramme illustrant, les concentrations en soufre dissous et particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.

L'H<sub>2</sub>S est enrichi dans le fluide hydrothermal. Entre 0 et 20% de contribution hydrothermal, l'H<sub>2</sub>S dissous exhibe un comportement conservatif. Au delà de 20% d'apport hydrothermal, l'H<sub>2</sub>S a tendance à précipiter, probablement sous forme de sulfures (Figure III-11 et Tableau III-6).

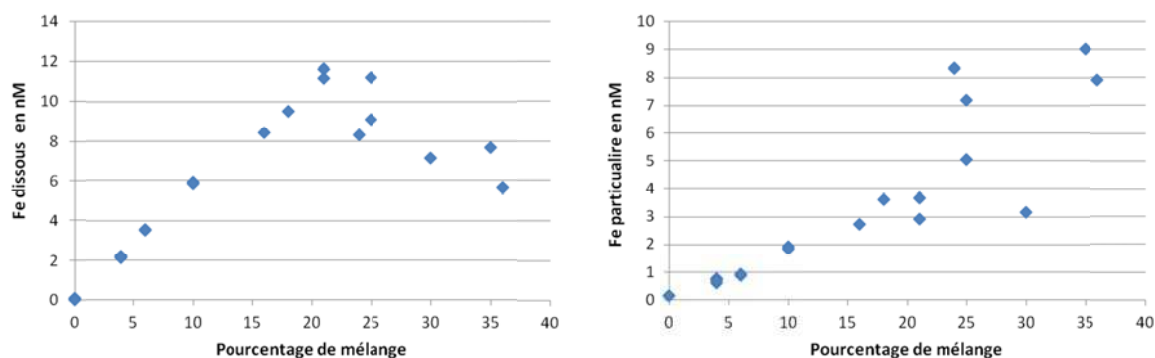


**Figure III-11 :** Diagramme illustrant, les concentrations en  $H_2S$ , dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.

### Les métaux traces: Fe, Cu, Cd, Pb, Zn et Mo

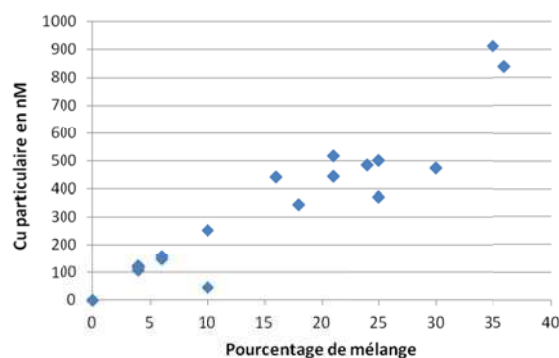
A l'exception du molybdène qui est appauvri dans le fluide, les métaux traces tels que Cu, Cd, Zn et Pb sont enrichis dans le fluide hydrothermal collecté (Tableaux III-6 et III-7). Comme dit précédemment, le manganèse dissous présente un comportement conservatif et est essentiellement présent sous forme dissoute.

Le fer, en revanche, est présent à la fois sous forme dissoute et sous forme particulaire lors du mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer (Tableaux III-6 et III-7). Entre 0 et 20% de contribution hydrothermale, le Fer dissous est conservatif montrant une absence de précipitation. En en-deçà de 80% d'apport d'eau de mer, il précipite (Figure III-12) probablement sous la forme de sulfure de fer. La proportion de Fer particulaire augmente également pour les plus grandes contributions de fluide hydrothermal où les concentrations en  $H_2S$  sont plus importantes (Figure III-11).



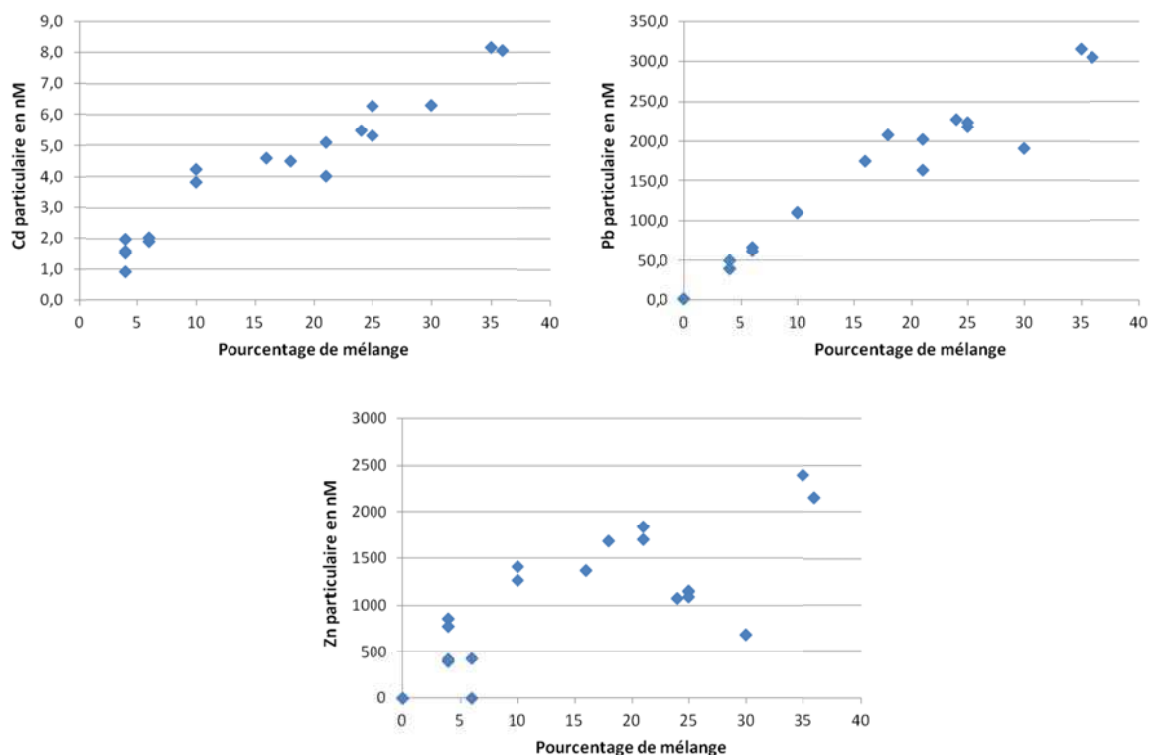
**Figure III-12 :** Diagrammes illustrant, les concentrations en fer dissous et particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.

Le cuivre est essentiellement sous la forme particulaire tout au long du gradient de mélange. Ce comportement est notamment lié à la forte affinité du Cuivre pour  $H_2S$  et la précipitation de sulfures de cuivre. En revanche, le Cuivre total (particulaire) montre un profil conservatif, ce qui suggère que la précipitation du Cu se réalise lors de l'échantillonnage et le refroidissement de l'échantillon après prélèvement (Figure III-13 et Tableau III-7).



**Figure III-13 :** Diagramme illustrant, les concentrations en cuivre dissous et particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.

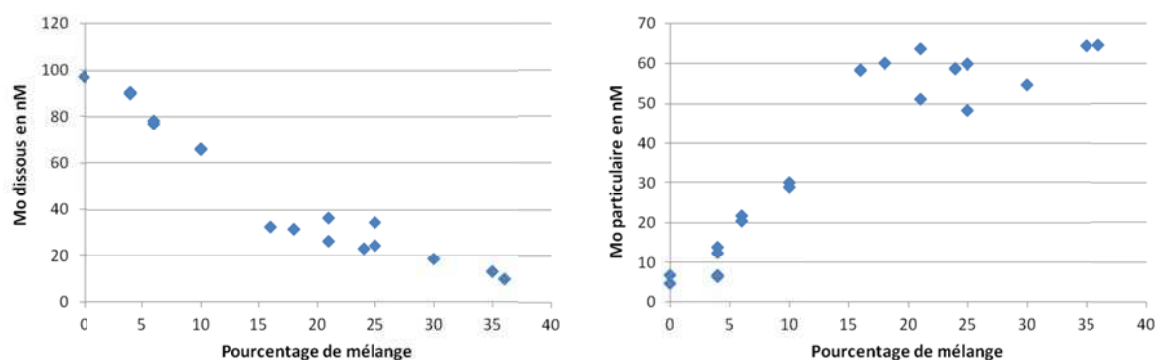
Ce même comportement se retrouve aussi pour les métaux fortement chalcophiles tels que Cd et Zn, Pb (Figure III-14).



**Figure III-14 :** Diagrammes illustrant, les concentrations en cadmium particulaire, plomb particulaire et zinc particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.

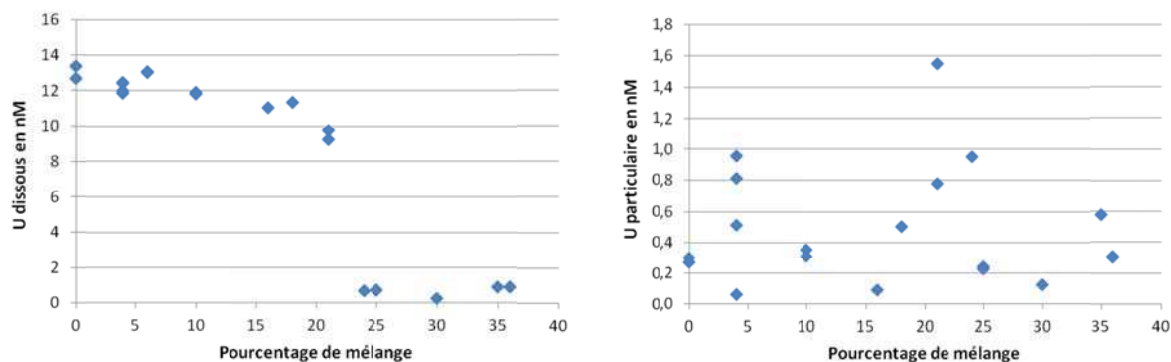


Le molybdène est le seul métal de transition qui est plus enrichi dans l'eau de mer que dans un fluide hydrothermal (Tableaux III-6 et III-7). Ce comportement est lié à sa spéciation stable dans l'eau de mer (Mo oxyanion) et sa forte réactivité en condition riche en  $H_2S$ . Ainsi, lors du mélange entre l'eau de mer riche en Mo et le fluide hydrothermal riche en  $H_2S$ , le Mo dissous montre un comportement non conservatif (appauvrissement) du à la co-précipitation avec les sulfures de Fe et Cu. En revanche, le Mo total est plutôt conservatif (relation linéaire) ce qui suggère une précipitation après échantillonnage (Figure III-15).



**Figure III-15 :** Diagrammes illustrant, les concentrations en molybdène dissous et particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.

Tout comme le Molybdène, l'uranium est plus enrichi dans l'eau de mer que dans le fluide hydrothermal (environ 13,4 nM d'uranium dissous dans l'échantillon A1 composé uniquement d'eau de mer) (Tableau III-6). La solubilité de l'Uranium est fortement liée à sa spéciation et surtout à son état redox. L'Uranium est très soluble dans les eaux oxygénées sous sa forme uranyle  $U(VI)O_2^{2+}$ . En milieu anoxique, et surtout contenant de l' $H_2S$ , l' $U(VI)$  est rapidement réduit sous une forme insoluble  $U(IV)O_2$  (Tableau III-7). Ce comportement explique donc le profil de concentration de l'Uranium dans la zone de mélange qui montre un appauvrissement rapide à environ 20% de contribution de fluide hydrothermal. Cette appauvrissement est observable à la fois pour la forme dissoute et pour l'Uranium total, ce qui suggère que la précipitation d'Uranium a eu lieu avant l'échantillonnage ou que les formes insolubles de U ont précipitées le long de la canule d'échantillonnage (Figure III-16).



**Figure III-16 :** Diagrammes illustrant, les concentrations en uranium dissous et particulaire, dans le panache, en fonction du pourcentage de mélange du fluide hydrothermal avec l'eau de mer.

### Précipitation et adsorption dans la zone de mélange fluide hydrothermal-eau de mer :

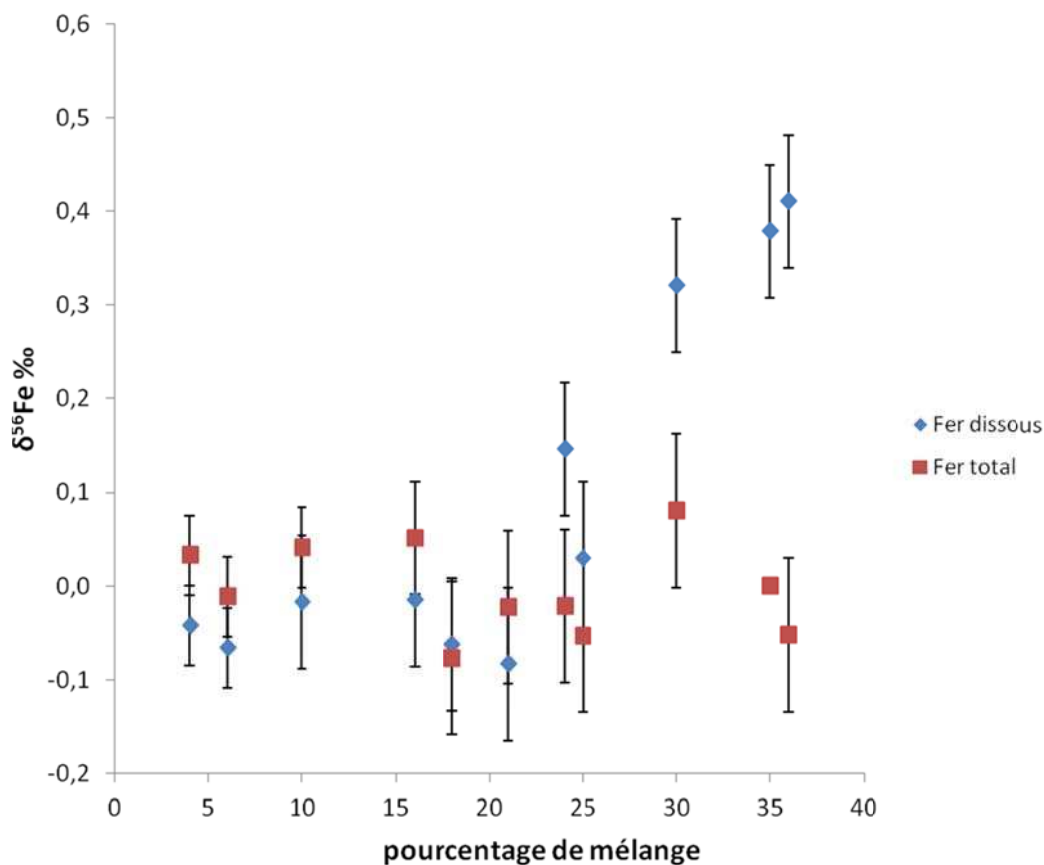
Le comportement des différents éléments et de leurs spéciations (dissous ou particulaire), renseigne sur les réactions chimiques qui ont lieu dans la zone de mélange fluide hydrothermal - eau de mer :

- Éléments conservatifs : Mn, Mg
- Co-précipitation avec l' $H_2S$  dissous lors du refroidissement du fluide hydrothermal pour former des sulfures polymétalliques : Fe, Cu, Zn ;
- Co-précipitation avec le sulfate de l'eau de mer pour former des précipités sulfatés de  $BaSO_4$ , ou simple précipitation dans le cas de la silice amorphe (effet de sursaturation)
- Changement d'état rédox et/ou spéciation des éléments de l'eau de mer (U, Mo) lors du mélange avec le fluide hydrothermal.
- La réaction entre oxygène de l'eau de mer et les composés réduits du fluide hydrothermal (e.g. formation d'oxydes de fer) n'a pas pu être mise en évidence dans la zone de mélange. Ceci est probablement dû aux cinétiques de réactions qui sont limités dans ces environnements ainsi qu'à la faible contribution de processus microbiens dans ces zones très dynamiques. Ceci est d'ailleurs confirmé par l'étude des isotopes du Fer présentée ci-dessous.

#### 3.2.4. Isotopie du Fer dans la zone de mélange du fluide PI 1772

L'analyse des rapports isotopiques du fer dissous et du fer total a pu être réalisée pour tous les échantillons prélevés dans la zone de mélange à l'exception de l'échantillon A1 (constitué uniquement d'eau de mer) qui ne contenait pas suffisamment de fer.

Les mesures révèlent que moins le fluide hydrothermal est dilué avec l'eau de mer, plus la valeur du  $\delta^{56}\text{Fe}$  devient positive (Figure III-17 et Table III-9). La valeur isotopique du fer total, quand à elle, est constante et est de  $0 \text{ ‰} \pm 0.08$  (Figure III-17 et Table III-10).



**Figure III-17 :** Valeur du  $\delta^{56}\text{Fe}$  du fer dissous (en bleu) et du fer total (en rouge) par rapport aux pourcentages de mélange fluide hydrothermal-eau de mer

Les rapports isotopiques du fer dissous mesurés, dans les échantillons les plus chauds (C2 à D3), sont donc plus positifs que ceux mesurés dans des fluides chauds collectés au niveau de la dorsale médio-atlantique (sites Rainbow et TAG)(Severmann et al. 2004), au niveau de la ride de Juan de Fuca (sites Bastille, S&M, Grotto, Inferno et Pipe Organ) (Sharma et al. 2001) ou au niveau de la dorsale Est pacifique (Beard et al. 2003) (Tableau III-9).

**Tableau III-9 :** Tableau comparant les valeurs isotopiques du fer dissous obtenus dans la zone de mélange (plongée 1772 (en gras)), à celles obtenues dans des fluides collectés au niveau de la ride de Juan de Fuca (Sharma et al. 2001), au niveau de la dorsale médio-atlantique (MAR) (Severmann et al. 2004) et au niveau de la dorsale Est pacifique (Beard et al. 2003).

Echantillon Fe dissous	Contribution		$\delta^{56}\text{Fe}\text{‰} \pm 2\text{-S}$	$\delta^{57}\text{Fe}\text{‰} \pm 2\text{-S}$
	hydrothermale	Température		
	%			
<b>1772 A2FA</b>	<b>4</b>	<b>15</b>	<b>-0,04 ± 0,04</b>	<b>0,04 ± 0,22</b>
<b>1772 A3FA</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>-0,02 ± 0,07</b>	<b>0,02 ± 0,11</b>
<b>1772 B1FA</b>	<b>6</b>	<b>45</b>	<b>-0,07 ± 0,04</b>	<b>-0,14 ± 0,22</b>
<b>1772 B2F</b>	<b>16</b>	<b>49</b>	<b>-0,01 ± 0,07</b>	<b>-0,04 ± 0,11</b>
<b>1772 B3F</b>	<b>18</b>	<b>73</b>	<b>-0,06 ± 0,07</b>	<b>-0,20 ± 0,11</b>
<b>1772 C1FA</b>	<b>21</b>	<b>65</b>	<b>-0,08 ± 0,08</b>	<b>-0,26 ± 0,15</b>
<b>1772 C2F</b>	<b>24</b>	<b>83</b>	<b>0,15 ± 0,07</b>	<b>0,25 ± 0,11</b>
<b>1772 C3FA</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>0,03 ± 0,08</b>	<b>-0,02 ± 0,15</b>
<b>1772 D1F</b>	<b>35</b>	<b>115</b>	<b>0,38 ± 0,07</b>	<b>0,51 ± 0,11</b>
<b>1772 D2F</b>	<b>30</b>	<b>121</b>	<b>0,32 ± 0,07</b>	<b>0,51 ± 0,11</b>
<b>1772 D3F</b>	<b>36</b>	<b>133</b>	<b>0,41 ± 0,07</b>	<b>0,59 ± 0,11</b>
Bastille (Juan de Fuca)		376	-0,42 ± 0,37	-0,63 ± 0,37
S&M (Juan de Fuca)		367	-0,49 ± 0,21	-0,61 ± 0,21
Grotto (Juan de Fuca)		355	-0,30	-0,44
Inferno (Juan de Fuca)		329	-0,77 ± 0,13	-1,06 ± 0,13
Pipe Orgab (Juan de Fuca)		265	-0,46 ± 0,16	-0,69 ± 0,16
Rainbow (MAR) 442-4			-0,22 ± 0,05	-0,25 ± 0,03
Rainbow (MAR) 442-6			-0,24 ± 0,07	-0,35 ± 0,03
Rainbow (MAR) 442-W7			-0,23 ± 0,07	-0,33 ± 0,03
Rainbow (MAR) 443-W3			-0,19 ± 0,04	-0,28 ± 0,03
Rainbow (MAR) 443-W4			-0,25 ± 0,05	-0,32 ± 0,03
TAG (MAR) 431-2a			-0,26 ± 0,01	-0,37 ± 0,01
TAG (MAR) 431-1			-0,20 ± 0,02	-0,29 ± 0,01
TAG (MAR) 431-3			-0,26 ± 0,01	-0,38 ± 0,04
Fluides hydrothermaux Atlantique et Pacifique			-0,21 à -0,54	

La valeur isotopique du fer total est constante dans la zone de mélange. Elle est proche de la plupart des valeurs obtenues dans le panache hydrothermal du site Rainbow (Severmann et al. 2004) (Tableau III-10).

**Tableau III-10 :** Tableau comparant les valeurs isotopiques du fer total obtenus dans la zone de mélange (plongée 1772 (en gras)), à celles des sédiments hydrothermaux superficiels (Severmann et al. 2004).

Echantillon Fe total	Contribution hydrothermale %	Température	$\delta^{56}\text{Fe}\text{‰} \pm 2\text{-S}$
<b>1772 A2NFA</b>	<b>4</b>	<b>15</b>	<b>0,03 <math>\pm</math> 0,04</b>
<b>1772 A3NFA</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>0,04 <math>\pm</math> 0,04</b>
<b>1772 B1NF</b>	<b>6</b>	<b>45</b>	<b>-0,01 <math>\pm</math> 0,04</b>
<b>1772 B2NF</b>	<b>16</b>	<b>49</b>	<b>0,05 <math>\pm</math> 0,07</b>
<b>1772 B3NF</b>	<b>18</b>	<b>73</b>	<b>-0,08 <math>\pm</math> 0,08</b>
<b>1772 C1NFA</b>	<b>21</b>	<b>65</b>	<b>-0,02 <math>\pm</math> 0,08</b>
<b>1772 C2NF</b>	<b>24</b>	<b>83</b>	<b>0,02 <math>\pm</math> 0,08</b>
<b>1772 C3NFA</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>-0,05 <math>\pm</math> 0,08</b>
<b>1772 D2NFA</b>	<b>30</b>	<b>121</b>	<b>0,08 <math>\pm</math> 0,08</b>
<b>1772 D3NF</b>	<b>36</b>	<b>133</b>	<b>-0,05 <math>\pm</math> 0,08</b>
Sédiments hydrothermaux superficiels (0-1 cm) Rainbow (MAR) 316			0,33 $\pm$ 0,010

Les mécanismes pouvant expliquer le fractionnement du fer dissous lors du mélange fluides hydrothermal – eau de mer sont l'oxydation du Fe(II) par l'oxygène contenu dans l'eau de mer (Severmann et al. 2004) et la co-précipitation du fer dissous avec les sulfures (Bennett et al., 2009). Le premier processus a pour conséquence un enrichissement en isotope léger du pool de fer dissous (précipitation d'oxy-hydroxides de Fer enrichis en isotopes lourds) alors que le deuxième processus a pour effet d'enrichir le fluide en isotopes lourds (précipitation de sulfures de Fer enrichis en isotopes légers).

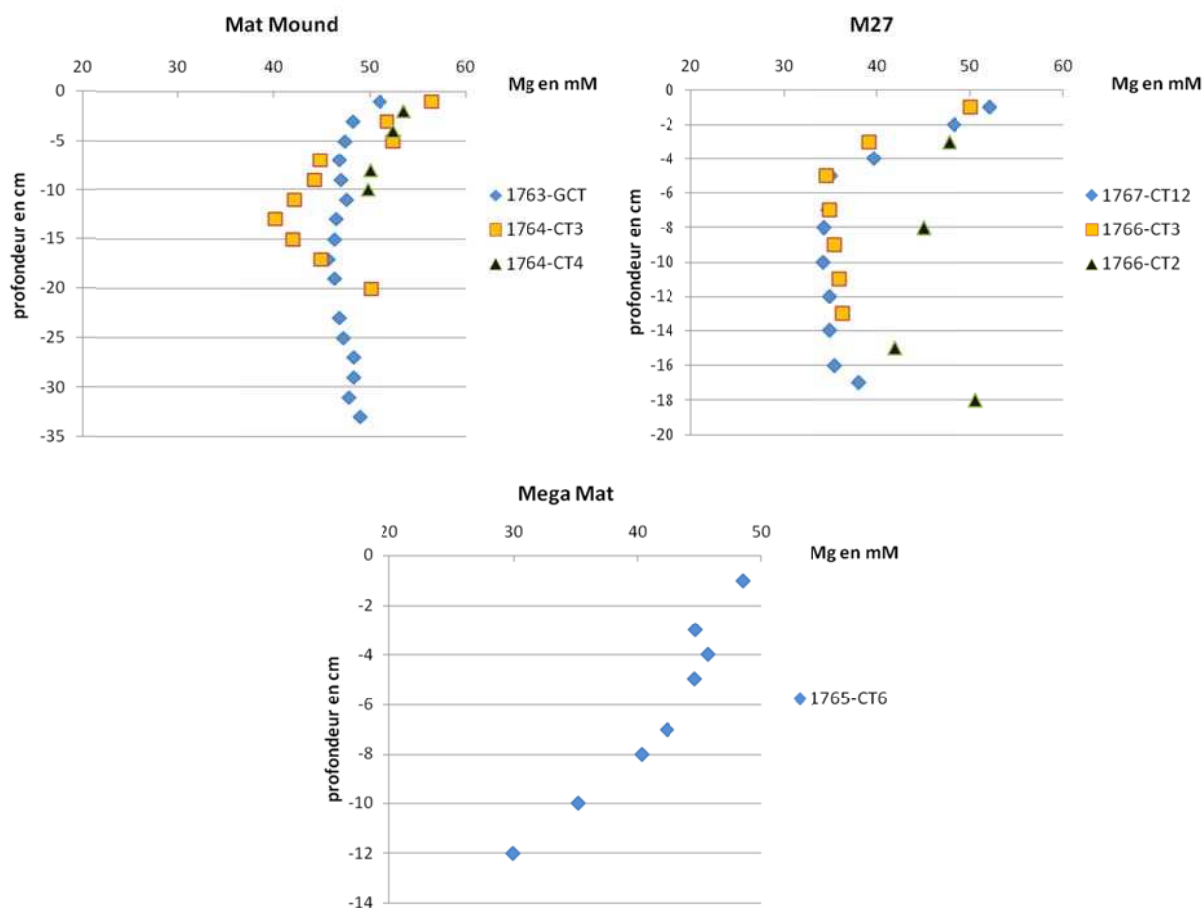
Ainsi, l'augmentation des valeurs de  $\delta^{56}\text{Fe}$  dans le Fer dissous observée dans la zone de mélange à Guaymas est le résultat de la précipitation des sulfures de Fer à partir du  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{H}_2\text{S}$  dissous du fluide hydrothermal. Le refroidissement du fluide hydrothermal lors de son mélange avec l'eau de mer permet une sursaturation de sulfures de fer (ex pyrrhotite, pyrite) et une précipitation rapide. Ce résultat est en accord avec le profil de concentration en Fer total et dissous et  $\text{H}_2\text{S}$  présentés précédemment.

#### 4. Etude préliminaire des sédiments hydrothermaux :

Trois zones d'échantillonnage en contexte sédimentaire, affectés par des circulations de fluides chauds ont été sélectionnées. Il s'agit des sites Mat Mound (ou marqueur BIG 1), MegaMat et Marker 27 ; tous recouverts d'épais tapis microbiens blanc et orange et dans lesquels la température augmente en fonction de la profondeur. La composition des eaux interstitielles des sédiments de ces

sites est donc affectée à la fois à un apport hydrothermal (diffusion, advection), par une infiltration (diffusion) de l'eau de mer et par les processus diagénétiques, biologiques et chimiques.

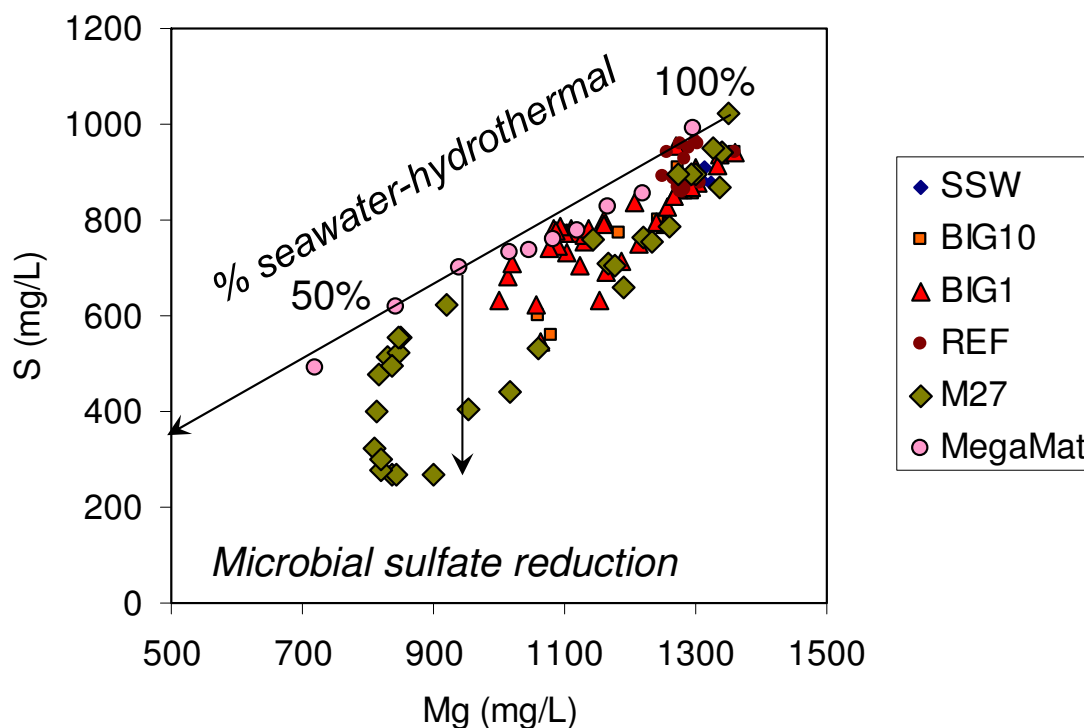
La concentration en magnésium dissous dans les eaux interstitielles de chaque site, met en évidence un apport hydrothermal, qui pour un même site, varie selon la profondeur (Figure III-18).



**Figure III-18 :** Diagrammes illustrant, par site, les concentrations en magnésium dissous en fonction de la profondeur.

La concentration en magnésium dissous dans les eaux interstitielles varie globalement en fonction de la profondeur, en s'enrichissant vers la surface ; sauf pour la carotte 1764-CT3 du site Mat Mound qui présente un appauvrissement à l'horizon 11-15 cm de profondeur. Il apparaît que le site MegaMat est plus affecté par les apports hydrothermaux, que les autres sites.

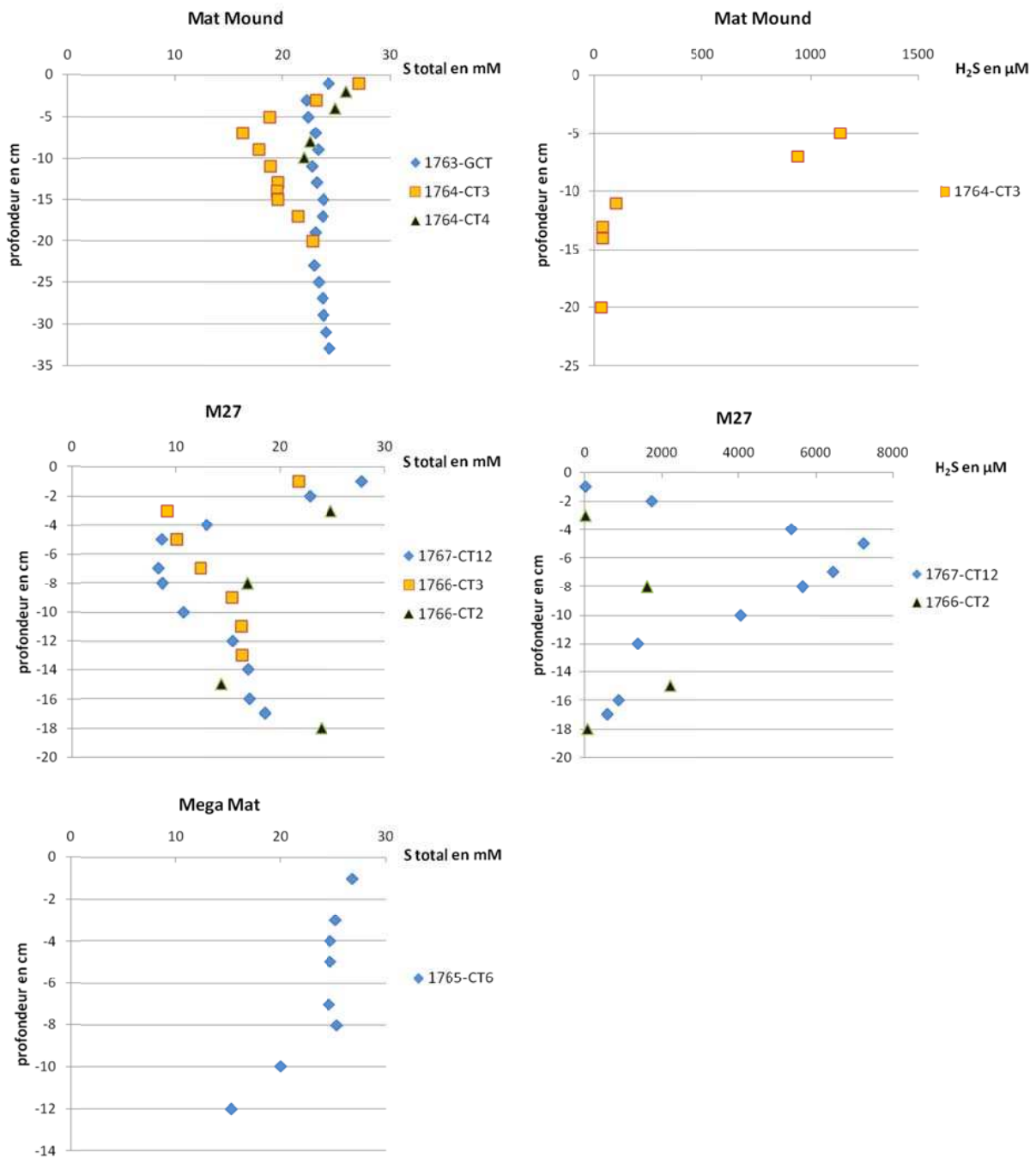
Les profils des concentrations en soufre total dissous (sulfate) en fonction du Mg, mettent aussi en évidence dans certains sites (ex : M27 et BIG1) une réduction microbienne alors que pour le site MegaMat, cela reflète un mélange eau de mer-fluide hydrothermal (Figure III-19).



**Figure III-19 :** Diagramme indiquant la courbe de mélange eau de mer-fluide hydrothermal et illustrant, la localisation des sites dans cette gamme de mélange, selon les concentrations en sulfate en fonction des concentrations en Mg.

L' $\text{H}_2\text{S}$  produit lors de la sulfato-réduction, de même que celui transporté par les remontées et circulations de fluides hydrothermaux, affectent la composition géochimique des eaux interstitielles notamment en co-précipitant avec certains éléments comme le fer (fer dissous a été mesuré à quelques nano-moles dans les eaux interstitielles) pour former des sulfures polymétalliques puis de la pyrite.

Dans les sédiments marins, la sulfato-réduction microbienne est responsable de 50% de la dégradation de la matière organique (Jørgensen 1977). Ainsi une dégradation microbienne (diagénèse microbienne) de la matière organique a lieu dans les premiers centimètres de sédiments (Figure III-20).



**Figure III-20 :** Diagrammes illustrant, par site, les concentrations en soufre total dissous et en H<sub>2</sub>S en fonction de la profondeur.

Les profils des cations majeurs (magnésium, calcium) indiquent globalement une remontée de fluide hydrothermal qui se mélange avec les infiltrations d'eaux de mer. Un traitement rigoureux des effets de diffusion, d'advection et de réactions est possible en utilisant les modèles diagénétiques largement utilisés en contexte sédimentaire (Boudreau 1997).

Théoriquement, la composition des eaux interstitielles est la résultante du mélange entre le fluide hydrothermal ascendant et l'eau de mer ainsi que des réactions diagénétiques (réactions biogéochimiques ayant lieu dans le sédiment). Dans le cas du Mg, les eaux interstitielles contenant le



moins de magnésium aurait une contribution majoritairement hydrothermale puisqu'il est admis que la concentration du magnésium (ainsi que sulfate) dans un fluide hydrothermal est de 0. Cependant, il a été montré que le magnésium peut être désorbé de certaines phases lors de l'augmentation de l'alcalinité des eaux interstitielles (von Breymann et al. 1990), des échanges de cations avec le  $\text{NH}_4^+$  formé lors de la dégradation (biotique et/ou abiotique) de la matière organique (Von Breymann and Suess 1988) ou encore du à une circulation de fluide hydrothermal dans les sédiments (Magenheim and Gieskes 1992). Il convient donc d'interpréter les profils de Mg et  $\text{SO}_4^{2-}$  avec attention afin de bien différencier les processus microbiens (réduction des sulfates) des processus purement physico-chimiques (mélanges, précipitations). Des analyses des isotopes du strontium  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  dans les eaux interstitielles sont actuellement en cours afin de permettre de quantifier précisément les différentes contributions des sources : eau de mer *versus* fluide hydrothermal (enrichi en  $^{86}\text{Sr}$ ).

Dans ces trois sites, la température du sédiment augmente avec la profondeur. Ainsi, les fluides chauds qui circulent dans les sédiments vont interagir avec la matière organique et des phases minérales au cours des réactions diagénétiques, qui auront pour conséquence la pyrolyse de la matière organique. Les produits issus de cette pyrolyse sont des hydrocarbures légers, des acides organiques à chaîne courte, de la matière organique particulaire, de l'ammonium et du méthane (Welhan 1988; Martens 1990). Ces réactions chimiques vont modifier la chimie des eaux interstitielles et les appauvrir en certains éléments dues aux réactions de précipitation. De même, les produits issus de cette pyrolyse, ainsi que les éléments apportés par les circulations des fluides hydrothermaux (éléments réduits) et par les infiltrations d'eau de mer (éléments oxydés : oxygène, nitrates) vont pouvoir être utilisés lors de processus microbiens qui à leur tour vont modifier la géochimie locale.

## 5. Conclusion

Dans les systèmes hydrothermaux du Bassin de Guaymas, plusieurs types de fluides coexistent:

- l'eau de mer ambiante,
- les fluides hydrothermaux proprement dits émis par les édifices hydrothermaux,
- les fluides diffus et panache hydrothermal qui correspond à la zone de mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer
- les eaux interstitielles qui subissent à la fois le mélange fluide hydrothermal-eau de mer et les réactions diagénétiques.

Au cours de leurs parcours, les fluides hydrothermaux vont interagir avec les éléments de l'eau de mer et des phases minérales et voir leur composition chimique se modifier : allant, selon l'élément considéré, d'un effet de mélange à des réactions de co-précipitation ou d'adsorption sur des oxydes ou des particules.

La composition des eaux interstitielles est la résultante d'interactions et de processus multiples : le mélange entre un fluide hydrothermal ascendant et l'eau de mer qui s'infiltré dans les sédiments, auxquels s'ajoutent des réactions diagénétiques, de pyrolyses de matière organiques et des activités microbiennes.

Déterminer les conditions *in situ*, notamment par l'étude de la géochimie des fluides : fluides hydrothermaux et eaux interstitielles, permet de connaître et de contraindre le biotope dans lequel vivent les micro-organismes. Ceci permet aussi, lors d'études *in situ* de déterminer la part abiotique de la part biotique lors de certains processus tels que la production de phases minérales ; mais aussi d'orienter les stratégies d'étude afin de déterminer : « Quels sont les micro-organismes présents ? » (cultures, diversité phylogénétique) et « quelles sont leurs fonctions ? » (cultures, diversité fonctionnelle, altération de phases minérales).



## **IV. Colonisation et altération des verres basaltiques *in situ***

---

1. Introduction des études

2. Méthodes utilisées

3. Etude A : Article 1 - Microbial colonization of basaltic glasses deployed on hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin

4. Etude B : Article 2 - Microbial colonization of basaltic glasses in hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin

5. Résultats complémentaires

6. Synthèse des études



## 1. Introduction des études

Dans les environnements hydrothermaux, la colonisation microbienne (procaryotes et micro-eucaryotes) de substrats minéraux a déjà été étudiée (Reysenbach et al. 2000; Corre et al. 2001; Takai et al. 2003; Alain et al. 2004; Higashi et al. 2004; Lopez-Garcia et al. 2007; Page et al. 2008; Rassa et al. 2009). De nombreux systèmes de colonisations microbiennes, tels que les : vent caps, TRAC (Titanium Ring for Alvinellid Colonization), ISCS (*in situ* colonization system), vent catheters, growth chamber et thermocouples, ont déjà été déployés sur divers sites hydrothermaux (Reysenbach et al. 2000; Corre et al. 2001; Takai et al. 2003; Alain et al. 2004; Higashi et al. 2004; Page et al. 2008; Rassa et al. 2009). Ces études ont principalement montré d'une part que le groupe des *Epsilonproteobacteria* était dominant, et d'autre part que la diversité microbienne peut varier à la fois en termes de structure et d'abondance, selon les conditions environnementales, la composition du substrat minéral et la durée de déploiement. A ce jour, l'altération biologique (microbienne) et / ou abiotique des verres basaltiques n'a été étudiée que dans des environnements oligotrophes, à faible température (3-4°C) (Mason et al. 2007; Santelli et al. 2009) ou à des températures plus élevées (entre 40°C et 60°C) (Orcutt et al. 2010; Orcutt et al. 2011). Cependant, très peu d'informations sont disponibles à propos des processus de colonisation microbienne et d'altération des verres basaltiques dans un écosystème hydrothermal riche en matière organique tels que le Bassin de Guaymas.

Ces approches de colonisation devraient permettre : 1) d'une part, d'étudier la colonisation microbienne de substrats basaltiques de différentes natures (naturels, synthétiques et synthétiques enrichis en <sup>57</sup>Fe) ; et 2) d'autre part, par comparaison des colonisateurs avec les contrôles abiotiques, d'étudier l'impact biotique et abiotique sur l'altération des verres et sur la production de précipitations minérales secondaires.

## 2. Méthodes utilisées

Afin d'étudier la colonisation et l'altération de substrats basaltiques, deux types de modules de colonisation ont été utilisés. Chaque module était constitué de plusieurs colonisateurs dont certains étaient des témoins abiotiques. Les colonisateurs étaient remplis de différents types de verres basaltiques : soit de basaltes naturels, de basaltes synthétiques ou de basaltes synthétiques enrichis en <sup>57</sup>Fe. Le module de **Géomicrobiologie**, a été déployé à la surface de sédiments hydrothermaux recouverts de tapis microbiens blancs et orange (Mat Mound, marqueur BIG 1) pendant 24 jours. Les modules **AISICS** 1 et 2, eux, ont été déployés dans ces mêmes sédiments hydrothermaux recouverts de tapis microbien pendant respectivement 22 et 8 jours. La composition

des communautés microbiennes a été analysée par approche moléculaire basée sur des analyses phylogénétiques de séquences ADN du gène codant pour l'ARNr 16S et de gène de fonction *dsrAB* ((di)sulfite reductase) et *mcrA* (sous unité alpha de la methyl-coenzyme M-reductase) qui codent respectivement pour des gènes clés impliqués dans la sulfato-réduction et dans la méthanogénèse/méthanotrophie anaérobie (l'étude des gènes de fonction n'a pu être réalisée qu'à partir des échantillons issus des modules AISICS). Aussi, l'influence du substrat (uniquement pour le module de géomicrobiologie), de la durée de déploiement, de la profondeur et de la géochimie de fluide ont été considérés *via* une analyse statistique basée sur la présence des OTU en fonction de leurs habitats (substrat, modules, profondeur) et de leur positions phylogénétiques. L'altération des verres a été étudiée par deux approches : une approche de microscopie (microscopie électronique à balayage MEB) et une approche de spectroscopie RAMAN. La composition chimique des fluides : eau de mer environnante et fluide collecté par le système d'échantillonnage de fluide du module AISICS, ont aussi été analysés afin de déterminer la contribution et l'influence du fluide hydrothermal sur la colonisation microbienne.

Ces approches ont permis d'établir des corrélations plus ou moins solides entre les conditions environnementales et l'établissement des communautés microbiennes puis de mettre en évidence un probable rôle des micro-organismes dans la formation des nano-cristaux de pyrite et de barytine.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux sont présentés et discutés dans deux articles. Le premier, est un article en préparation et porte sur la colonisation du module de Géomicrobiologie déployé à la surface du sédiments. Le second qui présente la colonisation et l'altération des verres basaltiques des modules AISICS déployés dans le sediment, est un article en révision pour un numéro spécial du Journal Frontier in Microbiology.

### 3. Etude A : Article 1- Microbial colonization of basaltic glasses deployed on hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin

#### Authors & Affiliations:

Nolwenn Callac<sup>abcd</sup>, Céline Rommevaux-Jestin<sup>e</sup>, Olivier Rouxel<sup>df</sup>, Françoise Lesongeur<sup>abc</sup>, and Anne Godfroy<sup>abc</sup>

<sup>a</sup>Université de Brest, UEB, IUEM, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197 place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France.

<sup>b</sup>Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, 29280 Plouzané, France.

<sup>c</sup>CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197, 29280 Plouzané, France.

<sup>d</sup>Université de Brest, IUEM, Domaines Océaniques UMR6538, Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané, France.

<sup>e</sup>Laboratoire Géobiosphère Actuelle et Primitive, IPGP, Sorbonne Paris Cité, Université Paris Diderot, UMR 7154 CNRS, 75005 Paris, France.

<sup>f</sup>Ifremer, Laboratoire de Géochimie et de Métallogénie, 29280 Plouzané, France.

E-mail: [anne.godfroy@ifremer.fr](mailto:anne.godfroy@ifremer.fr)

#### Correspondance:

Dr. Anne Godfroy

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes – UMR 6197

IFREMER – Centre de Brest

BP70

29280 Plouzané

France

**Running Title** = Microbial colonization of basaltic glasses on hydrothermal organic-rich sediments



**Abstract**

Oceanic basalts host diverse microbial communities with various metabolisms involved in C, N, S and Fe biogeochemical cycles and in mineral alteration through redox reactions. In order to study microbial colonization of basaltic glasses and their biotic/abiotic weathering, a geomicrobiology colonization module was deployed on seafloor of hydrothermal deep-sea sediments at the Guaymas Basin, for 24 days. The module contained 6 colonizers filled with different basaltic glasses and including sterile controls. For each colonizer the phylogenetic diversity of bacterial and archaeal communities was explored using molecular approach. A large archaeal and bacterial diversity, independent of the type of substrata, was highlighted. This high diversity seems to be driving by hydrothermal fluid diffusing and by various micro-habitats in all colonizers, including anaerobic niches, created by mixing between the hydrothermal fluid and the seawater. Also, in all colonizers, the occurrence of anaerobic, thermophilic and hydrothermal micro-organisms, suggest in the first hand a dispersal role by hydrothermal fluid circulation and also, in the other hand that the hydrothermal systems are windows to the subsurface hydrothermal biosphere. In addition, within the Bacteria, new clusters, which confined with other unclassified environmental sequences and far from cultivated representatives, increased the current view of microbial diversity in hydrothermal systems. Besides dissolution pits observed on the surface of all basaltic glasses, alteration products were not formed during the experiments. Accumulations of biogenic debris and aggregation of carbon-rich matter associated with crystals of pyrite were also observed. According to the local environmental conditions of deployment, this study gives new highlights into the colonization steps of volcanic rock substrates and therefore provides further insights into microbial succession and distribution in hydrothermal systems.

**Keywords** = *in situ* colonization module / microbial colonization / organic-rich sediment affected by hydrothermal fluid / basalt glasses / microbial mat / glass alteration / Guaymas basin

**1. Introduction**

The deep-sea seafloor host a wide range of microorganism in term of species, metabolic functions and with respect to their requirement and tolerance in salt concentrations, pH and in temperature, in a wide range of habitats. Some of them are expanded as: sediments, basaltic crust, other are focused as hydrothermal systems, deep-sea volcanoes, brine lacks and some are more restricted and scattered as whales and woods sinking, for broad microorganisms. Among these marine habitats, the sub-seafloor basaltic crust represents the largest habitable zone by volume on Earth. Owing the wide surface of crust in contact with deep water, its alteration by seawater is one of the major processes controlling the global fluxes of many elements at mid-oceanic ridges and ridge flanks (e.g. (Staudigel

and Hart, 1983 ; Wheat and Mottl, 2000). This weathering had also deeply affected the mineralogical and chemical composition of the former oceanic crust (Alt, 1995). In addition, it has been demonstrated that seafloor basalts harbor a wide diversity of microbial community either on rock surface (epilithic microorganisms) or inside (endolithic microorganisms) (Lysnes et al., 2004 ; Mason et al., 2007 ; Santelli et al., 2009). Thus, microorganisms are also susceptible to take a role in the oceanic crust alteration (Bach and Edwards, 2003), especially at the interface between seawater and crust, where they could oxidize sulfur and iron reduced species from basalt with dissolved oxygen and nitrate from seawater (Mason et al., 2008 ; Santelli et al., 2008b ; McLoughlin et al., 2010 ; Orcutt et al., 2011b). By their metabolism, microorganisms could promote mineral dissolution or precipitation (Ehrlich, 1999 ; Edwards et al., 2003a ; Holden and Adams, 2003 ; Edwards et al., 2005 ; Houghton et al., 2007 ; Houghton and Seyfried Jr, 2010). Even if, to date, no direct evidence of (micro-)biological alteration are available, many clues including: conspicuous alteration textures of volcanic glass (Fisk et al., 1998 ; Torsvik et al., 1998 ; Furnes et al., 2001 ; Einen et al., 2006); the high C, N and P contents in altered glass (putative DNA fingerprint) (Thorseth et al., 1992); as well as light isotopic composition of C and S in altered basalt (highlighted a potential organic carbon cycling and sulfate reduction within volcanic basement) (Furnes et al., 2001 ; Rouxel et al., 2008); together tend to prove a biological involvement.

Moreover, among the marine habitats, seafloor hydrothermal chimneys and hydrothermally-affected sediments are complex environments with highly diverse and active microbial communities (Karl, 1995 ; Schrenk et al., 2003 ; Edwards et al., 2005 ; Nakagawa et al., 2006 ; Page et al., 2008 ; Takai et al., 2008 ; Nunoura et al., 2010 ; Amend et al., 2011 ; Flores et al., 2011) which are fueled by strong physical and chemical gradients in the mixing zone between oxygenated cold seawater and reduced metal-rich high temperature hydrothermal fluid. Like for the oceanic crust, the hydrothermal systems provide specific biotope hosting a wide range of microorganisms involved in key biogeochemical reactions related to carbon, sulfur, nitrogen and iron cycles (Burggraf et al., 1990 ; Slobodkin et al., 2001 ; Kashefi et al., 2002 ; Teske et al., 2002 ; Dhillon et al., 2003 ; Francis et al., 2007 ; Byrne et al., 2009 ; Teske et al., 2009 ; Yamamoto and Takai, 2011 ; Biddle et al., 2012 ; Bowles et al., 2012). One of hydrothermally-affected sediments is the Guaymas Basin, located in the Gulf of California (Mexico). The Guaymas Basin is a particular site covered by a thick layer of organic and diatomaceous-rich sediments (100-500m) with rapid sedimentation rate (up to 2 mm per year) due to both important biological productivity in the surface water column and terrigenous input from rivers (Schrader, 1982 ; Simoneit and Lonsdale, 1982 ; Von Damm et al., 1985b ; De la Lanza-Espino and Soto, 1999 ; Dean et al., 2004b). At the Southern Trough, one of the accretion ridges of the Guaymas basin, the seafloor is exposed to the hydrothermal activity (Lonsdale and Lawver, 1980 ; Jenden, 1982 ; Lonsdale and Becker, 1985). The circulation of hydrothermal fluids results in both formation of

sulfide and carbonate-rich chimneys and in diffusion in hydrothermal sediments. Diagenetic interactions between the ascending high temperature hydrothermal fluids and sediments result in the pyrolysis of organic matter and precipitation of metal-sulfide minerals in subsurface (e.g. pyrrhotite FeS). Products of pyrolysis include light hydrocarbons, short-chain organic acids, particulate organic matter, ammonia and methane (Simoneit, 1985 ; Bazylinski et al., 1988 ; Welhan, 1988 ; Whelan et al., 1988 ; Didyk and Simoneit, 1990 ; Martens, 1990) which provide unique conditions for uncommon and diverse microbial life (Teske et al., 2002). This microbial communities of hydrothermally active sediments covered by microbial mats and microbial mat composition at Guaymas Basin have been extensively studied in term of physiological and phylogenetical diversity using both cultural and molecular approaches (Edgcomb et al., 2002 ; Teske et al., 2002 ; Dhillon et al., 2003 ; Dhillon et al., 2005 ; Teske, 2010 ; Biddle et al., 2012 ; Bowles et al., 2012 ; McKay et al., 2012).

The colonization of hydrothermal chimneys or their vicinity has already been studied in diverse localizations (various site on the Mid-Atlantic Ridge, East Pacific rise, Juan de Fuca Ridge, Okinawa Trough, the Guaymas Basin or some Seamount: Suiyo Seamount and Loihi Seamount), using various systems (eg vent caps, TRAC, ISCS, vent catheters, growth chamber, thermocouple, AISICS module) in order to assess both prokaryotic and micro-eukaryotic diversity (Reysenbach et al., 2000 ; Corre et al., 2001 ; Nercessian et al., 2003 ; Takai et al., 2003 ; Alain et al., 2004 ; Higashi et al., 2004 ; Page et al., 2008 ; Rassa et al., 2009). Thus, all these systems, used to investigate microbial colonization using molecular and/or cultural approaches and sometimes mineral alteration texture, allow to obtain a better insight into factors that can influence microbial colonization processes. Usually, they underlined that the *Epsilonproteobacteria* were dominants, with also the evidence of new clusters and new species isolation. They also highlighted that the microbial diversity can vary in their structure and size, depending on the sites, the localization on mineral deposits (inside *versus* outside), the age of the chimneys, the temperature and the deployment duration. Finally, coupled to the microbial colonization, particles rock substrates alteration was studied using FLOCSs (Flow-Trough Osmo Colonization Systems) deployed directly in boreholes (Orcutt et al., 2010 ; Edwards et al., 2011 ; Orcutt et al., 2011a) or using AISICS modules deployed in hydrothermally-active deep-sea sediment of the Guaymas Basin (Callac et al., submitted).

Microbial or/and abiotic alteration of basaltic glasses, were essentially studied at low (i.e. 3-4°C) (Mason et al., 2007 ; Santelli et al., 2009) to medium temperature (i.e. 40°C and 60°C) (Orcutt et al., 2010 ; Orcutt et al., 2011a) in poor organic-matter and volcanic environment (Mason et al., 2007 ; Santelli et al., 2008a ; Santelli et al., 2009).

Nevertheless, little is known about microbial colonization and basaltic glass alteration under hydrothermal conditions, on seafloor of organic-rich sediment affected by fluid diffusion.

Thus, the present study aims to explore microbial colonization, microbial community structure, and putative (bio)-alteration of basaltic glasses at Guaymas Basin, on a sediment-hosted hydrothermal system covered by conspicuous microbial mat affected by hydrothermal.

110 For that, the Geomicrobiology module containing basaltic substrata were deployed for 24 days on sediments underlying by microbial mat and exposed to hydrothermal conditions in the Guaymas Basin. As, basaltic glass substrates exposed to *in situ* conditions may be affected by both biological and inorganic (i.e. fluid/rock) interactions, colonization experiments were systematically perform in the presence of to abiotic controls

115 The samples were analyzed for microbial diversity based on 16S rRNA. In addition, glass alteration and secondary mineral precipitation were investigated in both biotic and abiotic conditions and dissolved major and trace elements as well as hydrogen sulfide concentration in surrounding seawater were analyzed.

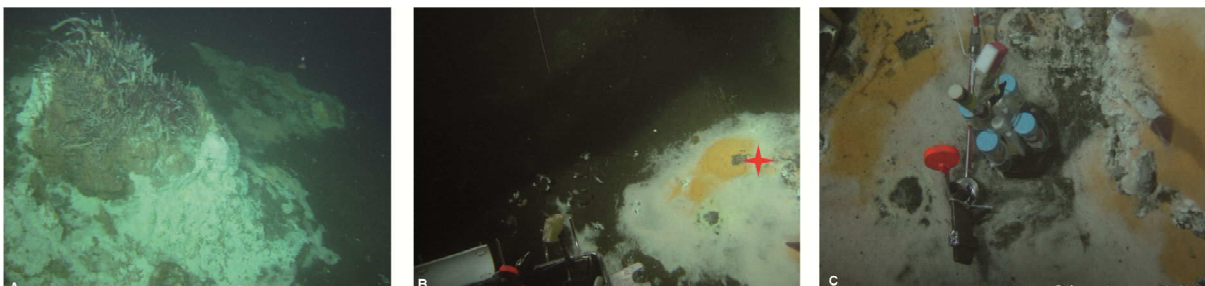
## 2. Material and Methods

120

### 2.1. Site description

Deployment was conducted by the research submersible *Nautilus* (Ifremer) during the BIG oceanographic cruise (RV *L'Atalante*) that took place in the Guaymas Basin in June - July 2010. Geomicrobiology module deployment was done at the Mat Mound site (N27°00.388, W111°25.471; 125 2004 m depth, BIG1 Marker) on the Southern Trough. This site is composed of a small hydrothermal mound made by sulfide and carbonate minerals emerging the sediment affected by hydrothermal fluid circulation. The mound and the surrounding sediments were widely covered by thick white and orange microbial mats of autotrophic, sulfur-oxidizing, filamentous *Beggiatoa* spp. (Nelson et al., 1989b ; Gundersen et al., 1992). Associated macrofauna is dominated by dense Polychaete worms' bushes (*Riftia* spp. from Siboglinidae family) at the top of the mound and sometime stuck in bacterial mats (Figures 1). Polychaete worms from *Alvinellidae* and *Polynoidae* families were also observed.

130



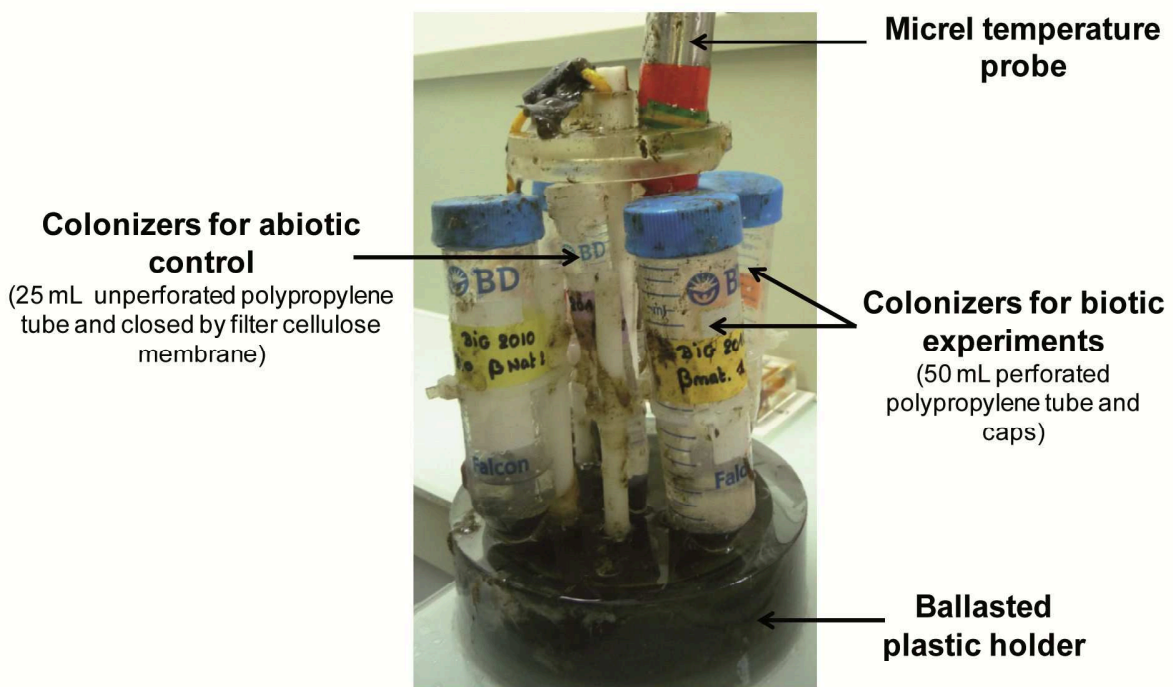
**Figure 1:** Photographs of the Mat Mound site, (A) global view; (B) the deployment site the Geomicrobiology module; (C) the deployed module (photo were taken with the submersible *Nautilus* during the BIG cruise, Dive 1745)

135

The presence of white and orange microbial mats and the parallel deployment of Autonomous In Situ Instrumented Colonization Systems (AISICS; Callac et al. submitted) inside sediments percolated by hydrothermal fluids with a temperature gradient of 3°C by centimeters, has guided the choice of site for the surface Geomicrobiology colonizers deployment during 24 days in the white bacterial mat.

**2.2. Description of the Geomicrobiology module : substrata, instrumental setting and deployment**

The module consists of a ballasted plastic holder hosting six incubators: four biotic colonizers and two abiotic controls, distributed circularly around a Micrel temperature probe (Figure 2). Colonizers for biotic experiments are composed of 50 mL polypropylene Falcon™ tubes with caps (BD Falcon™ Conical Tubes), both perforated with 1 mm holes. Colonizers for abiotic control are made up of 25 mL polypropylene Falcon™ tubes (BD Falcon™ Conical Tubes) where the cap is replaced by a 0.22 µm filter cellulose membrane (Millipore) (Figure 2).



150

**Figure 2:** Photograph of the Geomicrobiology module showing its different parts.

Two biotic colonizers, were filled with a synthetic basaltic glass of MORB composition one doped with <sup>57</sup>Fe (noted G1 and G5 respectively), and the others with natural basaltic glass from the Atlantic Lucky Strike site (noted, samples G3 and G4). The two abiotic colonizers were filled by a synthetic basaltic glass and a natural basaltic glass respectively.

155

In order to access the variations of environmental conditions, temperature was recorded all along the deployment; the measurement frequency of temperature was 30 seconds.

The synthetic basaltic glasses were prepared using a mix of oxides and carbonates powders (SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, MgCO<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub>) whose proportion in weight % respects the composition of a MORB type basaltic glass. Powder was dried in a drying oven at 150°C during at least 24 hours. The mixture was homogenized by crushing and mixing in an agate mortar. The preparation is placed in a platinum crucible weighed beforehand and after filling to check the synthesis. Two different ovens have been used: a Carbolite muffle furnace 1700 reaching temperatures up to 1600°C and hand quenching at the end of synthesis for ambient atmosphere synthesis used to synthesize the <sup>57</sup>Fe doped glass; a vertical furnace, mounted at Geomaterials laboratory (Univ. Marne La Vallée), with automatic quench system, for the syntheses under controlled atmosphere (H<sub>2</sub>) used to synthesize the synthetic glass. The syntheses were carried out according the following melting scheme: a temperature ramp up to 600°C for 30 min or 2h, a bearing of decarbonation at 600°C for 45 min or 1h, a temperature gradient of up to 1600°C for 45 min or 3h, a bearing for melting at 1600°C for 60 min and then the immediate quenching for ambient or controlled synthesis respectively. The natural basaltic glasses Bat09-ROC22 sample was recovered during the 395 VICTOR dive during Bathyluck cruise (2009) in the Lava Lake (Lucky Strike site, MAR). Basaltic substrates were crushed in an agate mortar to obtain pieces less than 2 mm in size, cleaned in an ultrasonic bath in ethanol, then air-dried and stocked in Falcon™ tubes.

The perforated Falcon™ tubes and caps used for biotic experiment were rinsed five times with deionized water (MilliQ™ 18mΩ) before use in order to eliminate dusts and deposits due to holes drilling. Then they were filled with approximately 10 percent in volume by basaltic glass, and then sterilized by autoclaving (30 min. at 121°C). All plastic parts of the module were rinsed several times with deionized water (MilliQ™ 18mΩ), cleaned up using Desibac HPC solution, rinsed with Ethanol 96% and then were UV-treated (more than 1h). After sanitizing steps, mini-colonizers were placed on the module aseptically under laminar flow hood, and then, UV-treated (more than 1h). The microbiological insulated box, allowing to deployment and recovery of module without contamination by the column seawater, was also cleaned (using Desibac HPC and Ethanol 96%) and filled by sterilized seawater before the module was set inside either for deployment or recovery

### 2.3. Sample processing

On board, immediately after recovery, samples from each colonizer were aseptically divided into 5 fractions under laminar flux chamber, then treated and stored as follows. Two fractions were processed for molecular diversity analysis: some pieces of substrates were directly frozen at -80°C (fraction 1) and at -20°C in a 2 mL micro-tube containing 1mL 96% ethanol (fraction 2). The other 3

fractions were conditioned for microscopy and RAMAN analysis: i) directly at -20°C for SEM and RAMAN analysis; ii) fixed for 2 h in formaldehyde 2% (prepared with sterile seawater), rinsed 3 times with sterile seawater and stored in 1 mL of 96% ethanol and stored at -20°C; or iii) directly stored in 1 mL of 50% ethanol – PBS 1X solution (1 : 1) and stored at -20°C, for SEM and FISH analysis.

#### 2.4. DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from basaltic glasses using the FastDNA® Spin Kit for Soil (Bio101 Systems, MP Biomedicals), following the protocol modified by Webster and collaborators (Webster et al., 2003). DNA extraction were independently performed on both basalt glasses stored directly at -80°C or in 96% ethanol at -20°C, then extraction products were pooled, prior to PCR amplification.

#### 2.5. 16S rRNA gene and functional genes amplification

The 16S rRNA gene was amplified using the specific primers combination as A8F (5'-CGGTTGATCCTGCCGGA-3') and ARC915R (5'-CTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3') (Casamayor et al., 2000 ; Kolganova et al., 2002) for *Archaea* and E8F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') with U907R (5'-CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT-3') (Lane et al., 1985 ; Lane D, 1991) for *Bacteria*. All amplification reactions were performed in 50 µl reaction mixture containing: 10 µL of 5X GO Taq® DNA polymerase buffer (Promega), 5 µL of 25 mM MgCl<sub>2</sub> solution (Promega), 1 µL of 10 mM dNTPs (Eurogentec), 0.2 µL of each primers at 100 µM and 0.24 µl of 5 U.µL<sup>-1</sup> GO Taq® DNA polymerase (Promega). All amplifications were realized in 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing for 1 min 30 s at 58°C or 52°C for the archaeal or bacterial 16S rRNA gene respectively, follow by an extension at 72°C for 7 min. All PCR reactions were carried out using a GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems) thermal cycler, and PCR products were visualized using gel electrophoresis.

#### 2.6. Cloning, sequencing of 16S rRNA genes and phylogenetic analysis

Prior to cloning, positively amplified PCR products were gel purified using NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel) according the manufacturer's instructions.

All the 16S rRNA clone libraries were carried out with the TOPO XL cloning kit (Invitrogen) and functional gene clone libraries with the pGEM®-T cloning kit (Promega), both following the manufacturer's recommendations. Positive clones were processed for sequencing at GATC Biotech (Konstanz, Germany) using M13F primers. Sequences were imported into the BLAST nucleotide search program through the National Center for Biotechnology Information (NCBI - website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) to find closely related sequences within the GenBank database.

The clone library of 16S rRNA sequences was aligned, edited and analyzed using Bioedit version 7.1.3 software. Phylogenetic trees were constructed using the MEGA 5 program (Kumar et al., 2008). The

robustness of inferred topologies was tested using 1000 bootstrap resampling of the trees calculated on the basis of neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987) with Kimura two-parameter correction matrix (Kimura, 1980). All sequences presenting more than 97% similarity were considered to belong to the same phylotype (OTU) and were clustered together in the alignment (Schloss and Handelsman, 2004). The sequence data reported in this study have been submitted to GenBank nucleotide sequence databases under accession number XXX to XXX and XXX to XXX for respectively *Archaea* and *Bacteria* gene sequences.

## 2.7. Statistical analysis of diversity pattern

The diversity pattern between each sample was analyzed using the frequency of 16S rRNA gene for each archaeal or bacterial OTU obtained in each sample clone libraries. For that, the matrix was realized after making a grid to determine which OTU is present in which sample and in which proportion (in percentage). The matrixes were then used to build similarity matrixes based on the Jaccard coefficient, using the vegan package within the R package version 1.15-1 (Oksanen et al., 2008 ; R Development Core team, 2010). Then, the dendrograms were obtained using the ward agglomeration method within the hierarchical clustering package of the R software.

To examine statistically the influence of the substrata type on both archaeal and bacterial diversity, we used the UniFrac computational tool (<http://bmf2.colorado.edu/unifrac/>) (Lozupone et al., 2006). For that, the matrix was realized after making a grid to determine which phylotype is present in which habitat (sample) and in which proportion (by number of clone). The phylogenetic trees of our archaeal and bacterial sequences were realized using the neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987) with Kimura two-parameter correction matrix (Kimura, 1980), and 1000 bootstrap resampling (a bacterial sequence was used as outgroup for the archaeal tree or inversely an archaeal sequence was used as outgroup for the bacterial tree). Then, the habitats were clustered using the jackknife environment clusters analysis tool with 100 permutations.

## 2.8. Scanning electron microscopy: SEM

Scanning electron microscopy (SEM) was carried out at the “Service Commun de Microscopie Electronique à Balayage” (UPMC, Paris, France) using a Zeiss SUPRA® 55 VP Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM). The variable pressure capability (2–133 Pa) enables to examine both non-coating and Au or C coating samples. Three secondary electron detectors (Everhart-Thornley for high voltage mode, VPSE used for variable pressure mode and InLens for low voltage mode) and backscattered electron detector enable acquiring high-resolution imaging (0.8 nm to 2 nm) from surface and relative composition respectively, with analytical conditions varying from 3-30 kV, 10 pA-



1 nA, 30-133 Pa and 3.3-7.2 mm working distance. We also performed elemental microanalysis by using an Energy Dispersive X-ray detector (PGT) installed on the SEM chamber.

## 2.9. RAMAN

265 RAMAN data were obtained at IPGP (Paris, France) on resin free samples with a Renishaw InVia spectrometer using the 514 nm wavelength of a 20 mW argon laser focused through an Olympus BX61 microscope with x50 objective (numerical aperture 0.75). This configuration yields a planar resolution close to 1  $\mu\text{m}$ , and the laser power delivered at the sample surface was 0.5 mW with integration times of 100 s, well below the critical dose of radiation that can damage the  
270 carbonaceous matter. A holographic grating with 1800 grooves. $\text{mm}^{-1}$  dispersed light and a RENCAM CCD (charge-coupled device) detector analyses the signal. The RAMAN spectra were acquired then treated using the WiRE 3.3 Renishaw software.

## 2.10. Geochemical deep-seawater analysis

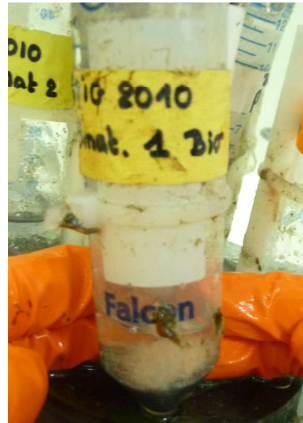
275 Deep-seawater surrounding the deployment site was collected at the end of the deployment (before recovery of the module) using a couple of Titanium syringe (Von Damm et al., 1985a), Samples named 1768-TiD and 1768TiG were sub-sampled and stored as follows. For the analysis of dissolved major and trace elements, approximately 20 mL of sample were filtered through 0.22 $\mu\text{m}$  (Sterivex<sup>TM</sup>, Millipore<sup>®</sup>) membrane and stored unacidified on board at 4°C; for hydrogen sulfide quantification, 10  
280 ml were filtered through 0.45 $\mu\text{m}$  (Sterivex<sup>TM</sup>, Millipore<sup>®</sup>) membrane and precipitated as ZnS in 25 mL evacuated septum vials containing 0.1g of Zinc Acetate (Sigma-Aldrich) and stored at 4°C. Concentration of major elements was measured using Ultima 2 Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometry (ICP-AES, Ultima 2, Horiba JobinYvon) and the concentration of trace elements using High-Resolution ICP Mass Spectrometer (HR-ICP-MS, Element 2, ThermoFisher), both  
285 operated at the Pole Spectrometry Ocean Brest (PSO, Brest). Prior to elemental analysis, samples were acidified at least 1 month in advance at 0.28 mol.L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> using concentrated ultra-pure reagent grades. Solutions for ICP-AES and ICP-MS analysis were diluted 100-fold with 0.28 mol.L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> using 2-stages sub-boiled distilled acid. Three water solution standards: Slew 3, Cass 4 and Nass 5 were also prepared along with the samples. For both ICP-AES and ICP-MS analysis, two sets of  
290 calibrating standards were used by adding multi-elemental standard solutions either with pure MilliQ<sup>TM</sup> water or with 100-fold diluted Cass 4 in 0.28 mol.L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. Dissolved hydrogen sulfide was measured using spectrophotometric method using the protocol described by Cline (Cline, 1969).

295

### 3. Results

#### 3.1. Macroscopic description

300 The Geomicrobiology colonization module was deployed at Mat Mound site, on a thick layer of white microbial mat beside which few *Riftia* tubes were observed. At the end of the deployment time, a thin coat of similar looking microbial mat was observed in all biotic colonizers and was higher on G3 colonizer filled with natural basaltic glass (Figure 3).



305 **Figure 3:** Photograph of one of the colonizers of the Geomicrobiology module showing the mat inside the colonizer G3 filled with natural basaltic glass (photo was taken onboard just after recovering).

Also both the holder module and the outer walls of colonizers were embedded in a conspicuous gelatinous matrix consisting of spherically shaped masses resembling to the matrix previously described by Grunke et collaborator (Grunke et al., 2010) (Figure 4) which could not be recovered and sampled, on board.

310



**Figure 4:** Photograph of the Geomicrobiology module during the dive 1763 (photo was taken with the submersible Nautilie during the BIG cruise (Dive 1745)).

315

### 3.2. Microbial diversity

For each colonizer, a low quantity of DNA was extracted and a relative low number of clones could be obtained and analyzed (around 50 and 45 per samples for *Archaea* and *Bacteria* respectively). In all samples 16S rRNA gene sequences, belonging to *Gammaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Thaumarchaeota* formerly known as MGI (Marine group I) and *Thermococcales* (both *Thermococcus sp.* and *Palaeococcus sp.*) were retrieved and in lesser proportion sequences belonging to CFB phylum (*Flexibacter-Bacteroides-Cytophaga*), MBG-D (Marine Benthic Group-D) and *Desulfurococcales* (Figures 5 and 6 and Fig S Supplementary data).

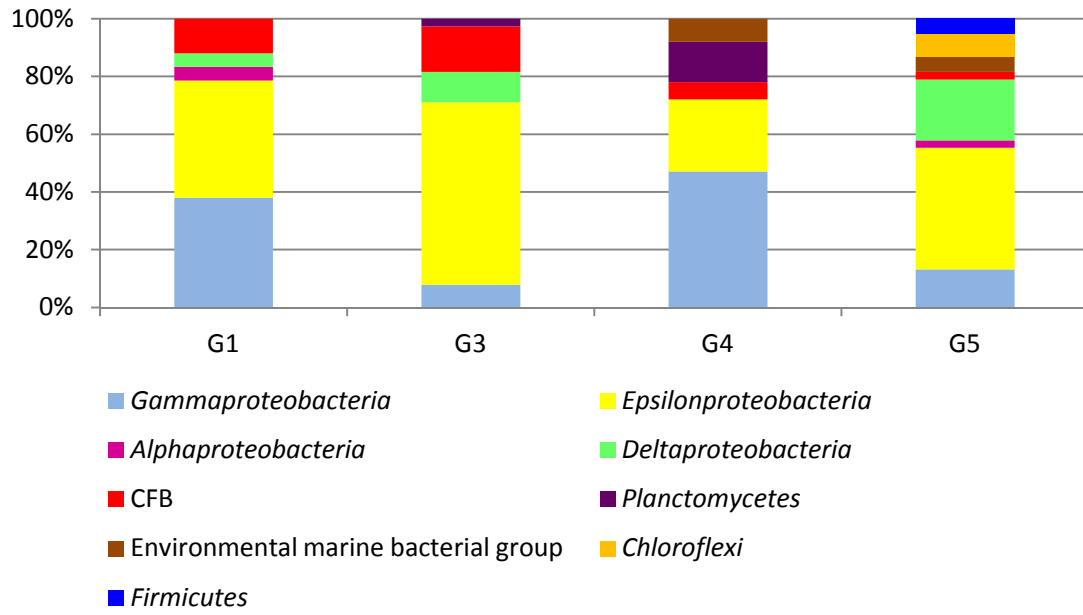
325 Within *Gammaproteobacteria*, numerous sequences were related to *Beggiatoa sp.*. Concerning the *Archaea*, additional sequences amplified were close to MGII (Marine Group II), *Archaeoglobales* (*Archaeoglobus sp.*), *Methanococcaceae*, ANME-1a (anaerobic methane oxidizers group 1a), *uncultured Thermoproteales* and to MBG-C (Marine Benthic Group-C).

In the G1 colonizer (filled with synthetic basaltic glasses), additional bacterial sequences affiliated to *Alphaproteobacteria* and to *Deltaproteobacteria* were retrieved.

330 In the G5 colonizer (synthetic <sup>57</sup>Fe doped basaltic glasses), additional sequences were affiliated to *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* and to a uncultivated bacteria for the *Bacteria* and to MBG-C, *uncultured Thermoprotei*, MCG (Marine Group G), *uncultured Crenarchaeota*, DHVE-2 (Deep-sea Hydrothermal Vent *Euryarchaeota* group 2), ANME-2c and to *uncultured Euryarchaeota* for the *Archaea*.

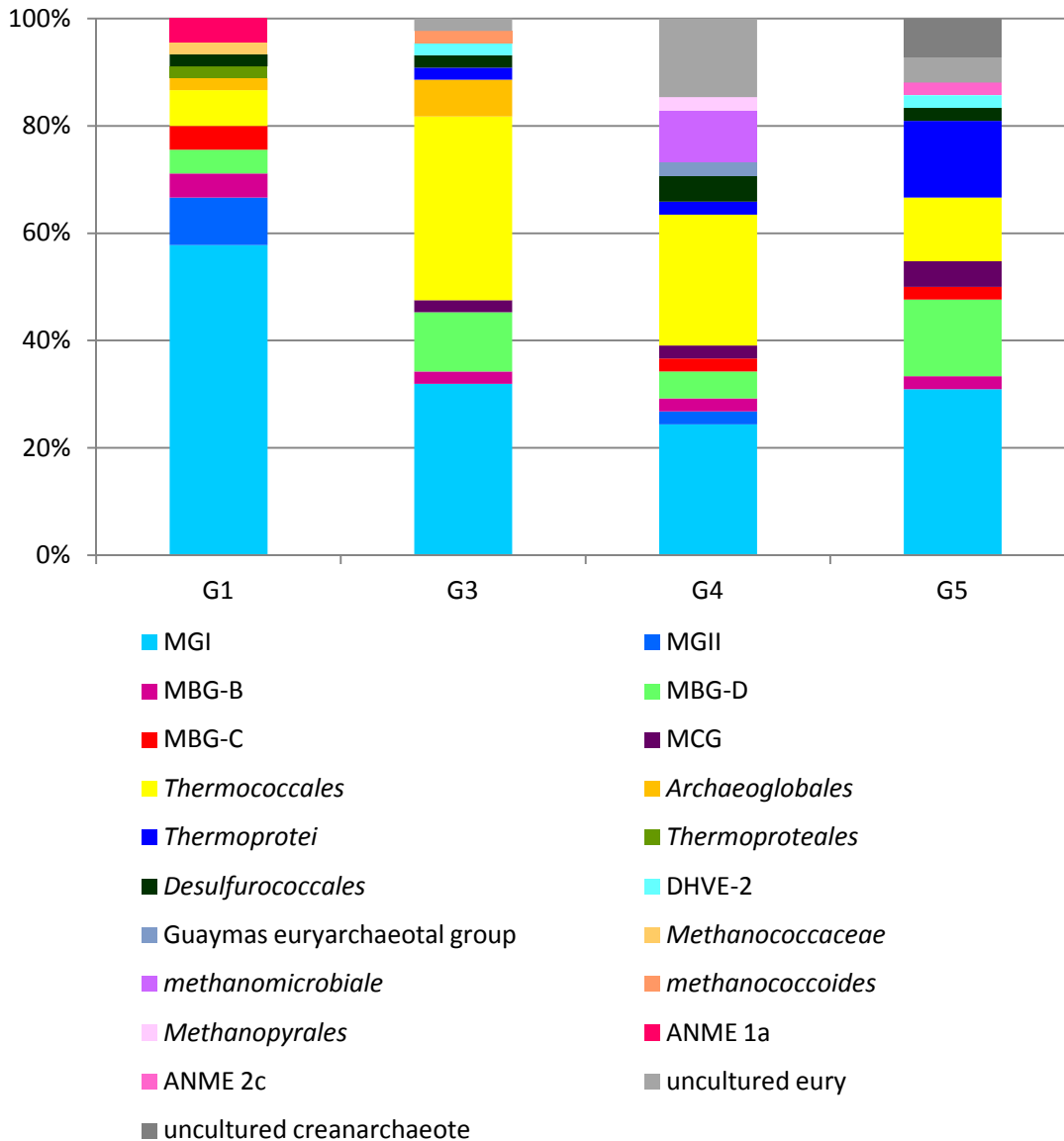
On G3 colonizer, natural basaltic glasses sample, the other bacterial sequences were related to *Deltaproteobacteria* and to *Planctomycetes*; the other archaeal sequences were affiliated to *Archaeoglobales* (*Archaeoglobus sp.*), DHVE-2, *Methanococcoides*, *uncultured Euryarchaeota*, MCG and to *uncultured Thermoprotei*.

340 On G4 colonizer, *Planctomycetes* Guaymas Bacterial group 2 (a new cluster of uncultivated bacteria) as well as MG II, *Methanomicrobiale*, *Methanopyrales*, Guaymas *Euryarchaeotal* group, *uncultured Euryarchaeota*, MBG-C, *uncultured Thermoprotei* and MCG sequences were detected.



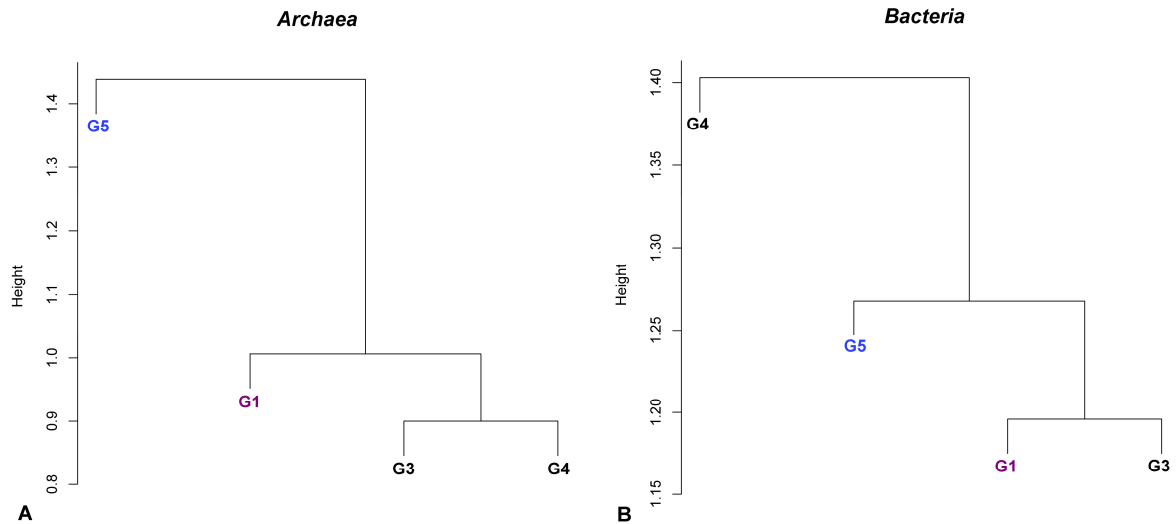
345

**Figure 5:** Repartition of the bacterial community based on the frequency of archaeal or 16S rRNA gene in clone libraries in the different colonizers (sample G1 filled with synthetic basaltic glasses; G3 and G4 with natural basaltic glasses; and G5 with synthetic <sup>57</sup>Fe doped basaltic glasses)



350 **Figure 6:** Repartition of the archaeal community based on the frequency of archaeal 16S rRNA gene in clone libraries in the different colonizers (sample G1 filled with synthetic basaltic glasses; G3 and G4 with natural basaltic glasses; and G5 with synthetic <sup>57</sup>Fe doped basaltic glasses)

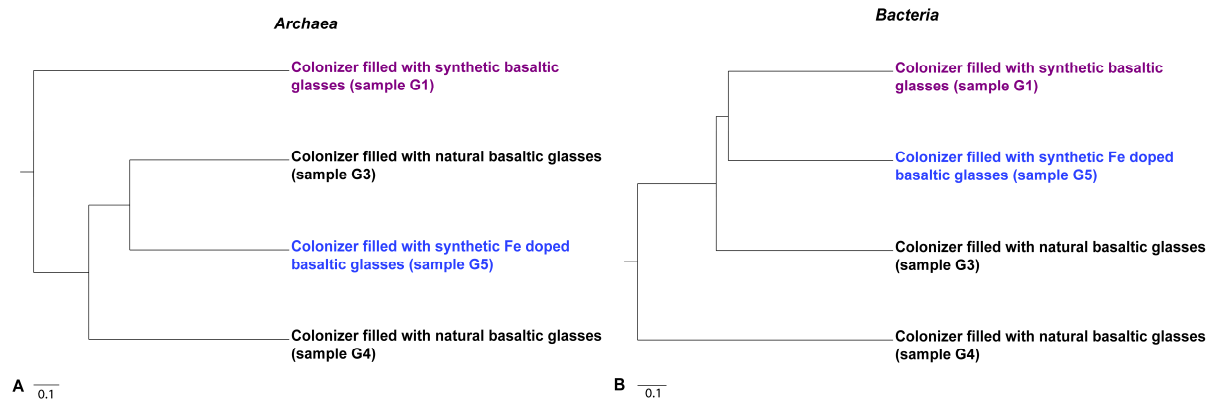
The archaeal diversity pattern was analyzed by clustering using the Jaccard coefficient and the resulting dendrogram grouped samples G3 and G4 (both filled by natural basaltic glasses) (Figure 7), while for bacterial, the dendrogram clustered G1 (synthetic basaltic glasses) and G3 (natural basaltic glasses) (Figure 7).  
355



**Figure 7:** Dendrograms showing the archaeal and the bacterial diversity patterns diversity analyzed using the Jaccard coefficient. Sample G1 was filled with synthetic basaltic glasses; G3 and G4 with natural basaltic glasses; and G5 with synthetic <sup>57</sup>Fe doped basaltic glasses.

360

Statistical jackknife environment clusters trees, obtained with the archaeal sequences showed no owing the substrata (Figure 8) contrary to this observed with the Jaccard coefficient. For the *Archaea*, showed no correlation according the substrata was observed (Figure 8).



365

**Figure 8:** Jackknife environment cluster tree (made using the weighted UniFrac metric, based 16S rRNA gene sequences determined by neighbour-joining tree) showing the phylogenetic relationships among the (A) archaeal lineages and (B) bacterial lineage recovered in the module according the type of substrata.

370

### 3.3. Microscopy and spectrometry analysis

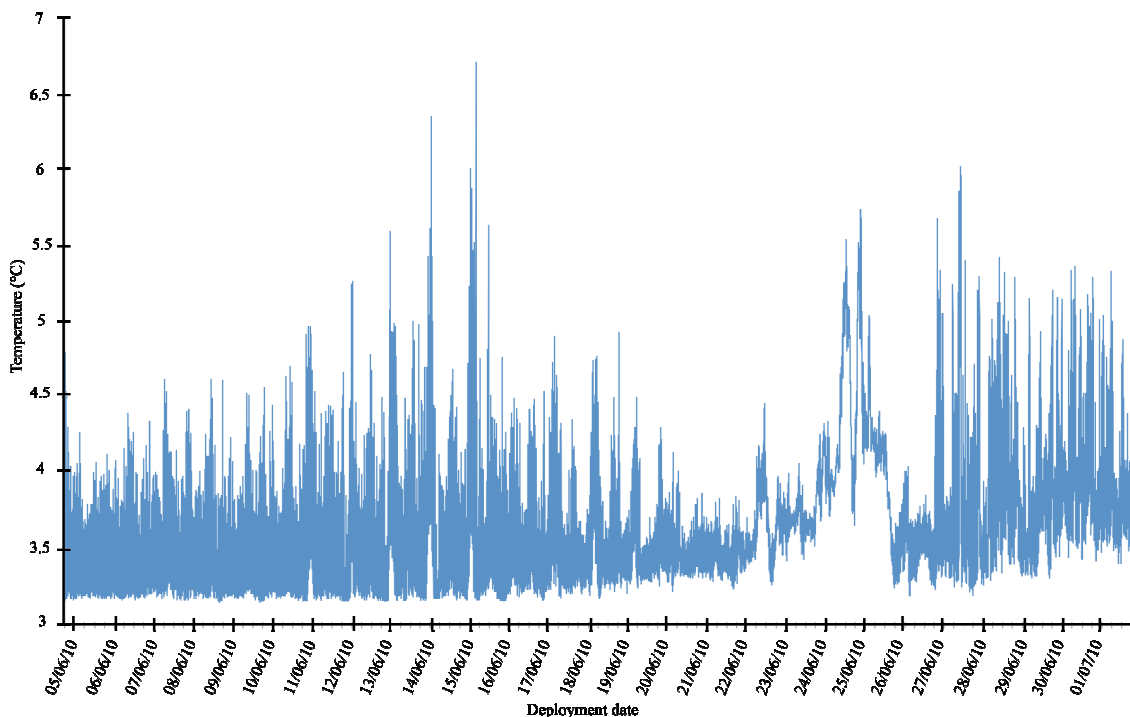
Microscopy analysis (SEM) showed that whatever the type of colonizer (i.e. biotic or abiotic) and the type of basalt (i.e. natural, synthetic or synthetic doped in <sup>57</sup>Fe), the glass surface was covered by salt micro-crystals as NaCl or MgCl, and also by sulfates as gypsum. In the same way, some dendritic structures of salt are often observed on glasses surface exposed to both biotic and abiotic conditions.

375 Overall, the glass surface exposed of both biotic and abiotic conditions, does not present clear alteration structure.

However, before the experiment, only the natural basaltic glasses exhibited some vesicles, all glasses displayed some after deployment. Vesicles contain scattered micro-crystals of salts and pyrite, crystal nature being confirmed by RAMAM spectra but only samples exposed to biotic  
380 condition contain nano-crystal of pyrite. Also on surfaces exposed to biotic condition, various form of organic matter: small droplets, heap or mat covering the glass surface were present as attested by RAMAM spectra. Whole diatoms and diatom's debris as well as micro-crystals of barite were observed associated with organic material and encrusted in organic mat or droplets.

### 385 3.4. Geochemistry of seawater and temperature profiles

During the module deployment, the mean temperature recorded was 3,62°C (overall fluctuate between 3,15°C and 6,71°C). The temperature profile records two different phenomena, the first giving a regular variation of 12 hours that correspond to the ocean tide effect, the second one less regular and with larger amplitude is related to the variations of hydrothermal diffusion through the  
390 sediments. Change in temperature conditions was observed all along the module deployment duration, with an increase of temperature during the first 10 days, a decrease during the 7 following days, a 5 days episode with a different pattern showing a temperature increase partially masked by the tide effect, and finally a large variability during the last 4 days (Figure 9).



395 **Figure 9:** Temperature recorded during the deployment duration.

The surrounding seawater sampled at the end of deployment, exhibits a low dissolved H<sub>2</sub>S concentration (around 0.1 mM). Sulfate concentrations, determined using total dissolved S measurement (acidified and filtered sample and so containing no H<sub>2</sub>S) were comprised between 32 and 35 mM and contained between 0.41 and 0.48 µM of dissolved iron, 57.12 mM of magnesium and between 1.30 and 1.39 µM of dissolved manganese showing an hydrothermal contribution.

#### 4. Discussion

##### 4.1. Microbial communities and their putative metabolisms

For each colonizer, due to the number of analyzed clones, only the major phyla could have been detected (Crépeau et al., 2011). Miscellaneous groups of *Archaea* or some *Bacteria* were detected in each colonizer, even if the phylogenic affiliation cannot be always directly linked to metabolic or physiological properties, when the sequences studied clearly belong to a cluster of microorganisms sharing similar properties, then metabolic and physiological trends could be cautiously inferred (Alain et al., 2002) for dominant phyla as well as their involvement in biogeochemical cycles (Callac et al., 2013 submitted).

##### 4.1.1. Sulfur cycle

**Sulfur-oxidation:** sulfur-oxidation as one of the major occurring metabolism is highly suggested by the detection in clone libraries of members of the *Gammaproteobacteria* the *Epsilonproteobacteria*, and the *Alphaproteobacteria*. White *Beggiatoaceae* filament members were visually observed on and inside colonizers as on the underlying sediment and detected in 2 clones libraries. As previously reported *Beggiatoa* species might being poorly detected in clones libraries despite they visually dominate samples (Crépeau et al., 2011). Indeed, *Beggiatoa* species are known to be sulfide-oxidizers, inhabiting freshwater, marine sediments (McHatton et al., 1996 ; McKay et al., 2012) or in hydrothermal vent sediment (Guaymas Basin, (Jannasch et al., 1989 ; Nelson et al., 1989a)), They oxidize soluble hydrogen sulfide into sulfate using dissolved oxygen as electron acceptor (Nelson and Jannasch, 1983 ; Nelson et al., 1986 ; Hagen and Nelson, 1997) but can also stored elemental sulfur globules inside cell, (Vargas and Strohl, 1985 ; McHatton et al., 1996 ; Preisler et al., 2007). They are also able to live anaerobically by gaining their energy from the sulfide oxidation coupled to the reduction of the nitrates they can accumulate in vacuole (McHatton et al., 1996 ; Mußmann et al., 2003 ; Preisler et al., 2007).

Within the *Epsilonproteobacteria* some of our sequences were closely affiliated to the *Sulfuricurvaceae*, *Sulfurovumaceae* and the *Arcobacteraceae* family and were related to sulfur-oxidizer species isolated from hydrothermal ecosystems as *Sulfurimonas* strain (Inagaki et al., 2003 ;



Takai et al., 2006)) (Takai et al., 2003 ; Campbell et al., 2006), *Sulfurovum* strain (*S. Lithotrophicum* (Inagaki et al., 2004) or *Arcobacter* strain (Sievert et al., 2008) .

435 Some clones of *Alphaproteobacteria* affiliated to the *Rhodobacteraceae* clade were previously noticed in deep sea hydrothermal systems (Sylvan et al., 2012) (Figure SX) and could also be able to oxidize sulfur species as previous studies have demonstrated that many *Roseobacter* species (*Rhodobacteraceae* clade) contain in their genome the *soxB* gene which encode for a key compounds implied in the periplasmic thiosulfate-oxidizing Sox complex enzyme system (Newton et al., 2010 ; Lenk et al., 2012).

440

**Sulfur-reduction:**

*Thermococcus* and *Palaeococcus*, frequently detected in all colonizers are hyperthermophilic archaea, strictly anaerobic and fermentative chemoorganotrophs able to reduce various sulfur compounds (Godfroy et al., 1997 ; González et al., 1999 ; Bertoldo and Antranikian, 2006 ; Teske et al., 2009).

445 DHVE-2, strains were so far isolated from hydrothermal ecosystems (Flores et al., 2012) and *Aciduloprofundum boonei* (unique described species) and shown to be anaerobic thermoacidophilic, heterotrophic sulfur-reducer (Reysenbach et al., 2006). Also mineralogical analysis of samples containing DHVE-2 demonstrated that this clade is highly involved in the sulfur cycle (Nercessian et al., 2003 ; Reysenbach et al., 2006 ; Flores et al., 2012). Concerning the *Planctomycetes*, it was  
450 previously suggested that some are able to reduce sulfur under anaerobic condition (Elshahed et al., 2007).

**Sulfate-reduction:** Presence of *Deltaproteobacteria* (*Desulfobacteriaceae*), *Firmicutes* (ie *Desulfotomaculum sp.*) and to *Archaeoglobus sp.* (Widdel and Hanson, 1992) suggest that sulfate-reduction could have take place.

455 Thus, in the colonizers, the sulfate from the seawater, sulfur and H<sub>2</sub>S from organic matter, from hydrothermal fluid or from microbial activity (both in the sediment and in the colonizers), could have fuelled sulfur metabolizing communities.

**4.1.2. Nitrogen cycle**

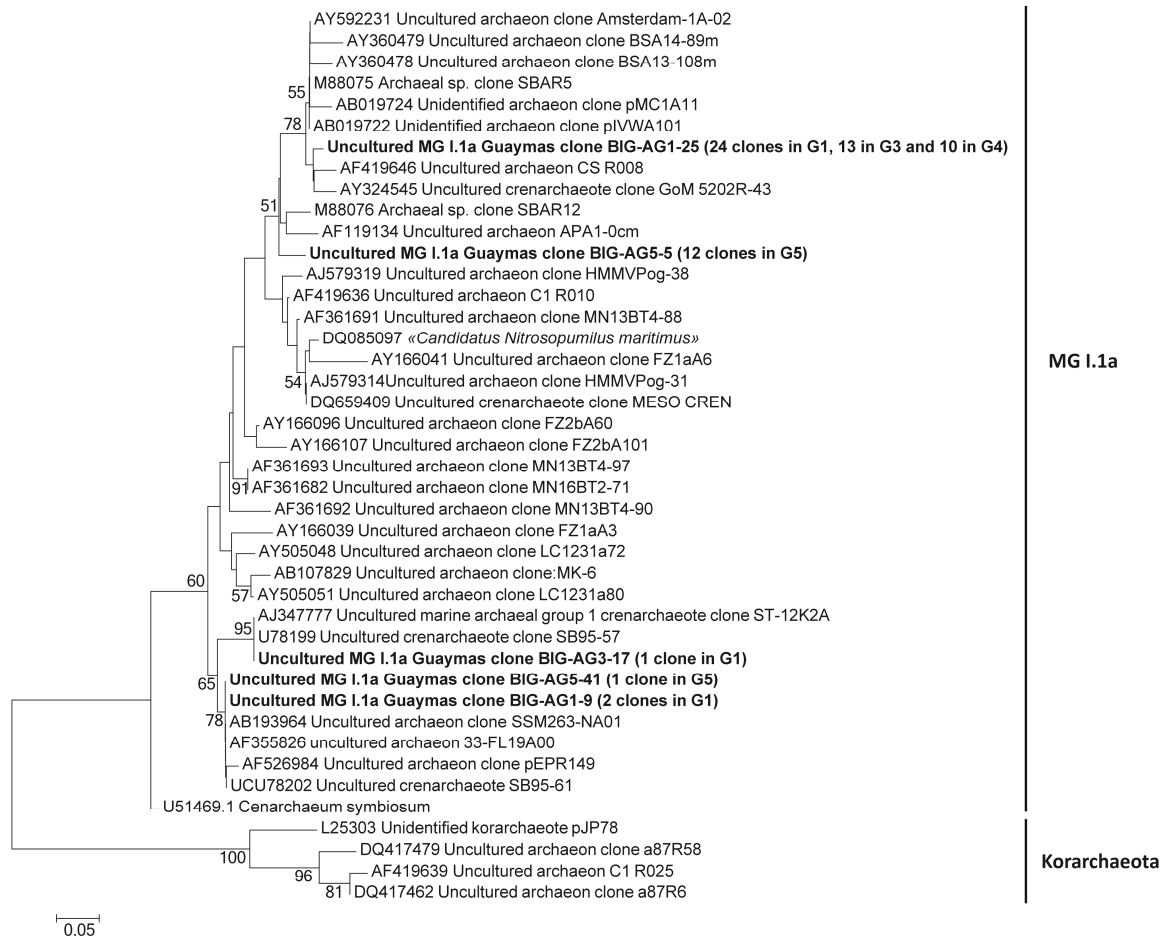
460 The reduction of nitrate into nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitric oxide (NO), nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) and/or gaseous dinitrogen (N<sub>2</sub>), or the DNRA could take place in our colonizers owing the presence of members of *Epsilonproteobacteria*, *Firmicutes* and *Beggiatoa sp.*

Thus, nitrates could have been used as electron acceptor by *Firmicutes* (L'Haridon et al., 2006), by some *Epsilonproteobacteria* (Nakagawa et al., 2005 ; Bowles et al., 2012) as previously suggested.

465 Also *Beggiatoa sp.* can couple to the reduction of the nitrates to the sulfide oxidation in anaerobiosis (Vargas and Strohl, 1985 ; McHatton et al., 1996 ; Brandes et al., 2007 ; Preisler et al., 2007).

*Planctomycetes* sequences were found in two colonizers containing natural basaltic glass (G3 and G4).. Despite being distant from cultivated anammox strains one sequence directly branching in the anammox *Planctomyces* species cluster, while the other sequences are distant from all cultivated  
470 *Planctomycetes* species and to, to date known ANAMMOX cluster. However, we cannot clearly allow to rule on the function of detected planctomyces ANAMMOX bacteria were known to be presents and actives in hydrothermal systems (Byrne et al., 2009) and so ANAMMOX could have occurred in anaerobic micro colonizers niches.

Ammonium oxidation could also have taken place as a large number of analyzed clones were  
475 affiliated to the *Thaumarchaeota* MGI group (Brochier-Armanet et al., 2008) Indeed all *Thaumarchaeota* sequences detected were affiliated to the group 1a (Figures 6 and 10) which group is suspected to performed the ammonium-oxidation to nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) (Francis et al., 2007). This group is present in oxic to suboxic conditions in seawater (Francis et al., 2005 ; Beman et al., 2008) in bacterioplankton (Karner et al., 2001); and include, the first isolated strain, *Nitrosopumilus maritimus*  
480 (Konneke et al., 2005) and was also detected in many marine environment i.e. basalts (Mason et al., 2007 ; Mason et al., 2008) sediments (Francis et al., 2005 ; Beman and Francis, 2006), and hydrothermal microbial mat (Crépeau et al., 2011).



485 **Figure 10:** Phylogenetic relationships of the *Thaumarchaeota* based on 16S rRNA gene sequences, determined by neighbour-joining analysis. Bootstrap values above 50% based on 1000 replicates are displayed. *Korarchaeota* are used as outgroup.

Thus, the presence of nitrogen compound i) nitrate from the seawater (up to 40  $\mu\text{M}$  in Guaymas  
 490 basin seawater (McHatton et al., 1996); ii) nitrite from seawater as well as from the denitrification  
 and the ammonia-oxidation reactions, and iii)  $\text{NH}_4^+$  from organic matter remineralization in suboxic  
 area (Francis et al., 2007), from the organic matter nitrogen-compounds assimilation (Brandes et al.,  
 2007 ; Francis et al., 2007 ; Orcutt et al., 2011b), from nitrogen-containing organic-compounds  
 degradation by hydrothermal circulation (Orcutt et al., 2011b) and from the DNRA, could have  
 495 provided favorable conditions for microbial populations involved in nitrogen cycle. This suggests that  
 a global nitrogen cycle could occur in the Geomicrobiology module but also by extension in the oxic-  
 anoxic interface in microbial mat. Moreover, *Thaumarchaeota* MGI sequences being dominant in all  
 archaeal clones libraries it could be assume that, archaeal ammonia-oxidation is one of the  
 predominant metabolisms.

500

#### 4.1.3. Iron cycle

Few sequences related to microorganisms that could be involved in the iron cycle were detected: they are *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* and the DHVE2 and possibly some *Firmicutes*. Iron-oxidation being performed by the *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Deltaproteobacteria*, using oxygen and/or nitrate as electron acceptor (Edwards et al., 2003b ; Weber et al., 2006 ; Nakagawa and Takai, 2008 ; Hedrich et al., 2011 ; Swanner et al., 2011), Iron-reduction could have been mediated by members of the DHVE2. Indeed, the sole DHVE2 isolate: *Aciduliprofundum boonei*, is able to growth using poorly crystalline ferric iron (Fe(III)) as electron acceptor (dissimilatory iron-reduction DIR) and it was shown that members of the DHVE-2 could be associated to iron oxyhydroxide (Reysenbach et al., 2006) suggesting that this clade is highly involved in the iron cycle. Within the *Deltaproteobacteria* thermophilic iron-reducer as: *Geothermobacter ehrlichii* (Kashefi et al., 2003), *Deferrisoma camini* (Slobodkina et al., 2011) living in hydrothermal are able to reduce iron oxyhydroxide. Within the *Firmicutes* few as *Thermovenabulum ferriorganovororum* (Zavarzina et al., 2002), *Fervidicola ferrireducens* (Ogg and Patel, 2009a) or *Thermotalea metallivorans* (Ogg and Patel, 2009b) are able to used ferric iron as electron acceptor. Belonging to clusters distant from all cultivated species sharing the iron-reduction metabolic properties cannot be clearly inferred to our *Deltaproteobacteria* and *Firmicutes*.

#### 4.1.4. Carbon cycle

Due to high input of organic matter at the Guaymas basin seafloor (Calvert, 1966 ; Schrader, 1982 ; Simoneit and Lonsdale, 1982 ; Von Damm et al., 1985b ; De la Lanza-Espino and Soto, 1999 ; Dean et al., 2004a), it is assumed that the organic matter plays an important role as carbon source and/or electron donor and acceptor for the microorganisms living at the sea water/sediment interface and in the sediment. Thus large amount of organic matter under various forms as particles, droplets, mat forming at the surface of basaltic glass exposed on biotic conditions was observed and confirmed by RAMAN spectra.

This organic matter could directly support chemoorganotrophic microbial life associated with basalt substrates. We observed evidence for fermentative microorganisms (e.g. *Thermococcales*) that are likely involved in the degradation of complex organic substrates into smaller molecules such as short organic acids, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> (Orcutt et al., 2011b). Organic end products of fermentation, together with compounds sinking from the surface water, could be used by heterotrophic microorganisms detected, such as those from CFB division, or *Proteobacteria*. In all cases, produced CO<sub>2</sub> will be available for autotrophic microorganisms such as *Planctomycetes* (the ANAMMOX group) (Fuerst and Sagulenko, 2011), some *Epsilonproteobacteria* (Inagaki et al., 2003 ; Campbell et al., 2006), *Beggiatoa sp.*

(Nelson and Jannasch, 1983 ; McHatton et al., 1996) and some *Thaumarchaeota* (Walker et al., 2010 ; Tourna et al., 2011) that were detected in the module.

In the module, the microbial diversity surveys reveal the presence of both heterotrophic, autotrophic and organotrophic microorganisms. This finding is similar to studies of the microbial diversity of seafloor lava (Santelli et al., 2009) but contrasts with microbial diversity from bare rock basalts (Santelli et al., 2008a) and glassy pillow basalts (Mason et al., 2008), where the autotrophic way of carbon assimilation is most often detected; suggesting here a complete carbon cycle.

#### 4.1.5. Uncultivated lineages

Many sequences belonging to uncultivated groups including Guaymas Euryarchaeotal Group, MGII (Massana et al., 1997 ; Reysenbach et al., 2000 ; Bano et al., 2004 ; Brazelton et al., 2006 ; Inagaki et al., 2006), MBG-D (Vetriani et al., 1999 ; Inagaki et al., 2006 ; Webster et al., 2006) MBG-C (Barns et al., 1996 ; Vetriani et al., 1999 ; Teske et al., 2002 ; Kendall et al., 2007), MCG, MBG-B and uncultivated *Bacteria* were detected in the colonizers. The knowledge about these groups is often restricted in their distribution and sometimes in their abundance through different ecosystems, then the lack of information about their putative physiology does not allow to infer about their ecological implication. Nevertheless most of these lineages were previously reported from many deep marine environments.

Among these the Guaymas Euryarchaeotal Group was detected in the colonizers; previously retrieved in the Guaymas Basin sediment, affected by hydrothermal circulation, their distribution seems to be restricted to this area, and highly suggested that these *Euryarchaeotes* are anaerobes and probably involved in the degradation of the organic matter, hydrocarbon and even in petroleum compounds (Teske et al., 2002 ; Dhillon et al., 2005).

Within the samples G4 and G5, some bacterial sequences (BG4-45, BG5-16 and BG5-34, Fig SXXX) were affiliated to some uncultured clones, far from any known lineages or cultivated representatives.

#### 4.2. Geomicrobiological interactions (*in progress*)

The first evident deposit on glasses on all samples whatever the type of glasses and the type of exposure was the accumulations of micro-crystals of salts, diatoms and carbon-rich aggregates. The presence of micro-crystals of NaCl, MgCl, and also of sulfates-crystallization as gypsum or barite, whatever the type of colonizer (i.e. biotic or abiotic) and the type of basalt (i.e. natural, synthetic or synthetic doped in <sup>57</sup>Fe) could be explained by seawater precipitation that occurred after samples retrieving.

Accumulations of diatom debris and carbon-rich aggregates were frequently observed on biotic samples where they cover a large part of the surface. Few carbon-rich aggregates were sometimes

identified on abiotic samples; but globally, they were very sparse or even absent. Both diatoms and organic compounds probably come from the important quantity of marine snow that falls to the bottom of the Guaymas basin.

575 Pyrite crystals were observed on glass surfaces exposed to both biotic and abiotic conditions suggesting that their formation is due to chemical process. Also, they were systematically observed at the bottom of the holes, in all, suggesting that the chemical conditions in holes could have promoted the precipitation of pyrite. In another hand, nano-crystals of pyrite were only detected on glasses exposed to biotic conditions, and closely associated with thin organic material, suggesting a direct or indirect biological implication in this crystallization process. Indeed, these glasses exposed  
580 to biologic condition harbor organic matter deposits (droplets, heap mat) which could fuel in carbon and energy sources the microbial life and so have changed locally the chemistry (as pH, redox) and have participated to chemical glass alteration and mineral crystallization. Thus directly *via* their metabolisms or indirectly *via* by-products of metabolisms, some microorganisms could be involved in pyrite nano-crystals formation. These data were confirmed by RAMAN spectra.

585 Small rounded to slightly elongated vesicles (10-150  $\mu\text{m}$  diameter) were observed in all glass samples, regardless of the depth and duration of deployment. Vesicles in synthetic glass as well as for natural basaltic glass existed before incubation, although they were not detected macroscopically due to their small size of less than 50  $\mu\text{m}$  they were likely formed due to gas micro-bubbles in silicate melt, trapped and preserved as vesicles during quenching.

590

#### 4.2.1. Clues of anoxia pouches in the colonizers

The existence, in the colonizers, of anoxic microniches, is suggested by the presence of pyrite formation, the molecular signature of microorganisms known to be anaerobes.

Pyrite grain, retrieved on all basaltic glasses and on almost all small holes detected on the glass  
595 surface, is formed in anoxic and shallow organic-rich sediments during the early stage of diagenesis. Its formation is due to a first reaction between sulfide or polysulfides and the available ferrous iron Fe(II) produced during the microbial dissimilatory iron reduction or by reaction between dissolved sulfide with ferric oxyhydroxide-bearing compounds (Berner, 1984 ; Luther III, 1991 ; Raiswell and Canfield, 1998 ; Schoonen, 2004 ; Rickard and Luther, 2007) that result in the formation of  
600 amorphous iron mono-sulfides named FeS precursors; The second step is the conversion of the FeS precursors into pyrite by reactions with various oxidized sulfur compounds (including polysulfide or thiosulfate ( $\text{FeS} + \text{HS}_x^- \rightarrow \text{FeS}_2 + \text{S}_{x-1}^{2-} + \text{H}^+$ ) (Berner, 1984 ; Luther III, 1991 ; Schoonen, 2004). Thus, the pyrite formation is highly dependent on the availability of dissolved sulfide, on oxidized sulfur species, on accessibility of reactive iron minerals and on metabolizable buried organic matter (Berner,

605 1984 ; Luther III, 1991 ; Schoonen, 2004). In our condition, pyrite observed suggest that some anoxic pouches take place in the colonizers.

The second clue, albeit less convincing than the first because based directly on DNA sequences, is the presence of anaerobic microorganisms which have not be found to date in aerobic condition as here *Thermococcales*, *Archaeoglobus sp.*, *Methanogens*, ANMEs and DHVE2. Indeed in all colonizers, a large proportion of archaeal clones was affiliated to the *Thermococcales* (eg *Thermococcus sp.* and *Palaeococcus sp.*). So far, all isolated *Thermococcales* strains are strictly anaerobes (Zillig et al., 1983 ; Godfroy et al., 1997 ; Takai et al., 2000 ; Bertoldo and Antranikian, 2006 ; Pikuta et al., 2007 ; Teske et al., 2009); however some of them will be able, at the deep seawater temperature (experience performed at 4°C), to survived to a more or less short oxygen exposure (2h to 3 weeks) (Jannasch et al., 1992). In addition few sequences affiliated to strictly anaerobes were detected in the colonizers as *Methanoarchaea* (Garcia et al., 2000 ; Whitman et al., 2006) distributed within the *Methanococcaceae*, the *Methanomicrobiales*, the *Methanococcoides* and the *Methanopyrales*, as the anaerobic methanotrophic *archaea* (Knittel and Boetius, 2009) ANME-1a and ANME-2c, or as *Archaeoglobus* species (Burggraf et al., 1990 ; Beeder et al., 1994 ; Huber et al., 1997 ; Mori et al., 2008 ; Steinsbu et al., 2010), as well as DHVE2 (Reysenbach et al., 2006 ; Flores et al., 2012).

620 It is highly probable that these anoxic pouches have take place in the observed holes but also on basaltic pieces located in the center part of the colonizers that they are less subject to the diffusion and circulation of both fluid and seawater contrary to the glasses placed on the upper and edge part of the colonizer; as well as in micrometer scale on one basaltic piece.

625

#### **4.3. The Geomicrobiological colonizer: a new habitat to colonize and a window to the subsurface community?**

The basaltic glasses which filled the colonizers are new colonizing substrates for the microbial community. Regarding the statistical diversity analysis done with the Jackknife Environment Clusters (Figure 8), the trees showed that the diversity: both archaeal and bacterial diversity, is irrespective of the type of substrata (the same couple of colonizers filled with the same substrata were never cluster together). So it seems that there is another control of the microbial colonization. Owing the *in situ* characteristic, it appears rather that this microbial control could be the hydrothermal fluid diffusing on the seafloor. Indeed, the module have been deployed on the sediment through which the hydrothermal fluid diffuses by pulses (according the temperature pulse Figure 9) with an intake of sulfide. This fluid could be mixed with surrounding seawater, and create new habitats as some micro-niches in each colonizers. Indeed, according to the mixing ratio between seawater and hydrothermal fluid which create an inverse double gradient between sulfide and oxygen, various micro-habitats harboring aerobic, micro-aerobic to anoxic conditions were possibly created. They can be distributed

640 between the upper or external part and the center part of the layer of glasses in the colonizer as well also at a lower level, at the scale of one basaltic glass; where micro-niches are susceptible to take place on basaltic glasses surface coated with an organic matter biofilm, as observed over the glass (Banfield and Nealson, 1997).

The occurrence of these micro-habitats at the scale of the colonizer and at the scale of one basaltic 645 glass is corroborated by the microbial survey, crystals formation, deposits at the glass surface, microscopic and macroscopic observations as well as surrounding seawater analysis. It seems so that the Geomicrobiology module and in particular each colonizer, hosts a complex system especially in term of environment.

Thus at the large scale of the colonizers, the microbial communities including the *Beggiatoa sp.* as 650 well as the other group of microorganisms, which are able to perform the sulfur-oxidation, and forming the gelatinous mat observed on the module or present inside the colonizer in surface glasses, are settled at the interface between sulfide flux and the oxygen availability (and nitrates). In the same way, the *Thaumarchaeota* group 1a could establish both on the surface of the basaltic glass layer (aerobic area) and in the periphery of the colonizer (more internal layer; micro-aerobic to 655 suboxic area) as well report in previous studies (Coolen et al., 2007 ; Beman et al., 2008). Similarly, iron oxidizers could also be established in micro-aerobic niches where chemically ferrous iron oxidization using dissolved oxygen is retarded in circum-neutral pH condition. In parallel, the metabolisms that require anaerobic conditions as fermentation, sulfate-, sulfur- and iron-reduction, as well as denitrification or/and ANAMMOX could take place in anoxic pouches, and be carried out by 660 psychrophilic microorganisms.

At a lower scale, this of one piece of glass, at basaltic glasses coated with an organic matter biofilm, it is possible to find a sequence of micro-habitats. On the upper part, in contact with oxygen, is found the aerobic microorganisms which could performed organic matter hydrolysis, nitrification, ammonia-oxidation as well as sulfo- or iron-oxidation. In medium place, is retrieved the micro- 665 aerophiles or facultative aerobes like some fermentative species. Then, in the deeper place next to the glass, is found the anaerobes which could carried out fermentation, denitrification (also DNRA dissimilatory nitrate reduction to ammonium), and reduction of sulfur, sulfate and iron.

Thus the microbial diversity driver seems to be the hydrothermal fluid diffusing and also the difference of fluid diffusion exposure which by far, mixed with seawater, formed various different 670 micro-habitats between the colonizers

Another point was that numerous detected *Archaea* were previously retrieved in the Guaymas basin hydrothermal environments as both chimneys and hydrothermally affected sediments. (The discussion below was focused on studies performed on samples: chimneys, sediments, collected on the hydrothermal part of the Guaymas basin). Many archaeal sequences retrieved in the colonizers



675 was related to the *Thermococcales*, *Archaeoglobus sp.*, and DHVE2 whose members have already been found in sediments and chimneys of the Guaymas basin (Burggraf et al., 1990 ; Canganella et al., 1998 ; Teske et al., 2002 ; Jolivet et al., 2003 ; Biddle et al., 2012 ; Flores et al., 2012) or in the colonizers AISICS deployed in the Mat Mound sediment next to the Geomicrobiology module during the time (Callac et al.; submitted manuscript). Among the sequences detected in our samples few as  
680 *Methanoarchaea* e.g. *Methanopyrales* (Burggraf et al., 1991)(Callac et al.; submitted manuscript) and *Methanococcaceae* (Callac et al.; submitted manuscript), were previously described only in active hydrothermal chimneys. On the other hand, many clones were beforehand detected in the hydrothermally affected sediments: *Thaumarchaeota* (Teske et al., 2002), *Euryarchaeota* as MBG-D, ANME 1a and 2c (Teske et al., 2002 ; Biddle et al., 2012), members of the Guaymas Euryarchaeotal  
685 group (Teske et al., 2002 ; Dhillon et al., 2005), *Methanococcoides* (detected only using the *mcrA* gene (Dhillon et al., 2005)); and *Crenarchaeota* including *Thermoprotei*, MCG, MBG-C and MBG-B (Teske et al., 2002 ; Dhillon et al., 2005 ; Biddle et al., 2012). In addition, at the exception of the *Methanococcoides*, all of these groups previously found in the sediment, were already retrieved in the colonizers AISICS deployed in the Mat Mound sediment (Callac et al.; submitted manuscript).  
690 Among all sequences affiliated to groups detected in previous hydrothermal samples, some are related to isolate *Archaea* as *Thermococcales*, *Archeoglobus sp.*, *Methanopyrales* and the DHVE2, known, to date, to harbor conservative features as anaerobic and (hyper)-thermophilic traits. These archaeal groups were here amplified from our colonizers far from their putative optimal growth condition, particularly in term of temperature and anoxia. They are probably transported and  
695 dispersed by the hydrothermal fluid circulation: these “anaerobes and thermophiles Guaymas hydrothermal systems micro-organisms” could be emitted in seawater when hydrothermal fluid vents on the seafloor. Like each pulse of diffusion is associated with a temperature pulse (Figure 9), owing the temperature recordings, it was shows that during the eight finals days of the deployment there was an intake of diffusive hot fluids. This could explain that these communities were present in  
700 the colonizers and PCR-amplified but probably not active. The hypothesis that it was *via* the hydrothermal fluid circulation through the hydrothermal basement and during its venting on seafloor expulsing in seawater the hyperthermophilic communities; was previously suggested by the isolation of the hyperthermophilic *Thermococcales* from samples collected in low-temperature basalt-hosted diffuse fluid (15°C; collected at the Endeavour Segment, Juan de Fuca Ridge) (Summit and Baross,  
705 2001); and by the occurrence of the hyperthermophilic archaeal communities retrieved on basaltic flanks of the East Pacific Rise (site MM, with no conspicuous no visual evidence of hydrothermal activity) (Ehrhardt et al., 2007).That also highlighted the hypothesis that the hydrothermal systems, and by extension in here the colonization module, could be a window to the subsurface hydrothermal biosphere (Deming and Baross, 1993).

710 By this way, according to the statistical microbial diversity analysis, it was highly emphasis that the  
colonizers are complex habitats harboring numerous and various micro-niches. Thus the  
Geomicrobiology module could correspond to new and complex biotope to be colonized by  
microorganisms. Indeed, in the first hand, inside each colonizer and even at the local scale of the  
715 glass, several micro-habitats, with different proportion of oxygen and also in sulfide would be  
created. In the second hand, a part of the archaeal diversity seems to be originated from the  
hydrothermal fluid diffusion. According to the temperature recorded, it is supposed that the  
“anaerobes and thermophiles Guaymas hydrothermal systems micro-organisms” found in the  
module is linked to the dispersion phenomenon due to hydrothermal fluid diffusion through the  
heated-sediment layer; and was probably not active in the colonizer contrary to the other detected  
720 communities.

## 5. Conclusion

The deployment of *in-situ* colonization module had allowed exploring microbial colonization on a  
seafloor of a hydrothermally and organic matter-rich sediment. This study pointed out that a highly  
725 diverse microbial community involved in carbon, nitrogen, sulfur and iron cycles, have colonized the  
surface of basaltic glasses.

Our data show that the microbial diversity is driven by the hydrothermal fluid diffusing and by the  
various the micro-habitats creating by mixed between the fluid and the seawater. Thus, in all  
colonizers, various micro-niches with some in anaerobic condition were created.

730 We also report in all colonizers, the occurrence of anaerobic thermophilic and hydrothermal micro-  
organisms, suggest in the first hand a dispersal role by hydrothermal fluid circulation and also, in the  
other hand that the hydrothermal systems are windows to the subsurface hydrothermal biosphere  
as previously hypothesis (Deming and Baross, 1993).

In addition, new clusters of *Bacteria*, which are far from any known environmental clones and  
735 cultivated representatives, increasing our current view of microbial diversity in hydrothermal systems.  
Also, despite the lack of formation of specific glass alteration textures, due to limited deployment  
time, we observed the formation of secondary minerals, as pyrite, on all glass surfaces. Thus the  
pyrite seems likely result from the combination of both biotic and abiotic processes in  
microenvironments as those related to basalt vesicles and organic matter aggregates. Applying  
740 similar experimental approach in future studies, comparing geochemical characteristics of the  
growth medium and mineral substrate with microbial diversity should provide further insights into  
the capability of microbial communities to exploit new environmental conditions and colonize new  
niches.

745 **Acknowledgements**

The authors want to thank all the BIG shipboard cruise party for their work and support during the BIG cruise: officers, crew and technicians of the *R/V L'Atalante*, the DSV *Nautile* team and all the on board scientific team, in particular Mathilde Le Roy for her help during the sub-sampling. The authors thank Stéphanie Rossano (Lab. Géomatériaux et Environnement, Univ. de Marne La Vallée, France),  
 750 who has allowed us to use installations from her lab and has shared with us her experience in the synthesis of MORB-type basaltic glasses. This cruise was funded by Ifremer (France) and has benefited from a work permit in Mexican waters (DAPA/2/281009/3803, October 28th, 2009). This work was supported by Ifremer, the GIS Europôle Mer (grant for NC), UEB, CNRS, INSU and had benefited from state aid managed by the Agence Nationale de la Recherche under the program  
 755 "Investments for the Future" with the reference ANR-10-LabX-19-01.

**References**

- Alain, K., Olagnon, M., Desbuyères, D., Page, A., Barbier, G., Juniper, K., Querellou, J., and Cambon-Bonavita, M.A. (2002). Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 463-476.  
 760  
 Alain, K., Zbinden, M., Le Bris, N., Lesongeur, F., Gaill, F., and Cambon-Bonavita, M.-A. (2004). Early steps of microbial colonization process at deep-sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology* 6, 227-241.  
 765  
 Alt, J.C. (1995). Sulfur isotopic profile through the oceanic crust: Sulfur mobility and seawater-crustal sulfur exchange during hydrothermal alteration. *Geology* 23, 585-588.  
 Amend, J.P., Mccollom, T.M., Hentscher, M., and Bach, W. (2011). Catabolic and anabolic energy for chemolithoautotrophs in deep-sea hydrothermal systems hosted in different rock types. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, 5736-5748.  
 770  
 Bach, W., and Edwards, K.J. (2003). Iron and sulfide oxidation within the basaltic ocean crust: implications for chemolithoautotrophic microbial biomass production. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 3871-3887.  
 Banfield, J.F., and Nealson, K.H. (1997). *Geomicrobiology: interactions between microbes and minerals: Reviews in Mineralogy and Geochemistry*.  
 775  
 Bano, N., Ruffin, S., Ransom, B., and Hollibaugh, J.T. (2004). Phylogenetic Composition of Arctic Ocean Archaeal Assemblages and Comparison with Antarctic Assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 781-789.  
 Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D., and Pace, N.R. (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 9188-9193.  
 780  
 Bazylinski, D.A., Farrington, J.W., and Jannasch, H.W. (1988). Hydrocarbons in surface sediments from Guaymas basin hydrothermal vent site. *Org. Geochem.* 12, 547-558.  
 Beeder, J., Nilsen, R.K., Rosnes, J.T., Torsvik, T., and Lien, T. (1994). *Archaeoglobus fulgidus* isolated from hot North Sea oil field waters. *App. Environ. Microbiol.* 60, 1227-1231.  
 785  
 Beman, J.M., and Francis, C.A. (2006). Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in the Sediments of a Hypernutrified Subtropical Estuary: Bahía del Tóbari, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7767-7777.  
 Beman, J.M., Popp, B.N., and Francis, C.A. (2008). Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME J* 2, 429-441.

- 790 Berner, R.A. (1984). Sedimentary pyrite formation: An update. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 605-615.
- Bertoldo, C., and Antranikian, G. (2006). "The Order Thermococcales," in *The Prokaryotes.*, 69-81.
- Biddle, J.F., Cardman, Z., Mendlovitz, H., Albert, D.B., Lloyd, K.G., Boetius, A., and Teske, A. (2012). Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *ISME Journal* 6, 1018-1031.
- 795 Bowles, M.W., Nigro, L.M., Teske, A.P., and Joye, S. (2012). Denitrification and environmental factors influencing nitrate removal in Guaymas Basin hydrothermally-altered sediments. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Brandes, J.A., Devol, A.H., and Deutsch, C. (2007). New developments in the marine nitrogen cycle. *Chemical reviews* 107, 577-589.
- 800 Brazelton, W.J., Schrenk, M.O., Kelley, D.S., and Baross, J.A. (2006). Methane- and Sulfur-Metabolizing Microbial Communities Dominate the Lost City Hydrothermal Field Ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6257-6270.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., and Forterre, P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Rev Microbiol* 6, 245-252.
- 805 Burggraf, S., Jannasch, H.W., Nicolaus, B., and Stetter, K.O. (1990). *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 13, 24-28.
- Burggraf, S., Stetter, K.O., Rouvire, P., and Woese, C.R. (1991). *Methanopyrus kandleri*: An archeal methanogen unrelated to all other known methanogens. *System. Appl. Microbiol.* 14, 346-351.
- 810 Byrne, N., Strous, M., Crépeau, V., Kartal, B., Jean-Louis, B., Schmid, M.C., Lesongeur, F., Schouten, S., Jaeschke, A., Jetten, M.S.M., Prieur, D., and Godfroy, A. (2009). Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *ISME Journal*, 1-7.
- 815 Calvert, S.E. (1966). Origin of Diatom-Rich, Varved Sediments from the Gulf of California. *The Journal of Geology* 74, 546-565.
- Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., and Takai, K. (2006). The versatile e-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology* 4, 458-468.
- Canganella, F., Jones, W.J., Gambacorta, A., and Antranikian, G. (1998). *Thermococcus guaymasensis* sp. nov. and *Thermococcus aggregans* sp. nov., two novel thermophilic archaea isolated from the Guaymas Basin hydrothermal vent site. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1181-1185.
- 820 Casamayor, E.O., Schafer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, C., and Muyzer, G. (2000). Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 499-508.
- 825 Cline, J.D. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* 14, 454-458.
- Coolen, M.J.L., Abbas, B., Van Bleijswijk, J., Hopmans, E.C., Kuypers, M.M.M., Wakeham, S.G., and Sinninghe Damste, J.S. (2007). Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: a basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environmental Microbiology* 9, 1001-1016.
- 830 Corre, E., Reysenbach, A.-L., and Prieur, D. (2001). e-Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiology Letters* 205, 329-335.
- 835 Crépeau, V., Cambon Bonavita, M.-A., Lesongeur, F., Randrianalivelo, H., Sarradin, P.-M., Sarrazin, J., and Godfroy, A. (2011). Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field. *FEMS Microbiology Ecology* 76, 524-540.
- De La Lanza-Espino, G., and Soto, L.A. (1999). Sedimentary geochemistry of hydrothermal vents in Guaymas Basin, Gulf of California, Mexico. *Applied Geochemistry* 14, 499-510.

- 840 Dean, W., Pride, C., and Thunell, R. (2004a). Geochemical cycles in sediments deposited on the slopes of the Guaymas and Carmen Basins of the Gulf of California over the last 180 years. *Quaternary Science Reviews* 23, 1817-1833.
- Dean, W., Pride, C., and Thunell, R. (2004b). Geochemical cycles in sediments deposited on the slopes of the Guaymas and Carmen Basins of the Gulf of California over the last 180 years.
- 845 *Quaternary Science Reviews* 23, 1817-1833.
- Deming, J.W., and Baross, J.A. (1993). Deep-sea smokers : Windows to a subsurface biosphere. *Geochim. Cosmochim. Acta* 57, 3219-3230.
- Dhillon, A., Lever, M., Lloyd, K.G., Albert, D.B., Sogin, M.L., and Teske, A. (2005). Methanogen Diversity Evidenced by Molecular Characterization of Methyl Coenzyme M Reductase A (mcrA) Genes in Hydrothermal Sediments of the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4592-4601.
- 850 Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., and Sogin, M.L. (2003). Molecular Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2765-2772.
- 855 Didyk, B.M., and Simoneit, B.R.T. (1990). Petroleum characteristics of the oil in a Guaymas Basin hydrothermal chimney. *Applied Geochemistry* 5, 29-40.
- Edgcomb, V.P., Kysela, D.T., Teske, A., De Vera Gomez, A., and Sogin, M.L. (2002). Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 7658-7662.
- 860 Edwards, K.J., Bach, W., and Mccollom, T.M. (2005). Geomicrobiology in oceanography: microbe-mineral interactions at and below the seafloor. *Trends in Microbiology* 13, 449-456.
- Edwards, K.J., Mccollom, T.M., Konishi, H., and Buseck, P.R. (2003a). Seafloor bioalteration of sulfide minerals: results from in situ incubation studies. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 2843-2856.
- 865 Edwards, K.J., Rogers, D.R., Wirsén, C.O., and Mccollom, T.M. (2003b). Isolation and Characterization of Novel Psychrophilic, Neutrophilic, Fe-Oxidizing, Chemolithoautotrophic  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria from the Deep Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2906-2913.
- Edwards, K.J., Wheat, C.G., and Sylvan, J.B. (2011). Under the sea: microbial life in volcanic oceanic crust. *Nat Rev Micro* 9, 703-712.
- 870 Ehrhardt, C.J., Haymon, R.M., Lamontagne, M.G., and Holden, P.A. (2007). Evidence for hydrothermal Archaea within the basaltic flanks of the East Pacific Rise. *Environmental Microbiology* 9, 900-912.
- Ehrlich, H.L. (1999). Microbes as Geologic Agents: Their Role in Mineral Formation. *Geomicrobiology Journal* 16, 135-153.
- 875 Einen, J., Kruber, C., Øvreås, L., Thorseth, I.H., and Torsvik, T. (2006). "Microbial colonization and alteration of basaltic glass", (ed.) B. Discussions.)
- Elshahed, M.S., Youssef, N.H., Luo, Q., Najar, F.Z., Roe, B.A., Sisk, T.M., Bühring, S.I., Hinrichs, K.-U., and Krumholz, L.R. (2007). Phylogenetic and Metabolic Diversity of Planctomycetes from Anaerobic, Sulfide- and Sulfur-Rich Zodletone Spring, Oklahoma. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4707-4716.
- 880 Fisk, M.R., Giovannoni, S.J., and Thorseth, I.H. (1998). Alteration of Oceanic Volcanic Glass: Textural Evidence of Microbial Activity. *Science* 281, 978-980.
- Flores, G.E., Campbell, J.H., Kirshtein, J.D., Meneghin, J., Podar, M., Steinberg, J.I., Seewald, J.S., Tivey, M.K., Voytek, M.A., Yang, Z.K., and Reysenbach, A.-L. (2011). Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* 13, 2158-2171.
- 885 Flores, G.E., Wagner, I., Liu, Y., and Reysenbach, A.-L. (2012). Distribution, abundance, and diversity patterns of the thermoacidophilic "Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota 2" (DHVE2). *Frontiers in Microbiology* 3.

- 890 Francis, C.A., Beman, J.M., and Kuypers, M.M.M. (2007). New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME Journal* 1, 19-27.
- Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., and Oakley, B.B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14683-14688.
- 895 Fuerst, J.A., and Sagulenko, E. (2011). Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nat Rev Micro* 9, 403-413.
- Furnes, H., Staudigel, H., Thorseth, I.H., Torsvik, T., Muehlenbachs, K., and Tumyr, O. (2001). Bioalteration of basaltic glass in the oceanic crust. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 2.
- 900 Garcia, J.-L., Patel, B.K.C., and Ollivier, B. (2000). Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6, 205-226.
- Godfroy, A., Lesongeur, F., Raguénès, G., Quérellou, J., Antoine, E., Meunier, J.-R., Guezennec, J., and Barbier, G. (1997). *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 622-626.
- 905 González, J.M., Sheckells, D., Viebahn, M., Krupatkina, D., Borges, K.M., and Robb, F.T. (1999). *Thermococcus waiotapuensis* sp. nov., an extremely thermophilic archaeon isolated from a freshwater hot spring. *Archives of Microbiology* 172, 95-101.
- Grunke, S., Lichtschlag, A., Beer, D.D., Kuypers, M., Losekann-Behrens, T., Ramette, A., and Boetius, A. (2010). Novel observations of Thiobacterium, a sulfur-storing Gammaproteobacterium producing gelatinous mats. *ISME J* 4, 1031-1043.
- Gundersen, J.K., Jorgensen, B.B., Larsen, E., and Jannasch, H.W. (1992). Mats of giant sulphur bacteria on deep-sea sediments due to fluctuating hydrothermal flow. *Nature* 360, 454-456.
- Hagen, K.D., and Nelson, D.C. (1997). Use of Reduced Sulfur Compounds by *Beggiatoa* spp.: Enzymology and Physiology of Marine and Freshwater Strains in Homogeneous and Gradient Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3957-3964.
- 915 Hedrich, S., Schlömann, M., and Johnson, D.B. (2011). The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology* 157, 1551-1564.
- Higashi, Y., Sunamura, M., Kitamura, K., Nakamura, K.-I., Kurusu, Y., Ishibashi, J.-I., Urabe, T., and Maruyama, A. (2004). Microbial diversity in hydrothermal surface to subsurface environments of Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, using a catheter-type in situ growth chamber. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 327-336.
- 920 Holden, J.F., and Adams, M.W.W. (2003). Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. *Current Opinion in Chemical Biology* 7, 160-165.
- 925 Houghton, J., Seyfried, W., Banta, A., and Reysenbach, A. (2007). Continuous enrichment culturing of thermophiles under sulfate and nitrate-reducing conditions and at deep-sea hydrostatic pressures. *Extremophiles* 11, 371-382.
- Houghton, J.L., and Seyfried Jr, W.E. (2010). An experimental and theoretical approach to determining linkages between geochemical variability and microbial biodiversity in seafloor hydrothermal chimneys. *Geobiology* 8, 457-470.
- 930 Huber, H., Jannasch, H., Reinhard, R., Fuchs, T., and Stetter, K.O. (1997). *Archaeoglobus veneficus*, sp. nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, isolated from abyssal black smokers. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 374-380.
- 935 Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F.S., Nealson, K.H., Horikoshi, K., D'hondt, S., and Jørgensen, B.B. (2006). Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2815-2820.
- 940 Inagaki, F., Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2003). *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing e-proteobacterium isolated from

- hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1801-1805.
- 945 Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2004). Sulfurovum lithotrophicum gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the {varepsilon}-Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1477-1482.
- Jannasch, H.W., Nelson, D.C., and Wirsén, C.O. (1989). Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa*) at hydrothermal vent site. *Nature* 342, 834-836.
- 950 Jannasch, H.W., Wirsén, C.O., Molyneux, S.J., and Langworthy, T.A. (1992). Comparative physiological studies on hyperthermophilic archaea isolated from deep-sea hot vents with emphasis on *Pyrococcus* strain GB-D. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3472-3481.
- Jenden, P.D. (Year). "35. HYDROTHERMAL EFFECTS ON PROTOKEROGEN OF UNCONSOLIDATED SEDIMENTS FROM GUAYMAS BASIN, GULF OF CALIFORNIA: ELEMENTAL COMPOSITIONS, STABLE CARBON ISOTOPE RATIOS, AND ELECTRON SPIN RESONANCE SPECTRA1", in: *Proceedings of the Ocean Drilling Program: Initial report: National Science Foundation*, 905.
- 955 Jolivet, E., L'haridon, S., Corre, E., Forterre, P., and Prieur, D. (2003). *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 847-851.
- 960 Karl, D.M. (1995). "Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial communities," in *The microbiology of deep-sea hydrothermal vents*, ed. D.M. Karl. CRC Press), 35-124.
- Karner, M.B., Delong, E.F., and Karl, D.M. (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409, 507-510.
- 965 Kashefi, K., Holmes, D.E., Baross, J.A., and Lovley, D.R. (2003). Thermophily in the Geobacteraceae: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Member of the Geobacteraceae from the "Bag City" Hydrothermal Vent. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2985-2993.
- Kashefi, K., Tor, J.M., Holmes, D.E., Gaw Van Praagh, C.V., Reysenbach, A.L., and Lovley, D.R. (2002). *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 719-728.
- 970 Kendall, M.M., Wardlaw, G.D., Tang, C.F., Bonin, A.S., Liu, Y., and Valentine, D.L. (2007). Diversity of Archaea in Marine Sediments from Skan Bay, Alaska, Including Cultivated Methanogens, and Description of *Methanogenium boonei* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 407-414.
- 975 Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.
- Knittel, K., and Boetius, A. (2009). Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology* 63, 311-334.
- 980 Kolganova, T.V., Kuznetsov, B.B., and Tourova, T.P. (2002). Designing and Testing Oligonucleotide Primers for Amplification and Sequencing of Archaeal 16S rRNA Genes. *Microbiology* 71, 243-246.
- Konneke, M., Bernhard, A.E., De La Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., and Stahl, D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437, 543-546.
- 985 Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., and Tamura, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9, 299-306.
- L'haridon, S., Miroshnichenko, M.L., Kostrikina, N.A., Tindall, B.J., Spring, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Jeanthon, C. (2006). *Vulcanibacillus modesticaldus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, nitrate-reducing bacterium from deep-sea hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1047-1053.
- 990 Lane D, J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*.

- 995 Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., and Pace, N.R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 6955-6959.
- Lenk, S., Moraru, C., Hahnke, S., Arnds, J., Richter, M., Kube, M., Reinhardt, R., Brinkhoff, T., Harder, J., Amann, R., and Musmann, M. (2012). Roseobacter clade bacteria are abundant in coastal sediments and encode a novel combination of sulfur oxidation genes. *ISME J* 6, 2178-2187.
- 1000 Lonsdale, P., and Becker, K. (1985). Hydrothermal plumes, hot springs, and conductive heat flow in the Southern Trough of Guaymas Basin. *Earth and Planetary Science Letters* 73, 211-225.
- Lonsdale, P., and Lawver, L.A. (1980). Immature plate boundary zones studied with a submersible in the Gulf of California. *Geological Society of America Bulletin* 91, 555-569.
- Lozupone, C., Hamady, M., and Knight, R. (2006). UniFrac—an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* 7, 371.
- 1005 Luther III, G.W. (1991). Pyrite synthesis via polysulfide compounds. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55, 2839-2849.
- Lysnes, K., Thorseth, I.H., Steinsbu, B.O., Øvreås, L., Torsvik, T., and Pedersen, R.B. (2004). Microbial community diversity in seafloor basalt from the Arctic spreading ridges. *FEMS Microbiology Ecology* 50, 213-230.
- 1010 Martens, C.S. (1990). Generation of short chain acid anions in hydrothermally altered sediments of the Guaymas Basin, Gulf of California. *Applied Geochemistry* 5, 71-76.
- Mason, O.U., Di Meo-Savoie, C.A., Van Nostrand, J.D., Zhou, J., Fisk, M.R., and Giovannoni, S.J. (2008). Prokaryotic diversity, distribution, and insights into their role in biogeochemical cycling in marine basalts. *ISME Journal* 3, 231-242.
- 1015 Mason, O.U., Stingl, U., Wilhelm, L.J., Moeseneder, M.M., Di Meo-Savoie, C.A., Fisk, M.R., and Giovannoni, S.J. (2007). The phylogeny of endolithic microbes associated with marine basalts. *Environmental Microbiology* 9, 2539-2550.
- Massana, R., Murray, A.E., Preston, C.M., and Delong, E.F. (1997). Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 50-56.
- 1020 Mchatton, S.C., Barry, J.P., Jannasch, H.W., and Nelson, D.C. (1996). High Nitrate Concentrations in Vacuolate, Autotrophic Marine *Beggiatoa* spp. *Applied in Environmental Microbiology* 62, 954-958.
- 1025 McKay, L.J., Macgregor, B.J., Biddle, J.F., Albert, D.B., Mendlovitz, H.P., Hoer, D.R., Lipp, J.S., Lloyd, K.G., and Teske, A.P. (2012). Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white *Beggiatoa* mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 67, 21-31.
- Mcloughlin, N., Staudigel, H., Furnes, H., Eickmann, B., and Ivarsson, M. (2010). Mechanisms of microtunneling in rock substrates: distinguishing endolithic biosignatures from abiotic microtunnels. *Geobiology* 8, 245-255.
- 1030 Mori, K., Maruyama, A., Urabe, T., Suzuki, K.-I., and Hanada, S. (2008). *Archaeoglobus infectus* sp. nov., a novel thermophilic, chemolithoheterotrophic archaeon isolated from a deep-sea rock collected at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, western Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 810-816.
- 1035 Mußmann, M., Schulz, H.N., Strotmann, B., Kjær, T., Nielsen, L.P., Rosselló-Mora, R.A., Amann, R.I., and Jørgensen, B.B. (2003). Phylogeny and distribution of nitrate-storing *Beggiatoa* spp. in coastal marine sediments. *Environmental Microbiology* 5, 523-533.
- Nakagawa, S., and Takai, K. (2008). Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. *FEMS Microbiology Ecology* 65, 1-14.
- 1040 Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Horikoshi, K., and Sako, Y. (2005). *Nitratiruptor tergaricus* gen. nov., sp. nov. and *Nitratifactor salsuginis* gen. nov., sp. nov., nitrate-reducing chemolithoautotrophs of the e-Proteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal system in the Mid-Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 925-933.



- 1045 Nakagawa, T., Takai, K., Suzuki, Y., Hirayama, H., Konno, U., Tsunogai, U., and Horikoshi, K. (2006). Geomicrobiological exploration and characterization of a novel deep-sea hydrothermal system at the TOTO caldera in the Mariana Volcanic Arc. *Environmental Microbiology* 8, 37-49.
- Nelson, D.C., and Jannasch, H.W. (1983). Chemoautotrophic growth of a marine *Beggiatoa* in sulfide-gradient cultures. *Archives of Microbiology* 136, 262-269.
- 1050 Nelson, D.C., Revsbech, N.P., and Jørgensen, B.B. (1986). Microoxic-Anoxic Niche of *Beggiatoa* spp.: Microelectrode Survey of Marine and Freshwater Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 161-168.
- Nelson, D.C., Wirsén, C.O., and Jannasch, H.W. (1989a). Characterization of large, autotrophic *Beggiatoa* sp. abundant at hydrothermal vent of Guaymas basin. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2909-2917.
- 1055 Nelson, D.C., Wirsén, C.O., and Jannasch, H.W. (1989b). Characterization of large, autotrophic *Beggiatoa* spp. abundant at hydrothermal vents of the Guaymas Basin. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2909-2917.
- 1060 Nercessian, O., Reysenbach, A.-L., Prieur, D., and Jeanthon, C. (2003). Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13°N). *Environmental Microbiology* 5, 492-502.
- Newton, R.J., Griffin, L.E., Bowles, K.M., Meile, C., Gifford, S., Givens, C.E., Howard, E.C., King, E., Oakley, C.A., Reisch, C.R., Rinta-Kanto, J.M., Sharma, S., Sun, S., Varaljay, V., Vila-Costa, M., Westrich, J.R., and Moran, M.A. (2010). Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage. *ISME J* 4, 784-798.
- 1065 Nunoura, T., Oida, H., Nakaseama, M., Kosaka, A., Ohkubo, S.B., Kikuchi, T., Kazama, H., Hosoi-Tanabe, S., Nakamura, K.-I., Kinoshita, M., Hirayama, H., Inagaki, F., Tsunogai, U., Ishibashi, J.-I., and Takai, K. (2010). Archaeal Diversity and Distribution along Thermal and Geochemical Gradients in Hydrothermal Sediments at the Yonaguni Knoll IV Hydrothermal Field in the Southern Okinawa Trough. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 1198-1211.
- 1070 Ogg, C.D., and Patel, B.K.C. (2009a). *Fervidicola ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium from geothermal waters of the Great Artesian Basin, Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1100-1107.
- 1075 Ogg, C.D., and Patel, B.K.C. (2009b). *Thermotalea metallivorans* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 964-971.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'hara, B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., Oksanen, M.J., and Suggests, M. (2008). The vegan Package.
- 1080 Orcutt, B., Wheat, C.G., and Edwards, K.J. (2010). Subseafloor Ocean Crust Microbial Observatories: Development of FLOCS (Flow-through Osmo Colonization System) and Evaluation of Borehole Construction Materials. *Geomicrobiology Journal* 27, 143-157.
- Orcutt, B.N., Bach, W., Becker, K., Fisher, A.T., Hentscher, M., Toner, B.M., Wheat, C.G., and Edwards, K.J. (2011a). Colonization of subsurface microbial observatories deployed in young ocean crust. *ISME Journal* 5, 692-703.
- 1085 Orcutt, B.N., Sylvan, J.B., Knab, N.J., and Edwards, K.J. (2011b). Microbial Ecology of the Dark Ocean above, at, and below the Seafloor. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75, 361-422.
- Page, A., Tivey, M.K., Stakes, D.S., and Reysenbach, A.-L. (2008). Temporal and spatial archaeal colonization of hydrothermal vent deposits. *Environmental Microbiology* 10, 874-884.
- 1090 Pikuta, E.V., Marsic, D., Itoh, T., Bej, A.K., Tang, J., Whitman, W.B., Ng, J.D., Garriott, O.K., and Hoover, R.B. (2007). *Thermococcus thioeducens* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1612-1618.
- 1095 Preisler, A., De Beer, D., Lichtschlag, A., Lavik, G., Boetius, A., and Jørgensen, B.B. (2007). Biological and chemical sulfide oxidation in a *Beggiatoa* inhabited marine sediment. *ISME J* 1, 341-353.
- R Development Core Team (2010). *R: A language and environment for statistical computing*.

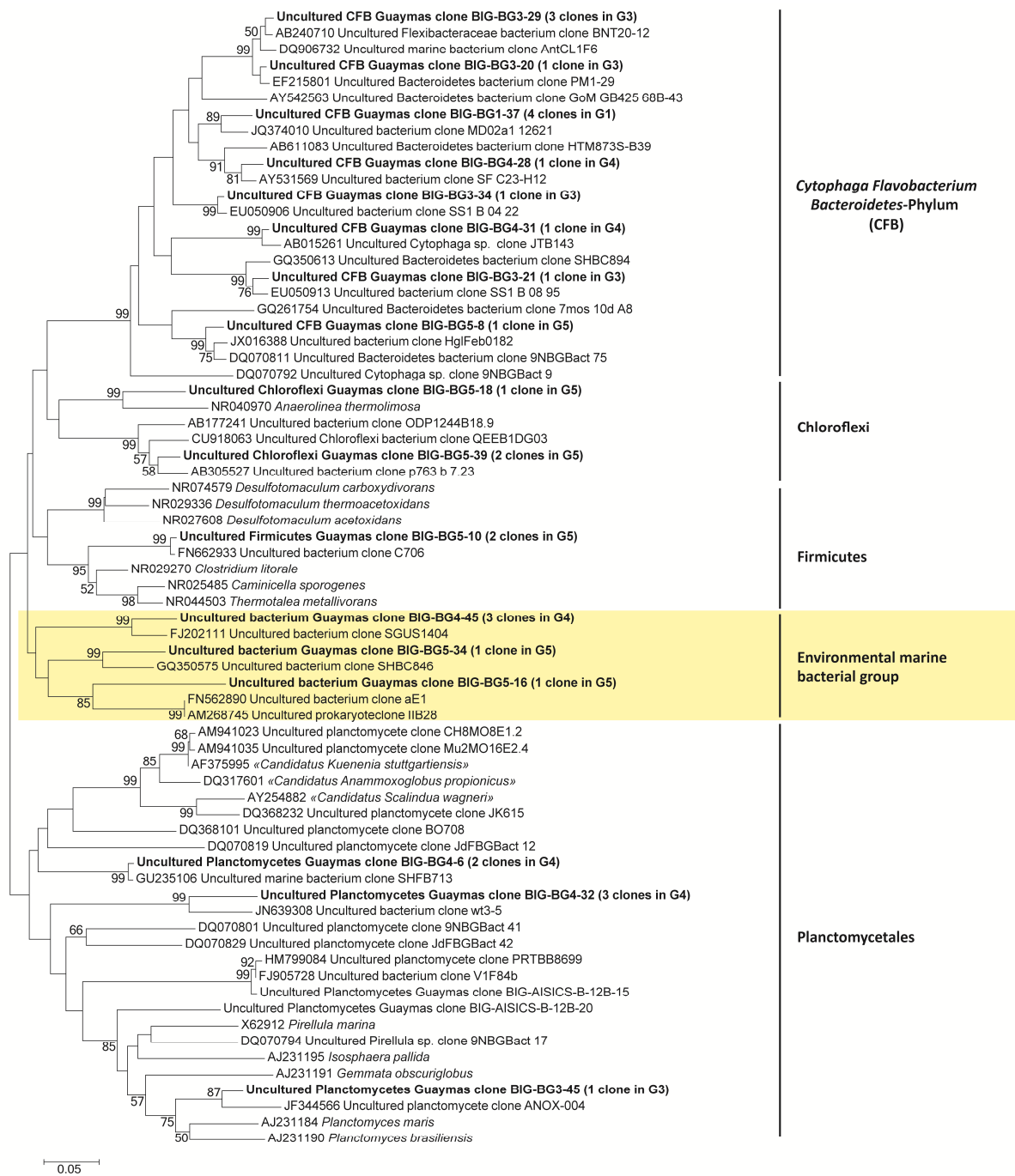
- Raiswell, R., and Canfield, D.E. (1998). Sources of iron for pyrite formation in marine sediments. *American Journal of Science* 298, 219-245.
- 1100 Rassa, A.C., Mcallister, S.M., Safran, S.A., and Moyer, C.L. (2009). Zeta-Proteobacteria Dominate the Colonization and Formation of Microbial Mats in Low-Temperature Hydrothermal Vents at Loihi Seamount, Hawaii. *Geomicrobiology Journal* 26, 623-638.
- Reysenbach, A.-L., Liu, Y., Banta, A.B., Beveridge, T.J., Kirshtein, J.D., Schouten, S., Tivey, M.K., Von Damm, K.L., and Voytek, M.A. (2006). A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature* 442, 444-447.
- 1105 Reysenbach, A.L., Longnecker, K., and Kirshtein, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3798-3806.
- Rickard, D., and Luther, G.W. (2007). Chemistry of iron sulfides. *Chemical reviews* 107, 514-562.
- 1110 Rouxel, O., Shanks lii, W.C., Bach, W., and Edwards, K.J. (2008). Integrated Fe- and S-isotope study of seafloor hydrothermal vents at East Pacific Rise 9-10°N. *Chemical Geology* 252, 214-227.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Santelli, C.M., Edgcomb, V.P., Bach, W., and Edwards, K.J. (2009). The diversity and abundance of bacteria inhabiting seafloor lavas positively correlate with rock alteration. *Environmental Microbiology* 11, 86-98.
- 1115 Santelli, C.M., Orcutt, B.N., Banning, E., Bach, W., Moyer, C.L., Sogin, M.L., Staudigel, H., and Edwards, K.J. (2008a). Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature* 453, 653-656.
- Santelli, C.M., Orcutt, B.N., Banning, E., Bach, W., Moyer, C.L., Sogin, M.L., Staudigel, H., and Edwards, K.J. (2008b). Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature* 453, 653-657.
- 1120 Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2004). Status of the Microbial Census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 686-691.
- Schoonen, M.A.A. (2004). Mechanisms of sedimentary pyrite formation. *Geological Society of America Special Papers* 379, 117-134.
- 1125 Schrader, H. (1982). Diatom biostratigraphy and laminated diatomaceous sediments from the Gulf of California. In J. R. Curray (ed.), *Initial reports of the Deep Sea Drilling Project, Leg 64*. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., p. 973-981.
- Schrenk, M.O., Kelley, D.S., Delaney, J.R., and Baross, J.A. (2003). Incidence and Diversity of Microorganisms within the Walls of an Active Deep-Sea Sulfide Chimney. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3580-3592.
- 1130 Sievert, S.M., Hügler, M., Taylor, C.D., and Wirsén, C.O. (2008). "Sulfur Oxidation at Deep-Sea Hydrothermal Vents Microbial Sulfur Metabolism," eds. C. Dahl & C.G. Friedrich. Springer Berlin Heidelberg), 238-258.
- Simoneit, B.R. (1985). Hydrothermal petroleum: genesis, migration, and deposition in Guaymas Basin, Gulf of California. *Canadian Journal of Earth Sciences* 22, 1919-1929.
- 1135 Simoneit, B.R.T., and Lonsdale, P.F. (1982). Hydrothermal petroleum in mineralized mounds at the seabed of Guaymas Basin. *Nature* 295, 198-202.
- Slobodkin, A., Campbell, B., Cary, S.C., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Jeanthon, C. (2001). Evidence for the presence of thermophilic Fe(III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13°N (East Pacific Rise). *FEMS Microbiology Ecology* 36, 235-243.
- 1140 Slobodkina, G.B., Reysenbach, A.-L.I., Panteleeva, A., Kostrikina, N., Wagner, I., Bonch-Osmolovskaya, E., and Slobodkin, A.I. (2011). *Deferrisoma camini* gen. nov., sp. nov. a novel moderately thermophilic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent that forms a distinct phylogenetic branch in Deltaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- 1145 Staudigel, H., and Hart, S.R. (1983). Alteration of basaltic glass: Mechanisms and significance for the oceanic crust-seawater budget. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 337-350.
- Steinsbu, B.O., Thorseth, I.H., Nakagawa, S., Inagaki, F., Lever, M.A., Engelen, B., Øvreås, L., and Pedersen, R.B. (2010). *Archaeoglobus sulfaticallidus* sp. nov., a thermophilic and facultatively

- 1150 lithoautotrophic sulfate-reducer isolated from black rust exposed to hot ridge flank crustal fluids. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2745-2752.
- Summit, M., and Baross, J.A. (2001). A novel microbial habitat in the mid-ocean ridge seafloor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2158-2163.
- 1155 Swanner, E.D., Nell, R.M., and Templeton, A.S. (2011). *Ralstonia* species mediate Fe-oxidation in circumneutral, metal-rich subsurface fluids of Henderson mine, CO. *Chemical Geology* 284, 339-350.
- Sylvan, J.B., Pyenson, B.C., Rouxel, O., German, C.R., and Edwards, K.J. (2012). Time-series analysis of two hydrothermal plumes at 9°50'N East Pacific Rise reveals distinct, heterogeneous bacterial populations. *Geobiology* 10, 178-192.
- 1160 Takai, K., Inagaki, F., Nakagawa, S., Hirayama, H., Nunoura, T., Sako, Y., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2003). Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated  $\epsilon$ -Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *FEMS Microbiology Letters* 218, 167-174.
- Takai, K., Nunoura, T., Ishibashi, J.-I., Lupton, J., Suzuki, R., Hamasaki, H., Ueno, Y., Kawagucci, S., Gamo, T., Suzuki, Y., Hirayama, H., and Horikoshi, K. (2008). Variability in the microbial communities and hydrothermal fluid chemistry at the newly discovered Mariner hydrothermal field, southern Lau Basin. *Journal of Geophysical Research* 113, doi:10.1029/2007JG000521.
- 1165 Takai, K., Sugai, A., Itoh, T., and Horikoshi, K. (2000). *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50 Part 2, 489-500.
- 1170 Takai, K., Suzuki, M., Nakagawa, S., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Inagaki, F., and Horikoshi, K. (2006). *Sulfurimonas paralvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1725-1733.
- 1175 Teske, A. (2010). "Sulfate-Reducing and Methanogenic Hydrocarbon-Oxidizing Microbial Communities in the Marine Environment Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology," ed. K.N. Timmis. Springer Berlin Heidelberg), 2203-2223.
- 1180 Teske, A., Edgcomb, V., Rivers, A., Thompson, J., De Vera Gomez, A., Molyneaux, S., and Wirsén, C. (2009). A molecular and physiological survey of a diverse collection of hydrothermal vent *Thermococcus* and *Pyrococcus* isolates. *Extremophiles* 13, 905-915.
- 1185 Teske, A., Hinrichs, K.-U., Edgcomb, V., De Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S.P., Sogin, M.L., and Jannasch, H.W. (2002). Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1994-2007.
- Thorseth, I.H., Furnes, H., and Heldal, M. (1992). The importance of microbiological activity in the alteration of natural basaltic glass. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 845-850.
- 1190 Torsvik, T., Furnes, H., Muehlenbachs, K., Thorseth, I.H., and Tumyr, O. (1998). Evidence for microbial activity at the glass-alteration interface in oceanic basalts. *Earth and Planetary Science Letters* 162, 165-176.
- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schloter, M., Wagner, M., Richter, A., and Schleper, C. (2011). *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 8420-8425.
- 1195 Vargas, A., and Strohl, W. (1985). Utilization of nitrate by *Beggiatoa alba*. *Archives of Microbiology* 142, 279-284.

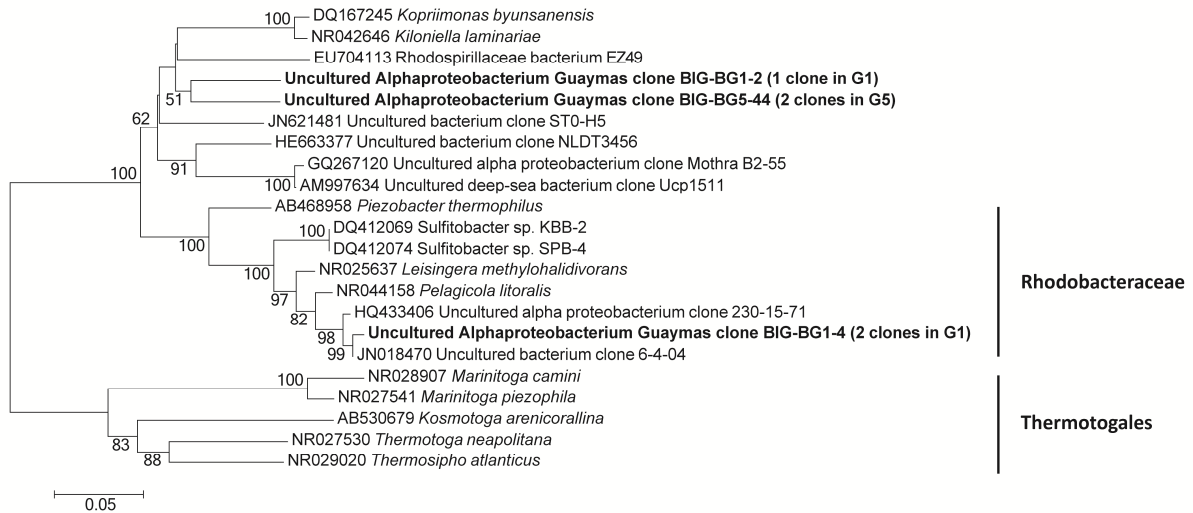
- 1200 Vetriani, C., Jannasch, H.W., Macgregor, B.J., Stahl, D.A., and Reysenbach, A.-L. (1999). Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4375-4384.
- Von Damm, K.L., Edmond, J.M., Grant, B., Measures, C.I., Walden, B., and Weiss, R.F. (1985a). Chemistry of submarine hydrothermal solutions at 21 °N, East Pacific Rise. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49, 2197-2220.
- 1205 Von Damm, K.L., Edmond, J.M., Measures, C.I., and Grant, B. (1985b). Chemistry of submarine hydrothermal solutions at Guaymas Basin, Gulf of California. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49, 2221-2237.
- 1210 Walker, C.B., De La Torre, J.R., Klotz, M.G., Urakawa, H., Pinel, N., Arp, D.J., Brochier-Armanet, C., Chain, P.S.G., Chan, P.P., Gollabgir, A., Hemp, J., Hügler, M., Karr, E.A., Könneke, M., Shin, M., Lawton, T.J., Lowe, T., Martens-Habben, W., Sayavedra-Soto, L.A., Lang, D., Sievert, S.M., Rosenzweig, A.C., Manning, G., and Stahl, D.A. (2010). Nitrosopumilus maritimus genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 8818-8823.
- 1215 Weber, K.A., Achenbach, L.A., and Coates, J.D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology* 4, 752-764.
- Webster, G., John Parkes, R., Cragg, B.A., Newberry, C.J., Weightman, A.J., and Fry, J.C. (2006). Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru Margin. *FEMS Microbiology Ecology* 58, 65-85.
- 1220 Webster, G., Newberry, C.J., Fry, J.C., and Weightman, A.J. (2003). Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods* 55, 155-164.
- Welhan, J.A. (1988). Origins of methane in hydrothermal systems. *Chemical Geology* 71, 183-198.
- 1225 Wheat, C.G., and Mottl, M.J. (2000). Composition of pore and spring waters from Baby Bare: global implications of geochemical fluxes from a ridge flank hydrothermal system. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 629-642.
- Whelan, J.K., Simoneit, B.R., and Tarafa, M.E. (1988). C<sub>1</sub>- C<sub>8</sub> hydrocarbons in sediments from Guaymas Basin, Gulf of California—Comparison to Peru Margin, Japan Trench and California Borderlands. *Organic Geochemistry* 12, 171-194.
- 1230 Whitman, W.B., Bowen, T.L., and Boone, D.R. (eds.). (2006). *The methanogenic bacteria*. Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, Erko Stackebrandt.
- Widdel, F., and Hanson, T.E. (eds.). (1992). *The Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Bacteria*. New York USA: Balows A., Truper H. G., Dworkin M., Harder W., and Schleifer K-H.,.
- Yamamoto, M., and Takai, K. (2011). Sulfur metabolisms in epsilon- and gamma-Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *Frontiers in Microbiology* 2.
- 1235 Zavarzina, D.G., Tourova, T.P., Kuznetsov, B.B., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Slobodkin, A.I. (2002). *Thermovenabulum ferriorganovororum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic, endospore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1737-1743.
- 1240 Zillig, W., Holtz, I., Janekovic, D., Schäfer, W., and Reiter, W.D. (1983). The archaebacterium *Thermococcus celer* represents a novel genus within the thermophilic branch of the archaebacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 88-94.

1245

Supplementary information:

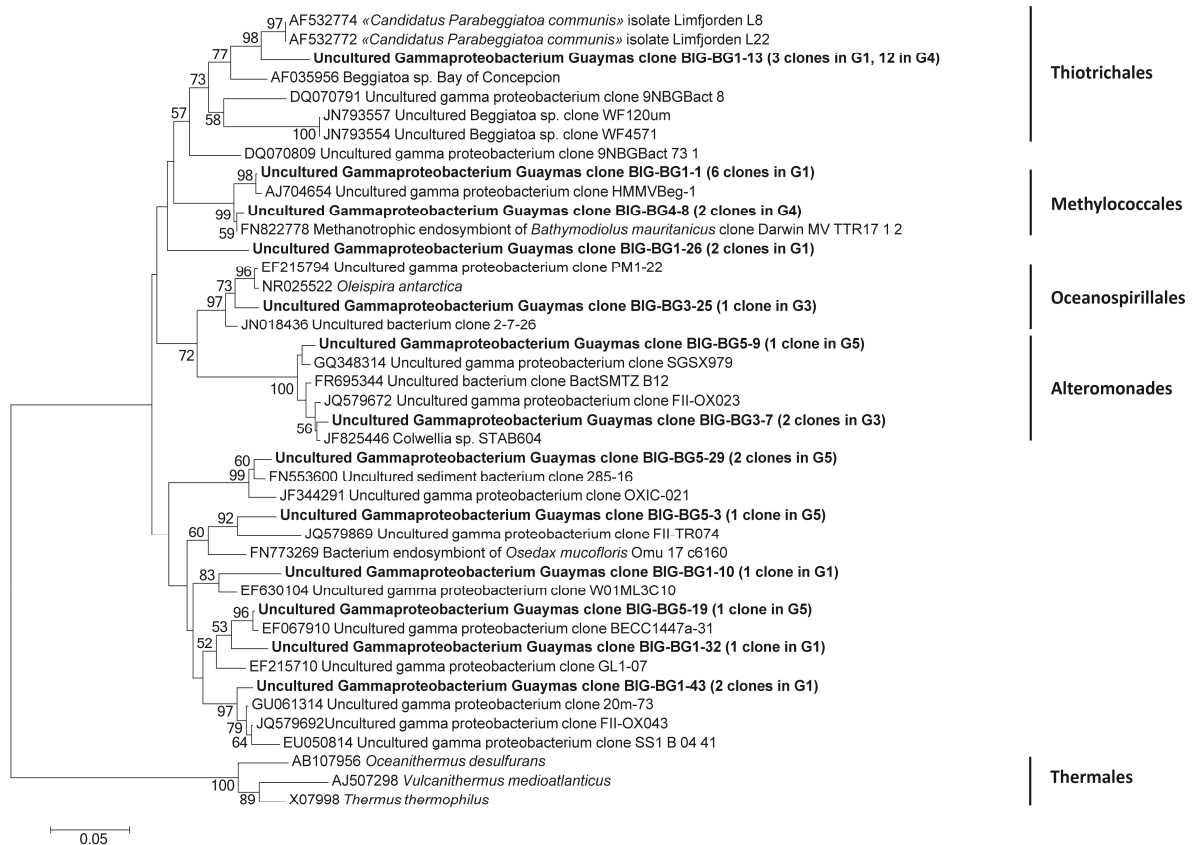


1250 **Figure 1:** Phylogenetic relationships of the Bacteria (excluding Proteobacteria) based on 16S rRNA gene sequences determined by neighbour-joining analysis. Bootstrap values above 50% (from 1000 bootstrap samples) are indicated near their corresponding nodes.



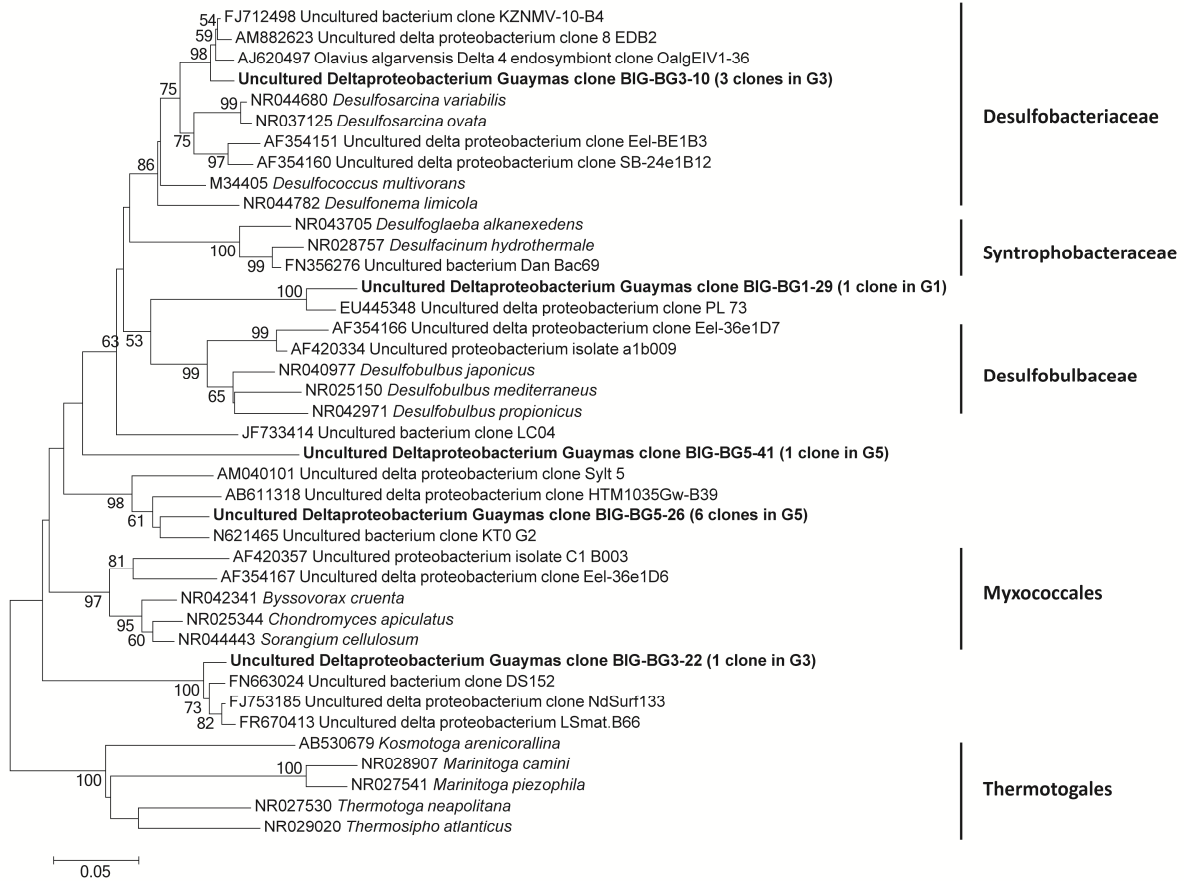
1255 **Figure 2:** Neighbor-joining phylogenetic tree showing the Alphaproteobacteria based on 16S rRNA gene. Bootstrap values above 50% (from 1000 bootstrap samples) are indicated near their corresponding nodes. Thermotogales are used as outgroup.

1260

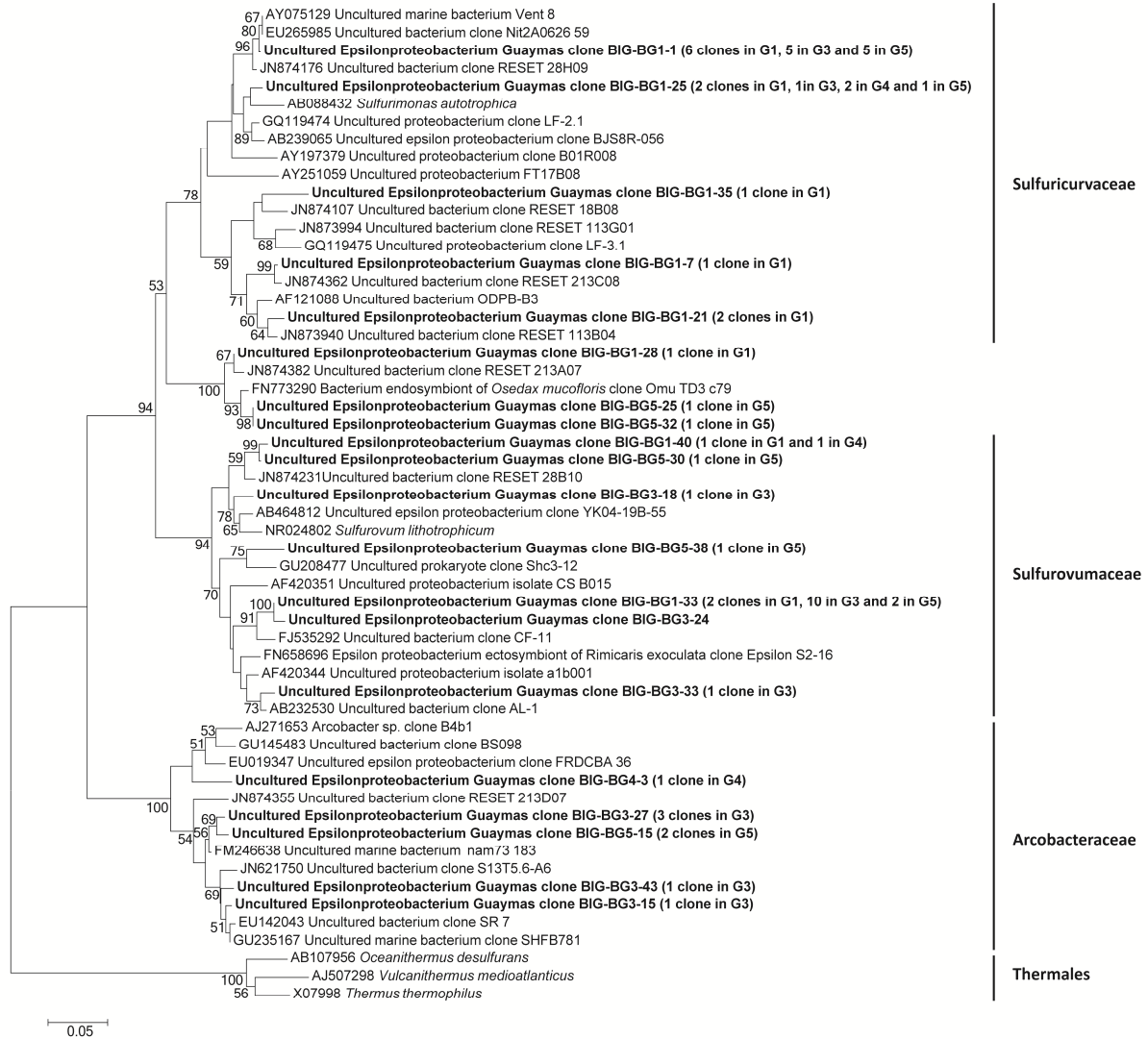


**Figure 3:** Neighbor-joining phylogenetic tree showing the Gammaproteobacteria based on 16S rRNA gene. Bootstrap values above 50% (from 1000 bootstrap samples) are indicated near their corresponding nodes. Thermotogales are used as outgroup.

1265

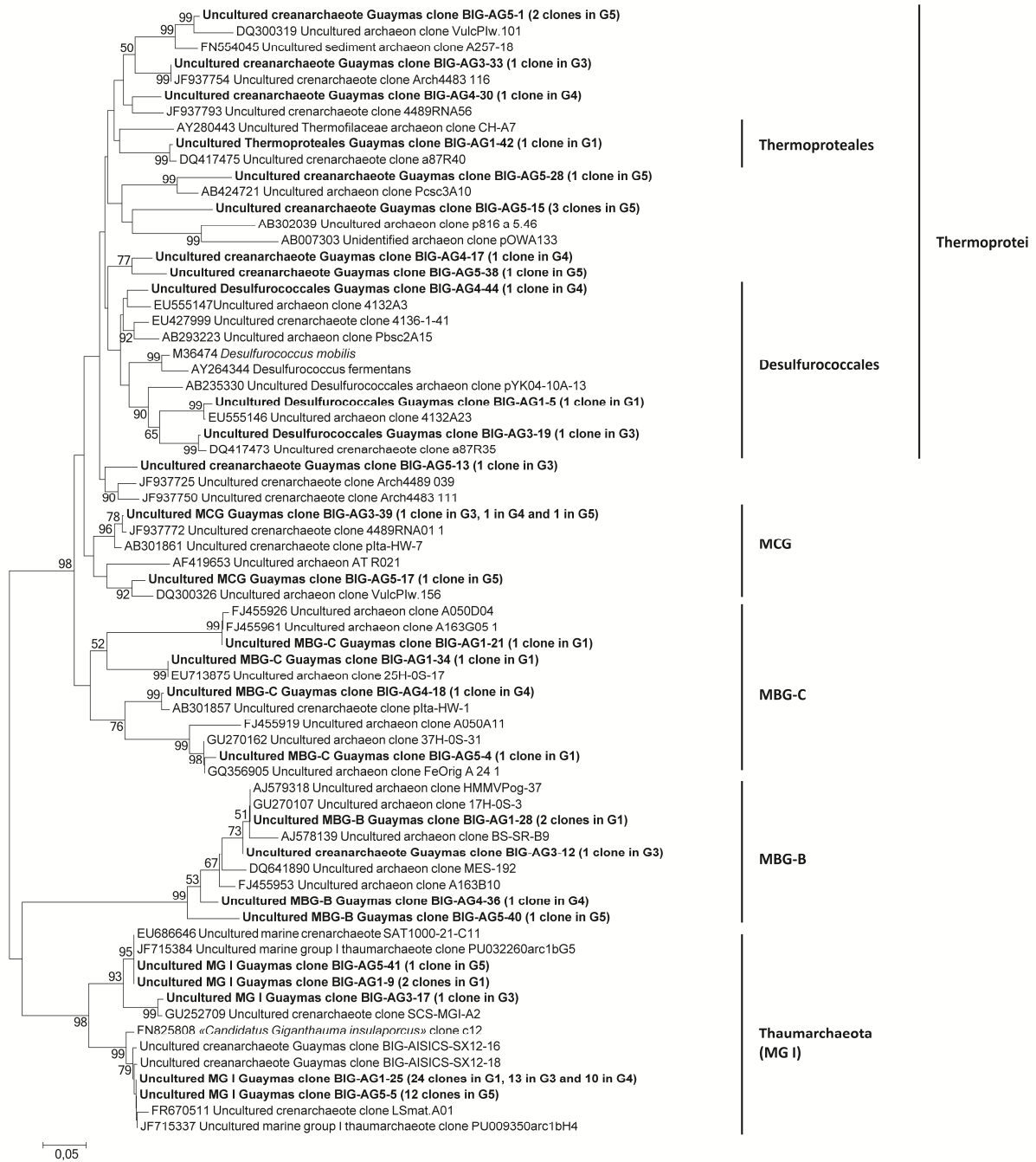


**Figure 4:** Neighbor-joining phylogenetic tree showing the Deltaaproteobacteria based on 16S rRNA gene. Bootstrap values above 50% (from 1000 bootstrap samples) are indicated near their corresponding nodes. Thermotogales are used as outgroup.

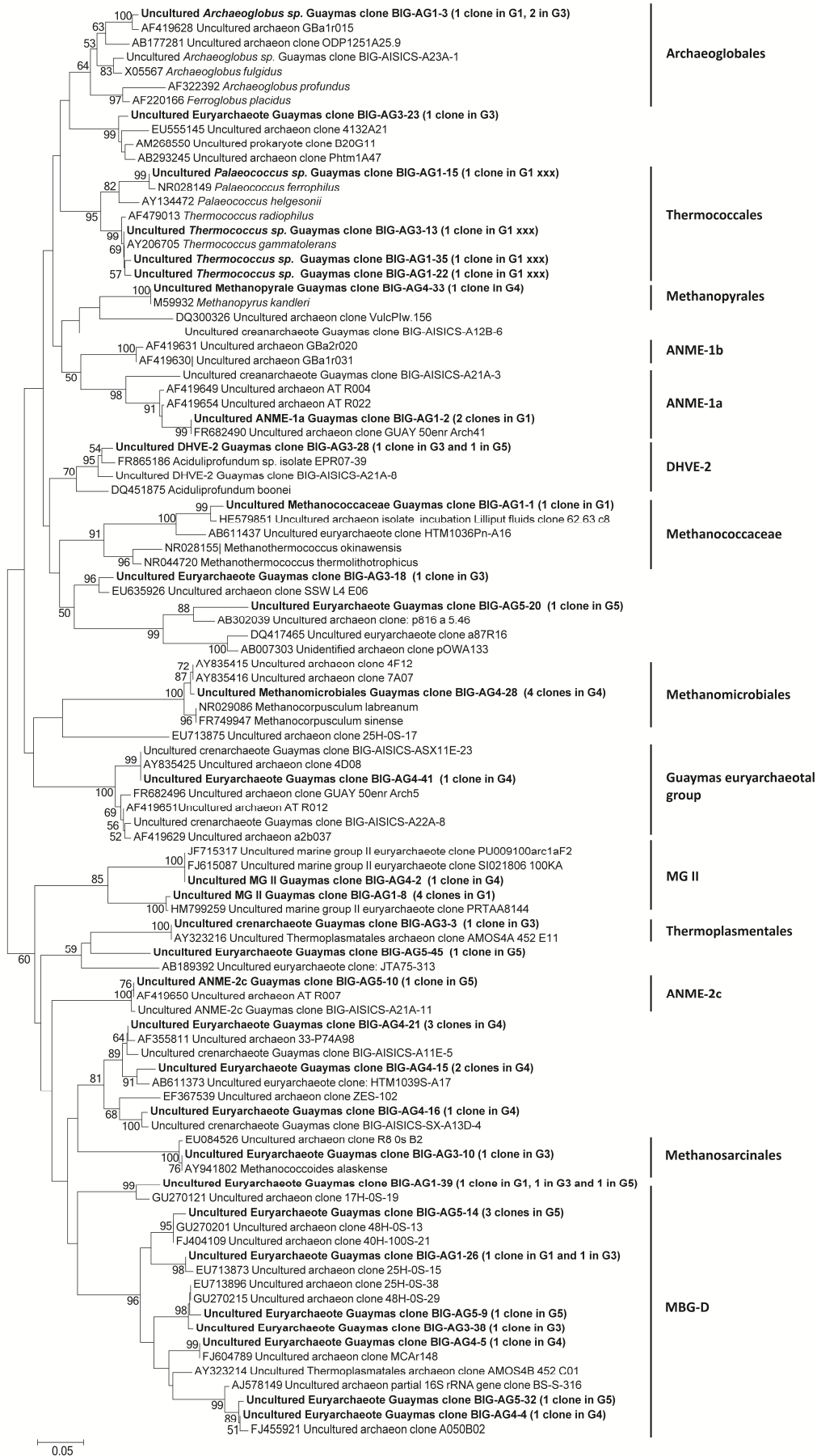


**Figure 5:** Neighbor-joining phylogenetic tree showing the Epsilonproteobacteria based on 16S rRNA gene. Bootstrap values above 50% (from 1000 bootstrap samples) are indicated near their corresponding nodes. Thermales are used as outgroup.





**Figure 6:** Phylogenetic relationships of the Crenarchaeota based on 16S rRNA gene sequences determined by neighbour-joining analysis. Bootstrap values above 50% (from 1000 bootstrap samples) are indicated near their corresponding nodes.



**Figure 7:** Phylogenetic relationships of the Euryarchaeota based on 16S rRNA gene sequences determined by neighbour-joining analysis. Bootstrap values above 50% (from 1000 bootstrap samples) are indicated near their corresponding nodes.

#### 4. Etude B : Article 2 - Microbial colonization of basaltic glasses in hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin

##### Authors & Affiliations:

Nolwenn Callac<sup>abcd</sup>, Céline Rommevaux-Jestin<sup>e</sup>, Olivier Rouxel<sup>df</sup>, Françoise Lesongeur<sup>abc</sup>, Céline Liorzou<sup>d</sup>, Claire Bollinger<sup>g</sup>, Antony Ferrant<sup>h</sup> and Anne Godfroy<sup>abc\*</sup>

<sup>a</sup>Université de Brest, UEB, IUEM, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197 Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France.

<sup>b</sup>Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, 29280 Plouzané, France.

<sup>c</sup>CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197, 29280 Plouzané, France.

<sup>d</sup>Université de Brest, IUEM, Domaines Océaniques UMR6538, Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané, France.

<sup>e</sup>Laboratoire Géobiosphère Actuelle et Primitive, IPGP, Sorbonne Paris Cité, Univ Paris Diderot, UMR 7154 CNRS, 75005 Paris, France

<sup>f</sup>Ifremer, Laboratoire de Géochimie et de Métallogénie, 29280 Plouzané, France.

<sup>g</sup>Université de Brest, IUEM, UMS 3113, Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané, France

<sup>h</sup>Ifremer, Unité Recherches et Développements Technologiques, 29280 Plouzané, France

E-mail: anne.godfroy@ifremer.fr

##### Correspondance:

Dr. Anne Godfroy

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes – UMR 6197

IFREMER – Centre de Brest

BP70

29280 Plouzané

France

**Running Title** = Microbial colonization, basaltic glasses, hydrothermal sediments

**Abstract**

Oceanic basalts host diverse microbial communities with various metabolisms involved in C, N, S and Fe biogeochemical cycles which may contribute to mineral and glass alteration processes at, and below the seafloor. In order to study the microbial colonization of basaltic glasses and their biotic/abiotic weathering, two colonization modules called AISICS (“Autonomous *In Situ* Instrumented Colonization System”) were deployed in hydrothermal deep-sea sediments at the Guaymas Basin for 8 days and 22 days. Each AISICS module contained 18 colonizers (including sterile controls) filled with basaltic glasses of contrasting composition. Chemical analyses of ambient fluids sampled through the colonizers showed a greater contribution of hydrothermal fluids (maximum temperature 57.6°C) for the module deployed during the longer time period. For each colonizer, the phylogenetic diversity and metabolic function of bacterial and archaeal communities were explored using a molecular approach. Results show large microbial diversity in all colonizers. The bacterial distribution is primarily linked to the deployment duration, as well as the depth for the short deployment time module. Some 16s rRNA sequences form a new cluster of *Epsilonproteobacteria*. Within the Archaea the retrieved diversity could not be linked to duration, depth or substrata. However, *mcrA* gene sequences belonging to the ANME-1 *mcrA*-guaymas cluster were found either sometimes associated with their putative sulfate-reducers syntrophs depending on the colonizers. Although no specific alteration texture could be observed on glasses, nano-crystals of barite and pyrite were observed in close association with organic matter, suggesting a possible biological mediation. This study gives new insights into the colonization steps of volcanic rock substrates and the capability of microbial communities to exploit new environmental conditions.

**Keywords** = colonization module, basalt alteration, Guaymas basin, organic-rich sediment, hydrothermal systems,

**1. Introduction**

Alteration of the oceanic crust by seawater is one of the most important processes controlling the global fluxes of many elements at mid-oceanic ridges and ridge flanks (e.g. (Staudigel and Hart, 1983 ; Wheat and Mottl, 2000) and it strongly affects the mineralogical and chemical composition of the aging oceanic crust (Alt, 1995). Since sub-seafloor basaltic crust represents the largest habitable zone by volume on Earth, microbes may play a significant role in the alteration process (Bach and Edwards, 2003). Microorganisms exploiting these reactions are known from basalt exposed at the seafloor, where the oxidation of reduced sulfur (S) and iron (Fe) from basalt with dissolved oxygen and nitrate from seawater supports high microbial biomass and diversity (Mason et al., 2008 ; Santelli et al., 2008a ; Orcutt et al., 2011b). It has been demonstrated that seafloor basalts harbor diverse microbial

35 communities either on rock surfaces (epilithic microorganisms) or inside the rocks (endolithic microorganisms) (Mason et al., 2007 ; Santelli et al., 2009).

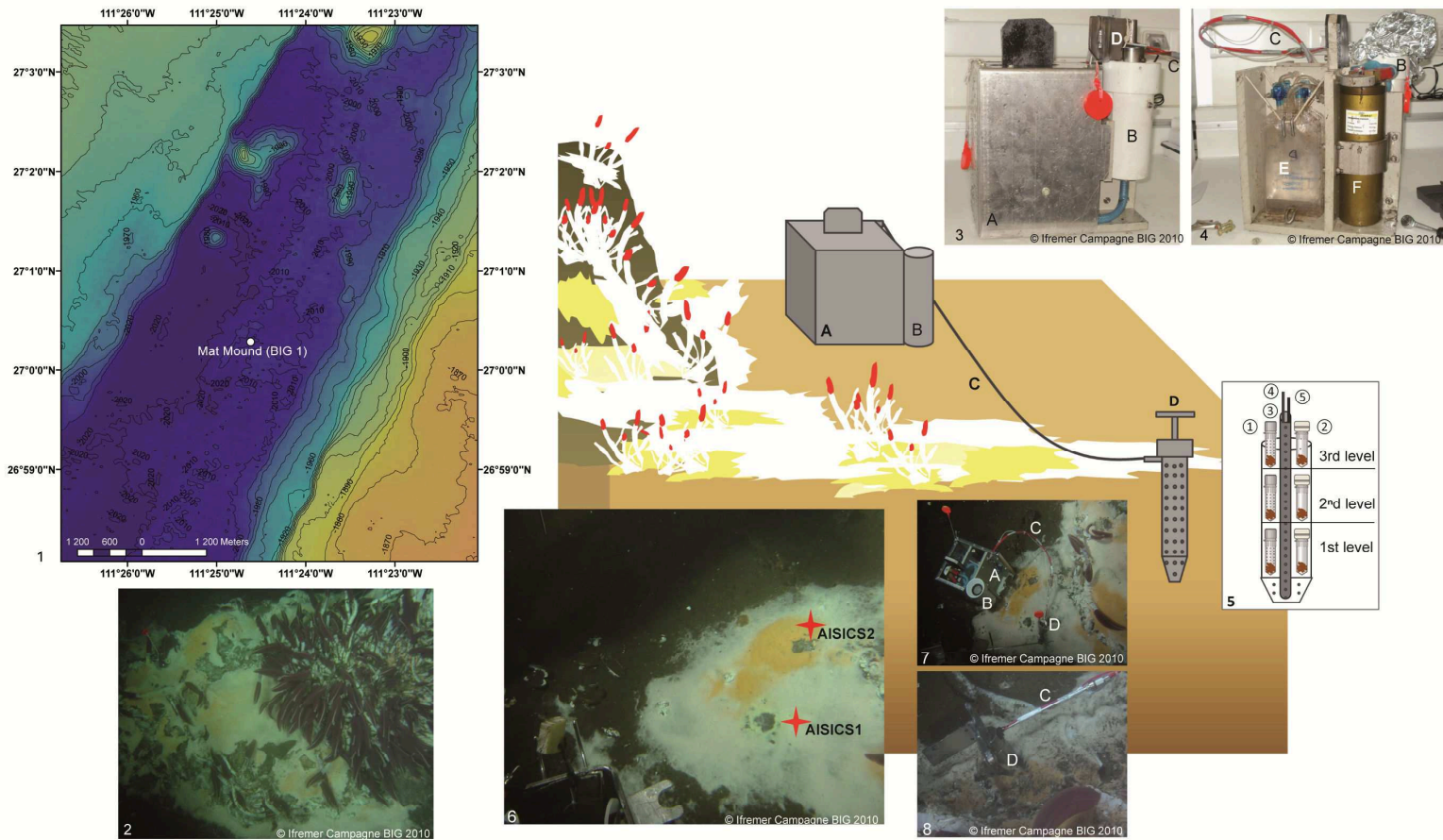
Seafloor hydrothermal systems are also complex environments with highly diverse and active microbial communities (Schrenk et al., 2003 ; Edwards et al., 2005 ; Nakagawa et al., 2006 ; Page et al., 2008 ; Flores et al., 2011) fuelled by steep physical and chemical gradients in the mixing zone  
40 between oxygenated cold seawater and reduced metal-rich high temperature hydrothermal fluid. Likewise, seafloor hydrothermal chimneys and hydrothermally-affected sediments provide specific habitats hosting a wide range of microorganisms involved in key biogeochemical reactions related to carbon, sulfur, nitrogen and iron cycles (Burggraf et al., 1990 ; Kashefi et al., 2002 ; Teske et al., 2002 ; Dhillon et al., 2003 ; Francis et al., 2007 ; Byrne et al., 2009 ; Biddle et al., 2012 ; Bowles et al., 2012).

45 Hence, microorganisms interact with their environment in many ways, and, in turn, could affect fluid composition, and promote mineral dissolution or precipitation (Edwards et al., 2003a ; Edwards et al., 2005 ; Houghton and Seyfried Jr, 2010). Evidence for microbial alteration of basaltic glasses is also increasing, and includes the alteration textures of volcanic glass (Furnes et al., 2001 ; Einen et al., 2006) as well as putative presence of DNA revealed by high C, N and P contents in altered glass  
50 (Thorseth et al., 1992). The light isotopic composition of C and S in altered basalts also demonstrates potential organic C cycling and sulfate reduction within volcanic basement (Furnes et al., 2001 ; Rouxel et al., 2008b).

Hydrothermally heated sediments covering oceanic basalts are present in the Guaymas Basin, one of the semi-closed basins of the Gulf of California (Mexico). The Guaymas Basin is covered by a thick  
55 layer of organic and diatomaceous-rich sediments (100-500m) due to a high sedimentation rate (up to 2 mm per year) and biological productivity in the upper ocean (Simoneit and Lonsdale, 1982 ; Von Damm et al., 1985b ; De la Lanza-Espino and Soto, 1999 ; Dean et al., 2004). In the Southern Trough area, where crustal accretion takes place (Lonsdale and Becker, 1985) (Figure 1), the seafloor is exposed to high-temperature hydrothermal activity. The circulation of hydrothermal fluids results in  
60 both the formation of sulfide and carbonate-rich chimneys and profoundly affects the sediment geochemistry. Diagenetic interactions between the ascending hydrothermal fluids and sediments result in the pyrolysis of organic matter and precipitation of metal-sulfide minerals in subsurface (e.g. pyrrhotite FeS). Products of pyrolysis include light hydrocarbons, short-chain organic acids, particulate organic matter, ammonia and methane (Welhan, 1988 ; Martens, 1990) which provide  
65 unique conditions for sustaining uncommon and diverse microbial life (Teske et al., 2002). Likewise, microbial communities within microbial mats at Guaymas Basin have been extensively studied in term of their physiological and phylogenetical diversity, using both cultural and molecular approaches (Teske et al., 2002 ; Dhillon et al., 2005 ; Holler et al., 2011 ; Biddle et al., 2012 ; Bowles et al., 2012 ; McKay et al., 2012).

70 The colonization of mineral substrates in hydrothermal environments or their vicinity has been  
already studied using diverse approaches in order to assess both prokaryotic and micro-eukaryotic  
diversity. Many microbial colonization systems (e.g. vent caps, TRAC, ISCS, vent catheters, growth  
chamber, thermocouples) were previously deployed on various hydrothermal areas (Reysenbach et  
al., 2000 ; Corre et al., 2001 ; Takai et al., 2003 ; Alain et al., 2004 ; Higashi et al., 2004 ; Page et al.,  
75 2008 ; Rassa et al., 2009). Those studies generally showed that the *Epsilonproteobacteria* were  
dominant, and that the microbial diversity can vary both in terms of structure and size, depending on  
environmental conditions, mineral substrate composition, and deployment duration. More recently,  
rock substrates were deployed directly in boreholes (Orcutt et al., 2010 ; Edwards et al., 2011 ;  
Orcutt et al., 2011a) using the FLOCSs (Flow-Trough Osmo Colonization Systems). So far, microbial  
80 or/and abiotic alteration of basaltic glasses were investigated at low (i.e. 3-4°C) (Mason et al., 2007 ;  
Santelli et al., 2009) to medium temperatures (i.e. 40°C and 60°C) (Orcutt et al., 2010 ; Orcutt et al.,  
2011a) in organic-matter poor volcanic environments. However, little is known about microbial  
colonization processes and basaltic glass alteration under hydrothermal conditions and in an organic-  
matter rich system, especially in term of the carbon and energy sources for microbial life and impact  
85 on basaltic glass alteration. Here, the AISICS “**Autonomous *In Situ* Instrumented Colonization System**”  
containing basaltic substrata was deployed for 8 and 22 days into the sediments underlying microbial  
mats and exposed to hydrothermal conditions in the Guaymas Basin. Since basaltic glass substrates  
exposed to *in situ* conditions may be affected by both biological and inorganic (i.e. fluid/rock)  
interactions, colonization experiments were systematically performed in the presence of abiotic  
90 controls. The microbial diversity of the samples was analyzed using 16S rRNA and functional gene  
sequencing, and fluids were recovered to determine their chemical composition. Moreover, glass  
alteration and secondary mineral precipitation were investigated under both biotic and abiotic  
conditions.

95  
100  
105  
110  
115  
120  
125  
130



**Figure 1:** Schematic diagram illustrating the deployment of the *in situ* AISICS module at Mat Mound site. (1) Bathymetric map showing the location of Mat Mound site in the Southern Trough of the Guaymas Basin ; (2) Mat Mound site exhibiting microbial mats and macro-fauna dominated by Riftia tub tube worms (*Siboglinidae*); (photo taken with the submersible Nautille during the BIG cruise, Dive 1745) ; (3) AISICS module covered by its lid before its deployment ; (4) AISICS module without its lid before its deployment ; (5) Diagram illustrating the internal structure of the incubator with biotic (1) and abiotic (2) mini-colonizers distributed per floor; the central titanium sheath containing the Micrel temperature sensor (4) and the fluid sample probe (5) hosted in a titanium sheath are placed in the middle of the incubator and are connected to the instrumented base ; (6) The deployment site of AISICS1 and 2 ; (7) The deployed AISICS1 (photo was taken with the submersible Nautille during the BIG cruise, Dives 1745) ; (8) The deployed AISICS2 (photo was taken with the submersible Nautille during the BIG cruise, Dives 1763) ; (A) instrumented module; (B) cylindrical insulated chamber; (C) sampling pipes and temperature probe; (D) incubator; (E) sampling pouches and (F) electronics.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Site description

Deployments were conducted by the research submersible *Nautilus* (Ifremer) during the BIG (Biodiversité et Interactions à Guaymas) oceanographic cruise (RV *L'Atalante*) that took place in the Guaymas Basin in June 2010. AISICS deployments were performed at the Mat Mound site (N27°00.388, W111°25.471; 2004 m depth, BIG1 Marker) on the Southern Trough (Figure 1). This site consists of a small sulfide- and carbonate-rich active hydrothermal mound emerging above the sediment at the seafloor. The mound and surrounding sediments are covered by thick, white and orange microbial mats. The macrofauna is dominated by dense *Riftia* worm bushes at the top of the mound, and *Alvinellids* and *Polynoids* around the mound (Figures 1). The choice of this site was guided by the occurrence of abundant white and orange microbial mat. The colonizers were deployed within a 20 cm<sup>2</sup> area located on the edge of a white microbial mat at the base of the mound. Temperatures of 36.5, 68, 84.5 and 103°C were measured at 10, 20, 30 and 40 cm depth below seafloor respectively. The deployment and recovery of the AISICS module were carried out one after the other, in order to minimize sediment and fluid flow disturbance.

### 2.2. Description of the Autonomous *In Situ* Instrumented Colonization System

The AISICS system is an autonomous instrumented microbial colonizer. It consists of the incubator itself and the instrumented module (Figure 1) (Sarrazin et al., 2006). The incubator is a titanium cylindrical chamber, perforated by numerous apertures 0.5 cm in diameter. A central titanium sheath, also perforated with 0.5 cm holes, hosts a Micrel<sup>TM</sup> temperature sensor and a titanium sampling pipe (0.5 cm diameter) both connected to the instrumented module by a 1 m long sampling tube. The AISICS instrumented module contains the electronic control card and battery for the pumping system encased in a watertight cylinder. The temperature probe electronics and four 100 mL sampling bags (PVC pouch, Baxter Clinic) are connected to a four-ways pump device for fluid collection (Sarrazin et al., 2006). The pump speed was set to a low flow rate (3.3 mL min<sup>-1</sup>) in order to minimize environmental perturbation. The insulated chamber was designed for aseptic transportation of the incubator by the means of o-rings at the top and bottom. The temperature probe was computer-encoded before deployment to record the temperature at regular time intervals. The four-way valve and fluid pumping device was also programmed on board to set the trigger time for fluid sampling.

Within each AISICS module, a total of 18 mini-colonizers were placed around the central sheath, and stacked over three layers (i.e. six per floor; 4 biotic, 2 abiotic). A perforated Teflon disk separated each layer from the other and allowed fluid circulation through the colonizers, (Figure 1). For the biotic experiments, the mini-colonizers consisted of a set of 2 mL polypropylene microtubes with



caps (SX-8G IP-Star® Compact), both perforated with 1 mm holes (Figure 1). For abiotic controls, the mini-colonizers also consist of a set of 2 mL polypropylene microtubes (SX-8G IP-Star® Compact) with the cap replaced by a 0.22 µm filter cellulose membrane (Millipore) (Figure 1). The apertures of the incubator, Teflon disk and mini-colonizer tubes and caps, ensure fluid exchange throughout the different compartment of the mini-colonizers.

### 2.3. Substrata, instrumental setting and deployment

Synthetic basaltic glasses were prepared using a mixture of pure element oxide and carbonate powders (with proportion in weight %: SiO<sub>2</sub>, 48.68; Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 15.7; CaO, 19.8; MgO, 16.12; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 14; Na<sub>2</sub>O, 4.62; K<sub>2</sub>O, 0.29; TiO<sub>2</sub>, 1.39) typical of tholeiitic basalt. One batch of synthetic basaltic glass was prepared using <sup>57</sup>Fe-enriched Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> powder obtained from Oak Ridge National Laboratory. Before mixing in agate mortar, powders were dried at 150°C for at least 24 hours. Two different furnaces were used to prepare glass beads: a Carbolite™ 1700 muffle furnace with a maximum temperature of 1600°C with manual quenching under ambient atmosphere conditions, and a vertical furnace, mounted at Geomaterials laboratory (Univ. Marne La Vallée), with automatic quench system under controlled atmosphere (H<sub>2</sub> or O<sub>2</sub>). The glass beads were prepared according to the following scheme: a temperature ramp up to 600°C for 30 min to 2h, decarbonation at 600°C for 45 min to 1h, another temperature increase up to 1600°C from 45 min to 3h, followed by 60 min at 1600°C and immediate quenching.

A sample of natural basaltic glass was obtained by separating the chilled margin of a pillow basalt (sample Bat09-ROC22) from the Mid-Atlantic Ridge recovered during the Bathyluck cruise (2009) at Lucky Strike hydrothermal field. Glass composition (wt%) has been determined: SiO<sub>2</sub>, 51.74; Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 14.96; CaO, 12.18; MgO, 8.1; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 9.95; Na<sub>2</sub>O, 2.28; K<sub>2</sub>O, 0.16; TiO<sub>2</sub>, 1.05; MnO, 0.18; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0.12. All natural and synthetic glasses were crushed in an agate mortar to obtain fragments of less than 2 mm in size. Chips were subsequently cleaned in an ultrasonic bath in ethanol and then air-dried.

Each mini-colonizer was filled with about 0.6 mL of glass fragments, and sterilized by autoclaving during 30 min at 121°C, then by UV for at least 1h. All titanium parts (i.e. incubator and the central titanium sheath) and Teflon-disks were rinsed five times with deionized water (MilliQ™ 18mΩ), cleaned up using Desibac HPC® solution, rinsed again with deionized water then with Ethanol 96% and finally UV-treated for at least 1h. The cylindrical insulated chamber was also cleaned using Desibac HPC®, deionized water and Ethanol 96% then filled with sterilized seawater prior to deployment.

#### 2.4. AISICS1 and 2

The AISICS1 module was deployed in the sediment at 40 cm depth below a thick white microbial mat (Figure 1). The maximum temperature reached at this depth was measured at 57.6°C over the 22 days of deployment. The AISICS1 mini-colonizers were filled with three different basaltic glass types: two synthetic glasses including one doped with <sup>57</sup>Fe (noted respectively, βsyn and βsyn\*), and the basaltic glass (noted βnat). Each of the three layers contained 1 biotic mini-colonizer with βsyn\*, 1 biotic mini-colonizer with βsyn, 2 biotic mini-colonizers with βnat, 1 abiotic mini-colonizer with βsyn and 1 abiotic mini-colonizer with βnat. The temperature measurement frequency was fixed every 30 seconds. The fluid pumping system was programmed to collect three fluid samples at 48 hours intervals.

The AISICS2 module was deployed for 8 days, at the junction between a white and orange microbial mat, at a distance of 5 to 10 cm from the location of AISICS1 module (Figure 1). Each of the three layers contained two biotic mini-colonizers filled with βnat and two others with βsyn\* and one abiotic tube for each substrate. Because of the short duration of deployment of this module, the temperature measurement frequency was set for every second and the fluid pumping system was programmed to collect fluids every 48 hours after deployment.

#### 2.5. Sample processing

Immediately after on board recovery, each glass sample from the mini-colonizers was aseptically split into 5 fractions. Two fractions were stored for molecular diversity analysis by freezing one at -80°C and storing the other at -20°C in 96% ethanol. One fraction was stored directly at -20°C for SEM and RAMAN analysis; one fraction was fixed for 2 h in 2% formaldehyde (prepared with sterile seawater), rinsed 3 times with sterile seawater and stored in 96% ethanol at -20°C for FISH and SEM analysis, as the last fraction directly stored in 50% ethanol – PBS 1X solution (1 : 1) at -20°C. During processing of the mini-colonizers located in the 3<sup>rd</sup> level of the AISICS1 module, biotic βnat and βsyn\* samples were accidentally mixed but nevertheless treated, and referred as βmix.

#### 2.6. DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from the two fractions of basaltic glasses for molecular diversity analysis, using the FastDNA® Spin Kit for Soil (Bio101 Systems, MP Biomedicals), following the protocol modified by Webster and collaborators (Webster et al., 2003). The DNA extractions of each sample were done independently for each type of storage and the extraction products were then pooled prior to PCR amplification.

### 2.7. 16S rRNA gene amplification

The 16S rRNA gene was amplified using the specific archaeal or bacterial domain primer combinations of A8F and ARC915R (Casamayor et al., 2000 ; Kolganova et al., 2002) and E8F and U907R (Lane et al., 1985 ; Lane D, 1991) respectively (Table 1). Both archaeal and bacterial 16S rRNA gene amplification reactions were performed in 50 µl reaction mixtures containing: 10 µl of 5X GO Taq<sup>®</sup> DNA polymerase buffer (Promega), 5 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub> solution (Promega), 1 µl of 10 mM dNTPs (Eurogentec), 0.2 µl of each primers at 100 µM and 0.24 µl of 5 U.µl<sup>-1</sup> GO Taq<sup>®</sup> DNA polymerase (Promega). All amplifications were conducted in 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing for 1 min 30 s at 58°C or 52°C for the archaeal or bacterial 16S rRNA gene respectively, and extension at 72°C for 7 min. All PCR reactions were carried out using a GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700 (Applied Biosystems) thermal cycler, and PCR products were visualized using gel electrophoresis.

### 2.8. PCR amplification of functional genes

The presence of sulfate-reducers was highlighted with the amplification of *dsrAB* gene targets (coding for the (di)sulfite reductase), with a DSR1F and DSR4R primer combination (Wagner et al., 1998) (Table 1). The presence of methanogens was investigated with the amplification of *mcrA* gene (coding for the alpha subunit of the methyl-coenzyme M-reductase) using ME1 and ME2 as coupled primers (Hales et al., 1996) (Table 1). Each amplification reaction was performed in 50 µl reaction mix containing: 10 µl of 5X GO Taq<sup>®</sup> DNA polymerase buffer (Promega), 5 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub> solution (Promega), 1 µl of 10 mM dNTPs (Eurogentec), 0.2 µl of each primer at 100 µM and 0.24 µl of 5 U.µl<sup>-1</sup> GO Taq<sup>®</sup> DNA polymerase (Promega). All amplifications were conducted in 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing for 1 min 30 s and extension at 72°C for 7min. The annealing temperature was set at 55°C and 50°C for *dsrAB* gene and *mcrA* gene respectively.

260

265

270

**Table 1:** List of the PCR primers used during the study.

Primers	Target	Sequence (5'-3')	Tm°C	Reference
<b>A8F</b>	Archaeal 16S rRNA	CGG-TTG-ATC-CTG-CCG-GA	58	(Kolganova et al., 2002)
<b>ARC915R</b>		CTG-CTC-CCC-CGC-CAA-TTC-CT		(Casamayor et al., 2000)
<b>E8F</b>	Bacterial 16S rRNA	AGA-GTT-TGA-TCA-TGG-CTC-AG	52	(Lane, 1991)
<b>U907R</b>		CCG-TCA-ATT-CMT-TTG-AGT-TT		(Lane et al., 1985)
<b>DSR1F</b>	<i>dsrAB</i> gene	AC[C/G]-CAC-TGG-AAG-CAC-G	55	(Wagner et al., 1998)
<b>DSR4R</b>		GTG-TAG-CAG-TTA-CCG-CA		
<b>ME1</b>	<i>mcrA</i> gene	GCM-ATG-CAR-ATH-GGW-ATG-TC	50	(Hales et al., 1996)
<b>ME2</b>		TCA-TKG-CRT-AGT-TDG-GRT-AGT		

## 2.9. Cloning, sequencing of 16S rRNA and functional genes, phylogenetic and statistical analysis

Prior to cloning, positively amplified PCR products were purified using NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel) according the manufacturer's instructions.

All of the 16S rRNA clone libraries were carried out with the TOPO XL cloning kit (Invitrogen) and functional gene clone libraries with the pGEM®-T cloning kit (Promega), both following the manufacturer's recommendations. Positive clones were processed for sequencing at GATC Biotech (Konstanz, Germany) using M13F primers. Sequences were imported into the BLAST nucleotide search program through the National Center for Biotechnology Information (NCBI website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) to find closely related sequences within the GenBank database. The clone library 16S rRNA sequences were aligned, edited and analyzed using Bioedit version 7.1.3 software. Phylogenetic trees were constructed using the MEGA 5 program (Kumar et al., 2008). The robustness of the inferred topologies was tested using 1000 bootstrap resampling of the trees calculated on the basis of neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987) using the Kimura two-parameter correction matrix (Kimura, 1980). All sequences more than 97% similar were considered to belong to the same phylotype (OTU) and were clustered together in the alignment (Schloss and Handelsman, 2004).

The sequence data reported in this study have been submitted to GenBank nucleotide sequence databases under accession numbers KC901750 to KC901834 and KC901560 to KC901725 for the *Archaea* and *Bacteria* gene sequences, respectively, and KC901726 to KC901749 for the *mcrA* gene sequences and KC901835 to KC901870 for the *dsrAB* gene sequences.

To examine the influence of the deployment time, depth or substrata type on both archaeal and bacterial diversity, we used the UniFrac computational tool (Lozupone et al., 2006). The habitats  
295 were clustered using the jackknife environment clusters analysis tool with 100 permutations.

### 2.10. Geochemical analysis

Interstitial fluids from the colonization modules and deep seawater above the Mat Mound site (Dive  
1770) were sub-sampled and stored as follows: 10 mL of fluid was used to measure pH at room  
300 temperature. For the analysis of dissolved major and trace elements, 30 mL of sample was filtered  
through 0.22  $\mu\text{m}$  (Sterivex™, Millipore) membrane and stored at 4°C. For hydrogen sulfide analysis,  
10 mL was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  (Sterivex™, Millipore) membrane and precipitated as ZnS in 25  
mL evacuated septum vials containing 0.1g of Zinc Acetate (Sigma-Aldrich) and stored at 4°C. In the  
AISICS1 module pouch number 1, two immiscible fluids were recovered: a small amount of a buoyant  
305 liquid (about 5 mL) overlying a saline, seawater-like liquid (around 60 mL). Only the denser phase was  
treated as described above while the lighter phase, likely composed of hydrocarbons, was not  
processed further. Concentration of major elements was measured using Inductively Coupled  
Plasma-Atomic Emission Spectrophotometry (ICP-AES, Ultima 2, Horiba JobinYvon) while the  
concentration of trace elements was measured using High-Resolution ICP Mass Spectrometer (HR-  
310 ICP-MS, Element 2, ThermoFisher), both operated at the Pole Spectrometry Ocean Brest (PSO, Brest).  
Prior to elemental analysis, samples were acidified at least 1 month in advance with 0.28 mol.L<sup>-1</sup>  
HNO<sub>3</sub> prepared from ultra-pure reagent grades. Solutions for ICP-AES and ICP-MS analysis were  
diluted 100-fold with 0.28 mol.L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. Three water solution standards (Slew 3, Cass 4 and Nass 5  
from the National Research Council of Canada) were also prepared along with the samples. For both  
315 ICP-AES and ICP-MS analysis, two sets of calibrating standards were used by adding multi-elemental  
standard solutions either with pure Milli-Q™ water or with 100-fold diluted Cass 4 in 0.28 mol.L<sup>-1</sup>  
HNO<sub>3</sub>. Dissolved hydrogen sulfide was measured using spectrophotometric method using the  
protocol described by (Cline, 1969).

### 320 2.11. Scanning electron microscopy: SEM

Scanning electron microscopy (SEM) was carried out at the “Service Commun de Microscopie  
Electronique à Balayage” (UPMC, Paris, France) using a Zeiss SUPRA® 55 VP Field Emission Scanning  
Electron Microscope (FE-SEM). The variable pressure capability (2–133 Pa) permits the examination  
of both uncoated and Au or C coated samples. Three secondary electron detectors (Everhart-  
325 Thornley for high voltage mode, VPSE used for variable pressure mode and InLens for low voltage  
mode) and a backscattered electron detector enable the acquisition of high-resolution images (0.8  
nm to 2 nm) using analytical conditions that varied from 3-30 kV, 10 pA-1 nA, and 30-133 Pa with a

3.3-7.2 mm working distance. We also performed elemental microanalysis using an Energy Dispersive X-ray detector (PGT).

330

## 2.12. RAMAN

RAMAN data were obtained at IPGP (Paris, France) on resin free samples using a Renishaw InVia spectrometer. A 514 nm argon laser (20 mW) was focused through an Olympus BX61 microscope equipped with an x50 objective (numerical aperture 0.75). This configuration yields a planar resolution of about 1  $\mu\text{m}$ , with a power delivered at the sample surface of 0.5 mW. An integration time of 100 s was used to ensure that the delivered radiation didn't damage the carbonaceous matter. The signal was detected using a holographic grating with 1800 grooves. $\text{mm}^{-1}$  dispersed light coupled with a RENCAM CCD (charge-coupled device) detector. The acquired RAMAN spectra were then treated using the WiRE 3.3 Renishaw software and compared to the RUFF database.

340

## 3. Results

### 3.1. Fluid geochemistry

About 60 mL of fluids were successfully recovered in each pouch of AISICS1, whereas very low quantities of fluid were pumped in AISICS2, probably due to clogging of the inlet. Hence,  $\text{H}_2\text{S}$  and pH determinations were not performed for AISICS2.

During the AISICS1 deployment, the average fluid temperature was 44.3°C with minimum and maximum values of 36°C and 57.6°C respectively. The fluid exhibited a near neutral pH (7.6) and low dissolved  $\text{H}_2\text{S}$  concentrations (below 5 $\mu\text{M}$ ). For AISICS2, the average temperature was 42.9°C with a minimum at 36.9°C and a maximum at 46.3°C (Table 2). In general, the concentrations of major cations (Ca, K), trace metals (Mn, Fe) and Si were higher in AISICS1 compared to AISICS2 (Table 2), reflecting a higher contribution of hydrothermal fluids in the AISICS1 colonization module. This is consistent with the lower concentration of Mg in the AISICS1, where Mg is typically depleted in hydrothermal vent fluids (Von Damm et al., 1985a ; Von Damm et al., 1985b). In general, fluids recovered from AISICS2 have chemical compositions quite similar to the overlying seawater (Table 2). Sulfate concentrations, determined as total dissolved sulfur on acidified and filtered sample (i.e. devoid of  $\text{H}_2\text{S}$ ) in AISICS1 and AISICS2 were close to seawater values, albeit slightly lower for AISICS1, consistent with the higher contribution of sulfate-depleted hydrothermal fluid. Additional evidence that the AISICS2 incubator was deployed under seawater dominated conditions comes from Mo concentrations (Table 2). Under anoxic conditions, where  $[\text{H}_2\text{S}] \geq 11 \mu\text{M}$  and  $[\text{O}_2] \approx 0 \mu\text{M}$ , seawater-derived molybdate ion will be reduced to the reactive tetrathiomolybdate species (Erickson and Helz,

360

2000) and readily precipitate. Hence, the complete removal of Mo observed in AISICS1 suggests predominantly anoxic, and probably sulfidic conditions while seawater-like Mo concentrations in AISICS2 provide evidence for rather oxic or micro-aerophilic conditions.

365

**Table 2:** Geochemical composition and pH measured in the sampling pouches and bottom seawater (dive 1770). nd for not determined.

	Mean T°C (max-min)	Pouch #	pH	H <sub>2</sub> S μM	Mg mM	Na mM	K mM	Ca mM	Sr mM	S mM	Si mM	Ba μM	Fe μM	Mn μM	Mo μM
<b>AISICS 1</b>	44.3 (57.6 - 36)	SX1-A	7.5	< 5	42.0	434.0	13.8	13.8	0.13	29.66	1.88	0.96	0.88	17.83	<0.01
		SX1-B	7.6	< 5	45.0	468.2	15.3	15.1	0.14	31.91	1.94	1.03	0.83	19.34	<0.01
		SX1-C	7.6	< 5	44.5	466.2	15.1	15.0	0.14	31.21	1.82	1.02	1.06	18.46	<0.01
		SX1-D	7.6	< 5	45.2	472.1	15.3	15.1	0.13	30.62	1.87	0.99	1.21	17.88	<0.01
<b>AISICS 2</b>	42.9 (46.3 - 36.9)	SX2-A	nd	nd	53.5	485.3	10.3	10.0	0.10	32.52	0.10	0.07	0.03	0.07	0.10
		SX2-B	nd	nd	53.6	482.7	10.5	9.8	0.10	33.16	0.11	0.07	<0.02	0.07	0.11
		SX2-C	nd	nd	55.1	492.9	10.9	10.2	0.10	32.58	0.18	0.11	<0.02	0.23	0.10
		SX2-D	nd	nd	53.2	481.1	10.4	9.8	0.10	32.75	0.16	0.10	<0.02	0.13	0.10
<b>Bottom seawater (Dive 1770)</b>			nd	nd	54.6	489.3	10.6	10.1	0.11	34.08	0.20	0.15	<0.02	0.17	0.12



### 3.2. Microbial diversity according to 16S rRNA genes sequences

370 The 16S rRNA gene was analyzed for 24 to 50 clones for each sample. High bacterial and archaeal diversity is generally observed in both colonizers with a slight difference in relation to the position of the mini-colonizers within the incubator (i.e. top or bottom). This translates into an increase in phylogenetic diversity with increasing depth in the sediment (Figure 2 and Table 3).

In general, the main groups retrieved in all samples are the *Epsilonproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* and *Thermococcus* sp. In addition, *Gammaproteobacteria*, *Caldithrix* sp., 375 *Thermotogales* and *Spirochaetes* were observed in lesser proportions, and the DHVE2 (Deep-sea Hydrothermal Vent *Euryarchaeota* group 2) were also detected (Figure 2 and Table 3). Sequences belonging to *Siboglinidae* as *Osedax* sp. or *Siboglinum* sp. endosymbiont and sequences close to the uncultured WS3 candidate division were retrieved in AISICS 1, the sampler that experienced a higher contribution of hydrothermal fluids and longer exposure time. In contrast, a new clade of 380 *Epsilonproteobacteria*, named Guaymas *Epsilonproteobacteria* group (Figure 3), DHVE-1 (Deep-sea Hydrothermal Vent *Euryarchaeota* group 1) as well as ANME 2 sequences were found only in AISICS2 (Figure 2 and Table 3).

The cluster tree obtained with the Archaeal sequences (Figure 4) using the statistical jackknife environment clusters does not show any correlation between the archaeal diversity and time, the 385 depth or the substrata. This contrasts with the cluster tree obtained for the Bacteria, where there is a correlation between bacterial diversity and deployment time and depth in the sediment only for AISICS2 (Figure 4).

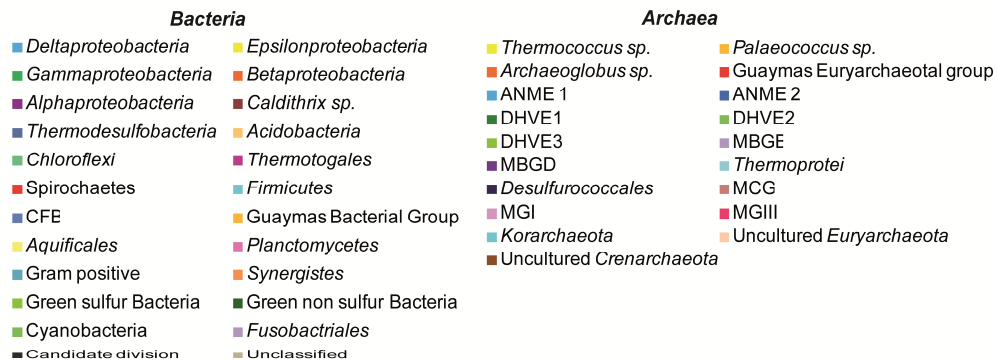
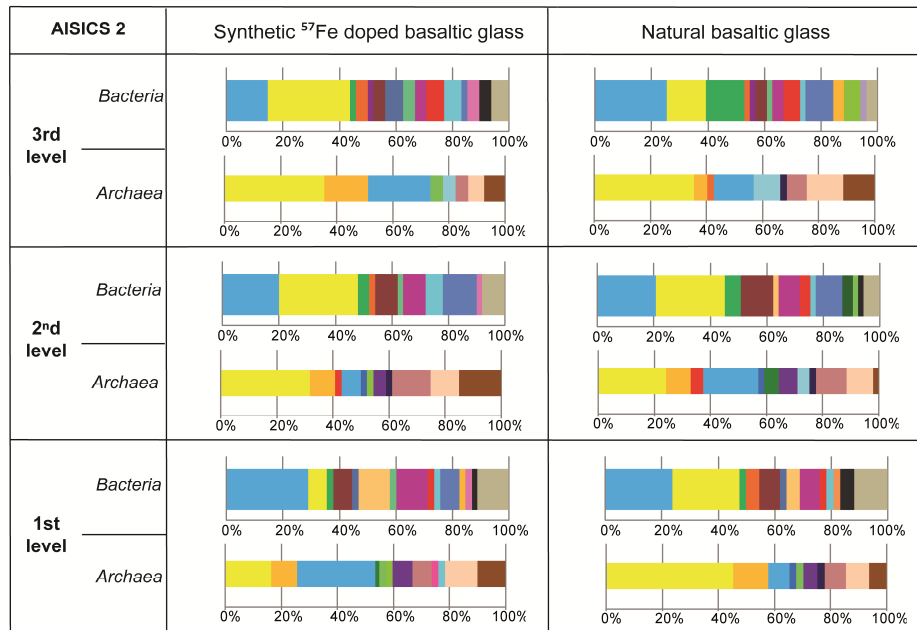
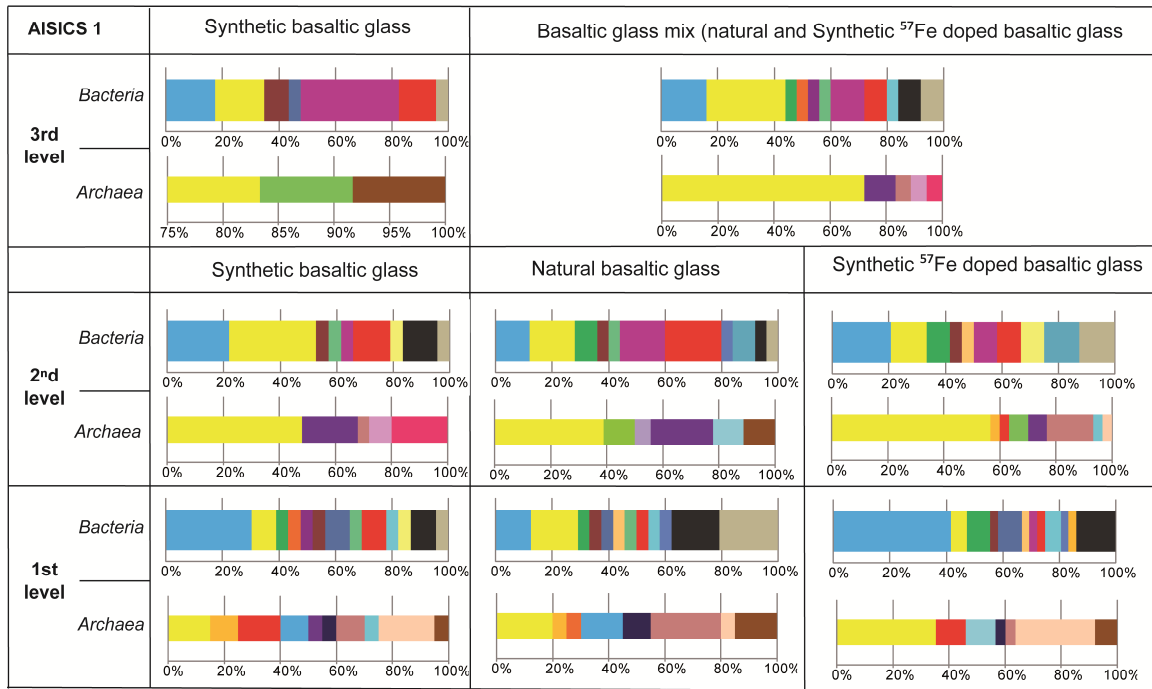
390

**Table 3:** Microbial composition determined per level, substratum and module. Only groups with more than 3 clones per samples are presented. + presence; - absence. In dark orange, microbial group retrieved in all samples; in light orange microbial group retrieved in almost all sample. In dark blue, microbial group retrieved only in all and/or mainly in AISICS1 samples; in light blue microbial group retrieved only in almost all and/or mainly in AISICS1 samples. In dark green, microbial group retrieved only in all and/or mainly in AISICS2 samples; in light green microbial group retrieved only in almost all and/or mainly in AISICS2 samples.

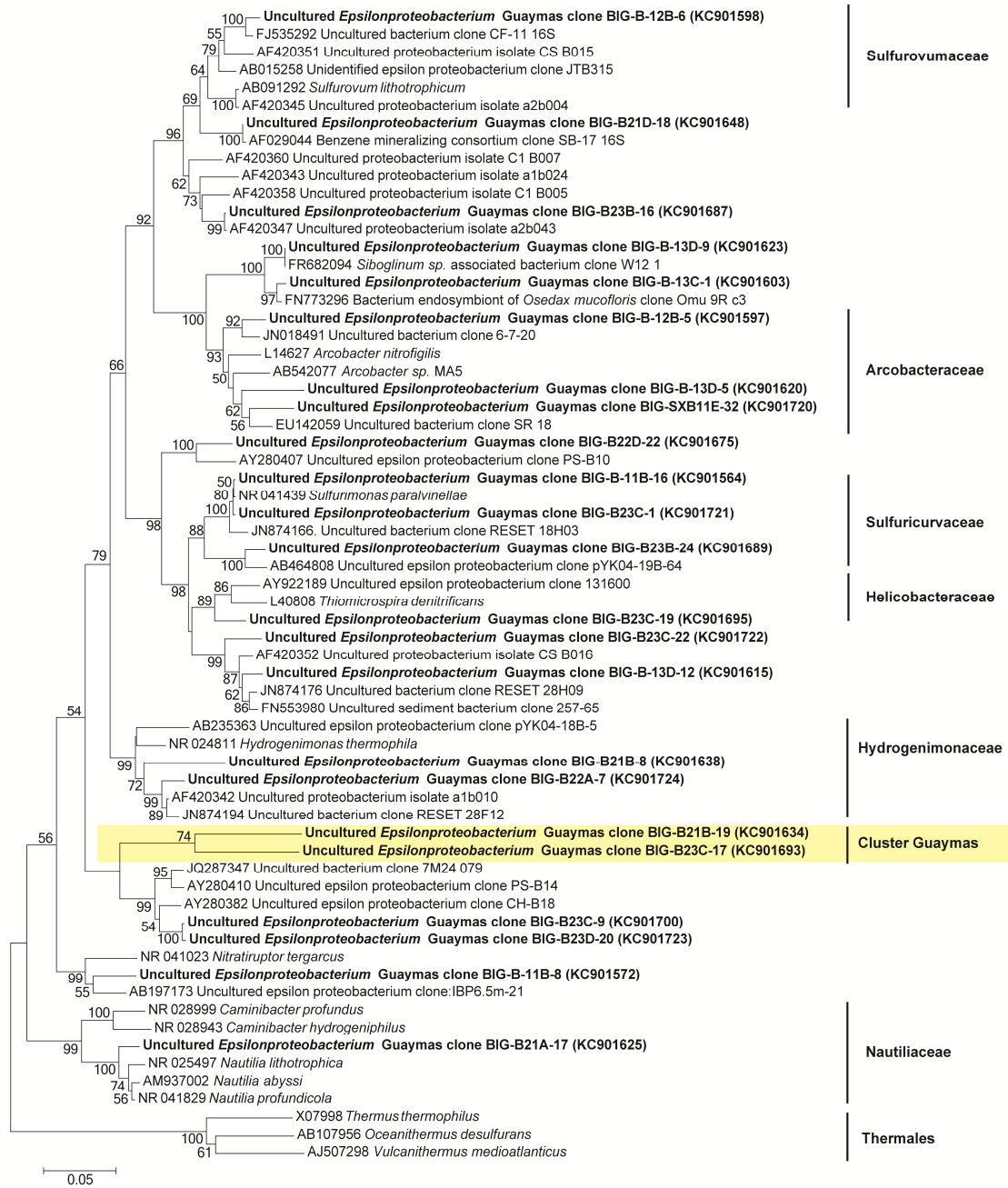
		AISICS1							AISICS2						
Deployment location		sediment covered by a white microbial mat							sediment covered by a white and orange microbial mat						
Deployment time		22 days							8 days						
Level		Level 1			Level 2			Level 3	Level 1		Level 2		Level 3		
Substratum		βnat	βsyn	βsyn*	βnat	βsyn*	βsyn	βnat	βmix	βnat	βsyn	βnat	βsyn	βnat	βsyn
<b>Bacteria</b>	<i>Deltaproteobacteria</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Epsilonproteobacteria</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Gammaproteobacteria</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Betaproteobacteria</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
	<i>Caldithrix sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Thermodesulfobacteria</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
	<i>Acidobacteria</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	<i>Chloroflexi</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
	<i>Thermotogales</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Spirochaetes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	<i>Firmicutes</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	CFB	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Guaymas Bacterial Group	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	<i>Aquificales</i>	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Planctomycetes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+

Colonisation et altération des verres basaltiques *in situ*

		AISICS1								AISICS2					
<b>Archaea</b>	<i>Thermococcus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Palaeococcus sp.</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Archaeoglobus sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Guaymas Euryarchaeotal group	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	ANME 1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	ANME 2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
	DHVE2	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
	DHVE3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	MBGB	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MBGD	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
	<i>Thermoprotei</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	<i>Desulfurococcales</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
	MCG	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	MGI	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	MGIII	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	<i>Korarchaeota</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Uncultured <i>Euryarchaeota</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
Uncultured <i>Crenarchaeota</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
<b>functional gene</b>	<i>mcrA</i> gene amplification	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>dsrAB</i> gene amplification	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

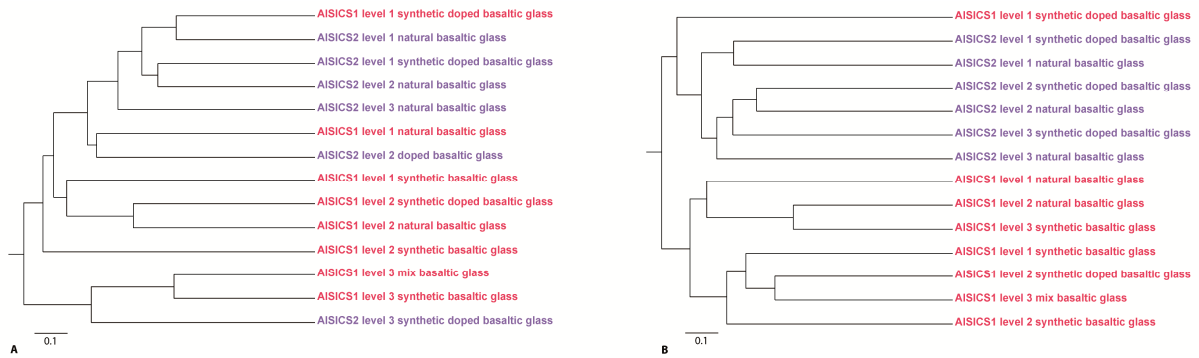


395 **Figure 2:** Bacteria and Archaea affiliation according the depth (i.e. position within the colonizer) and type of substratum for each colonization module. Data based on the frequency of 16S rRNA gene in clone libraries.



**Figure 3:** Neighbor-joining phylogenetic tree of the *Epsilonproteobacteria*, based on the 16S rRNA gene sequences. Bootstrap values above 50% (from 1000 bootstrap samples) are indicated near their corresponding nodes. In Yellow, the cluster of *Epsilonproteobacteria* cluster Guaymas; Thermales were used as outgroup.

400

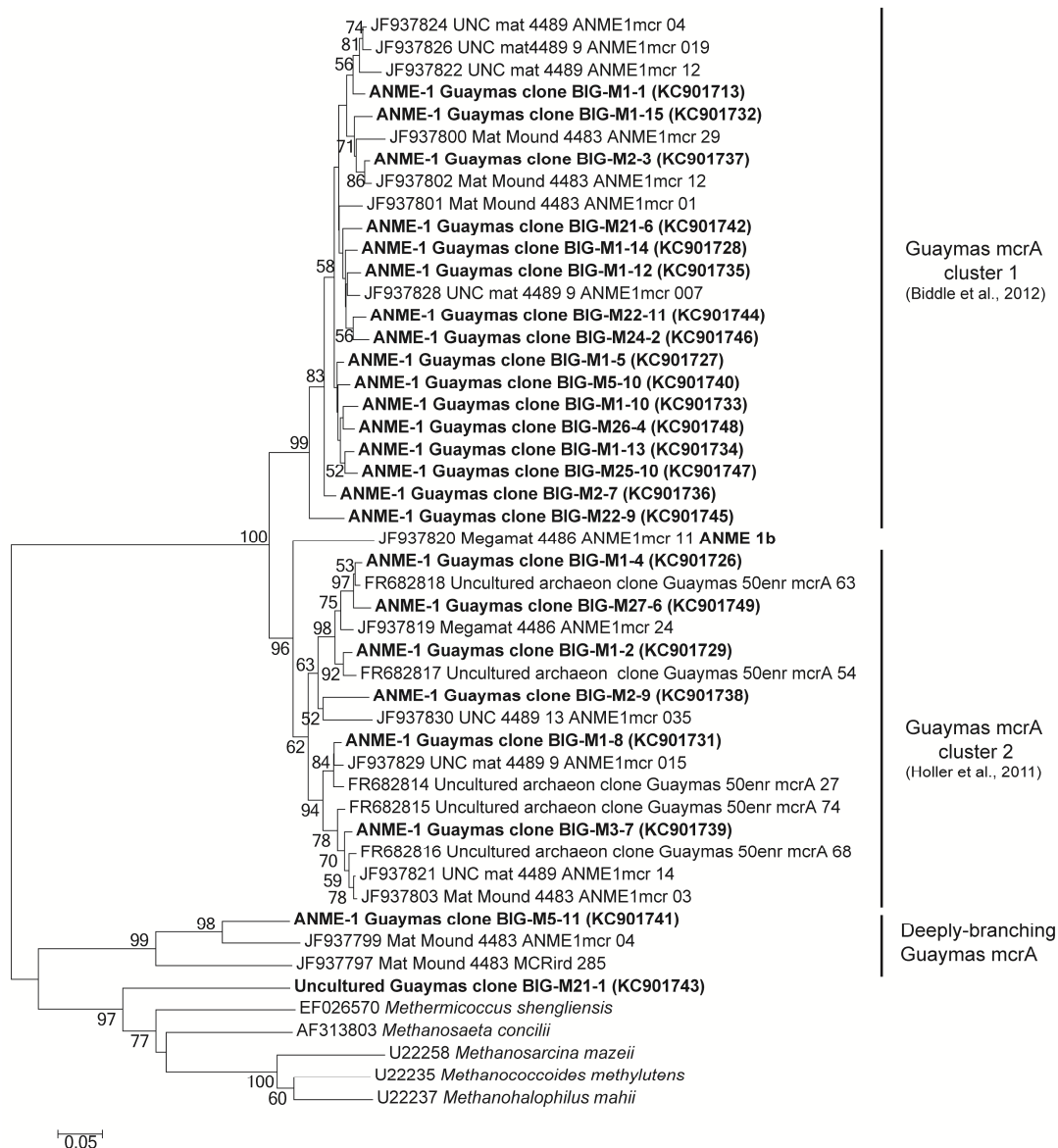


405 **Figure 4:** Jackknife environment cluster tree (made using the weighted UniFrac metric, based 16S rRNA gene sequences determined by neighbour-joining tree) showing the phylogenetic relationships among the **(A)** archaeal lineages and **(B)** bacterial lineage recovered in the modules, according to deployment duration, depth and substrata.

410 **3.3. *mcrA* and *dsrAB* gene diversity**

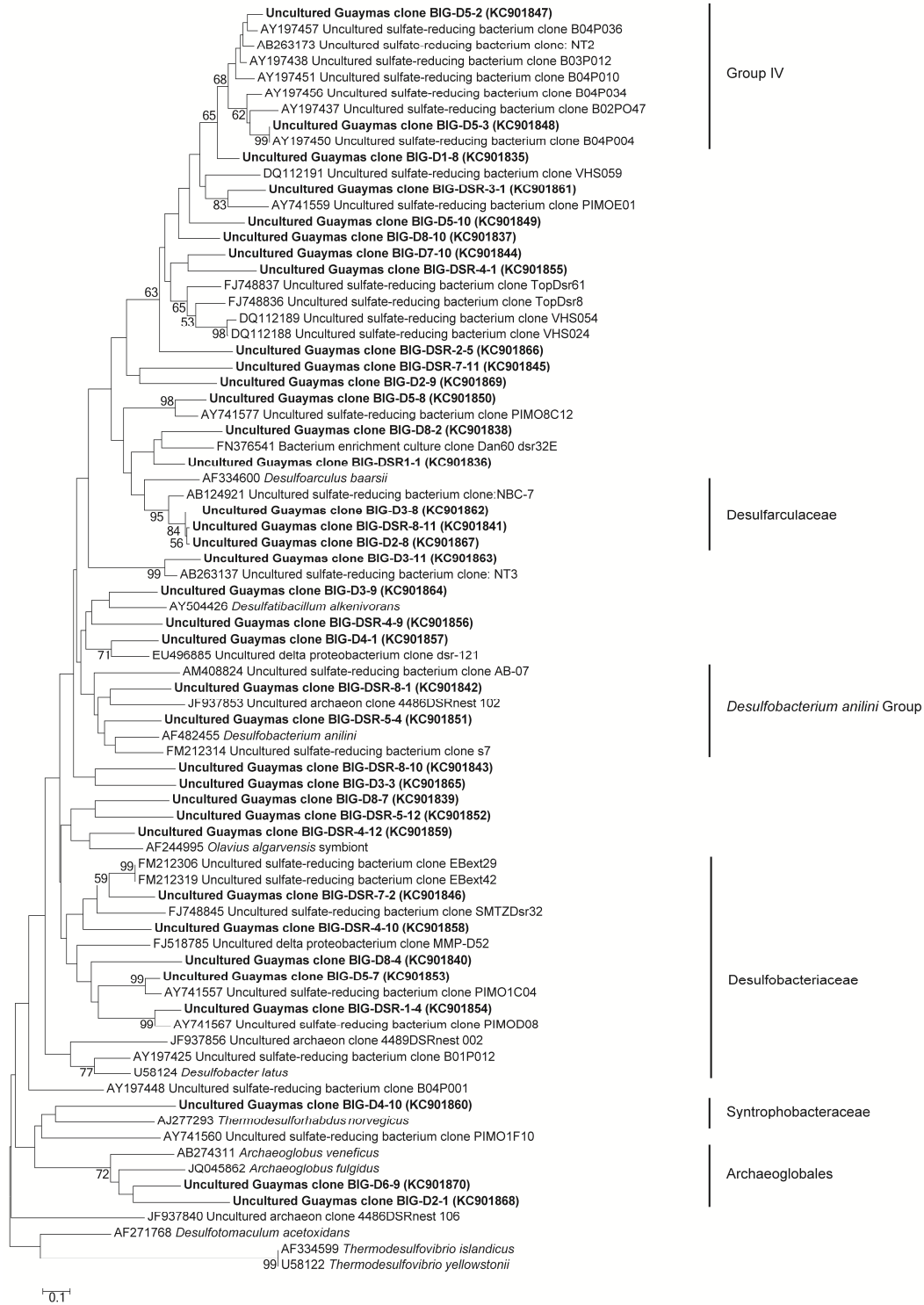
The *mcrA* gene sequences were detected in AISICS1, in particular in the deepest mini-colonizers (Table 3). In AISICS2, the *mcrA* gene was amplified in almost all mini-colonizers irrespective of deployment depth. With the exception of one methanogen sequence detected in a mini-colonizer containing  $\beta$ nat substrate, all *mcrA* sequences were affiliated to ANME 1 related to the Guaymas *mcrA* cluster (Holler et al., 2011 ; Biddle et al., 2012) or to the deeply branching Guaymas *mcrA* cluster (Biddle et al., 2012) (Figure 5).

415



420 **Figure 5:** Neighbor-joining phylogenetic tree of *mcrA* gene sequences. Bootstrap values above 50% based on 1000 replicates are displayed.

Using *dsrAB* gene sequencing, sulfate-reducers were detected in all mini-colonizers of AISICS1 (Table 3) but none in AISICS2. The majority of *dsrAB* (figure 6) sequences were related to *Deltaproteobacteria*, especially the *Syntrophobacteraceae*, and some were close to 425 *Desulfoarculaceae*, *Desulfohalobiaceae* and *Desulfobacteriaceae*, *Desulfobacterium anilini* group and to group IV (Dhillon et al., 2003). In addition few *Archaeoglobus* sequences were found in most samples.

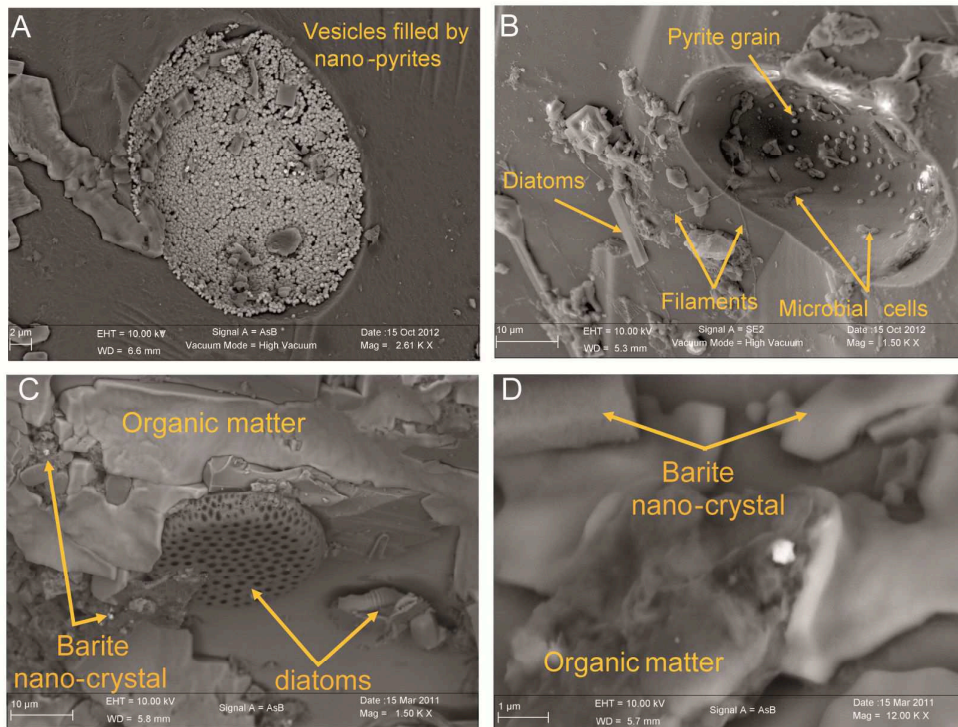


430 **Figure 6:** Neighbor-joining phylogenetic tree of predicted amino acid translations of partial *dsrAB* gene. Bootstrap values above 50% based on 1000 replicates are reported.

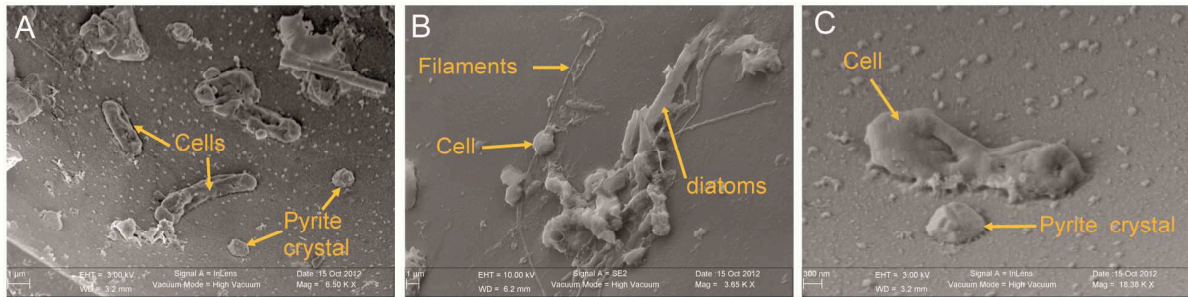


### 3.4. Microscopy and RAMAN spectroscopy analyses

Irrespective of their composition (i.e. natural or synthetic) or exposure conditions (i.e. biotic or abiotic), EDS analysis show that glass surfaces are covered by salt crystals (NaCl or MgCl), and sulfate minerals (gypsum or barite) due to direct precipitation from seawater after sample recovery. Glass surfaces from both AISICS modules do not present clear alteration structures or secondary mineral precipitation. All natural glass fragments ( $\beta_{nat}$ ) and several artificial glass fragments ( $\beta_{syn}$  or  $\beta_{syn}^*$ ) have exhibited small rounded vesicles whose diameters vary between 10 to 100  $\mu\text{m}$  (Figure 7). Those cavities are filled with sparse crystals of pyrite (Figure 7). Since vesicles were present in  $\beta_{nat}$  before deployment, they represent original features of submarine basalts that formed during magma degassing and were preserved during quenching. Interestingly, vesicles were not observed on the  $\beta_{syn}$  and  $\beta_{syn}^*$  before deployment. In addition to halite and pyrite crystals, vesicles of biotic samples also contain filaments and microbial cells. In some cases, vesicles could be completely filled with nano-pyrite (Figure 7). The biotic samples also exhibit an enrichment in organic matter forming small aggregates or film covering the glass surface (Figures 7 and 8). In some cases, accumulations of organic matter with remnant of diatoms were observed together with framboidal pyrite or nano-crystals of barite (Figures 7 and 8).

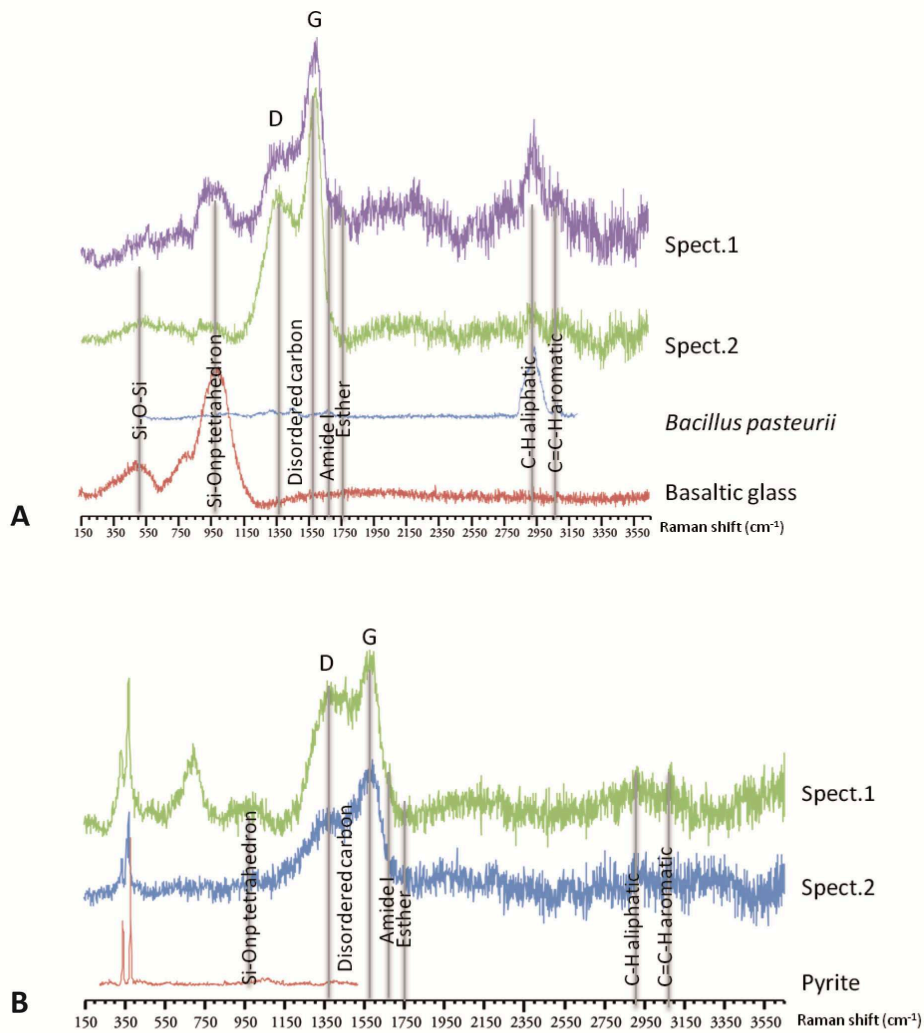


**Figure 7:** Scanning electron microscopy of basaltic glasses exposed to biotic conditions in AISICS1 module. **(A)** vesicle filled with nano-pyrite on natural basaltic glass; **(B)** vesicle containing microbial cells and pyrite grains on natural basaltic glass ; **(C)** heap of organic matter and diatoms with barite nano-crystal encrusted in organic matter; **(D)** zoom of organic matter heaps with barite nano-crystal surrounded by salts.



460 **Figure 8:** SEM photographs of natural basaltic glasses exposed to biotic condition in AISICS1 module showing in (A) microbial cells and pyrite crystal inside a vesicle, in (B) microbial cell, diatoms and filaments at the glass surface and in (C) microbial cell and pyrite crystal inside a vesicle.

In the first-order Raman spectra, we observe the typical broad and overlapping bands, designated as D and G bands (at 1380 and 1580  $\text{cm}^{-1}$  respectively), that are characteristic of disordered carbonaceous matter (DCM) with a weak structural organization and a low degree of carbonation (Spötl et al., 1998). Such short hydrocarbon chains are also abundant in the immediate environment (Figure 9). Superimposed on these spectral features, we observe the characteristic peaks related to aliphatic and aromatic compounds (2920 and 3060  $\text{cm}^{-1}$  respectively, Figure 9) as well as functional groups such as Amide I and Esther (1680 and 1750  $\text{cm}^{-1}$  respectively, Figure 9) (Maquelin et al., 2002). According to the Raman spectra of cultured microbial cells obtained under similar conditions (Figure 9), we interpret these peaks as evidence for microbial cells. Those microbial cells (mainly rods) were observed in both vesicles and on glass surfaces (Figures 7 and 9).



475

**Figure 9:** Raman spectra on biotic glasses exposed to biotic conditions. **(A)** Raman spectra (spect.1 and spect.2) at the surface of  $^{57}\text{Fe}$  doped synthetic basaltic glass showing identification of disordered organic matter with typical peaks at 1380-1580  $\text{cm}^{-1}$ , peaks at 2600-2900  $\text{cm}^{-1}$ , which could correspond to microbial mat observed as aggregate at the surface. **(B)** Raman spectra (spect.1 and spect.2) inside vesicle from natural basalt glass showing identification of poorly matured organic matter with typical peaks around 1300-1600  $\text{cm}^{-1}$ , peaks at 2600-2900  $\text{cm}^{-1}$  which could correspond to microbial mat, and two peaks around 334 and 369  $\text{cm}^{-1}$  assigned to pyrite.

480

## 485 4. Discussion

### 4.1. Microbial colonization of basaltic glass

#### 4.1.1. Microbial diversity and putative metabolisms

490 Miscellaneous groups of *Archaea* or *Bacteria* were detected in both short and long term deployments. According to the recorded temperature during incubation, all of the colonizing microbes should be mesophiles to thermophiles (Table 3), and exposed to mainly anaerobic

conditions. In both colonization modules, archaeal and bacterial diversity generally increases with burial depth in the sediment (Figure 2); this observation is more evident in the longer-term deployment module (AISICS1). The detected microorganisms can have several metabolisms including those involved in carbon, sulfur, iron or nitrogen biogeochemical cycles. Although phylogenetic affiliation may not be necessarily linked to specific metabolic or physiological properties, we cautiously infer metabolic and physiological trends for clusters of microorganisms sharing similar properties. The implications of the observed microbial diversity for sulfur, iron, carbon and nitrogen cycles are detailed below, with the aim to highlight potential biogeochemical reactions that may govern fluid-basalt interactions at high temperatures and in organic-rich environments:

**Carbon cycle:** Due to the enrichment of organic matter at Guaymas basin, carbon cycling is likely a major metabolic driver in our colonizers. At Guaymas basin, the sediments accumulate a wide variety of organic compounds including light hydrocarbons, short-chain organic acids, particulate organic matter and ammonia (Welhan, 1988 ; Martens, 1990). These compounds are derived from diagenetic reactions between high temperature hydrothermal fluids and sediments, resulting in the pyrolysis of organic matter and precipitation of metal-sulfide in the subsurface. In biotic colonizers, organic compounds occur as small particle deposits or aggregates, droplets or mats, and result in characteristic RAMAN spectra (Figure 12). This organic matter, likely derived from the surrounding sediments, could directly support chemoorganotrophic microbial life associated with basalt substrates. We observed evidence for fermentative microorganisms (e.g. *Thermococcales*) that are likely involved in the degradation of complex organic substrates into smaller molecules such as short organic acids as acetate, amines, alcohol, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> (Orcutt et al., 2011b). Organic end products of fermentation, together with compounds resulting from pyrolysis processes, could be used by heterotrophic microorganisms detected in the AISICS1 and 2, such as those from CFB division, *Proteobacteria* or *Spirochaetes*. Organic acids could also be used as energy sources by a wide range of organotrophic microorganisms, including sulfate-reducing *Deltaproteobacteria*. In all cases, produced CO<sub>2</sub> will be available for autotrophic microorganisms such as *Aquificales*, *Thermodesulfobacteria*, *Planctomycetes* or some *Epsilonproteobacteria* that were detected in the modules. Methanogenesis may also occur; however, only one methanogen sequence was detected in the modules. In contrast, ANME phylotypes, which mediate anaerobic methane oxidation (AOM), were retrieved in almost all mini-colonizers from both AISICS modules. ANMEs involved in AOM in deep marine sediment are frequently associated with syntrophic sulfate-reducers, although nitrate, ferric iron and manganese oxides may also serve as electron acceptors (Raghoebarsing et al., 2006 ; Beal et al., 2009). This issue is discussed in more detail in the following section.

In both colonizer modules, our microbial diversity surveys reveal the presence of both heterotrophic, autotrophic and organotrophic microorganisms. These results suggest that anaerobic carbon cycling occurs in the colonizers in the same way as in the surrounding sediments. This finding is similar to  
530 studies of the microbial diversity of seafloor lava (Santelli et al., 2009) and Guaymas Basin sediments (Teske et al., 2009) but contrasts with ultramafic rock-hosted hydrothermal systems (Roussel et al., 2011) and pillow basalts (Mason et al., 2008 ; Santelli et al., 2008b), that are dominated by autotrophic organisms.

535 **Sulfur cycle:** The data obtained from the 16S rRNA and *dsrAB* gene sequences both suggest that sulfate-reduction occurs, particularly due to the presence of members of the *Deltaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Thermodesulfobacteria* and *Archaeoglobales* (Figure 2 and Table 3) (Widdel et al., 1992). Sequences of *Deltaproteobacteria* are found in all mini-colonizers, while *dsrAB* gene amplification was successful only in the long-term deployment (AISICS1), suggesting that in AISICS2  
540 *Deltaproteobacteria* were not all sulfate-reducing bacteria. Indeed, strains belonging to the *Deltaproteobacteria* and the *Firmicutes* phyla are associated with numerous metabolisms in addition to sulfur metabolisms (Orcutt et al., 2011a ; Orcutt et al., 2011b). Microbial sulfate reduction has also been previously reported in Guaymas sediments (Dhillon et al., 2003 ; Teske et al., 2003 ; Biddle et al., 2012) and may occur in the colonizers using dissolved organic substrates and seawater sulfate. As  
545 discussed below, in-situ sulfate reduction may also explain the occurrence of pyrite observed in basalt vesicles.

Sulfur-reduction is also inferred from the occurrence of *Epsilonproteobacteria*, *Desulfurococcales*, *Thermotogales*, *Thermococcales* as well as *Deltaproteobacteria* and *Planctomycetes* that were retrieved in all samples. Indeed, some isolated strains of these groups are able to reduce diverse  
550 sulfur compounds (Bertoldo and Antranikian, 2006 ; Campbell et al., 2006 ; Elshahed et al., 2007).

Based on the physiology of the isolate *Caldisericum exile*, which is a thermophilic, anaerobic, thiosulfate-reducing bacterium and affiliated with OP5 clones (Mori et al., 2008 ; Mori et al., 2009), and based upon the OP5 occurrence in sediments and sulfur-rich environments (Hugenholtz et al., 1998 ; Teske et al., 2002), it can be assumed that OP5 members could be also involved in sulfur cycle.  
555 A metagenomic study of OP3 division members suggested that they share similar metabolic properties with *Deltaproteobacteria* (Glöckner et al., 2010) and single-cell analyses revealed that SKK-01 strain harbors sulfur-containing intracellular inclusions (Kolinko et al., 2012). The physiological properties of *Aciduliprofundum boonei*, and the environmental niches of other DHVE2 members, demonstrate that this clade is highly involved in the sulfur cycle (Nercessian et al., 2003 ;  
560 Reysenbach et al., 2006 ; Flores et al., 2012). Thus, even if the physiological properties of these microorganisms remain still unclear, OP5, OP3 and DHVE-2 members could play a role in sulfur cycle.

Therefore we suggest that an active anaerobic sulfur cycle took place within the mini-colonizers where both sulfate and sulfide coexist.

565 **Iron cycle:** Considering the abundance of iron in volcanic glass and its potential importance for supporting endolithic microbial growth (e.g.(Bach and Edwards, 2003)), it is crucial to evaluate the role of microorganisms in iron biogeochemical cycling. Among the groups identified in our experiments, *Beta-* and *Alpha-proteobacteria*, *Thermotogales*, DHVE2 and OP3 members could all be involved in iron cycling. For example, within the *Thermotogales* (Vargas et al., 1998), and within the  
570 DHVE2 (*Aciduliprofundum boonei* (Reysenbach et al., 2006)), some species are able to grow as dissimilatory iron reducers using poorly crystalline ferric iron (Fe(III)) as an electron acceptor. In addition, *Betaproteobacteria* and some *Alphaproteobacteria* are able to oxidize Fe(II) (Edwards et al., 2003b ; Nakagawa and Takai, 2008). Moreover, despite the lack of any cultivated OP3 members, the SKK-01 strain is a magnetotactic bacteria harboring Fe-containing magnetosomes (Kolinko et al.,  
575 2012). In addition, the OP3 group frequently occurs in anoxic deep-sea hydrothermal system and in heavy metal contaminated sediments (Teske et al., 2002 ; Rastogi et al., 2011), which may implicate OP3 in iron cycling.

The high concentration of dissolved Fe in AISICS1 may have multiple sources, including a direct contribution from hydrothermal fluids and dissimilatory iron reduction (DIR). High concentrations of  
580 other elements typically enriched in hydrothermal fluids (e.g. Si and Mn) argue for the former hypothesis and preclude identifying geochemical evidence for active DIR in the colonizers. In turn, both the prevailing anoxic conditions and our diversity surveys suggest the predominance of iron-reduction over Fe-oxidation pathways. Ongoing study of Fe isotopes ratios may help to explore this question (Johnson et al., 2004) .

585 **Nitrogen cycle:** The chemical analysis of the ambient fluid sampled through the colonizers (Table 2) showed an important seawater contribution of nitrate and nitrogen compounds which could support the growth of microorganisms in the colonizers. Our diversity survey corroborates previous studies demonstrating that denitrification takes place in deep-sea sediments affected by hydrothermal  
590 circulation in the Guaymas Basin (Bowles et al., 2012). Nitrate is a common electron acceptor used by a number of microorganisms under anaerobic conditions (Brandes et al., 2007 ; Jetten, 2008). Among all the microorganisms known to be able to use nitrates as final electron acceptor, *Aquificales* (Gotz et al., 2002 ; Huber et al., 2002), *Firmicutes* (L'Haridon et al., 2006), *Caldithrix* (Miroshnichenko et al., 2003) and *Epsilonproteobacteria* (Bowles et al., 2012) were detected in both AISICS modules.

595 In addition, it appears that ANAMMOX bacteria may also be active in our colonizers. Sequences closely related to *Planctomycetes* were found in AISICS2 colonizers (short exposure time). Within the

*Planctomycetes*, the ANAMMOX bacteria are the sole group known to be able to perform anaerobic oxidation of ammonium, (Jetten et al., 2005 ; Francis et al., 2007) where nitrite, one of the product of denitrification, serves as electron acceptor to form dinitrogen (gas) (Strous et al., 1999 ; Francis et al., 2007). Although the presence of sequences affiliated to *Planctomycetes* does not allow us to infer their function, ANAMMOX bacteria were known to be active in hydrothermal systems (Byrne et al., 2009) and were already detected in Guaymas basin sediment samples (Russ et al, this issue). Hence, all together, these results suggest that the anaerobic nitrogen cycle, denitrification and ANAMMOX processes might all occur in our colonizer modules, and by extension, in the surrounding sediments. This finding suggests that the anaerobic part of the nitrogen cycle is one of major processes in hydrothermal sediments, as well as previously noted for basaltic substrates (Mason et al., 2008 ; Santelli et al., 2009).

**Uncultivated lineage and under-represented groups:** Many sequences belonging to uncultivated lineages were detected. The lack of information about their putative physiology did not allow us to infer their role in the colonization process or their ecological importance. Members of the Guaymas Bacterial Group (Teske et al., 2002) and Guaymas Euryarchaeotal Group (Teske et al., 2002 ; Dhillon et al., 2005) were found in the two modules. These groups were previously detected in hydrothermally-affected deep-sea sediments and active chimneys of the Guaymas Basin (Teske et al., 2002) (Callac et al., 2013 submitted). Since their distribution is restricted to hydrothermal environments, it can be assumed that these microorganisms are anaerobes and probably involved in organic matter and hydrocarbon compound degradation. *Acidobacteria* sequences were retrieved in both AISICS modules. According to previous studies, it appears that *Acidobacteria* are ubiquitous in multiple habitats, including sediments, soils, hot springs, acidic lakes and caves (Barns et al., 1999). Since this group occurs in nutrient-poor (e.g. caves) and organic matter-rich ecosystems (sediment, soil), their ecological implication remains unclear.

The candidate division OP3, OP5, OP11 and OD1 were found in both AISICS1 and 2, while the JS1 and WS3 were restricted to AISICS1. These groups were already detected in hydrothermally affected sediments of the Guaymas Basin (WS3 (Dhillon et al., 2003), OP3, OP5, OP11 (Teske et al., 2002) and JS1 (Teske, 2010)), in anaerobic sludge digester (OD1, OP3 and WS3 (Chouari et al., 2005)), hydrothermal vents (OP3, OP5, OP11 and OD1 (Stott et al., 2008 ; Kato et al., 2010)) or in subsurface deep-sea sediments (JS1 (Inagaki et al., 2006 ; Webster et al., 2006)). It was shown that some JS1 are able to grow with sulfate in the presence of acetate and/or glucose (Webster et al., 2011). Considering the occurrence of these phylotypes in anaerobic niches, it can be suggested that they have an anaerobic metabolism and play a significant ecological role in these systems.

A new cluster of *Epsilonproteobacteria*, named Guaymas *Epsilonproteobacteria* group, was identified in AISICS 2; this group is only 91% similar to any known environmental clones or cultivated representatives. Like other members of the *Epsilonproteobacteria* from hydrothermal ecosystems, these microorganisms could be mesophilic or moderately thermophilic and involved in organic matter degradation and sulfur cycling in organic matter-rich hydrothermally affected sediments. The biogeochemical roles of uncultivated lineages remain unknown. To better understand these uncultivated lineages, their metabolic properties, functions and environmental roles need to be determined using various approaches, including enrichment to pure culture (Teske et al., 2002), metagenomic (as performed on the OP3 division (Glöckner et al., 2010)), single-cell analysis (e.g. for SKK-01a OP3 member (Kolinko et al., 2012)) or using multidisciplinary approaches mixing diverse methods (as geochemical survey, isotopic tracers, molecular analysis...) (Nunoura et al., 2010).

#### 4.1.2. AOM: ANMEs, potential syntrophs and other members

ANME-1 and more specifically “ANME-1 Guaymas *mcrA* cluster” sequences (Holler et al., 2011 ; Biddle et al., 2012), as well as “deeply-branching Guaymas *mcrA*” sequences, were retrieved in both modules (Figure 5, Table 3). Most of them are affiliated to sequences previously found in Guaymas hydrothermal sediments with a range of temperature regime (Biddle et al., 2012 ; Merkel et al., 2013).

Interestingly, no *dsrAB* genes could be amplified from the AISICS2 module (short-term deployment) where ANME sequences were retrieved (Table 3). In contrast, both ANME and *dsrAB* sequences were detected in the long-term AISICS1 deployment that experienced a greater hydrothermal fluid contribution (Table 2). In addition to *Desulfobacteriaceae*, sulfate-reducers such as *Deltaproteobacteria* are known to be ANME syntrophs. However, none of those groups could be detected using either *dsrAB* (Figure 6), or 16S rRNA sequencing. This suggests that detected ANME might have other syntrophs. For example, sulfate-reducers identified in AISICS 1 such as *Syntrophobacterales*, *Desulfobacterium anilini* group, group IV or archaea *Archaeoglobus* could play this role. Another hypothesis is that the syntrophs are not sulfate-reducers but rather are denitrifiers or iron-reducers (Raghoebarsing et al., 2006 ; Beal et al., 2009). Potential syntrophs identified in most mini-colonizers could be *Thermotogales* involved in iron-reduction, or *Epsilonproteobacteria* and/or *Caldithrix* involved in nitrate-reduction. It is also possible that sulfate-reducers involved in AOM colonize AISICS modules after ANME, or that sulfate-reducers progressively replace other syntrophs (e.g. nitrates and/or iron-reducers) to create new consortia with ANME. Alternatively, we cannot exclude that the ANME, especially the AISICS2 ANME-1, are able to utilize carbon, energy sources and electron acceptor needed for their growth without syntrophs, as previously shown (Knittel et al., 2005), or by doing AOM alone (Milucka et al., 2012). In addition, within the *Archaea*, MCG sequences



were detected. The MCG are well represented in the deep subsurface biosphere (Sorensen and Teske, 2006 ; Teske and Sorensen, 2007 ; Kubo et al., 2012). In previous works, it was largely hypothesized that MCG are anaerobes and heterotrophs able to use organic substrates (Biddle et al., 2006). It has also been suggested that they are able to oxidize methane without the assimilation of methane-derived carbon, using dissimilatory methane metabolism (Biddle et al., 2006). They could also benefit from AOM, directly or not (Sorensen and Teske, 2006). In our colonization modules, MCG could play a direct or indirect role in the methane cycle in association with methanogens and ANMEs. These data support the idea that anaerobic methane cycling is common in hydrothermal systems (Teske et al., 2002).

675

#### 4.1.3. Sediments: a nest for free-living symbionts?

Sequences of endosymbionts of *Siboglinidae* (*Osedax sp.* and *Siboglinum sp.*, Figure 3) were retrieved in the AISCIS1 module. Previous studies have reported free-living symbionts in bottom seawater overlying seafloor hydrothermal fields (Harmer et al., 2008), or in microbial mats (Crépeau et al., 2011). At Mat Mound site, vent fauna include *Riftia* worms, an unidentified *Siboglinidae*, polychaetes *Paralvinella sp.* and *Ampharetidae* in association with microbial mat (Figure 1) (Decker, Pradillon and Sarrazin personal communication). To date, symbionts of *Riftia sp.* and *Paralvinella sp.* epibionts were never reported in their free-living form. However, it has been suggested that vent fauna may gain their endosymbionts locally, leading to an opportunistic environmental acquisition of the best adapted microorganisms (Rodrigues et al., 2011). The presence of free-living symbionts in hydrothermally-affected sediment (e.g. average temperature around 44.3°C) suggest they are able to live in such conditions, which highlights the role of sediment substrate for the dispersion and horizontal transmission of vent fauna symbionts.

#### 690 4.2. Microbial diversity and potential control of geochemistry, substrata type, temperature and/or deployment time

A large microbial diversity was evident in both modules, and some phylotypes were common between the two modules. Archaeal diversity was not correlated with deployment duration, fluid chemistry, sediment depth or substrata. In contrast, bacterial colonization patterns are driven by a number of factors, such as the duration of deployment and the fluid chemistry. In AISCIS 2, the bacterial diversity is also influenced by the burial depth in the sediments (Figures 2 and 4). This is supported by the statistical analyses of the 16S rRNA sequences for AISCIS2, where the diversity clusters according to burial depth (Figure 4). In addition, the bacterial diversity tends to increase with depth (Figure 2), suggesting that the bacterial distribution could be linked to the thermal gradient and the availability of hydrothermally-derived compounds. A recent study at Guaymas Basin has

700

shown that the thermal regime and geochemistry of hydrothermally-affected sediments are highly heterogeneous (McKay et al., 2012). AISICS1 was deployed in a white mat and AISICS2 at the junction between white and orange mats, and while the *in situ* temperature at 20 cm depth was almost the same for both modules (average of 44.3 and 42.9°C respectively), the geochemistry of recovered pore water was drastically different. Indeed, the long-term deployment module (AISICS1) experienced a much higher hydrothermal contribution than AISICS2 (Table 2). This suggests that AISICS1 micro-colonizers encountered significant concentration of H<sub>2</sub>S (although < 5 µM) while fluids sampled in AISICS2 correspond mainly to heated seawater (Table 2). Hence, the geochemical differences between AISICS1 and 2 could explain the differences in bacterial colonization patterns. From the statistical jackknife environment clusters trees (Figure 4), it is clear that microbial colonization is not related to other parameters such as substrata composition.

Given the high concentration of organic matter in the sediment (between 2 to 4% of organic carbon (Kastner, 1982), and the ubiquitous deposition of organic matter on basaltic glass surfaces, it is likely that heterotrophic strains could have been pioneers. Fermentative strains can hydrolyze organic matter into small compounds, e.g. small organic acids, amines or alcohol as observed on the surfaces through RAMAN spectroscopy. These metabolic products could have fuelled other heterotrophs and organotrophs, as well as lithoautotrophs.

#### 4.3. Geomicrobiological interactions

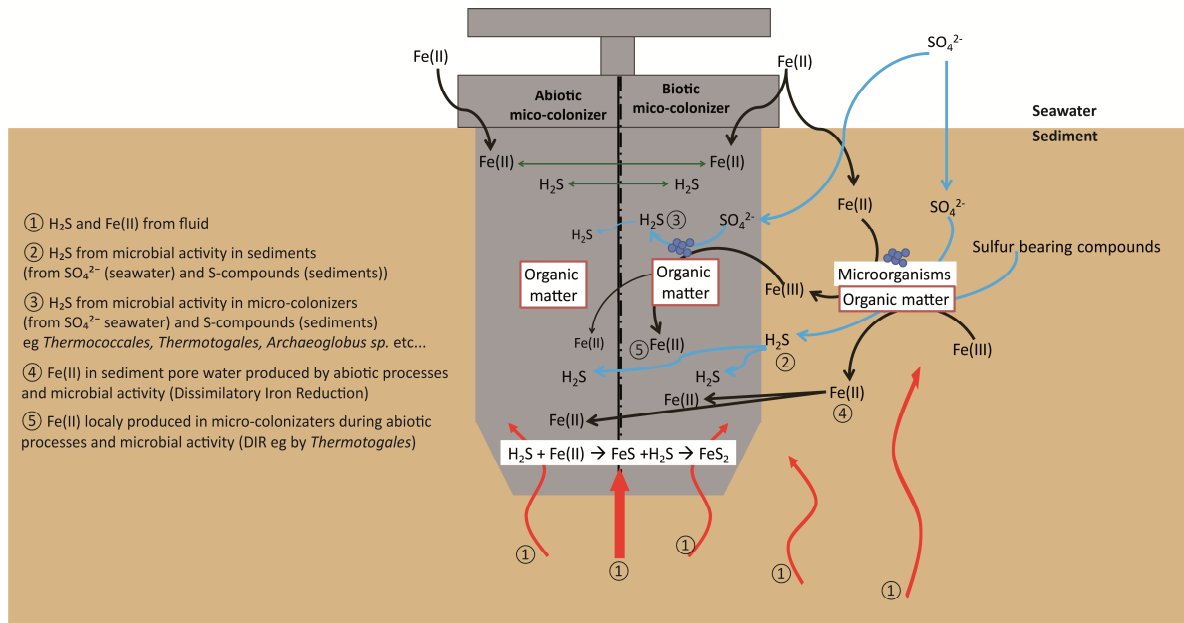
Both biotic and abiotic mini-colonizers were filled with identical substratum and exposed to the same environmental conditions allowing a direct comparison between chemical (abiotic) and biological processes taking place on the surface of basaltic glasses. To our knowledge, the systematic use of a sterile control for *in situ* basalt and/or mineral alteration experiments has never been attempted. Micro- and nano-crystals were observed, thus, it is important to note the difference between the micro- and the nano-crystal formation (both pyrite and barite): micro-crystals are observed on both biotic and abiotic glass surfaces while, nano-crystals of barite are only observed on biotic glass. Micro-crystals of pyrite and barite were observed on basaltic glass surfaces incubated under both biotic and abiotic conditions (Figures 7 and 8) suggesting that they result solely from chemical process. Similar to our results, laboratory microcosm experiments of basalt alteration have failed to reveal differences of alteration textures and secondary mineral precipitation between biotic and abiotic conditions (Einen et al., 2006). Nano-crystals of pyrite were only observed in basalts exposed to biotic conditions, which suggests a role of biological process in pyrite formation (Figures 7 and 8). Although pyrite can precipitate abiotically from H<sub>2</sub>S and Fe<sup>2+</sup> enriched in the hydrothermal fluid, microbial sulfate and sulfur reduction could have promoted nano-crystalline pyrite precipitation (Figure 10) instead of micro-crystalline pyrite. In addition, SEM observations of glass vesicles on biotic

740 samples show a dense mineralization of nano-crystals of pyrite lining the cavity, and wrapped in a film of organic material. The vesicles likely provide a favorable microenvironment for pyrite precipitation, for example through local build up of microbially produced hydrogen sulfide, leading to pyrite saturation (or its FeS mono-sulfide precursors, Berner, 1984). Framboidal pyrite mineralization was also observed on biotic glass surfaces. Although initially attributed to microbial process, this type of pyrite may form without microbial activity (Butler and Rickard, 2000). Ongoing study of sulfur isotopes of pyrite should help in distinguishing between those two models (e.g. (Canfield, 2001 ; Rouxel et al., 2008a).

745 Nano-crystals of barite were observed in close association with organic matter, suggesting a possible biological mediation for nano-barite crystallization. Barite is known to form bio-aggregates in association with decaying organic matter (Bishop, 1988). However, a direct precipitation of barite from hydrothermal fluid is also possible due to the enrichment of Ba in hydrothermal fluids (Von Damm et al., 1985b).

750 Small rounded to slightly elongated vesicles (10-150µm diameter) (Figure 7) were observed in all glass samples. The occurrence of vesicles in synthetic glass implies that they existed before incubation, although they were not detected macroscopically due to their small size of less than 50 µm. As for natural basaltic glass, vesicles formation is likely due to gas micro-bubbles in silicate melt, trapped and preserved as vesicles during quenching.

755 Accumulations of diatom debris and carbon-rich aggregates were frequently observed on biotic samples (Figures 7 and 8) but carbon-rich aggregates were also identified on abiotic samples due to the quantity of organic matter present in the neighboring sediments. The RAMAN spectra (Figure 9) reveal the presence of organic matter coming from both sediments and microorganisms. The presence of microbial cells has been also observed using SEM imaging. Finally, in comparison with studies done on long time (1 year) (Einen et al., 2006) or on natural samples (Thorseth et al., 1992 ; Furnes et al., 2001) the lack of glass alteration evidence is certainly due to the relatively short deployment time (less than 22 days), precluding formation of well-developed alteration rims.



765

**Figure 10:** Schematic diagram showing the different pathways for pyrite formation in both biotic and abiotic mini-colonizers.

## 5. Conclusion

770

By deploying *in-situ* colonization modules this study showed that diverse microbial communities involved in carbon, nitrogen, sulfur and iron cycles are able to colonize the surface of basaltic glasses in hydrothermal and organic matter-rich conditions.

775

While the archaeal colonization pattern is not dependent upon deployment duration, fluid chemistry, sediment depth or substrata, the diverse bacterial colonization patterns are driven by deployment time and fluid chemistry. In all cases, the nature of basalt does not seem to influence microbial colonization.

The presence of a new cluster of *Epsilonproteobacteria*, the Guaymas *Epsilonproteobacteria* group, which is distantly related to any known environmental clones and cultivated representatives expand our current view of microbial diversity in hydrothermal systems.

780

In some cases, we detected anaerobic methane oxidizers related to ANME 1 and 2, which were not associated with their usual sulfate-reducer syntrophs. This suggests that the ANME groups detected in this study are able to live without syntrophs or may have other sulfate-reducer, denitrifier (some *Epsilonproteobacteria* and/or *Caldithrix*), or iron-reducer (*Thermotogales*) syntrophs.

785

Despite the lack of specific glass alteration textures, the formation of secondary minerals was observed on glass surface for both biotic and abiotic experiments. Micro- and nano-crystalline pyrite was generally detected within basalt vesicles and in associated with organic matter aggregates. Further work, for example applying sulfur isotope systematic, is required to discriminate between biotic and abiotic processes involved in pyrite formation. Applying a similar experimental approach in

790 future studies, providing that deployment duration is sufficient, should provide new insights into the  
 capability of microbial communities to exploit new environmental conditions, colonize new niches  
 and promote mineral and rock substrate alteration.

### Conflict of Interest Statement

795 The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial  
 relationships that could be considered as a potential conflict of interest.

### Acknowledgments

800 The authors acknowledge the BIG shipboard cruise party for their work and support during the BIG  
 cruise: officers, crew and technicians of the *R/V L'Atalante*, the DSV *Nautilie* team and scientific team,  
 in particular Philippe Noel, Philippe Rodier, Christian Le Gall and Pierre-Marie Sarradin for their  
 precious help during the AISICS preparation, as well as Mathilde Le Roy for her help during the AISICS  
 samples conditioning. The "Recherches et Développements Technologiques" unit (Ifremer) is  
 thanked for the AISICS design and manufacturing. The authors thank Stéphanie Rossano (Lab.  
 Géomatériaux et Environnement, Univ. de Marne La Vallée, France), who has allowed us to use  
 805 installations from her lab and has shared with us her experience in the synthesis of MORB-type  
 basaltic glasses. The authors want to thank Carole Decker, Florence Pradillon and Josée Sarazin for  
 the fauna identification, their helps and discussions about the host-symbiont interaction. We are  
 indebted to Alexis Templeton for their helpful comments and corrections. We also thank the  
 anonymous reviewers and Karine Alain for their constructive suggestions and comments. This cruise  
 810 was funded by Ifremer (France) and has benefited from a work permit in Mexican waters  
 (DAPA/2/281009/3803, October 28th, 2009). This work was supported by Ifremer, the GIS Européle  
 Mer, UEB, CNRS, and has benefited from state aid managed by the Agence Nationale de la Recherche  
 under the program "Investments for the Future" with the reference ANR-10-LabX-19-01.

### 815 References

- Alain, K., Zbinden, M., Le Bris, N., Lesongeur, F., Gaill, F., and Cambon-Bonavita, M.-A. (2004). Early  
 steps of microbial colonization process at deep-sea hydrothermal vents. *Environmental  
 Microbiology* 6, 227-241.
- 820 Alt, J.C. (1995). Sulfur isotopic profile through the oceanic crust: Sulfur mobility and seawater-crustal  
 sulfur exchange during hydrothermal alteration. *Geology* 23, 585-588.
- Bach, W., and Edwards, K.J. (2003). Iron and sulfide oxidation within the basaltic ocean crust:  
 implications for chemolithoautotrophic microbial biomass production. *Geochimica et  
 Cosmochimica Acta* 67, 3871-3887.
- 825 Barns, S.M., Takala, S.L., and Kuske, C.R. (1999). Wide Distribution and Diversity of Members of the  
 Bacterial Kingdom Acidobacterium in the Environment. *Applied and Environmental  
 Microbiology* 65, 1731-1737.

- Beal, E.J., House, C.H., and Orphan, V.J. (2009). Manganese- and Iron-Dependent Marine Methane Oxidation. *Science* 325, 184-187.
- Bertoldo, C., and Antranikian, G. (2006). "The Order Thermococcales," in *The Prokaryotes.*, 69-81.
- 830 Biddle, J.F., Cardman, Z., Mendlovitz, H., Albert, D.B., Lloyd, K.G., Boetius, A., and Teske, A. (2012). Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *ISME Journal* 6, 1018-1031.
- Biddle, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Lloyd, K.G., Sørensen, K.B., Anderson, R., Fredricks, H.F., Elvert, M., Kelly, T.J., Schrag, D.P., Sogin, M.L., Brenchley, J.E., Teske, A., House, C.H., and Hinrichs, K.-U. 835 (2006). Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3846-3851.
- Bishop, J.K.B. (1988). The barite-opal-organic carbon association in oceanic particulate matter. *Nature* 332, 24.
- 840 Bowles, M.W., Nigro, L.M., Teske, A.P., and Joye, S. (2012). Denitrification and environmental factors influencing nitrate removal in Guaymas Basin hydrothermally-altered sediments. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Brandes, J.A., Devol, A.H., and Deutsch, C. (2007). New developments in the marine nitrogen cycle. *Chemical reviews* 107, 577-589.
- 845 Burggraf, S., Jannasch, H.W., Nicolaus, B., and Stetter, K.O. (1990). *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 13, 24-28.
- Butler, I.B., and Rickard, D. (2000). Framboidal pyrite formation via the oxidation of iron (II) monosulfide by hydrogen sulphide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 2665-2672.
- 850 Byrne, N., Strous, M., Crépeau, V., Kartal, B., Jean-Louis, B., Schmid, M.C., Lesongeur, F., Schouten, S., Jaeschke, A., Jetten, M.S.M., Prieur, D., and Godfroy, A. (2009). Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *ISME Journal*, 1-7.
- Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., and Takai, K. (2006). The versatile e-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology* 4, 458-468.
- 855 Canfield, D.E. (2001). Isotope fractionation by natural populations of sulfate-reducing bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 1117-1124.
- Casamayor, E.O., Schafer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, C., and Muyzer, G. (2000). Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulphurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. 860 *Applied and Environmental Microbiology* 66, 499-508.
- Chouari, R., Le Paslier, D., Dauga, C., Daegelen, P., Weissenbach, J., and Sghir, A. (2005). Novel Major Bacterial Candidate Division within a Municipal Anaerobic Sludge Digester. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2145-2153.
- Cline, J.D. (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. 865 *Limnology and Oceanography* 14, 454-458.
- Corre, E., Reysenbach, A.-L., and Prieur, D. (2001). e-Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiology Letters* 205, 329-335.
- Crépeau, V., Cambon Bonavita, M.-A., Lesongeur, F., Randrianalivelo, H., Sarradin, P.-M., Sarrazin, J., and Godfroy, A. (2011). Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike 870 hydrothermal vent field. *FEMS Microbiology Ecology* 76, 524-540.
- De La Lanza-Espino, G., and Soto, L.A. (1999). Sedimentary geochemistry of hydrothermal vents in Guaymas Basin, Gulf of California, Mexico. *Applied Geochemistry* 14, 499-510.
- Dean, W., Pride, C., and Thunell, R. (2004). Geochemical cycles in sediments deposited on the slopes of the Guaymas and Carmen Basins of the Gulf of California over the last 180 years. 875 *Quaternary Science Reviews* 23, 1817-1833.
- Dhillon, A., Lever, M., Lloyd, K.G., Albert, D.B., Sogin, M.L., and Teske, A. (2005). Methanogen Diversity Evidenced by Molecular Characterization of Methyl Coenzyme M Reductase A

- (mcrA) Genes in Hydrothermal Sediments of the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4592-4601.
- 880 Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., and Sogin, M.L. (2003). Molecular Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2765-2772.
- Edwards, K.J., Bach, W., and Mccollom, T.M. (2005). Geomicrobiology in oceanography: microbe-mineral interactions at and below the seafloor. *Trends in Microbiology* 13, 449-456.
- 885 Edwards, K.J., Mccollom, T.M., Konishi, H., and Buseck, P.R. (2003a). Seafloor bioalteration of sulfide minerals: results from in situ incubation studies. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 2843-2856.
- Edwards, K.J., Rogers, D.R., Wirsén, C.O., and Mccollom, T.M. (2003b). Isolation and Characterization of Novel Psychrophilic, Neutrophilic, Fe-Oxidizing, Chemolithoautotrophic  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria from the Deep Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2906-2913.
- 890 Edwards, K.J., Wheat, C.G., and Sylvan, J.B. (2011). Under the sea: microbial life in volcanic oceanic crust. *Nat Rev Micro* 9, 703-712.
- Einen, J., Kruber, C., Øvreås, L., Thorseth, I.H., and Torsvik, T. (2006). "Microbial colonization and alteration of basaltic glass", (ed.) B. Discussions.).
- 895 Elshahed, M.S., Youssef, N.H., Luo, Q., Najar, F.Z., Roe, B.A., Sisk, T.M., Bühring, S.I., Hinrichs, K.-U., and Krumholz, L.R. (2007). Phylogenetic and Metabolic Diversity of Planctomycetes from Anaerobic, Sulfide- and Sulfur-Rich Zedletone Spring, Oklahoma. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4707-4716.
- Erickson, B.E., and Helz, G.R. (2000). Molybdenum(VI) speciation in sulfidic waters: Stability and lability of thiomolybdates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 1149-1158.
- 900 Flores, G.E., Campbell, J.H., Kirshtein, J.D., Meneghin, J., Podar, M., Steinberg, J.I., Seewald, J.S., Tivey, M.K., Voytek, M.A., Yang, Z.K., and Reysenbach, A.-L. (2011). Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* 13, 2158-2171.
- 905 Flores, G.E., Wagner, I., Liu, Y., and Reysenbach, A.-L. (2012). Distribution, abundance, and diversity patterns of the thermoacidophilic "Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota 2" (DHVE2). *Frontiers in Microbiology* 3.
- Francis, C.A., Beman, J.M., and Kuypers, M.M.M. (2007). New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME Journal* 1, 19-27.
- 910 Furnes, H., Staudigel, H., Thorseth, I.H., Torsvik, T., Muehlenbachs, K., and Tumyr, O. (2001). Bioalteration of basaltic glass in the oceanic crust. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 2.
- Glöckner, J., Kube, M., Shrestha, P.M., Weber, M., Glöckner, F.O., Reinhardt, R., and Liesack, W. (2010). Phylogenetic diversity and metagenomics of candidate division OP3. *Environmental Microbiology* 12, 1218-1229.
- 915 Gotz, D., Banta, A., Beveridge, T.J., Rushdi, A.I., Simoneit, B., and Reysenbach, A.L. (2002). *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1349-1359.
- 920 Hales, B., Edwards, C., Ritchie, D., Hall, G., Pickup, R., and Saunders, J. (1996). Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 668-675.
- Harmer, T.L., Rotjan, R.D., Nussbaumer, A.D., Bright, M., Ng, A.W., Dechaine, E.G., and Cavanaugh, C.M. (2008). Free-Living Tube Worm Endosymbionts Found at Deep-Sea Vents. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3895-3898.
- 925 Higashi, Y., Sunamura, M., Kitamura, K., Nakamura, K.-I., Kurusu, Y., Ishibashi, J.-I., Urabe, T., and Maruyama, A. (2004). Microbial diversity in hydrothermal surface to subsurface environments of Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, using a catheter-type in situ growth chamber. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 327-336.

- 930 Holler, T., Widdel, F., Knittel, K., Amann, R., Kellermann, M.Y., Hinrichs, K.-U., Teske, A., Boetius, A., and Wegener, G. (2011). Thermophilic anaerobic oxidation of methane by marine microbial consortia. *ISME Journal* 5, 1946-1956.
- Houghton, J.L., and Seyfried Jr, W.E. (2010). An experimental and theoretical approach to determining linkages between geochemical variability and microbial biodiversity in seafloor hydrothermal chimneys. *Geobiology* 8, 457-470.
- 935 Huber, H., Diller, S., Horn, C., and Rachel, R. (2002). *Thermovibrio ruber* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-reducing bacterium that forms a deep branch within the phylum Aquificae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1859-1865.
- 940 Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K.L., and Pace, N.R. (1998). Novel Division Level Bacterial Diversity in a Yellowstone Hot Spring. *Journal of Bacteriology* 180, 366-376.
- Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M., Colwell, F.S., Nealson, K.H., Horikoshi, K., D'hondt, S., and Jørgensen, B.B. (2006). Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2815-2820.
- 945 Jetten, M.S.M. (2008). The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology* 10, 2903-2909.
- Jetten, M.S.M., Schmid, M.C., Van De Pas-Schoonen, K., Sinninghe Damsté, J., and Strous, M. (2005). Anammox Organisms: Enrichment, Cultivation, and Environmental Analysis. *Methods in Enzymology* 397, 34-57.
- 950 Johnson, C.M., Beard, B.L., Roden, E.E., Newman, D.K., and Nealson, K.H. (2004). Isotopic Constraints on Biogeochemical Cycling of Fe. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 55, 359-408.
- Kashefi, K., Tor, J.M., Holmes, D.E., Gaw Van Praagh, C.V., Reysenbach, A.L., and Lovley, D.R. (2002). *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 719-728.
- 955 Kastner, M. (1982). Evidence of two distinct hydrothermal systems in the Guaymas Basin. In J. R. Curran (ed.), *Initial reports of the Deep Sea Drilling Project, Leg 64*. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 64.
- 960 Kato, S., Takano, Y., Kakegawa, T., Oba, H., Inoue, K., Kobayashi, C., Utsumi, M., Marumo, K., Kobayashi, K., Ito, Y., Ishibashi, J.-I., and Yamagishi, A. (2010). Biogeography and Biodiversity in Sulfide Structures of Active and Inactive Vents at Deep-Sea Hydrothermal Fields of the Southern Mariana Trough. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2968-2979.
- 965 Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.
- Knittel, K., Losekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005). Diversity and Distribution of Methanotrophic Archaea at Cold Seeps. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 467-479.
- 970 Kolganova, T.V., Kuznetsov, B.B., and Tourova, T.P. (2002). Designing and Testing Oligonucleotide Primers for Amplification and Sequencing of Archaeal 16S rRNA Genes. *Microbiology* 71, 243-246.
- Kolinko, S., Jogler, C., Katzmann, E., Wanner, G., Peplies, J., and Schüler, D. (2012). Single-cell analysis reveals a novel uncultivated magnetotactic bacterium within the candidate division OP3. *Environmental Microbiology* 14, 1709-1721.
- 975 Kubo, K., Lloyd, K.G., F Biddle, J., Amann, R., Teske, A., and Knittel, K. (2012). Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. *ISME J* 6, 1949-1965.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., and Tamura, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9, 299-306.
- 980 L'haridon, S., Miroshnichenko, M.L., Kostrikina, N.A., Tindall, B.J., Spring, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Jeanthon, C. (2006). *Vulcanibacillus*



- modesticaldus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, nitrate-reducing bacterium from deep-sea hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1047-1053.
- 985 Lane D, J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*.  
Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., and Pace, N.R. (1985). Rapid determination of  
16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National  
Academy of Sciences* 82, 6955-6959.
- 990 Lonsdale, P., and Becker, K. (1985). Hydrothermal plumes, hot springs, and conductive heat flow in  
the Southern Trough of Guaymas Basin. *Earth and Planetary Science Letters* 73, 211-225.
- Lozupone, C., Hamady, M., and Knight, R. (2006). UniFrac—an online tool for comparing microbial  
community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* 7, 371.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., Van Den Braak, N., Endtz, H.P., Naumann, D., and  
Puppels, G.J. (2002). Identification of medically relevant microorganisms by vibrational  
995 spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* 51, 255-271.
- Martens, C.S. (1990). Generation of short chain acid anions in hydrothermally altered sediments of  
the Guaymas Basin, Gulf of California. *Applied Geochemistry* 5, 71-76.
- Mason, O.U., Di Meo-Savoie, C.A., Van Nostrand, J.D., Zhou, J., Fisk, M.R., and Giovannoni, S.J. (2008).  
Prokaryotic diversity, distribution, and insights into their role in biogeochemical cycling in  
1000 marine basalts. *ISME Journal* 3, 231-242.
- Mason, O.U., Stingl, U., Wilhelm, L.J., Moeseneder, M.M., Di Meo-Savoie, C.A., Fisk, M.R., and  
Giovannoni, S.J. (2007). The phylogeny of endolithic microbes associated with marine basalts.  
*Environmental Microbiology* 9, 2539-2550.
- 1005 Mckay, L.J., Macgregor, B.J., Biddle, J.F., Albert, D.B., Mendlovitz, H.P., Hoer, D.R., Lipp, J.S., Lloyd,  
K.G., and Teske, A.P. (2012). Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of  
phylogenetically diverse orange and white Beggiatoa mats in Guaymas Basin hydrothermal  
sediments. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 67, 21-31.
- Merkel, A.Y., Huber, J.A., Chernyh, N.A., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Lebedinsky, A.V. (2013).  
Detection of Putatively Thermophilic Anaerobic Methanotrophs in Diffuse Hydrothermal  
1010 Vent Fluids. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 915-923.
- Milucka, J., Ferdelman, T.G., Polerecky, L., Franzke, D., Wegener, G., Schmid, M., Lieberwirth, I.,  
Wagner, M., Widdel, F., and Kuypers, M.M. (2012). Zero-valent sulphur is a key intermediate  
in marine methane oxidation. *Nature* 491, 541-546.
- 1015 Miroshnichenko, M.L., Kostrikina, N.A., Chernyh, N.A., Pimenov, N.V., Tourova, T.P., Antipov, A.N.,  
Spring, S., Stackebrandt, E., and Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2003). *Caldithrix abyssi* gen. nov.,  
sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic  
Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. *International Journal of  
Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 323-329.
- 1020 Mori, K., Sunamura, M., Yanagawa, K., Ishibashi, J.-I., Miyoshi, Y., Iino, T., Suzuki, K.-I., and Urabe, T.  
(2008). First Cultivation and Ecological Investigation of a Bacterium Affiliated with the  
Candidate Phylum OP5 from Hot Springs. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6223-  
6229.
- 1025 Mori, K., Yamaguchi, K., Sakiyama, Y., Urabe, T., and Suzuki, K.-I. (2009). *Caldisericum exile* gen. nov.,  
sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum,  
*Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of  
*Caldisericaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov. *International  
Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2894-2898.
- Nakagawa, S., and Takai, K. (2008). Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and  
ecological significance. *FEMS Microbiology Ecology* 65, 1-14.
- 1030 Nakagawa, T., Takai, K., Suzuki, Y., Hirayama, H., Konno, U., Tsunogai, U., and Horikoshi, K. (2006).  
Geomicrobiological exploration and characterization of a novel deep-sea hydrothermal  
system at the TOTO caldera in the Mariana Volcanic Arc. *Environmental Microbiology* 8, 37-  
49.

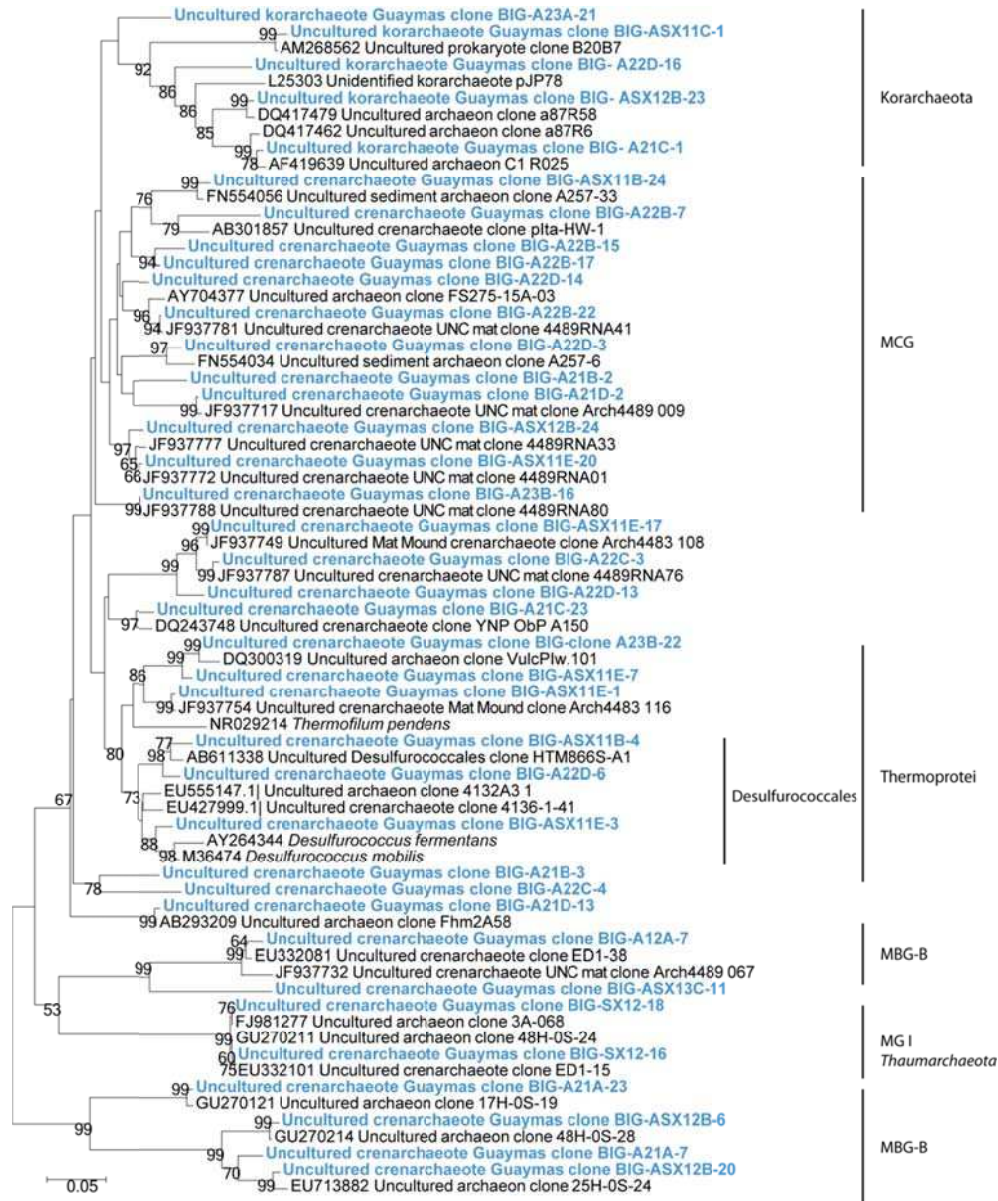
- 1035 Nercessian, O., Reysenbach, A.-L., Prieur, D., and Jeanthon, C. (2003). Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13°N). *Environmental Microbiology* 5, 492-502.
- 1040 Nunoura, T., Oida, H., Nakaseama, M., Kosaka, A., Ohkubo, S.B., Kikuchi, T., Kazama, H., Hosoi-Tanabe, S., Nakamura, K.-I., Kinoshita, M., Hirayama, H., Inagaki, F., Tsunogai, U., Ishibashi, J.-I., and Takai, K. (2010). Archaeal Diversity and Distribution along Thermal and Geochemical Gradients in Hydrothermal Sediments at the Yonaguni Knoll IV Hydrothermal Field in the Southern Okinawa Trough. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 1198-1211.
- Orcutt, B., Wheat, C.G., and Edwards, K.J. (2010). Subseafloor Ocean Crust Microbial Observatories: Development of FLOCS (Flow-through Osmo Colonization System) and Evaluation of Borehole Construction Materials. *Geomicrobiology Journal* 27, 143-157.
- 1045 Orcutt, B.N., Bach, W., Becker, K., Fisher, A.T., Hentscher, M., Toner, B.M., Wheat, C.G., and Edwards, K.J. (2011a). Colonization of subsurface microbial observatories deployed in young ocean crust. *ISME Journal* 5, 692-703.
- Orcutt, B.N., Sylvan, J.B., Knab, N.J., and Edwards, K.J. (2011b). Microbial Ecology of the Dark Ocean above, at, and below the Seafloor. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75, 361-422.
- 1050 Page, A., Tivey, M.K., Stakes, D.S., and Reysenbach, A.-L. (2008). Temporal and spatial archaeal colonization of hydrothermal vent deposits. *Environmental Microbiology* 10, 874-884.
- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., Van De Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I.C., Schouten, S., Damste, J.S.S., Op Den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., and Strous, M. (2006). A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 440, 918-921.
- 1055 Rassa, A.C., McAllister, S.M., Safran, S.A., and Moyer, C.L. (2009). Zeta-Proteobacteria Dominate the Colonization and Formation of Microbial Mats in Low-Temperature Hydrothermal Vents at Loihi Seamount, Hawaii. *Geomicrobiology Journal* 26, 623-638.
- 1060 Rastogi, G., Barua, S., Sani, R., and Peyton, B. (2011). Investigation of Microbial Populations in the Extremely Metal-Contaminated Coeur d'Alene River Sediments. *Microbial Ecology* 62, 1-13.
- Reysenbach, A.-L., Liu, Y., Banta, A.B., Beveridge, T.J., Kirshtein, J.D., Schouten, S., Tivey, M.K., Von Damm, K.L., and Voytek, M.A. (2006). A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature* 442, 444-447.
- 1065 Reysenbach, A.L., Longnecker, K., and Kirshtein, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3798-3806.
- Rodrigues, C., Hilário, A., Cunha, M., Weightman, A., and Webster, G. (2011). Microbial diversity in Frenulata (Siboglinidae, Polychaeta) species from mud volcanoes in the Gulf of Cadiz (NE Atlantic). *Antonie van Leeuwenhoek* 100, 83-98.
- 1070 Roussel, E.G., Konn, C., Charlou, J.-L., Donval, J.-P., Fouquet, Y., Querellou, J., Prieur, D., and Cambon Bonavita, M.-A. (2011). Comparison of microbial communities associated with three Atlantic ultramafic hydrothermal systems. *FEMS Microbiology Ecology* 77, 647-665.
- Rouxel, O., Ono, S., Alt, J., Rumble, D., and Ludden, J. (2008a). Sulfur Isotopes as Tracers for the Subsurface Biosphere in Altered Oceanic Basalts. *Earth and Planetary Science Letters* 268, 110-123.
- 1075 Rouxel, O., Shanks Iii, W.C., Bach, W., and Edwards, K.J. (2008b). Integrated Fe- and S-isotope study of seafloor hydrothermal vents at East Pacific Rise 9-10°N. *Chemical Geology* 252, 214-227.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- 1080 Santelli, C.M., Edgcomb, V.P., Bach, W., and Edwards, K.J. (2009). The diversity and abundance of bacteria inhabiting seafloor lavas positively correlate with rock alteration. *Environmental Microbiology* 11, 86-98.
- Santelli, C.M., Orcutt, B.N., Banning, E., Bach, W., Moyer, C.L., Sogin, M.L., Staudigel, H., and Edwards, K.J. (2008a). Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature* 453, 653-657.

- 1085 Santelli, C.M., Orcutt, B.N., Banning, E., Bach, W., Moyer, C.L., Sogin, M.L., Staudigel, H., and Edwards, K.J. (2008b). Abundance and diversity of microbial life in ocean crust. *Nature* 453, 653-656.
- Sarrazin, J., Sarradin, P.-M., and Participants, A.T.M.C. (2006). MoMARETO: a cruise dedicated to the spatio-temporal dynamics and the adaptations of hydrothermal vent fauna on the Mid-Atlantic Ridge. *InterRidge News* 15, 24-33.
- 1090 Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2004). Status of the Microbial Census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 686-691.
- Schrenk, M.O., Kelley, D.S., Delaney, J.R., and Baross, J.A. (2003). Incidence and Diversity of Microorganisms within the Walls of an Active Deep-Sea Sulfide Chimney. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3580-3592.
- 1095 Simoneit, B.R.T., and Lonsdale, P.F. (1982). Hydrothermal petroleum in mineralized mounds at the seabed of Guaymas Basin. *Nature* 295, 198-202.
- Sorensen, K.B., and Teske, A. (2006). Stratified Communities of Active Archaea in Deep Marine Subsurface Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4596-4603.
- Spötl, C., W. Houseknecht, D., and Jaques, R.C. (1998). Kerogen maturation and incipient graphitization of hydrocarbon source rocks in the Arkoma Basin, Oklahoma and Arkansas: a combined petrographic and Raman spectrometric study. *Organic Geochemistry* 28, 535-542.
- 1100 Staudigel, H., and Hart, S.R. (1983). Alteration of basaltic glass: Mechanisms and significance for the oceanic crust-seawater budget. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 337-350.
- Stott, M.B., Saito, J.A., Crowe, M.A., Dunfield, P.F., Hou, S., Nakasone, E., Daughney, C.J., Smirnova, A.V., Mountain, B.W., Takai, K., and Alam, M. (2008). Culture-independent characterization of a novel microbial community at a hydrothermal vent at Brothers volcano, Kermadec arc, New Zealand. *Journal of Geophysical Research* 113, B08S06.
- 1105 Strous, M., Kuenen, J.G., and Jetten, M.S.M. (1999). Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3248-3250.
- 1110 Takai, K., Inagaki, F., Nakagawa, S., Hirayama, H., Nunoura, T., Sako, Y., Nealson, K.H., and Horikoshi, K. (2003). Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated  $\epsilon$ -Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *FEMS Microbiology Letters* 218, 167-174.
- Teske, A. (2010). "Sulfate-Reducing and Methanogenic Hydrocarbon-Oxidizing Microbial Communities in the Marine Environment
- 1115 Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology," ed. K.N. Timmis. Springer Berlin Heidelberg), 2203-2223.
- Teske, A., Dhillon, A., and Sogin, M.L. (2003). Genomic Markers of Ancient Anaerobic Microbial Pathways: Sulfate Reduction, Methanogenesis, and Methane Oxidation. *Biol Bull* 204, 186-191.
- 1120 Teske, A., Edgcomb, V., Rivers, A., Thompson, J., De Vera Gomez, A., Molyneaux, S., and Wirsén, C. (2009). A molecular and physiological survey of a diverse collection of hydrothermal vent *Thermococcus* and *Pyrococcus* isolates. *Extremophiles* 13, 905-915.
- Teske, A., Hinrichs, K.-U., Edgcomb, V., De Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S.P., Sogin, M.L., and Jannasch, H.W. (2002). Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1994-2007.
- 1125 Teske, A., and Sorensen, K.B. (2007). Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME Journal* 2, 3-18.
- Thorseth, I.H., Furnes, H., and Heldal, M. (1992). The importance of microbiological activity in the alteration of natural basaltic glass. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 845-850.
- 1130 Vargas, M., Kashefi, K., Bluntharris, E.L., and Lovley, D.R. (1998). Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature* 395, 65-67.
- Von Damm, K.L., Edmond, J.M., Grant, B., Measures, C.I., Walden, B., and Weiss, R.F. (1985a). Chemistry of submarine hydrothermal solutions at 21 °N, East Pacific Rise. *Geochimica et*
- 1135 *Cosmochimica Acta* 49, 2197-2220.

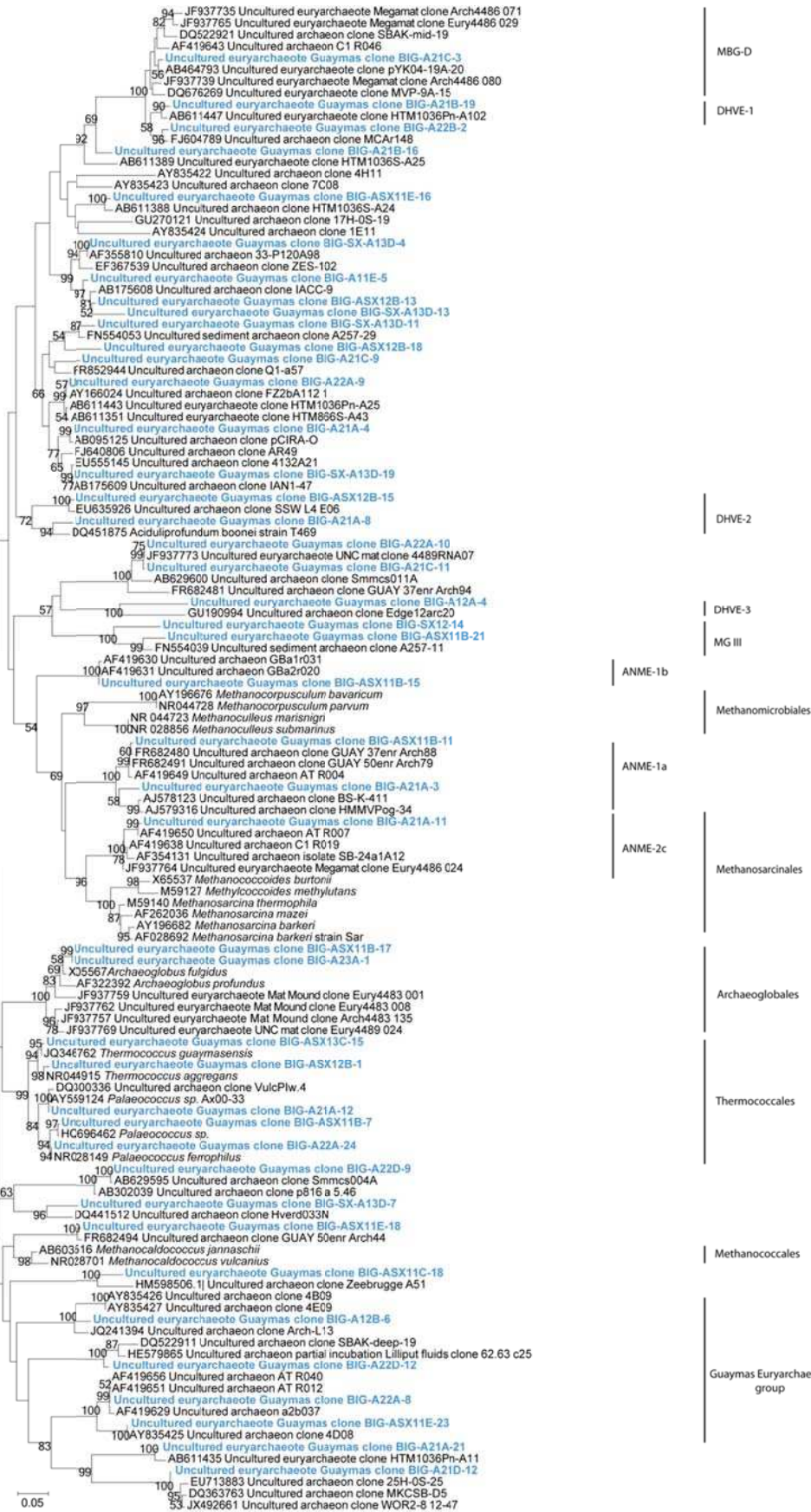
- Von Damm, K.L., Edmond, J.M., Measures, C.I., and Grant, B. (1985b). Chemistry of submarine hydrothermal solutions at Guaymas Basin, Gulf of California. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49, 2221-2237.
- 1140 Wagner, M., Roger, A.J., Flax, J.L., Brusseau, G.A., and Stahl, D.A. (1998). Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *Journal of Bacteriology* 180, 2975-2982.
- Webster, G., John Parkes, R., Cragg, B.A., Newberry, C.J., Weightman, A.J., and Fry, J.C. (2006). Prokaryotic community composition and biogeochemical processes in deep subseafloor sediments from the Peru Margin. *FEMS Microbiology Ecology* 58, 65-85.
- 1145 Webster, G., Newberry, C.J., Fry, J.C., and Weightman, A.J. (2003). Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods* 55, 155-164.
- Webster, G., Sass, H., Cragg, B.A., Gorra, R., Knab, N.J., Green, C.J., Mathes, F., Fry, J.C., Weightman, A.J., and Parkes, R.J. (2011). Enrichment and cultivation of prokaryotes associated with the sulphate–methane transition zone of diffusion-controlled sediments of Aarhus Bay, Denmark, under heterotrophic conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 77, 248-263.
- 1150 Welhan, J.A. (1988). Origins of methane in hydrothermal systems. *Chemical Geology* 71, 183-198.
- Wheat, C.G., and Mottl, M.J. (2000). Composition of pore and spring waters from Baby Bare: global implications of geochemical fluxes from a ridge flank hydrothermal system. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 629-642.
- 1155 Widdel, F., Hansen, T., Balows, A., Truper, H., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. (1992). The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, vol. I.*, 582-624.
- 1160

## 5. Résultats complémentaires

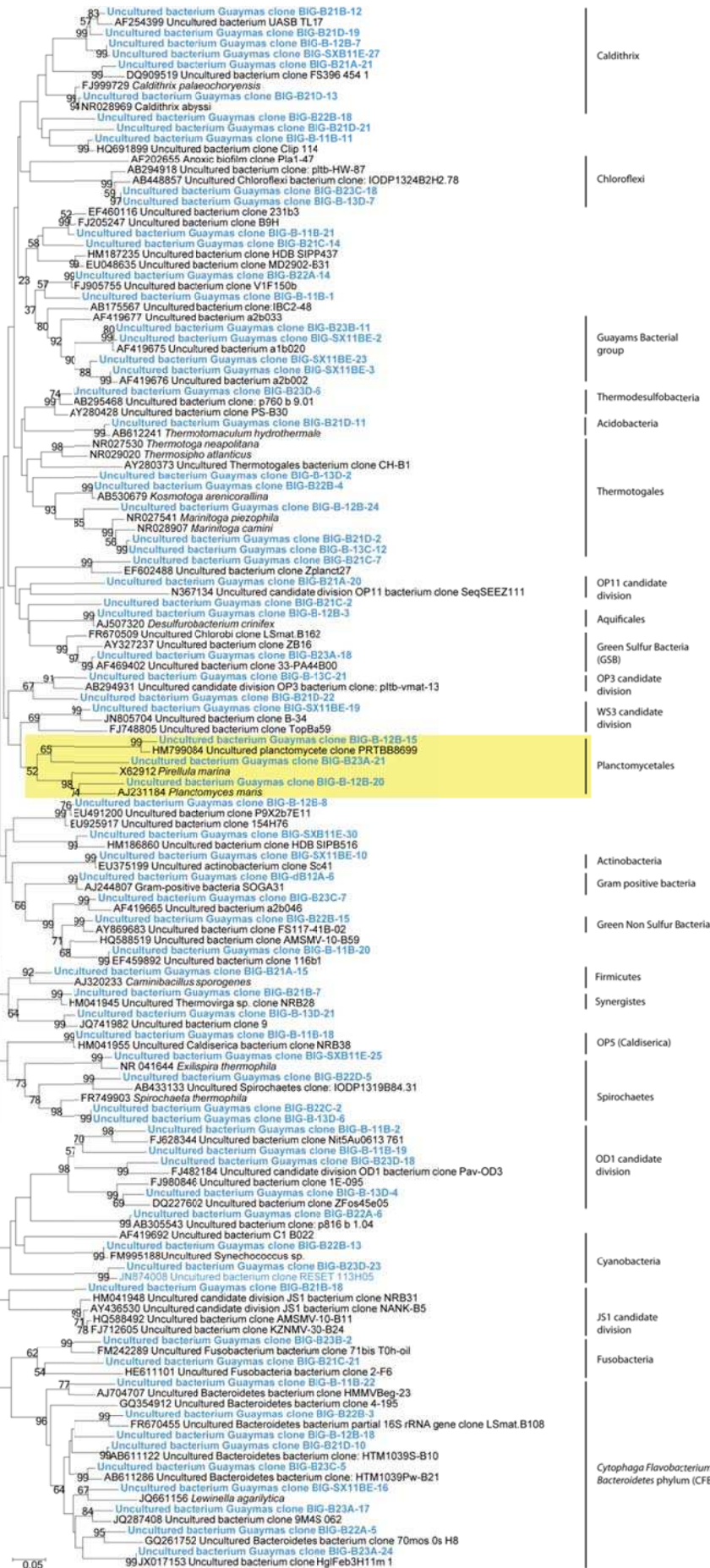
### 5.1. Arbres phylogénétiques



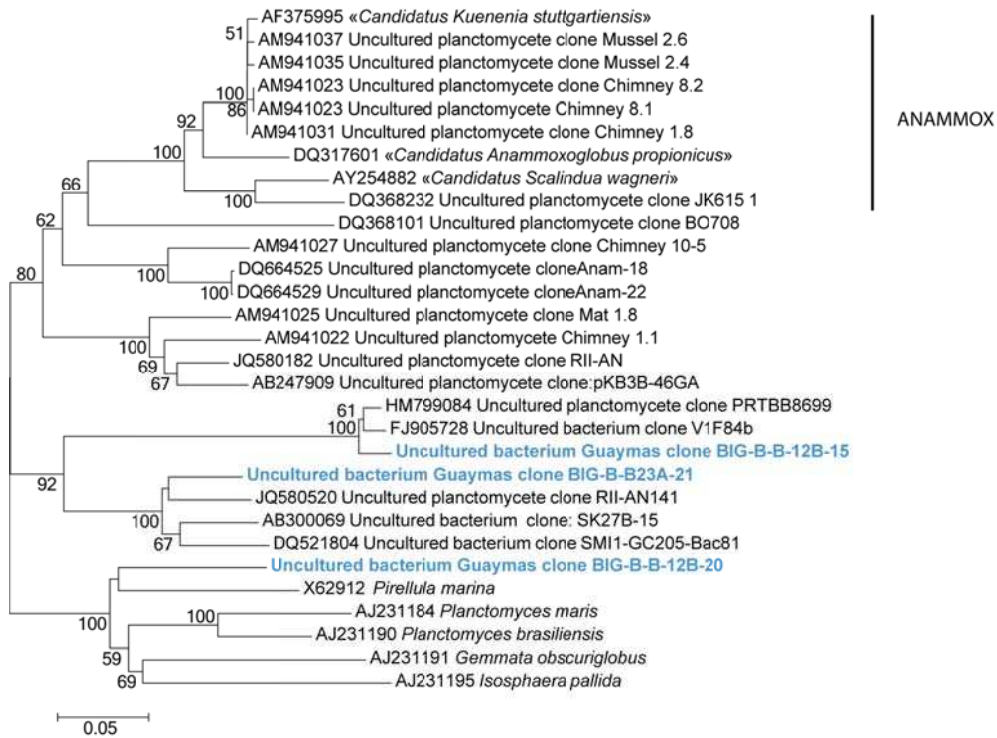
**Figure IV-1 :** Arbre phylogénétique représentant la position des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S issues des 2 modules de colonisation AISICS (en gras et en bleu) au sein des Crenarchaeota et des Korarchaeota (hors Euryarchaeota). L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode de neighbor-joining et la correction de Kimura (2 paramètres). Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% (à partir de 1000 ré-échantillonnages) sont indiquées à proximité de leurs nœuds correspondants.



**Figure IV-2** : Arbre phylogénétique représentant la position des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S issues des 2 modules de colonisation AISICS (en gras et en bleu) au sein des Euryarchaeota (hors Crenarchaeota et des Korarchaeota). L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode de neighbor-joining et la correction de Kimura (2 paramètres). Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% (à partir de 1000 ré-échantillonnages) sont indiquées à proximité de leurs nœuds correspondants.



**Figure IV-3 :** Arbre phylogénétique représentant la position des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S issues des 2 modules de colonisation AISICS (en gras et en bleu) au sein des Bacteria (hors Proteobacteria). L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode de neighbor-joining et la correction de Kimura (2 paramètres). Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% (à partir de 1000 ré-échantillonnages) sont indiquées à proximité de leurs nœuds correspondants.



**Figure IV-4 :** Zoom sur l'arbre phylogénétique représentant la position des séquences du gène codant l'ARNr 16S issues des 2 modules de colonisation AISICS (en gras et en bleu) au sein de Planctomyces. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode de neighbor-joining et la correction de Kimura (2 paramètres) avec 1000 bootstrap.

## 5.2. Observations microscopiques

Les observations en microscopie électronique à balayage (MEB) ont permis de comparer les productions minérales secondaires, obtenues sur les différents substrats, en fonction du type d'incubation (biotique *versus* abiotique).

Ces observations MEB mettent en évidence sur tous les types de verres (naturels, synthétiques et synthétiques enrichis en  $^{57}\text{Fe}$ ), provenant de toutes les incubations (biologiques et contrôles abiotiques) : des petits trous de 50 à 150  $\mu\text{m}$  ainsi que d'importantes traces de matières organiques sous forme d'agrégats, de gouttelettes ou d'un voile couvrant la surface des verres basaltiques (Figures IV-5 et IV-6).

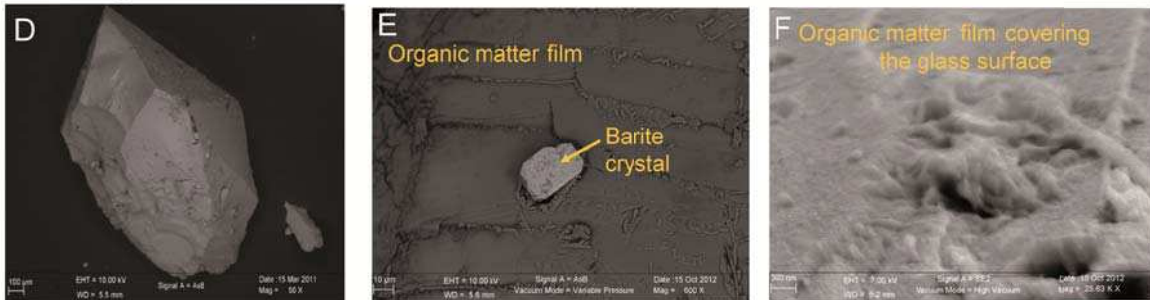
La figure IV-5 expose les microcristaux de barytine et de pyrite qui se sont formés sur les verres basaltiques incubés en condition abiotique.



AISICS1 natural basaltic glass



AISICS1 synthetic basaltic glass

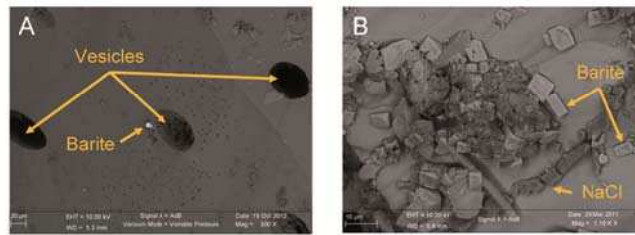


AISICS1 synthetic <sup>57</sup>Fe basaltic glass

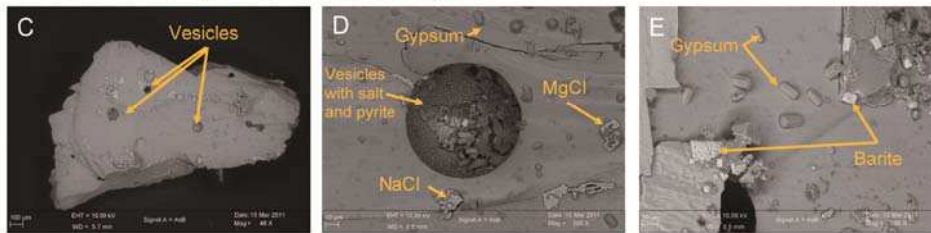


**Figure IV-5 :** Photographies MEB de verres basaltiques du module AISICS1 incubé en condition biologique (BSA électrons rétrodiffusés et SE électrons secondaires).  
**Verres basaltiques naturels** (A) vue globale ; (B) pyrite framboïde et diatomées incrustées dans une matrice de sel ; (C) agrégat et voile de matière organique sur la surface du verre. **Verres basaltiques synthétiques** (D) vue globale ; (E) cristal de barytine incrusté dans un voile de matière organique qui recouvre la surface du verre ; (F) voile de matière organique couvrant une portion de la surface du verre.  
**Verres basaltiques synthétiques enrichis en <sup>57</sup>Fe** (G) vue globale ; (H) agrégat de matière organique sur un cristal de gypse ; (I) amas de matière organique contenant des diatomées, et des filaments.

AISICS1 Abiotic natural basaltic glass



AISICS1 Abiotic synthetic <sup>57</sup>Fe basaltic glass



**Figure IV-6 :** Photographies MEB de verres basaltiques du module AISICS1 incubé en condition abiotique (BSA électrons rétrodiffusés et SE électrons secondaires).

**Verres basaltiques naturels** (A) vue globale; (B) cristaux de barytine et de sels à la surface du verre.

**Verres basaltiques synthétiques enrichis en <sup>57</sup>Fe** (C) vue globale ; (D) trous contenant des cristaux de sels et des grains de pyrite ; des cristaux de sels et de gypse sont présents sur la surface du verre; (E) cristaux de barytine et de gypse sur la surface du verre.

## 6. Synthèses des études

### 6.1. Rappel des principaux résultats

#### 6.1.1. Module de géomicrobiologie déployé à la surface de sédiments hydrotheraux

Les analyses phylogénétiques ont mis en évidence, dans tous les colonisateurs, la présence de phylotypes microbiens thermophiles et anaérobies généralement détectés dans les écosystèmes hydrothermaux, édifices actifs ou sédiments chauds. Cette observation suggère que la circulation et la diffusion des fluides hydrothermaux ont un rôle important dans la dispersion des communautés microbiennes. La colonisation microbienne observée est indépendante du type de substrat et semble plutôt être dirigée par la diffusion du fluide hydrothermal et par le mélange entre ce fluide et l'eau de mer qui crée au sein de chaque colonisateur, divers micro-habitats dont des niches anoxiques. Aucune texture d'altération des verres basaltique n'a été constatée mais des précipitations minérales

secondaires : nano-cristaux de pyrite, ont été observées uniquement dans les colonisateurs biologiques ; ce qui suggère un processus biologique pour leur formation.

Il est à noter que la détection, par PCR ciblant des gènes de fonction, de microorganismes a été testée plusieurs fois, en faisant varier plusieurs conditions:

- méthanogènes/méthanotrophes anaérobie en utilisant des amorces spécifiques du gène *mcrA* (codant sous unité alpha de la methyl-coenzyme M-reductase)
- sulfato-réducteurs en utilisant des amorces qui ciblent le gène *dsrAB* ((di)sulfite reductase)
- sulfo-oxydant en utilisant des amorces spécifiques des gènes SOXB et APS (codant la sous unité alpha de l'adémosine 5'phospho-sulfate réductase)

Pour toutes les conditions testées, aucune amplification n'a été obtenue, suggérant une faible, voire une absence de ces gènes dans les ADN extraits ; alors que des phylotypes affiliés à des genres connus pour réaliser ces métabolismes ont été détectés dans les banques de clones (par exemple des séquences affiliées méthanogènes et ANME, au genre *Archaeoglobus* (sulfato-réducteur), *Beggiatoa* (sulfo-oxydant).

### **6.1.2. Modules AISICS déployés dans les sédiments hydrothermaux**

Cette étude a permis de mettre en évidence que la colonisation des *Bacteria* est principalement guidée par les conditions environnementales : durée du déploiement, géochimie des fluides et la profondeur (pour le module déployé pendant 8 jours) alors que chez les *Archaea*, la distribution n'est affectée ni par la durée du déploiement, ni par la profondeur, ni par la nature du substrat basaltique. Parmi les phylotypes d'ANME 1 et 2 et de sulfato-réducteurs détectés, aucun des partenaires impliqués dans l'AOM n'est associés à son syntrophe habituel. Ceci suggère que les groupes ANMEs détectés dans cette étude seraient capables de vivre sans syntrophes ou seraient associés à d'autres syntrophes : d'autres sulfato-réducteurs, des dénitrifiants (certains *Epsilonproteobacteria* et / ou *Caldithrix*), ou des ferri-réducteur (*Thermotogales*). Les analyses phylogénétiques ont aussi permis de mettre en évidence la présence d'un nouveau cluster au sein des *Epsilonproteobacteria*. De plus, des bactéries proches d'endosymbiontes de Siboglinidés ont été détectées à différents étages du module AISICS déployé pendant 22 jours, suggérant que les sédiments pourraient-être un réservoir de forme libre de symbiontes. Enfin, bien qu'aucune texture d'altération spécifique n'ait pu être observée sur les verres basaltiques, des micro- et nano-cristaux de barytine et de pyrite ont été observés. Les nano-cristaux ont été remarqués uniquement dans les colonisateurs biologiques, en association étroite avec la matière organique. Ces observations

suggèrent fortement une implication biologique dans la cristallogénèse de ces nano-cristaux alors que la formation des microcristaux serait d'origine chimique.

## 6.2. Synthèse des résultats

Les études d'analyses phylogénétiques portant sur les ADNr 16S et gène de fonction, ont mis en évidence une importante diversité microbienne, hydrothermale et thermophile même pour le module déployé à la surface du sédiment. Au-delà de ces inventaires moléculaires, il apparaît que la colonisation des *Archaea* ne semble, pour aucun module, être orientée par des facteurs environnementaux (substrat, profondeur, durée du déploiement). En ce qui concerne les *Bacteria*, un profil de colonisation bactérienne a pu être décrit pour les modules AISICS1 et 2, où la durée du déploiement et la géochimie des fluides qui traversent les modules semblent contrôler la distribution des bactéries. Ce contrôle est encore plus visible pour le module déployé pendant 8 jours, ou en plus de ces paramètres, s'ajoute la profondeur dans le sédiment. Par contre, la distribution des bactéries dans les différents colonisateurs du module de géomicrobiologie n'est pas dirigée par des facteurs environnementaux.

Dans les colonisateurs biologiques de tous les modules, des micro- et nano-cristaux de pyrite et de barytine ont été observés alors que dans les colonisateurs abiotiques seuls des microcristaux ont été observés. Ces informations laissent fortement présumer un rôle biologique dans la cristallogénèse des nano-cristaux et un rôle abiotique dans la formation des microcristaux.

Ainsi, ensemble, ces études ont permis de mettre en évidence 1) un rôle de l'environnement sur la colonisation bactérienne et 2) une possible implication des micro-organismes dans la formation des nano-cristaux de pyrite et de barytine alors que les microcristaux auraient plutôt une origine chimique.

## 6.3. Perspectives

L'analyse de la diversité microbienne s'est portée uniquement sur l'analyse des gènes codant pour l'ARNr 16S pour le gène *mcrA* (méthanogénèse et méthanotrophie anaérobie) et le gène *dsrAB* (sulfato-réduction). Afin de réaliser une étude plus complète, compte tenu de la détection, dans tous les modules, de plusieurs phylotypes de *Planctomycetes*, il faudrait élargir les analyses phylogénétiques en ciblant un groupe de ces microorganismes : les bactéries ANAMMOX. En effet, ces dernières jouent un rôle important dans le cycle anaérobie de l'azote et ont été mises en évidence dans les sédiments chauds du Bassin de Guaymas (Russ et al, 2013 soumis). Les bactéries

ANAMMOX ne sont généralement pas mises en évidence en utilisant des amorces PCR bactériennes universelles ; ainsi, l'utilisation d'amorces PCR spécifiques du gène codant pour une des enzymes clé de ce métabolisme : l'hydrazine synthase (*hzsA*) (Harhangi et al. 2012) où la recherche de lipides caractéristiques de ce groupe bactérien, les Ladderanes (Byrne et al. 2009), nous renseignerait sur la possible présence de bactéries ANAMMOX dans les modules. Ceci pourrait confirmer nos hypothèses (cf. articles de ce chapitre) qui prédisent qu'un cycle complet de l'azote en condition anaérobie (dénitrification, réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium, Anammox et re-minéralisation de l'azote organique) a bien lieu dans les sédiments hydrothermaux et à l'interface eau de mer-sédiments hydrothermaux du Bassin de Guaymas.

Des études complémentaires de CARD-FISH (Catalyzed reporter deposition Fluorescence In Situ Hybridization) plutôt que du FISH du fait de la faible densité cellulaire observée sur les photographies MEB (il est à noter que des cellules ont pu être « décrochées » des verres et perdues lors du conditionnement des verres pour le FISH) pourraient être réalisées en utilisant des sondes spécifiques pour déterminer le type (Archaea ou Bacteria) et le genre ou groupes microbiens impliqués dans l'altération des verres basaltiques. De plus, les sondes se fixant sur les ARN, ceci nous renseignerait sur l'activité de ces micro-organismes.

Comme évoqué dans les matériels et méthodes (cf. chapitre II et les articles de ce chapitre), une partie des verres synthétiques a été enrichie en  $^{57}\text{Fe}$ . Ceux-ci ont été synthétisés dans le but de réaliser des analyses isotopiques du fer, qui faute de temps, n'ont pour le moment pu être réalisées. Ces analyses isotopiques avaient pour objet de déterminer la provenance de la mobilisation du fer : fluide hydrothermal, eau interstitielle ou verre lui-même, lors de la l'altération des verres basaltiques (en condition biologique et abiotique). Aussi, suite aux informations obtenues à partir des photographies MEB, avec la mise en évidence des nano-et micro-cristaux de pyrite selon le type d'incubation biotique versus abiotique, le traçage isotopique du fer pourrait permettre de renseigner sur le rôle des micro-organismes dans la formation des nano-cristaux de pyrite. Le traçage isotopique à partir des verres synthétiques enrichis ou non en isotope 57 du fer, permet aussi, par comparaison aux basaltes naturels qui ont déjà une « histoire », une exposition au lessivage de l'eau de mer, une probable colonisation microbienne, de s'affranchir de ce passé et de pouvoir réaliser une comparaison réelle et complète entre les échantillons incubés en conditions biologiques et abiotiques. Plusieurs méthodes d'analyses isotopiques du fer peuvent être utilisées :

- des sonde ioniques de type NanoSIMS (Dauphas and Rouxel 2006);
- l'ablation laser couplée au MC-ICP-MS (largeur de l'impact  $\approx 60 \mu\text{m}$  ; cf. protocole décrit par Craddock et al (Craddock et al. 2008) ;

- réaliser différents lessivages successifs des verres avec différents types d'acides afin de solubiliser le fer selon sa spéciation ;

dans le but de déterminer les différentes phases de dépôts minéraux secondaires. Ces analyses isotopiques complèteraient les études préalablement réalisées et statuerait sur l'origine du fer présent dans les cristaux de pyrite.

Aussi, afin de compléter ces études, des analyses complémentaires de spectrométrie de type STXM (Scanning Transmission X-ray Microscope) et NEXAFS (Near Edge X-Ray Absorption Fine Structure) afin de « cartographier » à une échelle fine (de l'ordre du  $\mu\text{m}$  et du  $\text{nm}$ ) la surface des verres pourraient être réalisées, comme effectuées précédemment sur des particules provenant d'un panache hydrothermal (Toner et al. 2009). Ces types de spectrométrie permettent de déterminer 1) la distribution du fer, du soufre et de carbone sur la surface des verres et 2) de déterminer la spéciation du fer et du soufre dans les amas de matière organique et sur la surface des verres. Ceci permettrait, grâce à la spéciation (par exemple distinction entre Fe(II) et Fe(III)), de mieux évaluer les métabolismes microbiens présents, de déterminer les associations Fe-S-C et donc de nous renseigner sur les possibles interactions minéral-fluide et minéral-fluide-microorganisme.

L'absence de textures d'altération « visible » sur les verres basaltiques peut-être liée aux temps de déploiement courts réalisés (maximum 24 jours). Aussi, il est probable que des zones d'altérations d'origines biologiques et chimiques soient observables sur les verres basaltiques qui remplissent les colonisateurs biologiques et abiotiques du module AISICS3 toujours déployés dans les sédiments hydrothermaux du site Mat Mound.

Enfin, comparer les processus de colonisation, d'altération des verres basaltiques et de production de minéraux secondaires entre des modules déployés en zone sédimentaire hydrothermale, avec des modules déployés en périphérie de sédiments hydrothermaux (sédiments non recouverts de tapis microbien) et/ou déployés en zone non active et hors axe (type zone de référence) permettrait d'aller plus loin dans la compréhension de ces processus en contexte sédimentaire riche en matière organique.



**V. Aperçu des interactions micro-organismes / minéraux lors d'une culture d'enrichissement en continu utilisant du fluide hydrothermal dilué comme milieu de culture et un fragment de cheminée hydrothermale comme inoculum**

---

1. Introduction de l'étude

2. Méthodes utilisées

3. Article 3- Insights into microbial-mineral interactions with continuous enrichment culture of hydrothermal chimneys using hydrothermal fluid as medium

4. Synthèse de l'étude





## 1. Introduction de l'étude

Les édifices hydrothermaux sont des structures minérales poreuses créées lorsque le fluide hydrothermal chaud chargé en éléments minéraux, réduit et anoxique entre en contact avec l'eau de mer environnante froide et oxygénée. Au niveau de cette matrice minérale, d'importants échanges thermiques et chimiques ont lieu, générant de forts gradients et de multiples micro-niches. Ces micro-habitats abritent des communautés microbiennes spécifiques du point de vue phylogénétique et physiologique (Karl 1995; Nakagawa et al. 2005; Nakagawa et al. 2006; Page et al. 2008; Takai et al. 2008; Byrne et al. 2009; Nunoura et al. 2010; Flores et al. 2011).

Grâce aux approches culturelles et moléculaires, il a été déterminé que ces communautés microbiennes, vivant en aérobiose ou en anaérobiose, sont impliquées dans de nombreuses réactions biogéochimiques clés des cycles du carbone, du soufre, d'azote et du fer (Reysenbach and Cady 2001; Slobodkin et al. 2001; Kashefi et al. 2002; Takai et al. 2003; Emerson et al. 2007; Byrne et al. 2009; Orcutt et al. 2011; Yamamoto and Takai 2011). De même, dans les édifices hydrothermaux, les procaryotes contribuent localement à la modification de leurs environnements. Certains micro-organismes vont interagir avec les minéraux en favorisant leur dissolution ou précipitation ; d'autres *via* leurs métabolismes vont modifier localement la géochimie du fluide (Ehrlich 1999; Edwards et al. 2003; Holden and Adams 2003; Schrenk et al. 2003; Edwards et al. 2005; Houghton et al. 2007; Page et al. 2008; Houghton and Seyfried Jr 2010; Orcutt et al. 2011).

Afin de mieux comprendre l'importance des conditions environnementales, telles que la chimie fluide ou la nature des substrats minéraux, sur la structure et l'activité des communautés microbiennes et inversement, nous avons réalisé une culture d'enrichissement continu en bioréacteur dans des conditions qui visaient à se rapprocher au mieux des conditions *in situ*. Notre méthode s'est basée sur la réalisation d'une culture en continu avec le fluide hydrothermal dilué comme milieu de culture et un échantillon broyé de flange hydrothermale active comme inoculum. Cette technique de culture en bioréacteur gaz-lift permet le balayage gazeux du milieu de culture par un mélange gazeux et la réalisation de culture en continu grâce au soutirage et à l'ajout de milieu de culture. Cette technique a déjà prouvé son efficacité pour plusieurs aspects dont notamment (Postec et al. 2005; Houghton et al. 2007; Postec et al. 2007; Byrne et al. 2009; Crépeau 2010) :

- la réalisation de cultures sur de longues périodes (jusque 85 jours (Crépeau 2010))
- la mise en évidence d'espèces minoritaires dans l'échantillon brut
- la mise en évidence d'espèces incultivées à ce jour
- d'étudier la dynamique des communautés microbiennes cultivées ainsi que les interactions entre les populations microbiennes dans des conditions stables ou changeantes (en faisant varier la température, ajout ou non de soufre)

- d'étudier l'influence des communautés microbiennes enrichies sur l'altération de certain substrat minéral (oxydation, réduction de certains phase ou éléments portés par des minéraux) (Houghton et al. 2007).

Maintenir des communautés microbiennes thermophiles en culture, en bioréacteur sur de longues périodes, en utilisant le fluide hydrothermal dilué comme milieu de culture et un fragment d'édifice hydrothermal comme inoculum, donc en se rapprochant des conditions *in situ*, pourrait permettre en conditions *in vitro* : 1) d'étudier la structure, l'activité et la dynamique des communautés microbiennes pendant toute la durée de la culture; 2) d'avoir un aperçu des interactions entre les micro-organismes, le fluide et les minéraux ; et enfin, 3) d'esquisser un schéma de fonctionnement global des cycles biogéochimiques du fer et du soufre en anaérobie et à haute température et de leurs interactions.

## 2. Méthodes utilisées

Afin d'étudier l'influence des conditions environnementales dont des variations de pH sur la structure et l'activité des communautés microbiennes, une culture d'enrichissement en bioréacteur gaz-lift a été réalisée à bord de *l'Atalante* pendant la campagne BIG (Biodiversité et Interactions à Guaymas). Cette culture d'enrichissement a été maintenue pendant 23 jours à 85°C sous un balayage gazeux continu de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (90:5:5).

Quotidiennement des échantillons ont été collectés afin d'analyser la diversité microbienne active basée sur l'étude phylogénétiques des ARNr 16S rétro-transcrits (par clonage-séquençage) ; d'estimer la densité cellulaire par comptage et Q-PCR à partir de l'ADN génomique ; et de suivre l'évolution des éléments majeurs et traces, des sulfates, du sulfure d'hydrogène et des acides organiques (acétate, formate, lactate et pyruvate).

Il est à noter qu'au 6<sup>ème</sup> jour de culture, un problème technique a eu lieu (la sonde pH s'est cassée) et le pH a chuté à 3,8.

Un fonctionnement des cycles biogéochimiques du soufre et du fer à haute température, mettant en avant les principaux acteurs microbiens actifs et leur dynamique au cours de la culture, a été dessiné, présenté et discuté sous la forme d'un article soumis au journal ISME.

### **3. Article 3 - Insights into microbial-mineral interactions with continuous enrichment culture of hydrothermal chimneys using hydrothermal fluid as medium**

#### **Authors & Affiliations:**

Nolwenn Callac<sup>abcd</sup>, Olivier Rouxel<sup>df</sup>, Françoise Lesongeur<sup>abc</sup>, Céline Liorzou<sup>d</sup>, Claire Bollinger<sup>e</sup>, Patricia Pignet<sup>abc</sup>, Sandrine Chéron<sup>f</sup>, Yves Fouquet<sup>f</sup>, Céline Rommevaux-Jestin<sup>g</sup> and Anne Godfroy<sup>abc</sup>

<sup>a</sup>Université de Brest, UEB, IUEM, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197 place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France.

<sup>b</sup>Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, 29280 Plouzané, France.

<sup>c</sup>CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197, 29280 Plouzané, France.

<sup>d</sup>Université de Brest, Domaines Océaniques IUEM, UMR6538, Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané, France.

<sup>e</sup>Université de Brest, IUEM, UMS3113, Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané, France

<sup>f</sup>Ifremer, Laboratoire de Géochimie et de Métallogénie, 29280 Plouzané, France.

<sup>g</sup>IPGP, Laboratoire Géobiosphère Actuelle et Primitive, UMR7154, 75238 Paris, France

E-mail: [Anne.Godfroy@ifremer.fr](mailto:Anne.Godfroy@ifremer.fr)

Corresponding author:

Dr. Anne Godfroy

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes – UMR 6197

IFREMER – Centre de Brest

BP70

29280 Plouzané

France

**Running title: Continuous enrichment culture using hydrothermal fluid as medium: insights into sulfur and iron biogeochemical cycles**

**Subject category:** Geomicrobiology and microbial contributions to geochemical cycles

## Abstract

Active hydrothermal chimneys host diverse microbial communities exhibiting various metabolisms including those involved in sulfur, carbon or iron biogeochemical cycles. To investigate microbial-mineral interactions in hydrothermal chimney, a cultural approach using a gas-lift bioreactor was chosen. An enrichment culture was performed for 23 days at 85°C using a crushed active chimney sample from the Guaymas Basin as inoculum and diluted hydrothermal fluid from the same vent as culture medium. Daily sampling had provided time-series access to active microbial diversity and medium composition, including metals, sulfate, hydrogen sulfide and organic acids concentrations. *Bacteria* were shown to be dominant during the whole duration of the culture. The active archaeal and bacterial community mostly consisted of representatives of the sulfur-, sulfate- and iron-reducing genera as *Thermococcus*, *Archaeoglobus*, *Geoglobus*, *Sulfurimonas* and *Thermotoga*. This cultural approach allowed not only the cultivation of thermophilic microbial populations that were under-represented in the initial environmental sample but also permitted to follow the community structure dynamic over time, depending on growth conditions and interactions indeed microbial community structure was impacted by mineral solubility and *per se* the availability of electron donors and acceptors. Our study also reports the first evidence for the cultivation of thermophilic *Ferroglobus*. All together the results demonstrate the links between sulfur and iron cycles and physiological and phylogenetical diversity in hydrothermal chimney environments.

**Keywords:** active microbial diversity / continuous enrichment culture / deep sea hydrothermal vent / hydrothermal fluid / iron cycle / sulfur cycle

## 1. Introduction

Deep-sea hydrothermal chimneys are porous mineral structure that precipitates as a result of mixing of H<sub>2</sub>S and metal-rich high temperature hydrothermal fluid with oxygenated cold seawater. It has been well documented that the steep temperature and geochemical gradient within the chimney wall generates specific micro-habitats that can host a large and diverse microbial populations (Karl, 1995, Nakagawa *et al*, 2005, Nakagawa *et al*, 2006, Page *et al*, 2008, Takai *et al*, 2008, Byrne *et al*, 2009a, Nunoura *et al*, 2010, Flores *et al*, 2011). The physiological and phylogenetical diversity of these prokaryotes has been previously investigated using both cultural and molecular approaches in order to determine their ecological role. These previous studies demonstrate that microorganisms interact with their environment and, in turn, could affect vent fluid composition and chimney mineralogy by promoting mineral dissolution or precipitation (Ehrlich, 1999, Holden and Adams, 2003, Schrenk *et al*, 2003, Houghton *et al*, 2007, Page *et al*, 2008, Houghton and Seyfried Jr, 2010). Likewise, microbial processes occurring in vent environments are involved in many key

biogeochemical reactions in carbon, sulfur, nitrogen and iron cycles (Reysenbach and Cady, 2001, Slobodkin *et al*, 2001, Kashefi *et al*, 2002a, Takai *et al*, 2003, Byrne *et al*, 2009b, Yamamoto and Takai, 2011).

40 Under high temperature conditions prevailing within seafloor hydrothermal chimneys, both sulfate and sulfur-reduction but also sulfur-oxidation may occur. According to their frequency in clone libraries and isolation in pure cultures, *Epsilonproteobacteria* and *Thermococcales* are considered to be key players in sulfur metabolism (Antoine *et al*, 1995, Godfroy *et al*, 1997, Reysenbach *et al*, 2000, Campbell *et al*, 2006, Teske *et al*, 2009). Sulfate reduction has been shown to be mediated by *Bacteria* belonging to the *Deltaproteobacteria* group, to the genera *Thermodesulfobacterium* 45 (*Jeanthon et al*, 2002) and *Thermodesulfatator* (*Moussard et al*, 2004, *Alain et al*, 2010). Within *Archaea*, sulfate reduction is the prerogative of only members of the genus *Archaeoglobus* (*Burggraf et al*, 1990, *Mori et al*, 2008).

Within active hydrothermal chimneys, iron cycle is likely mediated by thermophilic dissimilatory iron-reducers, including *Geothermobacter ehrlichii* (*Kashefi et al*, 2003), *Deferribacter abyssi* 50 (*Miroshnichenko et al*, 2003), *Deferribacter autotrophicus* (*Slobodkina et al*, 2009a), *Thermotoga maritima* (*Vargas et al*, 1998) and the *Archaea Geoglobus ahangari* (*Kashefi et al*, 2002b), *Geoglobus acetivorans* (*Slobodkina et al*, 2009b) and some *Thermococcus* isolates (*Slobodkin et al*, 2001). In contrast, described iron-oxidizers were found in the outside chimney wall in contact with seawater, in iron-rich mat and are mainly mesophilic. These iron-oxidizers mainly belong to the 55 *Zetaproteobacteria* and seem to be widely widespread in the low temperature part of the hydrothermal ecosystems (*Emerson et al*, 2007, *Kato et al*, 2009, *Emerson et al*, 2010, *Kato et al*, 2012) the prevalence of mesophilic iron-oxidizers, some close relatives to *Ferroglobus placidus* a shallow hyperthermophilic *Archaea* known to oxidize iron with nitrate as electron acceptor (*Hafenbradl et al*, 1996) were detected in deep hydrothermal samples (*Reysenbach and Cady*, 2001).

60 Due to the high biological productivity in the water column and rapid sedimentation rate, the Guaymas Basin is covered by a thick layer of organic and diatomaceous-rich sediments (100-500m) (*Schrader*, 1982, *Simoneit and Lonsdale*, 1982, *Von Damm et al*, 1985b, *De la Lanza-Espino and Soto*, 1999, *Dean et al*, 2004). In the Southern Trough the sediments are affected by circulation of hydrothermal fluids that result in the formation of sulfide and carbonate-rich chimneys at the 65 seafloor. Diagenetic interactions between the ascending high temperature hydrothermal fluids and sediments result in the pyrolysis of organic matter and metal-sulfide precipitation in subsurface (e.g. pyrrhotite FeS). Products of pyrolysis include light hydrocarbons, short-chain organic acids, particulate organic matter and ammonia (*Welhan*, 1988, *Martens*, 1990) which provide unique conditions for sustaining thermophilic microbial life (*Teske et al*, 2002). Likewise, hydrothermal 70 chimneys microbial mats and underlying hot sediment of Guaymas Basin have been extensively

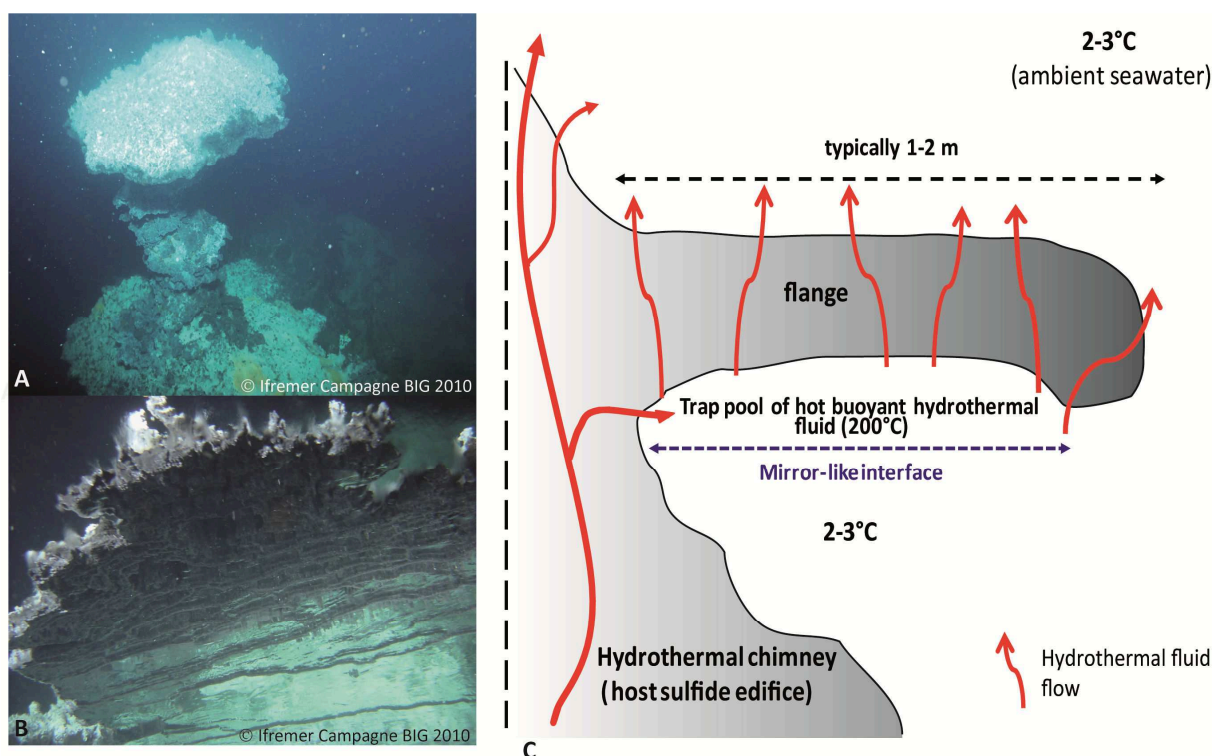
studied in the past regarding microbiology (e.g. (Bazylinski *et al*, 1989, Jannasch *et al*, 1989, Nelson *et al*, 1989, Burggraf *et al*, 1990, Jorgensen *et al*, 1990)), geochemistry (e.g. (Simoneit *et al*, 1979, Lonsdale and Becker, 1985, Von Damm *et al*, 1985b, Martens, 1990, Dean *et al*, 2004)). The geological setting and mineralogy of the hydrothermal fields have been also investigated (e.g.(Byrne and Emery, 1960, Lonsdale and Lawver, 1980, Peter and Scott, 1988, Otero *et al*, 2003)).

In order to better constrain the importance of environmental conditions, such as fluid chemistry and mineral substrates on microbial community structure, we performed a continuous enrichment culture in condition that try to mimic the *in situ* hydrothermal conditions. Our approach involved the use of a continuous culture in a gas-lift bioreactor with diluted hydrothermal fluid as culture medium and a crushed sample of an active vent flange as inoculum. The cultivation system allowed maintaining a constant N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> atmosphere and the removal and addition of culture medium. This technique has already proved its efficiency for long term cultivation to investigate hydrothermal microbial community dynamics, inter-species interactions in both stable and changing environmental conditions (Postec *et al*, 2005a, Postec *et al*, 2007, Byrne *et al*, 2009a). Here, the enrichment culture was maintained for 23 days at 85°C under continuous gas sweeping. Samples were analyzed every day for active microbial diversity based on 16S rRNA (sequencing and Q-PCR), element (major and trace) concentrations, as well as sulfate, hydrogen sulfide and organic acids concentrations. Moreover the influence of pH variations on the microbial community structure was investigated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sampling and sample description

An active hydrothermal flange sample was collected during the oceanographic cruise BIG (R/V *l'Atalante* June 2010) on "Rebecca's Roost" site (27° 00.634' N 111° 24.405' W; 1997 m depth) in the Southern trough of the Guaymas Basin (Gulf of California, Mexico) using the manned submersible *Nautile* (dive 1747). The chimney (sample 1747-BIG03E01) (Figure 1) consists of an asymmetrical horizontal structure, referred as "flange" that grow at the base of the Rebecca's Roost vent complex.



100 **Figure 1:** (a) Photograph of Rebecca's Roost chimney and flange structure; (b) bottom view of the flange  
 105 showing the mirror-like interface between trapped hydrothermal fluid underneath the flange and seawater. All  
 photos taken with the submersible Nautilie during the BIG cruise (Dive 1745); (c) Schematic diagram of a flange  
 showing the circulation of the hydrothermal fluid trapped underneath the flange and passing through the  
 porous mineral matrix (adapted from Tivey 1986; 1999; Kerr 1997 (Tivey & Delaney, 1986 ; Tivey et al., 1999 ;  
 Kerr, 1997).

The sample was brought aseptically to the surface into an insulated box. Immediately upon recovery  
 on board, the sample was crushed to grain size less than 1 cm and sub-sampled in an anaerobic  
 chamber under  $N_2/H_2/CO_2$ , 90:5:5 gas atmosphere. Crushed fragments were subsequently stored in  
 110 sterile vials filled with sterile NaCl solution at  $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , under anaerobic condition ( $N_2/H_2/CO_2$ , 90:5:5).  
 Sub-samples were stored at  $4^\circ\text{C}$  for cultivation, frozen at  $-20^\circ\text{C}$  for mineralogical analyzes or frozen at  
 $-80^\circ\text{C}$  for microbial diversity molecular survey.

Mineralogical and geochemical analyses were performed on the flange fragments at the beginning  
 and at the end of the culture (stored at  $-20^\circ\text{C}$  and  $-80^\circ\text{C}$ , respectively). Before analysis, crushed  
 115 samples were rinsed 6 times with dionized water (MilliQ<sup>TM</sup> 18m $\Omega$ ), dried at  $60^\circ\text{C}$  and powdered in  
 agate mortar. Pseudo-quantitative mineralogy was achieved by X-ray diffraction with a D8 ADVANCE  
 diffractometer Bruker AXS coupled with the XRD commander system for data acquisition. Minerals  
 were determined according their diffraction spectra using the Eva<sup>TM</sup> and Topas<sup>TM</sup> softwares.

Hydrothermal fluid from Rebecca's Roost site was collected during dives 1747 and 1772 near the  
 120 outflow orifice using titanium syringes (Von Damm *et al*, 1985a) in order to determine the fluid  
 composition.



## 2.2. Enrichment culture procedure using Gas-Lift bioreactor

### 2.2.1. Medium and inoculum

125 The medium used consisted of diluted hydrothermal fluid collected with the PEPITO water sampling  
system (Sarrazin *et al*, 2006), (dive 1747) in the seawater mixing zone of the Rebecca's Roost vent  
site at about 100°C (minimal temperature was 60°C and maxima was 190.1°C during sampling). Care  
was taken to sample diluted hydrothermal fluid from the same orifice where the chimney was  
sampled. Hydrothermal fluid samples were recovered sequentially in 3 sterile 5 liters pouches. Each  
130 pouch was sub-sampled for shore-based chemical analysis and stored at 10°C before being  
transferred aseptically into sterile 5 liters Nalgene bottle. Before being used as medium, the fluid was  
sparged with N<sub>2</sub> and rezasurin (0.5 mg.L<sup>-1</sup>) was added as anaerobiosis indicator. The first pouch  
served as medium until culture day 8, the second until day 19 and the third until the end of culture.  
Hydrothermal fluid, from the same hydrothermal site, was also collected near the vent orifice using  
135 titanium syringes (dive 1772), in order to determine the end-member fluid composition (i.e. with  
minimal mixing with ambient seawater). Our chemical data indicates that fluid used as medium is a  
hydrothermal fluid diluted at about 60% with ambient deep seawater. The bioreactor was inoculated  
with 400 ml of the hydrothermal flange sample (1747-BIG03E01) suspended in NaCl solution. In  
order to avoid a washout of cells before they start growing, the bioreactor was maintained in batch  
140 culture mode during the first 36h after inoculation.

### 2.2.2. Culture conditions and bioreactor sampling

The enrichment culture was carried out during 23 days (36h in batch mode and 21 days in continuous  
mode culture), at 85°C in an 850 mL glass gas-lift bioreactor as previously described (Raven *et al*,  
145 1992, Postec *et al*, 2005a, Godfroy *et al*, 2006, Postec *et al*, 2007, Byrne *et al*, 2009a). In order to  
maintain anaerobic condition and provide H<sub>2</sub> as possible electron donor and CO<sub>2</sub> as possible carbon  
source, the bioreactor was continuously sparged with a N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (75:20:5) (0.1 v.v.min<sup>-1</sup>) gas  
mixture. *Note that due to a pH probe failure at day 6, the pH dropped to 3.8 during few hours due to  
uncontrolled addition of HCl solution.*  
150 Daily samples from the liquid culture fraction were directly collected from the bioreactor, to  
determine: the cell density, the concentration of dissolved major and trace element, the sulfate,  
organic acid and hydrogen sulfide quantification and for DNA and RNA analysis.  
Further details of the culture conditions and sampling protocols are provided as supplementary  
Methods.

155

### 2.3. Nucleic acids extractions and PCR amplifications

Total nucleic acids (both DNA and RNA) from the crushed flange sample (raw sample before inoculation in the bioreactor), from the suspended materials from the medium (on filters) and from the mineral fraction recovered at the end of the culture, were extracted using a chemical and enzymatic lysis method. Detail for nucleic acids extraction is provided as Supplementary Methods. Seven samples, including the initial crushed flange used as inoculum, the end of batch culture mode (36 h) sample, continuous culture samples at day 4, 7, 15, 21 and from the mineral crushed recovered at the end of the culture, were used to investigate the active microbial diversity. Prior to reverse transcription, RNA was purified using NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II kit (MachereyNagel) according to the manufacturer instructions. Reverse transcription was performed using the qScript<sup>™</sup>cDNA SuperMix (Quanta BioSciences) reagent according to the manufacturer instruction. Details for PCR amplification, cloning, sequencing, phylogenetic analysis; relative quantification of archaeal and bacterial population by Q-PCR are provided as Supplementary Methods. The sequence data reported in this study have been submitted to GenBank nucleotide sequence databases under accession number XXX to XXX for Archaea and XXX to XXX for Bacteria sequences.

## 3. Results

### 3.1. Sample mineralogy and geochemistry

The hydrothermal chimney (i.e. flange) recovered from Rebecca's Roost vent site (Sample 1747-BIG03E01, Table 1) is essentially composed of calcite associated with fine grained sulfide minerals (e.g. pyrrhotite, sphalerite) and sulfate minerals (e.g. anhydrite, barite). At Rebecca's Roost, the temperature of the hydrothermal fluid circulating through the flange has been measured at 100 °C while a maximum temperature of 201°C was measured in focused hydrothermal discharge. As already described at several seafloor hydrothermal fields (Tivey and Delaney, 1986, Woods and Delaney, 1992, Kerr, 1997, Tivey *et al*, 1999), flanges correspond to horizontal structures that are typically located near the base of a hydrothermal spire. As illustrated in Figure 2, the hydrothermal fluid is trapped under the horizontal flange structure, forming a mirror-like contact with cold seawater. The upper part of the horizontal structures of the flanges is generally enriched in silica and sulfate minerals and serve as substrates for biologic activity (Holden and Adams, 2003). Quantitative analysis of mineralogy using XRD analysis suggest that the flange is essentially composed of calcite and barite and to a lesser proportion by nontronite (possibly associated to amorphous silica), anhydrite, ferrihydrite, aragonite and sulfide minerals such as pyrrhotite, sphalerite and galena (Table 1). This mineral assemblage is similar to previous mineral description from Guaymas Basin (Peter and Scott, 1988). The main difference of mineral composition before and after incubation is in

the lower abundance of calcite, and barite (Table 1). Nontronite, which has been observed at the beginning of the experiment, totally disappeared at the end of the culture

195 **Table 1:** Relative abundance of each mineral phase expressed in percentage of total abundance before (*in-situ* sample) and after enrichment culture (*ex-situ* sample). In bold are mineral phases having their relative abundances modified after the enrichment culture.

Mineral	Chemical formula	Raw flange sample	Bulk sample (end of the culture)
Anhydrite	CaSO <sub>4</sub>	<5	<5
<b>Calcite</b>	CaCO <sub>3</sub>	<b>65</b>	<b>90</b>
<b>Barite</b>	BaSO <sub>4</sub>	<b>13</b>	<b>&lt;5</b>
<b>Pyrrhotite</b>	Fe <sub>(1-x)</sub> S	<b>9</b>	<b>&lt;5</b>
Ferrihydrite	(Fe <sup>3+</sup> ) <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·0.5H <sub>2</sub> O	<5	<5
<b>Nontronite</b>	(CaO <sub>0.5</sub> ·Na) <sub>0.3</sub> Fe <sup>3+</sup> <sub>2</sub> (Si·Al) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> ·nH <sub>2</sub> O	<b>8</b>	<b>0</b>
Sphalerite	ZnS	<5	<5
Aragonite	CaCO <sub>3</sub>	<5	<5
Galena	PbS	<5	<5

### 3.2. Geochemistry of the hydrothermal fluid medium

200 Geochemical characteristics of the hydrothermal fluid at Rebecca's Roost (dives 1747 and 1772) include a circum-neutral pH (6.5 at 1 atm, 25°C) and concentrations of dissolved Na, Ca, K, Si and Mn enriched relative to local deep-seawater (Table 2) which are generally similar to previous studies at Guaymas Basin (Von Damm *et al*, 1985b). Dissolved Fe concentration at 1.36 µM, is lower than dissolved Fe concentrations measured at other hydrothermal vents along the Guaymas Basin (Von Damm *et al*, 1985b). H<sub>2</sub>S concentration at around 2 mM is also lower than previous studies reporting H<sub>2</sub>S concentrations between 3.8 mM and 6 mM (Von Damm *et al*, 1985b). The diluted hydrothermal fluid used as medium (Pepito pouches) is characterized by sulfate concentration around 20 mM (depending on pouch) which suggest a dilution of about 60% with ambient deep seawater, having sulfate concentration at 33 mM. Acetate concentration in the diluted hydrothermal fluid approached the detection limit (3 µM) in pouch 1 and was respectively 5.2 and 5.3 µM in pouch 2 and 3 ; formate concentration ranged from 17 to 20 µM. Lactate and propionate were not detected and H<sub>2</sub>S concentration remained between 2.2 and 3.6 mM, (Table 2). In the gas-lift bioreactor, the medium that has reacted with the mineral substrate during the first 36h of culture (sample 36h, Table 3) is characterized by near neutral pH (6.8), high acetate concentration (288µM), sulfate concentration up to 36mM, low formate concentration (no lactate and propionate), and dissolved H<sub>2</sub>S below detection (Table 3). Dissolved trace metals, such as Fe, Mn, Sr or Ba, have lower concentrations than those measured in the initial fluid. Also, the high salinity (reflected by Na concentration up to 700 mM

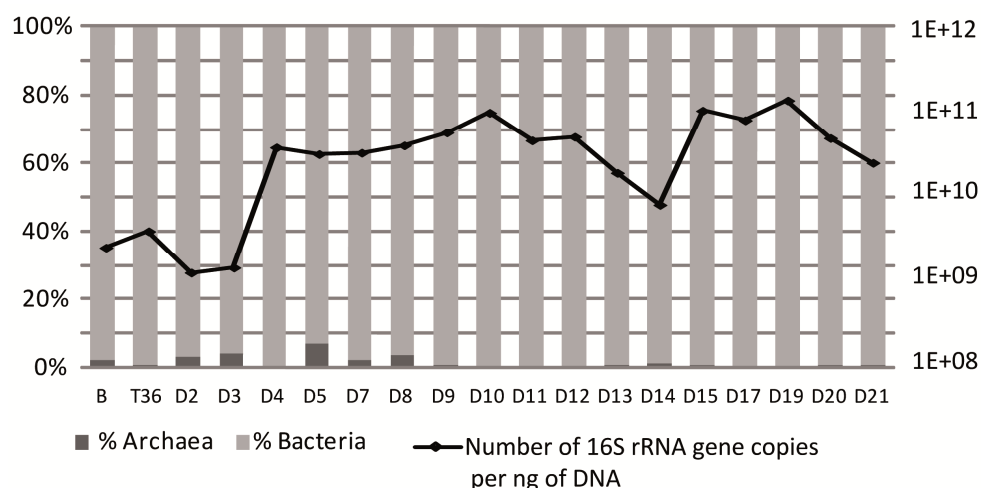
220 compared to 470 mM for background seawater, table 3) suggests that evaporation occurred during the initial stage of the experiment due to heating at 85°C and gas sweeping. After 36h, when the continuous mode has been being established, Na together with Ca,  $\text{SO}_4^{2-}$ , dissolved Fe and other elements (except Si) decreased, mainly due the addition of fresh solution medium into the bioreactor. Among the organic acids, lactate and propionate were also below detection and only low quantities of formate (below 3µM) were measured. Acetate concentrations decreased progressively from 288 µM at the beginning to 2 µM at the end (Table 3). As mentioned above, the pH dropped to 3.8 at day 225 6, and this change was associated with an abrupt increase in Fe, Mn, Pb, Ba, Si and U concentrations which then progressively decreased until the end of the experiment (Table 3, Figure 3). Due to sample preservation issue, nitrate was not measured. Nevertheless, previous studies report nitrate concentrations of 25 µM in hydrothermal fluid (Karl *et al*, 1988, McHatton *et al*, 1996) and 40 µM in Guaymas Basin seawater ((McHatton *et al*, 1996). This allow us to consider that, nitrate was available 230 as potential electron acceptor in the culture.

**Table 2:** Organic acid and sulfate concentrations measured in deep seawater and hydrothermal fluids collected during dives 1747 (sample A correspond to the right Titanium syringe and sample b to the left Titanium syringe) and 1772. Concentrations are also reported for each Pepito sampler pouches that were used as culture medium. "nd" corresponds to not determined and "bd" corresponds below detection limit.

	Seawater	Hydrothermal fluid (dive 1772)	Hydrothermal fluid (dive 1747-sample A)	Hydrothermal fluid (dive 1747-sample B)	Pepito pouch 1 (dive 1747)	Pepito pouch 2 (dive 1747)	Pepito pouch 3 (dive 1747)
pH	nd	6.5	nd	nd	nd	nd	nd
Acetate µM	nd	nd	nd	nd	3.8	5.2	5.3
Formate µM	nd	nd	nd	nd	16.9	18.5	19.5
Lactate µM	nd	nd	nd	nd	0	0	0
Propionate µM	nd	nd	nd	nd	0	0	0
Sulfate mM	34.9	2.4	nd	nd	20	19.9	20.1
H <sub>2</sub> S mM	bd	2	bd	bd	3.6	3.4	2.2
Na mM	482.6	503.8	447.2	438.5	448.8	447.0	446.3
Ca mM	10.2	29.0	17.0	15.2	15.8	15.5	15.7
Ba µM	41.4	26.0	29.9	17.8	8.7	14.4	16.9
Mg mM	54.4	3.1	30.6	34.4	33.8	34.5	34.9
Sr µM	113.2	231.4	132.7	118.1	121.5	122.2	122.0
Fe µM	<2.5	32.5	6.0	9.1	2.7	2.7	2.6
Mn µM	<0.1	129.1	53.5	40.4	45.3	42.0	41.2
K mM	10.5	49.1	22.5	19.2	21.0	20.0	19.9
Si mM	<0.01	1.9	1.7	1.6	1.6	1.6	1.6

### 3.3. Active microbial community in the flange sample, in the culture and in the solide fraction

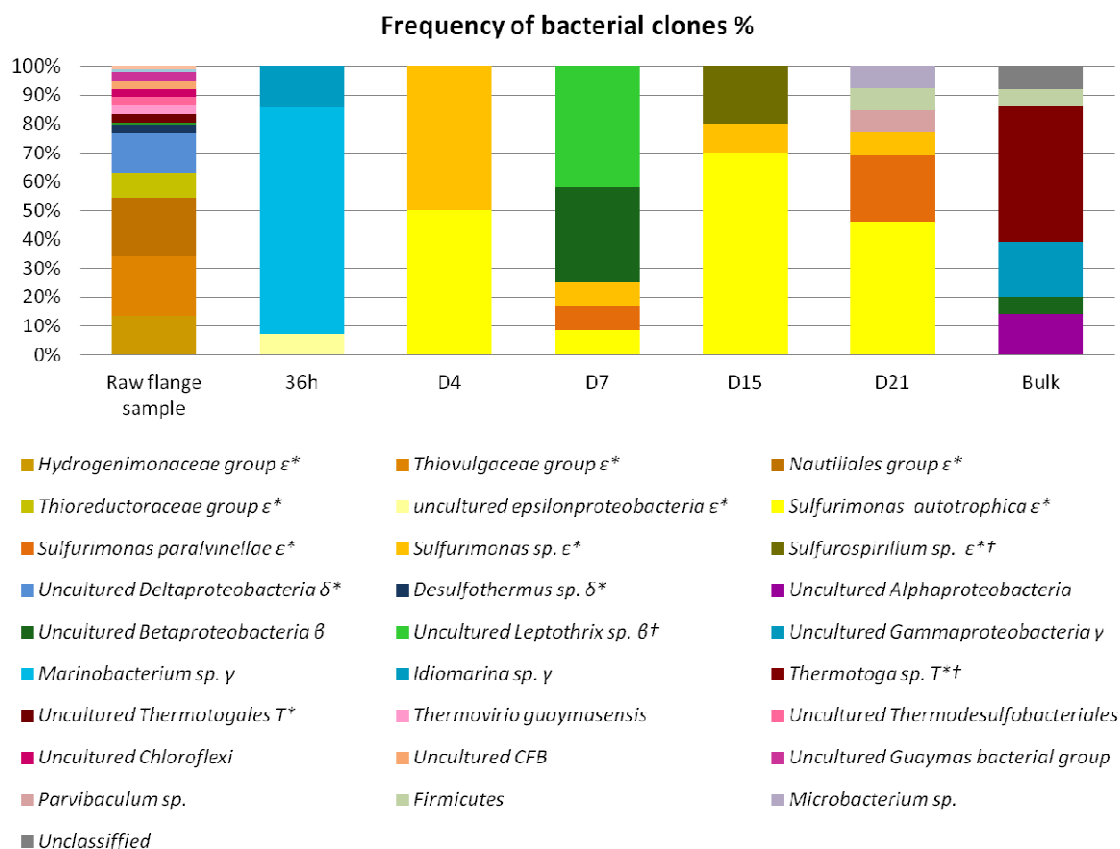
240 According to the Q-PCR data (Figure 2), *Bacteria* were dominant in the flange sample and during the culture. In the flange *Epsilonproteobacteria* were dominant in clone library.



245 **Figure 2:** Total of number of 16S rRNA gene copies per ng of whole DNA in the in-situ sample and in the bioreactor culture determined by Q-PCR results. Archaea and Bacteria ratio express in percentages of number of 16S rRNA gene copies per ng of whole DNA determined by Q-PCR. B corresponds to crude flange sample, T0, sample just after inoculation and D at each day of culture time.

Some *Deltaproteobacteria* were also detected, as well as member belonging to the *Thermotogales*,  
 250 the Guaymas bacterial group (Teske *et al*, 2002), the *Aquificales*, the *Thermodesulfobacteriales*, the  
*Flexibacter-Bacteroides-Cytophaga* division and the *Chloroflexi* division (Figures 3, 4 and 5). The  
 active archaeal community consisted of representatives of the *Thermococcus* and *Archaeoglobus*,  
 and the methanogens: *Methanocaldococcus*, *Methanothermococcus* and *Methanopyrus* (Figures 6  
 and 7).

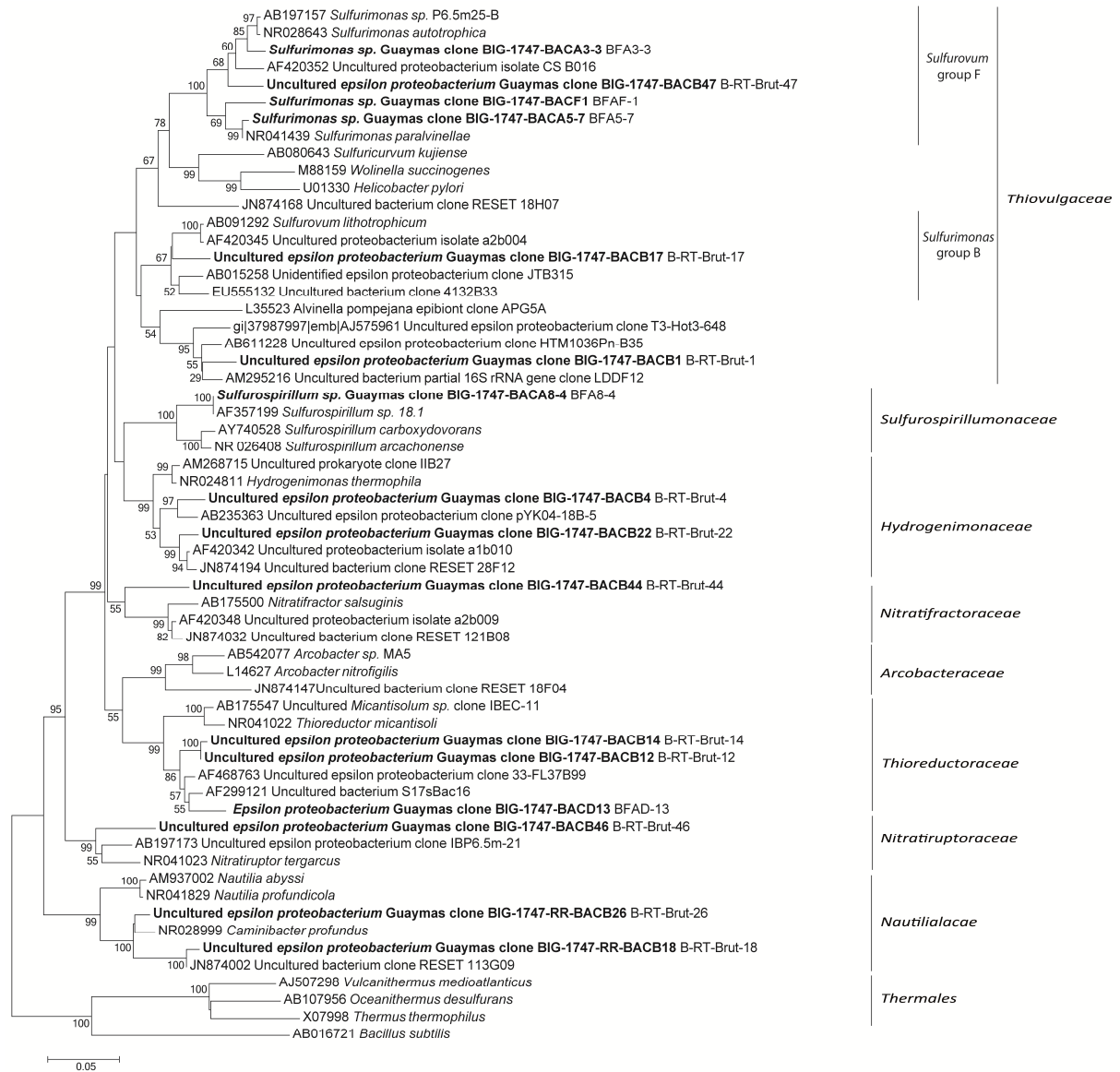
255



**Figure 3:** Repartition of active microbial community based on the frequency of archaeal or bacterial 16S rRNA gene in clone libraries at different time of the enrichment culture.

“Raw flange sample” corresponds to the the in-situ sample before culture.

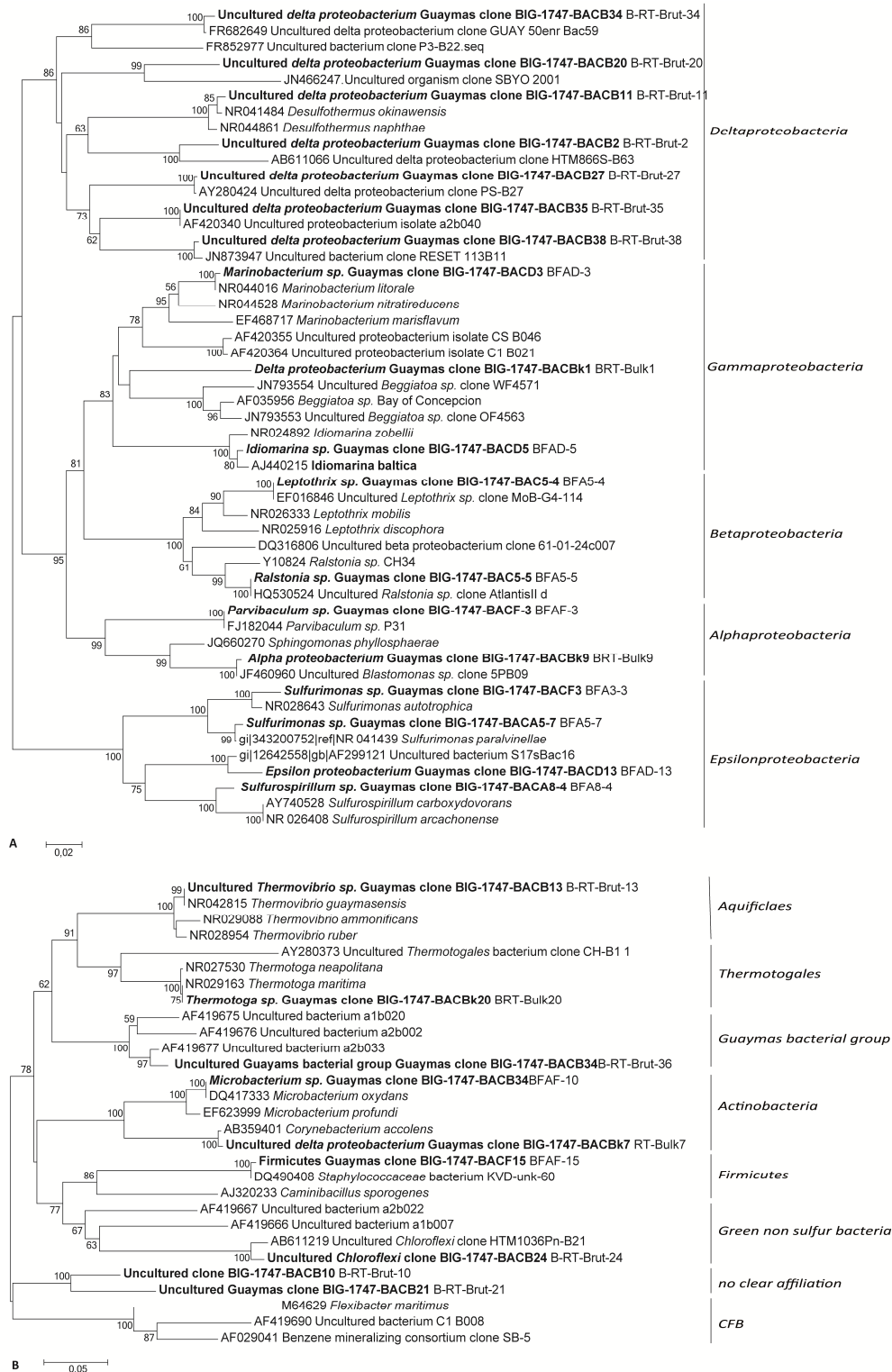
- 260 “Bulk” correspond to the solid fraction remaining at the end of the culture time (i.e. ex-situ)
- ε correspond to microbial group, species or sequences belonging to the Epsilonproteobacteria
- δ correspond to microbial group, species or sequences belonging to the Deltaproteobacteria
- β correspond to microbial group, species or sequences belonging to the Betaproteobacteria
- γ correspond to microbial group, species or sequences belonging to the Gammaproteobacteria
- 265 T correspond to microbial species or sequences belonging to the Thermotogales
- \* correspond to microbial group or species involved in the sulfur cycle
- † correspond to microbial group or species involved in the iron cycle



270

**Figure 4:** Neighbor-joining distance phylogeny of Epsilonproteobacteria based on 16S rRNA gene sequences after RNA reverse transcription obtained from the in-situ hydrothermal flange sample and during the enrichment culture. Bootstrap values above 50% based on 1000 replicates are reported. Thermales and *Bacillus subtilis* are used as outgroup.

275

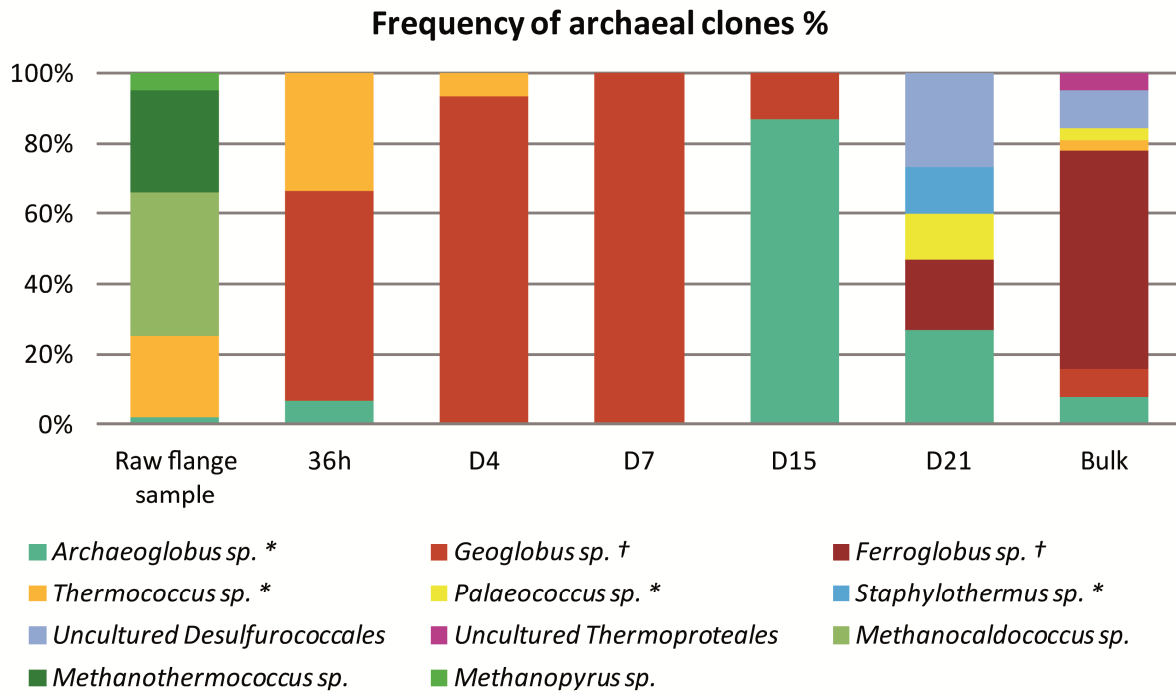


**Figure 5: A)** Phylogenetic tree of Proteobacteria based on 16S rRNA gene sequences obtained from gene sequences after RNA reverse transcription obtained from the in-situ hydrothermal flange sample and during the enrichment culture.

**B)** Phylogenetic tree of Proteobacteria based on 16S rRNA gene sequences obtained from gene sequences after RNA reverse transcription obtained from the in-situ hydrothermal flange sample and during the enrichment culture. CFB phylum is used as outgroup.

The trees were constructed using neighbor-joining algorithm with 1000 bootstraps. Bootstraps above 50% are reported





**Figure 6:** Repartition of active microbial community based on the frequency of archaeal or bacterial 16S rRNA gene in clone libraries at different time of the enrichment culture.

290 "Raw flange sample" corresponds to the the in-situ sample before culture.

"Bulk" correspond to the solid fraction remaining at the end of the culture time (i.e. ex-situ)

$\epsilon$  correspond to microbial group, species or sequences belonging to the Epsilonproteobacteria

$\delta$  correspond to microbial group, species or sequences belonging to the Deltaproteobacteria

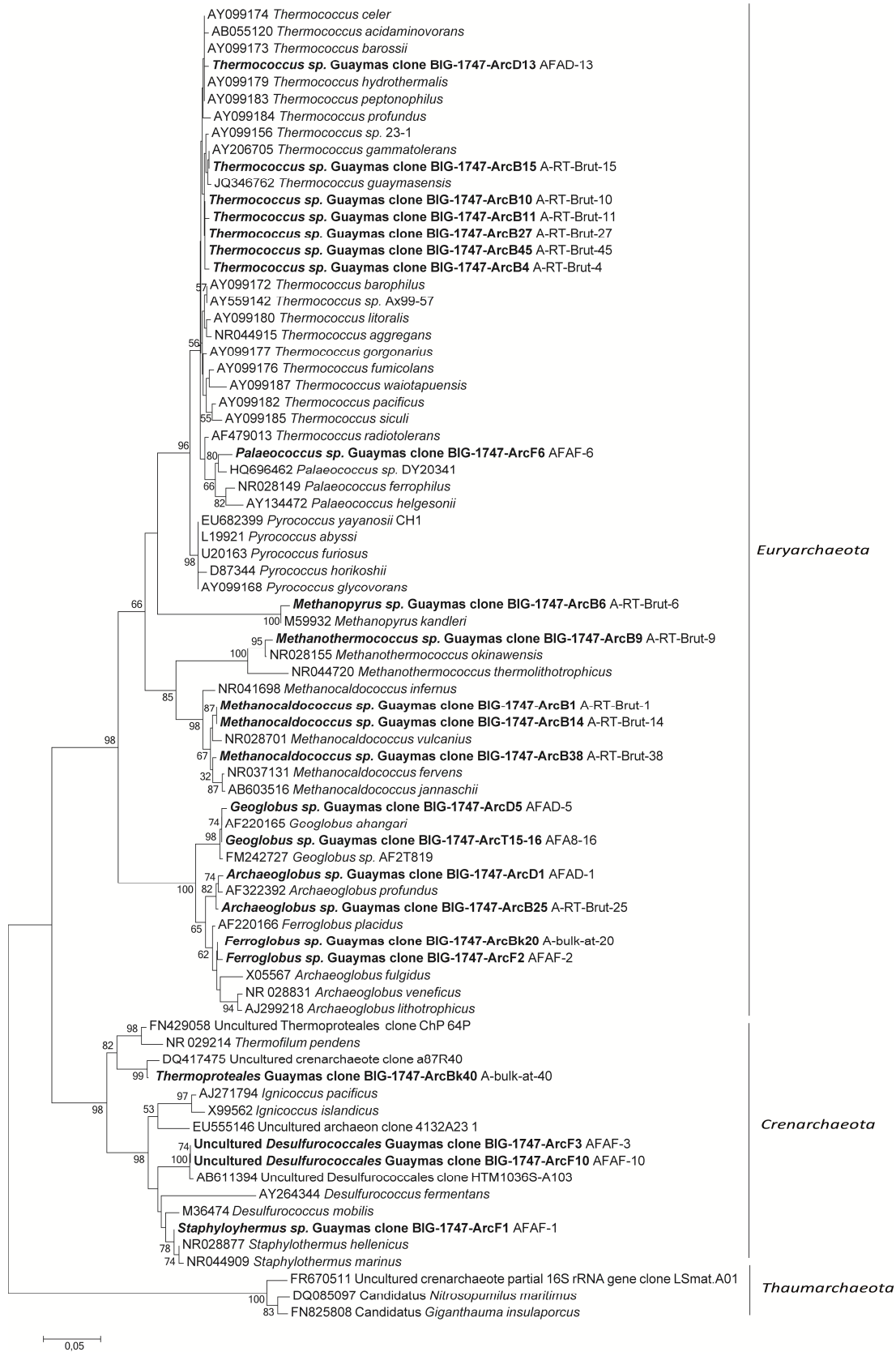
$\beta$  correspond to microbial group, species or sequences belonging to the Betaproteobacteria

295  $\gamma$  correspond to microbial group, species or sequences belonging to the Gammaproteobacteria

T correspond to microbial species or sequences belonging to the Thermotogales

\* correspond to microbial group or species involved in the sulfur cycle

† correspond to microbial group or species involved in the iron cycle



300

**Figure 7:** Phylogenetic relationships of Archaea based on 16S rRNA gene sequences after RNA reverse transcription obtained from the in-situ hydrothermal flange sample and during the enrichment culture, determined by neighbour-joining analysis. Bootstrap values above 50% based on 1000 replicates are displayed. Thaumarchaeota are used as outgroup.

305

For the duration of the bioreactor enrichment, low (i.e. below  $10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>) and variable cell densities were observed in the liquid fraction.

At 36 h, the active archaeal community consisted of members of the genera *Archaeoglobus*, *Geoglobus* and *Thermococcus*. Bacterial phylotypes were closely affiliated with the genera *Marinobacterium*, *Idiomonas* and to the *Epsilonproteobacteria*.

Archaeal sequences recovered from the enrichment until day 6 were related to the genera *Geoglobus* and *Thermococcus sp.*; the bacterial sequences were close to the genera *Sulfurimonas*. After the pH decreases to 3.8, only *Geoglobus sp.* sequences were detected and the bacterial sequences were affiliated to *Sulfurimonas sp.*, and to *Betaproteobacteria*.

At 15 days when pH stabilized again at 6.8, archaeal sequences affiliated to genera *Archeoglobus* and *Geoglobus* were detected; and bacterial phylotypes were affiliated with the genera *Sulfurimonas* and *Sulfurispirillum*.

At the end of the culture (21 days of culture), *Archeoglobus sp.*, *Staphylothermus sp.*, *Ferroglobus sp.*, *Desulfurococcales* and *Palaeococcus sp.*, archaeal sequences were detected and, within Bacteria the phylotypes were affiliated with the genera *Sulfurimonas*, *Parvibaculum* and *Microbacterium* (Figures 5 and 9). The active archaeal sequences retrieved in the solid fraction remaining at the end of the culture were in majority related to the genus *Ferroglobus*, and some closely affiliated to *Archeoglobus sp.*, *Geoglobus sp.*, *Thermococcus sp.*, *Palaeococcus sp.*, and to the *Thermoprotei* (Figures 4 and 5). The bacterial sequences were in majority related to the genus *Thermotoga* (99% of similarity with *Thermotoga maritima*). Also, some sequences affiliated to *Firmicutes* and to *Proteobacteria* were detected (Figures 3 and 5).

## 4. Discussion

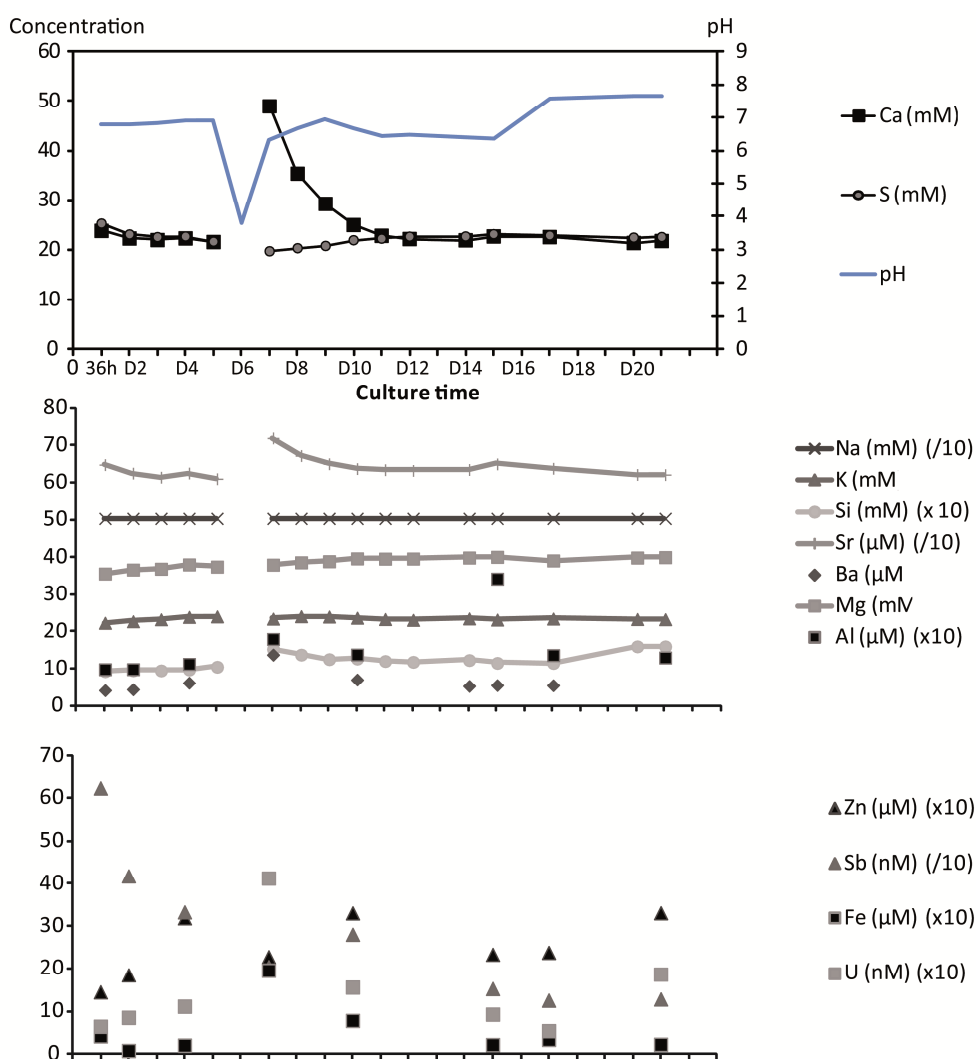
### 4.1. Geochemical evolution of the medium

Changes in the medium chemistry may have resulted from (1) evaporation and dilution process within the bioreactor; (2) change of primary composition of the fresh medium; (3) change of parameters, such as temperature or pH; (4) mineral dissolution or precipitation and (5) microbial activity. Dissolved sulfide concentration in the medium was affected by loss by gas purging due to vigorous and continuous sweeping with gas mixture (N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 75:20:5) but could also have precipitated with ferrous iron. During the first 36 hours of the culture in batch mode, and despite the presence of a condenser, significant evaporation, due to elevated temperature (85°C) and gas purging, and lack of medium replenishment, impacted elemental and organic compound concentrations (Table 3). Then during the continuous culture stage, the evaporation was attenuated by the input of fresh medium at a rate of about 400 mL day<sup>-1</sup>. The issue of medium evaporation and

dilution was considered by correcting all elemental concentrations by normalization to the same Na concentrations taken at Na=470 mM (concentration measured in the Rebecca's Roost hydrothermal fluid). Since Na is generally conservative during mixing and evaporation, this approach allows discussing Na-normalized values of other elements as resulting solely from mineral-fluid interactions.

345 Time-series concentrations reported in Figure 8 are therefore all corrected in this manner.

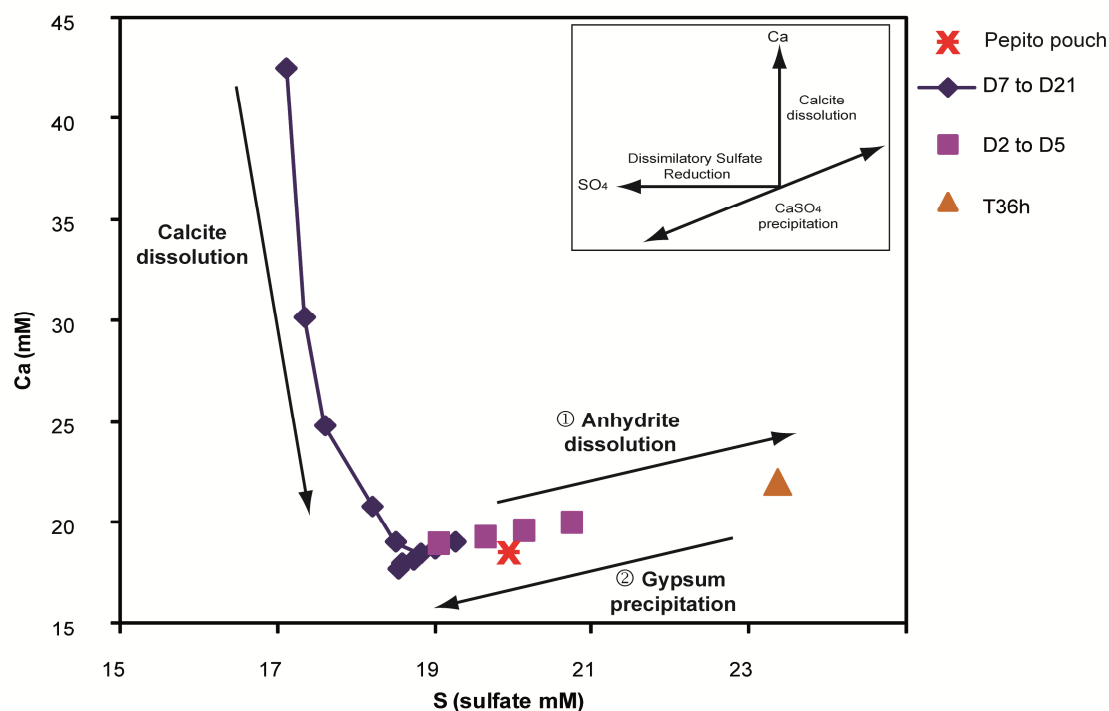
The medium composition was negligibly affected by the chemical composition of each three pouch and was related to the respective proportion of the end-member hydrothermal fluid and seawater (Table 2). Also, during the experiment, the medium interacts with the mineral substrate used as inoculum. These fluid / mineral interactions may have induced mineral dissolution and/or  
 350 precipitation due to a combination of parameters, such as changes in chemical species reactivity, temperature, pH and biological activity.



355 **Figure 8:** Time series of calcium (Ca), sulfur (S), potassium (K), magnesium (Mg), silica (Si), barium (Ba), strontium (Sr), aluminum (Al), iron (Fe), zinc (Zn), antimony (Sb) and uranium (U) concentrations and pH during the enrichment culture. Note that Si, Zn, Fe are multiplied by 10 and Na, Sr and Sb are multiplied by 0.1 for scaling purposes.

At 36h, Ca, Mg and Sr, follow the same trend: their concentrations decrease due to medium dilution rate which corresponds to a renewal of half volume of the culture per day (Figure 8). In contrast, Ba concentration increases during the first days of the culture, due to barite dissolution at 85°C (data not shown on Figure 8). Consecutive to medium acidification at D7, Ca and Sr increase, due to the rapid dissolution of calcite (Figure 8). After D7, when medium returns back to circum-neutral pH, the alkaline earth metals concentrations decrease due to the addition of fresh medium but also due to mineral precipitation. Precipitation process is particularly visible for Ca (and Sr) which had reacted with dissolved CO<sub>2</sub> and form carbonate phases (Figure 12).

Sulfide minerals, in particular monosulfides such as pyrrhotite, galena, and sphalerite are also prone to dissolution at low pH. Due to the low abundances of sulfide minerals in the original flange sample selected (Table 1), only Fe shows significant increase upon medium acidification (Figure 8). Mn shows a marked increase at D7 which suggest dissolution of Mn-rich phases at low pH. Because Mn-oxhydroxide phases were not observed during mineralogy studies, and rarely formed within active hydrothermal chimneys due to the very slow kinetic of Mn oxidation in vent environments, we propose that Mn sources reside rather in carbonates. In the initial pouch samples, sulfate concentrations were around 20 mM. At 36h, in the medium sulfate concentration was measured at 23 mM due to anhydrite dissolution at 85°C (trend 1 in Figure 9). After D7, sulfate concentration decreased due to its co-precipitation with Ca which increased two-fold because of the calcite dissolution. Precipitated sulfide minerals may have included gypsum (trend 2 in Figure 9). Note that gypsum has not been determined by XRD after the experiment, most likely because it dissolved during cleaning of the sample for XRD analysis to remove sea-salt.



380

**Figure 9:** Calcium versus Sulfur (Sulfate) behavior during the whole experiment time. The trend 1 (①) corresponds to the anhydrite dissolution during the first 36h of batch mode; the trend 2 (②) corresponds to the gypsum precipitation during the culture performed in continuous mode. Note that the data are corrected for evaporation effects after normalizing to Na at 470 mM.

385

The acetate concentration in the 3 pouches ranged from 3.8 to 5.3  $\mu\text{M}$ ; while during the first batch period, higher acetate concentration (288  $\mu\text{M}$ ) was measured in the bioreactor. This higher value was due to the release of organic compounds from chimney sample and from the thin microbial biofilm which covered this chimney which are not able to survive at this temperature (85°C) and whose their cell lyses yield organic compounds as acetate in the medium. After D10, acetate concentration was lower than its pouch concentration (eg 5.2  $\mu\text{M}$  in pouch 2 and 5.3  $\mu\text{M}$  in Pepito pouch 3). This suggests that acetate was actively used by microorganisms as energy source (Tor *et al*, 2001, Kashefi *et al*, 2002b, Slobodkina *et al*, 2009b) or as carbon source (Burggraf *et al*, 1990). Formate concentration in the medium is always lower than those measured in the pouches and remain close to the detection limit throughout the culture. This suggests that formate is also used by microorganisms as electron donor (Kashefi *et al*, 2002b, Slobodkina *et al*, 2009b) or as carbon source (Kim *et al*, 2010, Lim *et al*, 2012).

390

395

#### 4.2. Insight into sulfur biogeochemical cycle in chimneys

Active Sulfur ( $\text{S}^0$ ) reduction is suggested from the occurrence of *Epsilonproteobacteria* and *Thermococcales* that were retrieved in all liquid fractions (Finster *et al*, 1997, Nakagawa and Takaki, 2001, Jensen and Finster, 2005, Campbell *et al*, 2006, Yamamoto and Takai, 2011) (Godfroy *et al*,

400

1997, González *et al*, 1999, Bertoldo and Antranikian, 2006, Teske *et al*, 2009). Potential sources of S<sup>0</sup> in the medium include (Figure 10) (i) elemental sulfur present in the original sample (but below  
405 detection limit of XRD) which generally formed from pyrrhotite in chimney exposed to seawater; (ii) anaerobic microbial sulfide (H<sub>2</sub>S, FeS) oxidation (Jost *et al*, 2010). Bacterial phylotypes affiliated to the genera *Thermotoga* were found only at the end of the culture and in the solid fraction. *Thermotoga* are fermentative species that can also reduce elemental sulfur (Huber *et al*, 1986, Jannasch *et al*, 1988) or mediate iron reduction (see below) (Figure 10). Phylotypes affiliated to the  
410 genera *Archaeoglobus* (98% of similarity with *A. profundus*) were retrieved at the beginning (T36) and at the end (D15 and D21) of the culture and in the solid remaining fraction. *Archaeoglobus profundus* is a hyperthermophilic anaerobic Archaea able to reduce sulfate (Burggraf *et al*, 1990). The occurrence of *Archaeoglobus*-related species highly suggests that sulfate-reduction took place in our culture. Sulfate concentration fluctuated over the culture time between a maximum of 36 mM at  
415 36h and a minimum of 15 mM at D8 (Table 2). After evaporation and fluid dilution correction, sulfate concentrations range from 17 mM to 23 mM mainly due to anhydrite and gypsum precipitation (Figure 10). This shows that neither sulfur-oxidation (performed here by *Sulfurimonas* species) nor sulfate-reduction (performed here by *Archaeoglobus*) had a significant effect on sulfate concentration in the medium, mainly due the fast rate of medium renewal and low rate of microbial  
420 processes, even if hydrogen (continuously provided by gas mixture sweeping) and organic matter (from the chimney substrate) are added in the medium.

*Sulfurimonas* species were detected in the culture after the end of batch mode (D4). They are sulfur-oxidizers using elemental sulfur or sulfide as electron donors and nitrate or oxygen as electron acceptors (Inagaki *et al*, 2003, Takai *et al*, 2006). In our conditions their growth could have occurred  
425 by anaerobic sulfur oxidation with nitrate.

The presence of sulfur compounds as sulfur, sulfate, organic-sulfur-compounds or dissolved hydrogen sulfide and the availability in hydrogen, nitrate, CO<sub>2</sub> and organic carbon, allow establishing convenient conditions for the growth of the sulfur metabolizing species detected in the culture (Figure 10).

430 The simultaneous presence of sulfur and sulfate-reducers as well as sulfur-oxidizers members in our enrichment culture evidenced, for the first time that complete sulfur cycle can occur in anaerobiosis (Figure 10). A previous culture targeting nitrate-reducer have already suggested the simultaneous presence of both sulfur oxidation and reduction (Houghton *et al*, 2007).

435

### 4.3. The role of iron species in controlling microbial diversity

#### 440 4.3.1.Suspended aqueous medium

During the entire culture time, bacterial phylotype closely affiliated to *Geoglobus* species were found. To date, only two *Geoglobus* species were isolated from hydrothermal vents, they are *G. ahangari* (Kashefi *et al*, 2002b) and *G. acetivorans* (Slobodkina *et al*, 2009b). hyperthermophilic anaerobes able to growth on poorly crystalline ferric iron (Fe (III)) as sole electron acceptor through dissimilatory  
445 iron-reduction (DIR). Both strains are facultative chemolithoautotrophs also able to grow chemoorganotrophically on organic compounds. The active hydrothermal flange, used as inoculum, contained significant amount of iron oxide minerals such as ferrihydrite and Fe(III)-rich clay such as nontronite (Table 1). X-Ray mineralogical analysis after the culture showed a complete loss of nontronite while ferrihydrite was not detected either before or after incubation. Ferrihydrite  
450 resulting from alteration of primary sulfide mineral, is however observed petrographically on the outer wall of hydrothermal chimney. This suggests that these minerals may have been available and used for DIR (Figure 10).

The intake of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>, and the availability of acetate and other organic compounds such as formate in the medium, had offered convenient conditions for active DIR for the growth of  
455 *Geoglobus* species (Figure 10).

It is important to note that, despite the presence of dissimilatory iron-reducers and abundances of sulfide minerals, Fe(II) concentrations remain low (< 0.8 µM) during the entire culture time, and they were lower than in the hydrothermal fluid (Table 2). Presumably, this low concentrations were due to the relative low rate of dissimilatory iron-reduction compared to Fe(II) precipitation with H<sub>2</sub>S in  
460 the medium to form FeS precipitate (Vazquez G *et al*, 1989, Rickard, 1995) (Figure 12). It is also possible that a fraction of Fe(II) had been adsorbed or precipitated onto Fe(III) oxide or cells (Urrutia *et al*, 1998, Roden and Urrutia, 2002) (Figure 10).

The absence of *Geoglobus* species at the end of the culture in the suspended fraction could be explained by a lower availability of insoluble Fe(III) mineral (i.e. complete depletion) or chemical  
465 inhibition of iron-reduction. In the later case, dissimilatory iron reduction may have been inhibited by hydrogen sulfide which can reduce abiotically suspended Fe (III) oxide into Fe(II) (Coleman *et al*, 1993, Yao and Millero, 1996, Poulton *et al*, 2002, Weber *et al*, 2006) (Figure 10). Hence, it is only at the beginning of the experiment that Fe(III) reducers may have out-competed sulfate reducers due to higher availability of Fe(III) substrates.

470 Bacterial phylotypes closely affiliated with the genera *Ferroglobus* (from 96 to 97 % of similarity with *F. placidus*) were detected at the end of the culture (sample D21). *Ferroglobus placidus* was first described as hyperthermophilic, strictly lithotrophic anaerobe, oxidizing ferrous iron at neutral pH, in



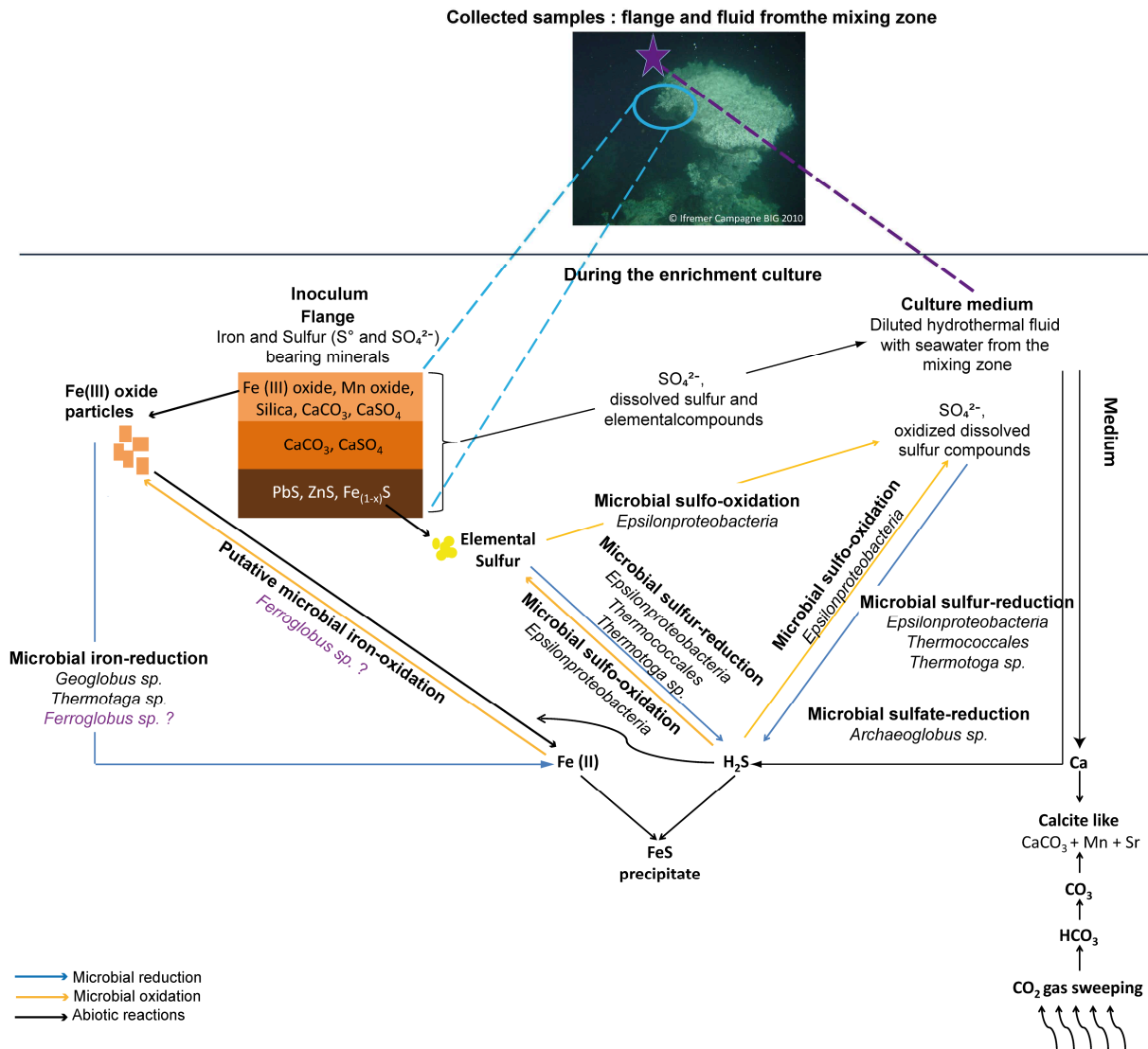
the presence of sulfide or H<sub>2</sub> with nitrate as electron acceptor (Hafenbradl *et al*, 1996). However, *F. placidus* harbor a versatile metabolism, as it is also able to mediate iron-reduction in the presence of acetate (Tor *et al*, 2001). The availability of H<sub>2</sub>, nitrate, organic matter and Fe species, built suitable conditions for the growth of *Ferroglobus sp.* in both iron-oxidation or iron-reduction modes (Figure 12).

#### 4.3.2. Hydrothermal chimney substrate at the end of the culture

480 The mineral fraction remaining at the end of the culture at the bottom of the bioreactor was collected, and sequences affiliated to *Geoglobus* species were found. Those results are interesting since *Geoglobus* species were not retrieved in the suspended fraction at the same sampling time (Figure 5). This could be due to a more available Fe(III) oxide pool in the flange sample enabling growth of *Geoglobus* species only in close association with mineral substrate.

485 Sequences close to *Ferroglobus sp.* and to *Thermotoga sp.* were also retrieved (Figures 6 and 7). *Thermotoga sp.* are, initially described as fermentative, sulfur-reducers (Huber *et al*, 1986), are also able to use Fe (III) as electron acceptor with H<sub>2</sub> as electron donor and organic compounds as carbon sources (Vargas *et al*, 1998). The intake of H<sub>2</sub> and the availability of nitrate, organic compounds and Fe (III) oxides, gave suitable conditions for *Ferroglobus sp.* and *Thermotoga sp.* growth.

490 Thus the bacterial phylotypes, affiliated to the genera *Ferroglobus*, and retrieved in the solid fraction are hypothesized to mediate dissimilatory iron-reduction that require contact with the Fe(III) oxides particles, as well as the *Geoglobus* species found in this mineral fraction, while the other *Ferroglobus* member found in the suspended culture could have rather mediated iron-oxidation (Figure 10). In addition, this culture confirms the presence of member of the *Ferroglobus* genus in deep-sea hydrothermal ecosystem (Reysenbach *et al*, 2000) and it is the first report of cultivation of member  
495 of this genus from deep-sea hydrothermal vent sample.



**Figure 10:** Schematic diagram showing the geochemical and microbiological processes related to coupled iron and sulfur cycles in the enrichment culture. See text for discussion.

500

## 5. Conclusion

Previous continuous enrichment cultures performed in bioreactors using a fragment of hydrothermal chimney as inoculum and synthetic medium containing more or less organic matter, have validated the use of this culture method to access to the microbial diversity, its dynamics and to the interactions between microorganisms (Postec *et al*, 2005b, Postec *et al*, 2007, Byrne *et al*, 2009a). The novelty of this study lies in 1) the use of diluted hydrothermal fluid and mineral substrate (i.e. flange fragment) such as culture medium, 2) the analysis, during the culture, the chemical composition of culture medium and the active microbial communities (cDNA) and 3) the analysis of the mineral fraction before and after culture. These analyzes allow us 1) to propose a scheme that summarizes the interactions between the microorganisms and their medium (hydrothermal fluid and chimney substrate), which took place in the bioreactor (Figure 12) and 2) to increase our understanding the activity of microbial community in hydrothermal chimney.

510

515 This enrichment culture in bioreactor using diluted hydrothermal fluid as medium allowed to study  
microbe-mineral interactions in the environment of deep-sea hydrothermal vent chimneys and to  
follow dynamic of microbial community over time, with changing culture conditions. The availability  
of substrates (electron donors and acceptors as well as carbon sources) fueling microbial growth  
appeared to be highly dependent on the interaction that occurred between the mineral fractions, the  
fluid, and culture conditions (gas sweeping, temperature, pH). We have showed that both  
520 precipitation and dissolution processes occurred into the bioreactor (i.e. calcite formation, loss of  
nontronite, variation in iron species concentrations etc.) On the other hand the growth of  
microorganisms involved in sulfur and iron metabolism had themselves modified these  
precipitation/dissolution processes playing on oxidation state of elements. Our study also reports  
the first evidence for the cultivation of thermophilic *Ferroglobus* and not only as iron reducer but  
525 possibly as iron oxidizer. All together the results demonstrate the links between sulfur and iron cycles  
and physiological and phylogenetical diversity in hydrothermal chimney environments.

Our study points that mineralogy, hydrothermal fluid composition and mixing degree with seawater,  
temperature and organic compounds availability drive the structure of microbial community in our  
culture as this may occur *in situ* within hydrothermal chimneys micro-habitats. Ultimately, this  
530 experimental approach permits to tune varying different parameters in order to evaluate their  
influences on the structure and activity of microbial communities. This uniquely illustrates how  
changing conditions at the seafloor may affect *in situ* microbial communities.

### **Acknowledgements**

535 We want to thank all the shipboard cruise party for their work and support during the BIG cruise:  
officers, crew and technicians of the *R/V L'Atalante*, the DSV *Nautile* team and the on-board scientific  
team. This cruise was funded by IFREMER (France) and has benefited from a work permit in Mexican  
waters (DAPA/2/281009/3803, October 28th, 2009).

We are grateful to Carole Decker and Jean-Claude Caprais for their assistance with hydrogen sulfide  
540 measurement. Yoan Germain is thanked for clean laboratory assistance. Karine Estève was thanking  
for its contribution during the cruise. Members of the LMEE, the PSO or the GM laboratory are  
thanked for their helpful comments, their suggestions and their advices. This work was supported by  
Ifremer, the GIS Europôle Mer, UEB, CNRS, and has benefited from state aid managed by the Agence  
Nationale de la Recherche under the program "Investments for the Future" with the reference ANR-  
545 10-LabX-19-01.

## References

- 550 Alain K, Postec A, Grinsard E, Lesongeur F, Prieur D, Godfroy A (2010). *Thermodesulfatator atlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 33-38.
- 555 Antoine E, Guezennec J, Meunier JR, Lesongeur F, Barbier G (1995). Isolation and characterization of extremely thermophilic archaeobacteria related to the genus *Thermococcus* from deep-sea hydrothermal Guaymas basin. *Current Microbiology* 31: 186-192.
- 560 Bazylinski DA, Wirsén CO, Jannasch HW (1989). Microbial utilization of naturally occurring hydrocarbons at the Guaymas basin hydrothermal vent site. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2832-2836.
- Bertoldo C, Antranikian G (2006). The Order Thermococcales. *The Prokaryotes*. pp 69-81.
- 565 Burggraf S, Jannasch HW, Nicolaus B, Stetter KO (1990). *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 13: 24-28.
- 570 Byrne JV, Emery KO (1960). Sediments of the Gulf of California. *Geological Society of America Bulletin* 71: 983-1010.
- 575 Byrne N, Lesongeur F, Bienvenu N, Geslin C, Alain K, Prieur D *et al* (2009a). Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor. *Extremophiles*. Springer Japan. pp 595-608.
- Byrne N, Strous M, Crépeau V, Kartal B, Jean-Louis B, Schmid MC *et al* (2009b). Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *ISME Journal*: 1-7.
- 580 Campbell BJ, Engel AS, Porter ML, Takai K (2006). The versatile e-proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology* 4: 458-468.
- Coleman ML, Hedrick DB, Lovley DR, White DC, Pye K (1993). Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature* 361: 436-438.
- 585 De la Lanza-Espino G, Soto LA (1999). Sedimentary geochemistry of hydrothermal vents in Guaymas Basin, Gulf of California, Mexico. *Applied Geochemistry* 14: 499-510.
- 590 Dean W, Pride C, Thunell R (2004). Geochemical cycles in sediments deposited on the slopes of the Guaymas and Carmen Basins of the Gulf of California over the last 180 years. *Quaternary Science Reviews* 23: 1817-1833.
- Ehrlich HL (1999). Microbes as Geologic Agents: Their Role in Mineral Formation. *Geomicrobiology Journal* 16: 135-153.
- 595 Emerson D, Rentz JA, Lilburn TG, Davis RE, Aldrich H, Chan C *et al* (2007). A Novel Lineage of Proteobacteria Involved in Formation of Marine Fe-Oxidizing Microbial Mat Communities. *PLoS ONE* 2: e667.

- 600 Emerson D, Fleming EJ, McBeth JM (2010). Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annual Review of Microbiology* 64: 561-583.
- Finster K, Liesack W, Tindall BJ (1997). *Sulfurospirillum arcachonense* sp. nov., a New Microaerophilic Sulfur-Reducing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 1212-1217.
- 605 Flores GE, Campbell JH, Kirshtein JD, Meneghin J, Podar M, Steinberg JI *et al* (2011). Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* 13: 2158-2171.
- 610 Godfroy A, Lesongeur F, Raguénès G, Quérellou J, Antoine E, Meunier J-R *et al* (1997). *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 622-626.
- Godfroy A, Postec A, Raven N (2006). Growth of hyperthermophilic microorganisms for physiological and nutritional studies. In: Rainey FA, Oren A (eds). *Methods in Microbiology, Extremophiles*. Academic Press.: Oxford, England.
- 615 González JM, Sheckells D, Viebahn M, Krupatkina D, Borges KM, Robb FT (1999). *Thermococcus waiotapuensis* sp. nov., an extremely thermophilic archaeon isolated from a freshwater hot spring. *Archives of Microbiology* 172: 95-101.
- 620 Hafenbradl D, Keller M, Dirmeier R, Rachel R, Rossnagel P, Burggraf S *et al* (1996). *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe<sup>2+</sup> at neutral pH under anoxic conditions. *Archives of Microbiology* 166: 308-314.
- 625 Holden JF, Adams MWW (2003). Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. *Current Opinion in Chemical Biology* 7: 160-165.
- Houghton J, Seyfried W, Banta A, Reysenbach A (2007). Continuous enrichment culturing of thermophiles under sulfate and nitrate-reducing conditions and at deep-sea hydrostatic pressures. *Extremophiles* 11: 371-382.
- 630 Houghton JL, Seyfried Jr WE (2010). An experimental and theoretical approach to determining linkages between geochemical variability and microbial biodiversity in seafloor hydrothermal chimneys. *Geobiology* 8: 457-470.
- 635 Huber R, Langworthy TA, König H, Thomm M, Woese CR, Sleytr VB *et al* (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Archives of Microbiology* 144: 324-333.
- 640 Inagaki F, Takai K, Kobayashi H, Nealson KH, Horikoshi K (2003). *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing e-proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1801-1805.
- 645 Jannasch HW, Huber R, Belkin S, Stetter KO (1988). *Thermotoga neapolitana* sp. nov. of the extremely thermophilic eubacterial genus *Thermotoga*. *Archives of Microbiology* 150: 103-104.
- Jannasch HW, Nelson DC, Wirsén CO (1989). Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa*) at hydrothermal vent site. *Nature* 342: 834-836.
- 650

- 655 Jeanthon C, L'Haridon S, Cueff V, Banta A, Reysenbach AL, Prieur D (2002). *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 765-772.
- 660 Jensen A, Finster K (2005). Isolation and characterization of *Sulfurospirillum carboxydovorans* sp. nov., a new microaerophilic carbon monoxide oxidizing epsilon Proteobacterium. *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 339-353.
- Jorgensen BB, Zawacki LX, Jannasch HW (1990). Thermophilic bacterial sulfate reduction in deep-sea sediments at the Guaymas Basin hydrothermal vent site (Gulf of California). *Deep-Sea Research* 37: 695-710.
- 665 Jost G, Martens-Habbenha W, Pollehne F, Schnetger B, Labrenz M (2010). Anaerobic sulfur oxidation in the absence of nitrate dominates microbial chemoautotrophy beneath the pelagic chemocline of the eastern Gotland Basin, Baltic Sea. *FEMS Microbiology Ecology* 71: 226-236.
- 670 Karl DM, Taylor GT, Novitsky JA, Jannasch HW, Wirsén CO, Pace NR *et al* (1988). A microbiological study of Guaymas basin high temperature hydrothermal vents. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers* 35: 777-791.
- Karl DM (1995). Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial communities. In: Karl DM (ed). *The microbiology of deep-sea hydrothermal vents*. CRC Press. pp 35-124.
- 675 Kashefi K, Holmes DE, Reysenbach AL, Lovley DR (2002a). Use of Fe(III) as an electron acceptor to recover previously uncultured hyperthermophiles: Isolation and characterization of *Geothermobacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1735-1742.
- 680 Kashefi K, Tor JM, Holmes DE, Gaw Van Praagh CV, Reysenbach AL, Lovley DR (2002b). *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 719-728.
- 685 Kashefi K, Holmes DE, Baross JA, Lovley DR (2003). Thermophily in the Geobacteraceae: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Member of the Geobacteraceae from the "Bag City" Hydrothermal Vent. *Appl Environ Microbiol* 69: 2985-2993.
- 690 Kato S, Kobayashi C, Kakegawa T, Yamagishi A (2009). Microbial communities in iron-silica-rich microbial mats at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Environmental Microbiology* 11: 2094-2111.
- 695 Kato S, Nakamura K, Toki T, Ishibashi J-i, Tsunogai U, Hirota A *et al* (2012). Iron-based microbial ecosystem on and below the seafloor: a case study of hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Kerr RC (1997). Heat transfer and hydrothermal fluid flow at flanges on large seafloor sulphide structures. *Earth and Planetary Science Letters* 152: 93-99.
- 700 Kim YJ, Lee HS, Kim ES, Bae SS, Lim JK, Matsumi R *et al* (2010). Formate-driven growth coupled with H<sub>2</sub> production. *Nature* 467: 352-355.

- 705 Lim JK, Bae SS, Kim TW, Lee J-H, Lee HS, Kang SG (2012). Thermodynamics of Formate-Oxidizing Metabolism and Implications for H<sub>2</sub> Production. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 7393-7397.
- 710 Lonsdale P, Lawver LA (1980). Immature plate boundary zones studied with a submersible in the Gulf of California. *Geological Society of America Bulletin* 91: 555-569.
- Lonsdale P, Becker K (1985). Hydrothermal plumes, hot springs, and conductive heat flow in the Southern Trough of Guaymas Basin. *Earth and Planetary Science Letters* 73: 211-225.
- 715 Martens CS (1990). Generation of short chain acid anions in hydrothermally altered sediments of the Guaymas Basin, Gulf of California. *Applied Geochemistry* 5: 71-76.
- McHatton SC, Barry JP, Jannasch HW, Nelson DC (1996). High Nitrate Concentrations in Vacuolate, Autotrophic Marine *Beggiatoa* spp. *Applied in Environmental Microbiology* 62: 954-958.
- 720 Miroshnichenko ML, Slobodkin AI, Kostrikina NA, L'Haridon S, Nercessian O, Spring S *et al* (2003). *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1637-1641.
- 725 Mori K, Maruyama A, Urabe T, Suzuki K-i, Hanada S (2008). *Archaeoglobus infectus* sp. nov., a novel thermophilic, chemolithoheterotrophic archaeon isolated from a deep-sea rock collected at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, western Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 810-816.
- 730 Moussard H, L'Haridon S, Tindall BJ, Banta A, Schumann P, Stackebrandt E *et al* (2004). *Thermodesulfatator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 227-233.
- 735 Nakagawa S, Takaki Y (2001). Nonpathogenic Epsilonproteobacteria. *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Nakagawa S, Takai K, Inagaki F, Hirayama H, Nunoura T, Horikoshi K *et al* (2005). Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-Proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. *Environmental Microbiology* 7: 1619-1632.
- 740 Nakagawa T, Takai K, Suzuki Y, Hirayama H, Konno U, Tsunogai U *et al* (2006). Geomicrobiological exploration and characterization of a novel deep-sea hydrothermal system at the TOTO caldera in the Mariana Volcanic Arc. *Environmental Microbiology* 8: 37-49.
- 745 Nelson DC, Wirsén CO, Jannasch HW (1989). Characterization of large, autotrophic *Beggiatoa* sp. abundant at hydrothermal vent of Guaymas basin. *Appl Environ Microbiol* 55: 2909-2917.
- 750 Nunoura T, Oida H, Nakaseama M, Kosaka A, Ohkubo SB, Kikuchi T *et al* (2010). Archaeal Diversity and Distribution along Thermal and Geochemical Gradients in Hydrothermal Sediments at the Yonaguni Knoll IV Hydrothermal Field in the Southern Okinawa Trough. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 1198-1211.
- Otero XL, Huerta-Diaz MA, Macias F (2003). Influence of a turbidite deposit on the extent of pyritization of iron, manganese and trace metals in sediments from the Guaymas Basin, Gulf of California (Mexico). *Applied Geochemistry* 18: 1149-1163.

- 755 Page A, Tivey MK, Stakes DS, Reysenbach A-L (2008). Temporal and spatial archaeal colonization of hydrothermal vent deposits. *Environmental Microbiology* 10: 874-884.
- 760 Peter JM, Scott SD (1988). Mineralogy, composition, and fluid inclusion microthermometry of sea-floor hydrothermal deposits in the southern trough of Guaymas Basin, Gulf of California. *The Canadian Mineralogist* 26: 567-587.
- 765 Postec A, Urios L, Lesongeur F, Ollivier B, Quérellou J, Godfroy A (2005a). Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting the deep-sea hydrothermal ecosystems. *Current Microbiology* 50: 138-144.
- 770 Postec A, Urios L, Lesongeur Fo, Ollivier B, Querellou JI, Godfroy A (2005b). Continuous Enrichment Culture and Molecular Monitoring to Investigate the Microbial Diversity of Thermophiles Inhabiting Deep-Sea Hydrothermal Ecosystems. *Current Microbiology*. Springer New York. pp 138-144.
- 775 Postec A, Lesongeur F, Pignet P, Ollivier B, Quérellou J, Godfroy A (2007). Continuous enrichment cultures: insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent chimneys. *Extremophiles* 11: 747-757.
- 780 Poulton SW, Krom MD, Rijn JV, Raiswell R (2002). The use of hydrous iron (III) oxides for the removal of hydrogen sulphide in aqueous systems. *Water Research* 36: 825-834.
- 785 Raven N, Ladwa N, Cossar D, Sharp R (1992). Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 263-267.
- 790 Reysenbach A-L, Cady SL (2001). Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. *Trends in Microbiology* 9: 79-86.
- 795 Reysenbach AL, Longnecker K, Kirshtein J (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3798-3806.
- 800 Rickard D (1995). Kinetics of FeS precipitation: Part 1. Competing reaction mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59: 4367-4379.
- 805 Roden EE, Urrutia MM (2002). Influence of Biogenic Fe(II) on Bacterial Crystalline Fe(III) Oxide Reduction. *Geomicrobiology Journal* 19: 209-251.
- 810 Sarrazin J, Sarradin P-M, participants atMc (2006). MoMARETO: a cruise dedicated to the spatio-temporal dynamics and the adaptations of hydrothermal vent fauna on the Mid-Atlantic Ridge. *InterRidge News* 15: 24-33.
- 815 Schrader H (1982). Diatom biostratigraphy and laminated diatomaceous sediments from the Gulf of California. In J R Curray (ed), Initial reports of the Deep Sea Drilling Project, Leg 64 US Government Printing Office, Washington, DC: p. 973-981.
- 820 Schrenk MO, Kelley DS, Delaney JR, Baross JA (2003). Incidence and Diversity of Microorganisms within the Walls of an Active Deep-Sea Sulfide Chimney. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3580-3592.
- 825



- Simoneit BRT, Mazurek MA, Brenner S, Crisp PT, Kaplan IR (1979). Organic geochemistry of recent sediments from Guaymas Basin, Gulf of California. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers* 26: 879-891.
- 810 Simoneit BRT, Lonsdale PF (1982). Hydrothermal petroleum in mineralized mounds at the seabed of Guaymas Basin. *Nature* 295: 198-202.
- Slobodkin A, Campbell B, Cary SC, Bonch-Osmolovskaya EA, Jeanthon C (2001). Evidence for the presence of thermophilic Fe(III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13°N (East Pacific Rise). *FEMS Microbiology Ecology* 36: 235-243.
- 815 Slobodkina GB, Kolganova TV, Chernyh NA, Querellou J, Bonch-Osmolovskaya EA, Slobodkin AI (2009a). *Deferribacter autotrophicus* sp. nov., an iron(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 1508-1512.
- 820 Slobodkina GB, Kolganova TV, Querellou J, Bonch-Osmolovskaya EA, Slobodkin AI (2009b). *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2880-2883.
- 825 Takai K, Inagaki F, Nakagawa S, Hirayama H, Nunoura T, Sako Y *et al* (2003). Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated  $\epsilon$ -Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *FEMS Microbiology Letters* 218: 167-174.
- Takai K, Suzuki M, Nakagawa S, Miyazaki M, Suzuki Y, Inagaki F *et al* (2006). *Sulfurimonas paralvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1725-1733.
- 830 Takai K, Nunoura T, Ishibashi J-i, Lupton J, Suzuki R, Hamasaki H *et al* (2008). Variability in the microbial communities and hydrothermal fluid chemistry at the newly discovered Mariner hydrothermal field, southern Lau Basin. *Journal of Geophysical Research* 113: doi:10.1029/2007JG000521.
- 835 Teske A, Hinrichs K-U, Edgcomb V, de Vera Gomez A, Kysela D, Sylva SP *et al* (2002). Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1994-2007.
- 840 Teske A, Edgcomb V, Rivers A, Thompson J, de Vera Gomez A, Molyneaux S *et al* (2009). A molecular and physiological survey of a diverse collection of hydrothermal vent *Thermococcus* and *Pyrococcus* isolates. *Extremophiles* 13: 905-915.
- 845 Tivey MK, Delaney JR (1986). Growth of large sulfide structures on the endeavour segment of the Juan de Fuca ridge. *Earth and Planetary Science Letters* 77: 303-317.
- 850 Tivey MK, Stakes DS, Cook TL, Hannington MD, Petersen S (1999). A model for growth of steep-sided vent structures on the Endeavour Segment of the Juan de Fuca Ridge: Results of a petrologic and geochemical study. *Journal of Geophysical Research* 104: 22859-22883.
- 855 Tor JM, Kashefi K, Lovley DR (2001). Acetate oxidation coupled to Fe(III) reduction in hyperthermophilic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1363-1365.

- 860 Urrutia MM, Roden EE, Fredrickson JK, Zachara JM (1998). Microbial and surface chemistry controls on reduction of synthetic Fe(III) oxide minerals by the dissimilatory iron-reducing bacterium *Shewanella alga*. *Geomicrobiology Journal* 15: 269-291.
- Vargas M, Kashefi K, BluntHarris EL, Lovley DR (1998). Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature* 395: 65-67.
- 865 Vazquez G F, Zhang J, zhong, Millero FJ (1989). Effect of metals on the rate of the oxidation of H<sub>2</sub>S in seawater. *Geophysical Research Letters* 16: 1363-1366.
- Von Damm KL, Edmond JM, Grant B, Measures CI, Walden B, Weiss RF (1985a). Chemistry of submarine hydrothermal solutions at 21 °N, East Pacific Rise. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49: 2197-2220.
- 870 Von Damm KL, Edmond JM, Measures CI, Grant B (1985b). Chemistry of submarine hydrothermal solutions at Guaymas Basin, Gulf of California. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49: 2221-2237.
- 875 Weber KA, Achenbach LA, Coates JD (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology* 4: 752-764.
- Welhan JA (1988). Origins of methane in hydrothermal systems. *Chemical Geology* 71: 183-198.
- 880 Woods AW, Delaney JR (1992). The heat and fluid transfer associated with the flanges on hydrothermal venting structures. *Earth and Planetary Science Letters* 112: 117-129.
- Yamamoto M, Takai K (2011). Sulfur metabolisms in epsilon- and gamma-Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *Frontiers in Microbiology* 2.
- 885 Yao W, Millero FJ (1996). Oxidation of hydrogen sulfide by hydrous Fe(III) oxides in seawater. *Marine Chemistry* 52: 1-16.

890

895

900

## Supplementary Methods :

### 905 1. Culture conditions and bioreactor sampling

The pH was monitored with an analogic control system (Infors HT™ system), associated to a temperature controlled circulation bath associated to a PTFE-covered PT100 temperature probe (PT 100, Radley™, UK) and a gel pH electrode (Metler Toledo™). The pH regulation was mediated by addition of a 0.2 N HCl or 0.2 N NaOH solutions added *via* the regulation system pumps. During the 6  
910 first days of culture the pH was maintained at 6.8. Then, due to the pH probe failure at day 6, the pH decreased down to 3.8 during a few hours as a result of the uncontrolled addition of HCl from the automatic titrator. The pH was then allowed to return to 6.8 within 24h by the addition of fresh medium solution. During the last 5 days of culture time, the pH remained stable at 7.6. Consequently to the pH probe failure, the pH was measured every day with a portable pH meter (at room  
915 temperature). Fresh medium was continuously provided to the bioreactor with a dilution rate of 0.022 h<sup>-1</sup> using Masterflex™ peristaltic pump, corresponding to about 440 mL.day<sup>-1</sup>, which is about half of the culture per day. The effluent culture was recovered in sterile 1 L Nalgene bottle stored at 6°C.

Cell density was determined on-board by direct cell counting using a Thoma chamber (depth 0.02  
920 mm) viewed with an Olympus™ BX60 phase contrast microscope (X400). For DNA and RNA analysis, the entire volume of medium recovered over a 24h period was filtered through 0.22 µm (isopore™, Millipore) membrane filtered and filters were stored at -80°C until extraction.

For dissolved major and trace element analysis, 5 mL of culture samples were filtered through 0.45µm (Millex®, Millipore) membrane in LDPE acid-cleaned bottles and stored at -20°C. For  
925 hydrogen sulfide quantification, 10 mL of culture were filtered through 0.45µm (Millex®, Millipore) membrane, precipitated as ZnS in 25 mL evacuated septum vials containing 0.1g of zinc acetate (Sigma-Aldrich™) and stored at 4°C. For sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) analysis, 1 mL of filtered culture was acidified with 10 µl of 65% HNO<sub>3</sub> and stored at 4°C. Filtered samples for organic acid analysis (i.e. acetate, lactate, propionate and formate) were preserved at -20°C until analysis.

930 Concentration of sulfate and organic acids: acetate, lactate, propionate and formate, were quantified in the diluted culture samples by ion exchange chromatography as described by Lazar and colleagues (Lazar *et al*, 2011). Dissolved hydrogen sulfide was measured using spectrophotometric method using protocol described by Cline (Cline, 1969). Concentrations of major elements were measured using Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer (ICP-AES, Ultima 2, Horiba  
935 JobinYvon™) and concentrations of trace elements were measured using High-Resolution ICP Mass Spectrometer (HR-ICP-MS, Element 2, ThermoFisher™) both operated at the Pôle Spectrométrie Ocean (PSO) in Brest (France). Prior to elemental analysis, samples were acidified at least 1 month in

advance at 0.28 mol.L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> using concentrated ultra-pure reagent grades. Solutions for ICP-AES and ICP-MS analysis were diluted 100-fold with 0.28 mol.L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> using 2-stages sub-boiled distilled acid. Three water solution standards: Slew 3, Cass 4 and Nass 5 were also prepared along with the samples. For both ICP-AES and ICP-MS analysis, two sets of calibrating standards were used, by adding multi-elemental standard solutions in either pure Milli-Q water or 100-fold diluted Cass 4 acidified to 0.28 mol.L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>.

945

## 2. Nucleic acids extractions:

The extractions were performed on frozen samples (i.e. crushed samples or filters), in TE-Na 1X lysis buffer (Tris-HCl pH8, 100 mM; NaCl 100 mM; EDTA pH8, 50 mM) which Sarkosyl (1% final), SDS (1% final) and proteinase K (0.4 mg.mL<sup>-1</sup> final) were added and incubated at 55°C for 3h. Supernatant were removed and treated once with equal volume of PCI (phenol/chloroform/isoamyl alcohol: 25/24/1, v/v/v) and once with an equal volume of chloroform. Then nucleic acids were precipitated in 0.7 volume of isopropanol and wash in an equal volume of ethanol 96%. After centrifugation at 10000 g during 10 min, nucleic acids were dried and finally re-suspended in 200 µL of TE 1X buffer (Tris-HCl pH8 at 100 mM, EDTA pH 8 at 2 mM).

955

## 3. 16s RNA cloning, sequencing and phylogenetic analysis

After RT-PCR, 16S rRNA genes were amplified using A8F / ARC915R primers combination (Table S1) (Casamayor *et al*, 2000, Kolganova *et al*, 2002) and E8F / U907R primers set (Table S1) (Lane *et al*, 1985, Lane D, 1991) as specific archaeal or bacterial domains primers in 30 cycles at an annealing temperature of 58°C and 52°C respectively. Before cloning, PCR products were excised from agarose gel and gel purified using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel) according the manufacturer instructions. Clone libraries were carried out with pGEM®-T cloning kit (Promega) following manufacturer recommendations. Then clones were cultured and treated for sequencing at GATC Biotech (Konstanz, Germany) using M13 primers. Sequences were compared with those available on NCBI BLAST network service to determine their phylogenetic affiliations and aligned, edited and analysis using Geneious Pro version 5.6 software. Phylogenetic trees were constructed using the MEGA 5 program. The robustness of inferred topologies was tested using 1000 bootstrap resampling of the trees calculated on the basis of neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987) with Kimura two-parameter correction matrix (Kimura, 1980).

970 Negative controls were also done during nucleic acid extractions performed without sample, during RNA purification (without sample and with the negative control of the nucleic acid extraction) and

also during the reverse transcription (without sample, and with negative controls from RNA purification). No PCR products were detected for any control.

975           **4. Relative quantification of archaeal and bacterial populations by quantitative PCR  
                  amplification (Q-PCR)**

Bacterial and archaeal 16S rRNA gene copy quantification in whole DNA extract from each day culture samples were performed by Q-PCR, using SybrGreen fluorochrome system. Detection of bacterial or archaeal 16S rRNA gene was determined using specific primers set BACT1369f /  
980 BACT1492r (Suzuki *et al*, 2000) and ARC787f / ARC1059r (Yu *et al*, 2005) (Table S1) in 35 cycles at an annealing temperature of 60°C for the bacteria or 58°C for the archaea. Q-PCR conditions were: 500 nM of each archaeal primer and 600 nM for bacterial primers, 6.25 µL of PerfeCta™ SYBR® Green SuperMix, ROX™ (Quanta Biosciences), 5 µl µL of DNA template and nuclease free sterile deionized water was added to a final volume of 25 µL.

985 Bacterial and archaeal standard curve were calibrated in ten-fold dilutions ranging from 10<sup>0</sup> to 10<sup>-5</sup> using DNA from *Citricella thiooxidans* (Sorokin *et al*, 2005) or DNA from *Methanoculleus marisnigri* (Maestrojuan *et al*, 1990) respectively. All reactions were realized in 96 well Q-PCR plates using Applied Biosystems StepOnePlus™ Instrument and its software. Q-PCR quantifications of 16S rRNA genes in sample extracts and in standard series were performed in triplicate. Q-PCR, amplification  
990 efficiency was 96.2% and 109%, slope was -3.42 and -3,11 and R<sup>2</sup> was 0.998 and 0,998 for *Archaea* and *Bacteria* respectively.

995

1000

**Supplementary Table****Supplementary Table 1:** List and properties of the PCR primers used during the study.

Primers	Target	Sequence (5'-3')	Annealing temperature °C	Reference
<b>A8F</b>	Archaeal 16S rRNA	CGG-TTG-ATC-CTG-CCG-GA	58	(Kolganova et al., 2002)
<b>ARC915R</b>		CTG-CTC-CCC-CGC-CAA-TTC-CT		(Casamayor et al., 2000)
<b>E8F</b>	Bacterial 16S rRNA	AGA-GTT-TGA-TCA-TGG-CTC-AG	52	(Lane, 1991)
<b>U907R</b>		CCG-TCA-ATT-CMT-TTG-AGT-TT		(Lane et al., 1985)
<b>ARC787f</b>	Archaeal 16S Q-PCR	ATT-AGA-TAC-CCS-BGT-AGT-CC	58	(Yu et al., 2005)
<b>ARC1059r</b>		GCC-ATG-CAC-CWC-CTC-TC		
<b>BACT1369f</b>	Bacterial 16S Q-PCR	CGG-TGA-ATA-CGT-TCY-CGG	60	(Suzuki et al., 2000)
<b>BACT1492r</b>		GGW-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T		

1005

**References**

Burggraf S, Jannasch HW, Nicolaus B, Stetter KO (1990). *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. Systematic and Applied Microbiology 13: 24-28.

1010

Casamayor EO, Schafer H, Baneras L, Pedros-Alio C, Muyzer G (2000). Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 66: 499-508.

1015

Cline JD (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. Limnology and Oceanography 14: 454-458.

1020

Kashefi K, Tor JM, Holmes DE, Gaw Van Praagh CV, Reysenbach AL, Lovley DR (2002). *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 719-728.

1025

Kim YJ, Lee HS, Kim ES, Bae SS, Lim JK, Matsumi R et al (2010). Formate-driven growth coupled with H<sub>2</sub> production. Nature 467: 352-355.

Kimura M (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111-120.

1030

Kolganova TV, Kuznetsov BB, Tourova TP (2002). Designing and Testing Oligonucleotide Primers for Amplification and Sequencing of Archaeal 16S rRNA Genes. Microbiology 71: 243-246.

Lane D J (1991). 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.

- 1035 Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82: 6955-6959.
- 1040 Lazar CS, Parkes RJ, Cragg BA, L'Haridon S, Toffin L (2011). Methanogenic diversity and activity in hypersaline sediments of the centre of the Napoli mud volcano, Eastern Mediterranean Sea. *Environmental Microbiology* 13: 2078-2091.
- 1045 Lim JK, Bae SS, Kim TW, Lee J-H, Lee HS, Kang SG (2012). Thermodynamics of Formate-Oxidizing Metabolism and Implications for H<sub>2</sub> Production. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 7393-7397.
- Lozupone C, Hamady M, Knight R (2006). UniFrac—an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* 7: 371.
- 1050 Maestrojuan GM, Boone DR, Xun L, Mah RA, Zhang L (1990). Transfer of *Methanogenium bourgense*, *Methanogenium marisnigri*, *Methanogenium olentangyi*, and *Methanogenium thermophilicum* to the Genus *Methanoculleus* gen. nov., Emendation of *Methanoculleus marisnigri* and *Methanogenium*, and Description of New Strains of *Methanoculleus bourgense* and *Methanoculleus marisnigri*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40: 117-122.
- 1055 Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- 1060 Slobodkina GB, Kolganova TV, Querellou J, Bonch-Osmolovskaya EA, Slobodkin AI (2009). *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2880-2883.
- 1065 Sorokin DY, Tourova TP, Muyzer G (2005). *Citricella thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a novel lithoheterotrophic sulfur-oxidizing bacterium from the Black Sea. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 679-687.
- Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF (2000). Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4605-4614.
- 1070 Tor JM, Kashefi K, Lovley DR (2001). Acetate oxidation coupled to Fe(III) reduction in hyperthermophilic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1363-1365.
- 1075 Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 89: 670-679.

## 4. Synthèse de l'étude

### 4.1. Rappel des principaux résultats

L'analyse de la diversité microbienne active présente dans l'échantillon brut de flange hydrothermal met en évidence, au moment de l'échantillonnage, une importante diversité des *Bacteria* notamment des *Epsilonproteobacteria* et une plus faible diversité des *Archaea* majoritairement réparties au sein des *Methanoarchaea* et des *Thermococcales*.

Cette culture d'enrichissement, a permis de mettre en évidence des communautés microbiennes actives sous-représentées et/ou non actives dans l'échantillon initial. La très grande majorité de ces micro-organismes a été affiliée aux genres *Thermococcus*, *Archaeoglobus*, *Geoglobus*, *Sulfurimonas* et *Thermotoga* et est très probablement impliquées dans des processus anaérobies des cycles du soufre et du fer tels que la sulfo-, la sulfato- et la ferri-réduction. De plus, la détection de phylotypes archéens affiliés à *Ferroglobus*, permet d'envisager une possible activité microbienne de ferro-oxidation à haute température bien qu'il est aussi été prouvé que ces procaryotes sont capable de ferri-réduction (Tor and Lovley 2001). Cependant c'est la première fois que ces micro-organismes ont pu être cultivés à partir d'un échantillon hydrothermal profond.

Les communautés microbiennes enrichies dans le bioréacteur ont métabolisé les sources de Fe(III) et de S° portées par certains minéraux ou utilisé le sulfate provenant du fluide prélevé dans la zone de mélange entre l'eau de mer et le fluide hydrothermal. Les produits issus de ces métabolismes vont réagir entre-eux et former notamment des précipités insolubles de FeS. Ainsi, pendant toute la durée de l'enrichissement, les conditions de culture dynamique : solubilisation de certains minéraux, la formation de précipités, impactent la disponibilité en donneurs et accepteurs d'électrons et donc finalement l'activité des communautés microbiennes cultivées.

Ces interactions mise en évidence *in vitro* entre procaryotes-minéraux-fluide, nous renseignent donc sur les possibles interactions qui ont lieu *in situ* dans les cheminées hydrothermales actives.

### 4.2. Perspectives

Un des problèmes rencontré lors de cette étude est l'absence (soit parce que les mesures n'ont pas été réalisées soit parce qu'elles n'ont pas été possibles) tout au long de la culture, de dosage du fer sous diverses formes : Fe(II), Fe(III) et FeS ; et des espèces du soufre : S° soluble, HS<sup>-</sup> et l'H<sub>2</sub>S dissous dans le milieu ( les concentrations dans le milieu étant trop faibles à cause du balayage



gazeux en continu). Ces informations auraient permis de nous renseigner sur l'activité des micro-organismes, sur les processus de dissolution de phases minérales et de (re)précipitation de certaines phases suite à des interactions par exemple entre le Fe(II) et l'H<sub>2</sub>S dissous. Ces analyses pourraient être réalisées en utilisant des sondes basées sur la technique de voltamétrie comme celles utilisées pour déterminer la spéciation du fer ou du soufre dans les sédiments ou dans des systèmes hydrothermaux (fluide, tapis microbiens) (Luther III et al. 2001; Taillefert et al. 2007; Glazer and Rouxel 2009).

Initialement, les isotopes du soufre issus de l'H<sub>2</sub>S dissous devaient être analysés. Cependant, faute d'avoir une concentration suffisante dans les échantillons liquides prélevés directement dans le bioréacteur et fixés à l'acétate de zinc dans des fioles (où un vide partiel avait été réalisé), ces mesures n'ont pu être réalisées. Lors d'une prochaine culture, ceci pourrait être résolu en réalisant un système de bullage de l'effluent gazeux, en condition anoxique, dans une fiole (où un vide partiel aura été appliqué) qui contiendrait une solution d'acétate de zinc qui piègerait l'H<sub>2</sub>S sous forme de précipités insoluble de ZnS.

Cette culture de 23 jours, a été réalisée pendant la durée de la campagne BIG. Il aurait été intéressant de suivre l'évolution des communautés microbiennes et de leurs interactions avec le milieu et les phases minérales sur une durée plus longue. De même, faire varier la température, en l'augmentant ou en la diminuant, permettrait d'accéder à d'autres communautés microbiennes et donc à d'autres interactions procaryotes-minéraux-fluide (ie. d'autres phases minérales se dissolveraient libérant dans le milieu d'autres accepteurs ou donneurs d'électron qui pourraient servir de substrat aux procaryotes).

Enfin, afin d'isoler des représentants du genre *Ferroglobus* et de statuer sur leur métabolisme (ferri-réduction et / ou ferro-oxydation anaérobie) et donc de déterminer leur rôle écologique, des essais de cultures en fioles pourraient être réalisés, à partir d'échantillons issus de la culture d'enrichissement (échantillon D21 liquide et solide) ou de l'échantillon brut en choisissant deux types de milieux : 1) des milieux spécifiques des procaryotes ferro-oxydant comme ceux utilisés pour isoler *Ferroglobus placidus* (Hafenbradl et al. 1996) et 2) des milieux pour micro-organismes ferri-réducteurs tels que ceux utilisés pour isoler et cultiver les souches de *Geoglobus* (Kashefi et al. 2002; Slobodkina et al. 2009).

## **VI. Etude du fractionnement isotopique du fer par des microorganismes thermophiles : Cultures de communautés microbiennes (culture d'enrichissement en continu) et de souches pures ferri-réductrices**

---

1. Introduction de l'étude

2. Méthodes utilisées

3. Article 4 - Investigation of iron isotope fractionation by thermophilic microorganisms using continuous enrichment culture in bioreactor and pure strains

4. Synthèse de l'étude



## 1. Introduction de l'étude

Le fer, en tant que donneur ou accepteur d'électrons, est un élément fréquemment utilisé dans les métabolismes microbiens. Ainsi, les isotopes stables du fer ont suscité un intérêt majeur au cours de 10 dernières années comme traceurs potentiels des processus microbiens sur la Terre actuelle et passée. En effet, au cours d'expériences basées sur des cultures de micro-organismes, il a été démontré que d'importants fractionnements isotopiques du fer ont lieu pendant : 1) la réduction dissimilative du Fe(III) (DIR) (Beard et al. 2003; Crosby et al. 2007); 2) l'oxydation anaérobie du Fe(II) durant la photosynthèse (Croal et al. 2004). En revanche, il a aussi été prouvé que les isotopes du fer peuvent aussi être fractionnés lors de processus abiotiques tels que : l'oxydation du Fe(II) et la précipitation d'hydroxydes ferriques (Bullen et al. 2001; Balci et al. 2006) ou l'absorption de Fe(II) aqueux sur les hydroxydes de Fe(III) (Icopini et al. 2004; Wu et al. 2010; Wu et al. 2011). Une des difficultés, aujourd'hui, est de distinguer les processus biologiques, des processus abiotiques de fractionnement des isotopes du fer. Aussi, l'attribution de ces signatures à des processus biotiques ou abiotiques est très débattue dans la communauté internationale (Beard et al. 1999; Anbar et al. 2000; Bullen et al. 2001; Archer and Vance 2006; Guilbaud et al. 2012)).

Jusqu'à présent, la plupart des études de fractionnement isotopique du fer en condition biologique ont été réalisées avec des souches microbiennes pures (le plus fréquemment avec : *Geobacter sp.* ou *Shewanella sp.*) (Icopini et al. 2004; Crosby et al. 2005; Johnson et al. 2005; Crosby et al. 2007) et en condition mésophile. A ce jour, seulement deux cultures d'enrichissement ont été réalisées afin d'étudier les fractionnements isotopiques du fer et donc les biosignatures générées par des communautés microbiennes cultivées en mésophilie. Ainsi, aucune étude de fractionnement isotopique du fer n'a encore été réalisée lors de culture de micro-organismes (hyper)thermophiles, que ce soit des souches pures ou des cultures d'enrichissement. Ce manque d'information pose un problème pour l'interprétation des isotopes du Fer dans les environnements océaniques anciens où les traces de vie potentielles peuvent être associées à des systèmes hydrothermaux (Philippot et al. 2007).

Cette étude est basée sur la réalisation de deux cultures d'enrichissement en continu. Le milieu choisi est une base artificielle d'eau de mer sans sulfate (afin de limiter le développement de populations sulfato-réductrices, qui pourraient rentrer en compétition pour le substrat avec les communautés ferri-réductrice que nous souhaitons cultiver). Les deux inocula étaient 1) un broyat de cheminée hydrothermale active et 2) des sédiments hydrothermaux provenant de 17,5-21,5 cm de profondeur.

Pour cette étude, l'utilisation de cette technique s'avère adéquate puisqu'elle permet un renouvellement du milieu de culture (ici soutirage lors de l'échantillonnage et l'ajout de milieu de culture), de maintenir les cultures sur de longues périodes, d'accéder à des espèces minoritaires dans l'échantillon brut et également, d'étudier les interactions entre populations microbiennes et entre ces populations et le milieu (Postec et al. 2005; Houghton et al. 2007; Postec et al. 2007; Byrne et al. 2009; Crépeau 2010).

Ainsi, cette approche avait pour but : 1) d'enrichir et de cultiver des micro-organismes capables de réduire le fer ferrique, 2) d'étudier les interactions entre les micro-organismes cultivés et le fer ; 3) d'avoir un aperçu des signatures isotopiques liées à l'activité des communautés microbiennes; et enfin 4) de comparer ces signatures isotopiques du Fe(II) avec celles obtenues à partir de souches pures ferri-réductrices thermophiles et de contrôles abiotiques.

## 2. Méthodes utilisées

Les deux cultures d'enrichissements : l'une inoculée avec un broyat de cheminée hydrothermale active et l'autre avec des sédiments hydrothermaux, ont été réalisées en bioréacteur gas lift (Godfroy et al. 2006).

Une semaine avant l'inoculation, le milieu de culture et la solution de Fe(III) ont été distribués dans les deux bioréacteurs. Ensuite, durant les trois jours précédant l'inoculation, dans les deux bioréacteurs, des prélèvements ont été effectués afin de déterminer les signatures isotopiques du fer total et du fer dissous et de déterminer leur valeur isotopique en condition abiotique.

Après inoculation, les cultures d'enrichissements ont été maintenues pendant 27 jours à pH7, à 80°C sous un balayage gazeux continu de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (90:5:5). Quotidiennement des échantillons ont été prélevés afin d'analyser la diversité microbienne active basée sur l'étude phylogénétique des ARNr 16S rétro-transcrits (par clonage-séquençage); de déterminer la densité cellulaire par comptage et par Q-PCR à partir de l'ADN génomique, l'évolution des concentrations en fer (fer total et dissous) et en éléments majeurs et traces ainsi que l'évolution des rapports isotopiques du fer total et du fer dissous.

Des cultures de souches pures ferri-réductrices : *Thermotoga maritima* et *Geoglobus acetivorans* réalisées à 80°C et des témoins abiotiques réalisés dans les mêmes conditions que les cultures ont été réalisés afin de déterminer et de distinguer les signatures isotopiques en Fe(II) d'origines biologiques et abiotiques.

La réduction dissimilative du fer à haute température et en condition anaérobie ainsi que les signatures isotopiques du fer obtenues en condition biologique à partir de souches pures et de communauté microbienne sont présentées et discutées sous la forme d'un article qui sera soumis au journal *Geobiology*.

### **3. Article 4 - Investigation of iron isotope fractionation by thermophilic microorganisms using continuous enrichment culture in bioreactor and pure strains**

#### **Authors & Affiliations:**

Nolwenn Callac<sup>abcd</sup>, Olivier Rouxel<sup>de</sup>, Françoise Lesongeur<sup>abc</sup>, Sandrine Chéron<sup>e</sup>, and Anne Godfroy<sup>abc</sup>

<sup>a</sup>Université de Brest, UEB, IUEM, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197 place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France.

<sup>b</sup>Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, 29280 Plouzané, France.

<sup>c</sup>CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197,29280 Plouzané, France.

<sup>d</sup>Université de Brest, UEB, IUEM, Domaines Océaniques, UMR6538, Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané, France.

<sup>e</sup> Ifremer, Laboratoire de Géochimie et de Métallogénie, 29280 Plouzané, France.

**Running Title: Continuous enrichment cultures: insights into iron biogeochemical cycles and isotopic signatures**

## Abstract

Iron, can be used as donor or electron acceptor. Iron is also the first transition metal that was considered as an indicator of isotopic biosignatures.

To investigate thermophilic hydrothermal microorganisms Fe (II) isotopic signatures both communities culture, thermophilic iron-reducing pure strains culture and abiotic controls were performed. For that, continuous enrichments culture targeting Iron reduction, in bioreactors, were realized at 80°C, using both active hydrothermal chimney sample and hydrothermal sediments as inocula. *Geoglobus acetivorans* and *Thermotoga maritima* were grown in batch cultures at 80°C in the presence of Fe(III) and abiotic control were realized in parallel. The abiotic controls were performed under the same conditions as the cultures to identify and distinguish between biotic and abiotic origins of the iron isotopic signatures.

In enrichment cultures, active microbial diversity based on 16S rRNA (from cDNA) was determined and correlated with changes in the concentrations of Fe (total and dissolved iron) and major and trace elements as well as with the evolution of isotopic ratios of total iron and dissolved iron.

Dissimilatory iron reducers affiliated to the genus *Geoglobus* were detected in both enrichment cultures while *Thermotoga* species were detected only in the enrichment culture inoculated with chimney fragment. However, Fe(II) production was detected only in the bioreactor inoculated with the chimney. Also, in pure strains culture conditions, *Thermotoga maritima* was to reduce Fe (III) to Fe (II) and exhibit a isotopic signature of Fe (II) enriched in the lighter isotope compared to the initial substrate of Fe(III), while no Fe (II) production was observed in our conditions for *Geoglobus acetivorans*.

Finally, according to the observed isotopic signatures  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  determined in both biological and abiotic systems, It remain difficult to consider that low and negative value  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  as a bio-signature of dissimilatory iron reduction. Thus, the use of iron isotopes to determine biotracers of life should be used with caution.

**Keywords:** Dissimilatory iron reduction, iron isotope fractionation, thermophilic microorganisms, *Geoglobus acetivorans*, *Thermotoga maritima*

## 30 1. Introduction

Iron was among the first transition metal that has been considered to provide isotopic biosignatures and provide constraints on biogeochemical cycling of Fe in modern and ancient Earth surface environments (Johnson et al., 2004; Johnson et al., 2008; Dauphas and Rouxel, 2007; Anbar and Rouxel, 2006). Microbiological experiments have shown that significant Fe isotope fractionations

35 occur during dissimilatory Fe(III) reduction (DIR) (e.g. (Beard et al., 2003a ; Crosby et al., 2007a)), but  
 also during anaerobic photosynthetic Fe(II) oxidation (Croal et al., 2004). Iron isotopes can be also  
 fractionated by abiotic Fe(II) oxidation and precipitation of ferric hydroxides (Bullen et al., 2001 ;  
 Balci et al., 2006) and by sorption of aqueous Fe(II) onto ferric hydroxides (Icopini et al., 2004a ; Wu  
 et al., 2010b ; Wu et al., 2011b). The largest equilibrium isotope fractionation (~ 3‰) was observed  
 40 and theoretically calculated between coexisting Fe(III) and Fe(II) aqueous species (Johnson et al.,  
 2002 ; Welch et al., 2003 ; Anbar et al., 2005). Significant kinetic Fe isotope fractionation (up to ~1‰)  
 are involved in non-redox processes such as inorganic mineral precipitation of Fe-oxides (Skulan et al.,  
 2002) and sulfides (Butler et al., 2004 ; Guilbaud et al., 2011a). These initial studies, together with  
 experimental investigations highlighted the importance of Fe redox cycling, mineral precipitation and  
 45 dissolution, and microbial processes as factors contributing to Fe isotope fractionations. In particular,  
 both biotic and abiotic redox processes are among the principal factors that fractionate Fe-isotopes.  
 The difficulty to clearly identify – or distinguish – biotic *versus* abiotic Fe isotope fractionation  
 processes has been the subject of intense debate in the recent years (e.g. (Beard et al., 1999 ; Anbar  
 et al., 2000 ; Bullen et al., 2001 ; Archer and Vance, 2006 ; Guilbaud et al., 2012)).

50 Microbial dissimilatory iron reduction (DIR) has been proposed to play a significant role in producing  
 Fe isotope fractionations recorded in both modern and ancient marine environments (Beard et al.,  
 2003a ; Archer and Vance, 2006 ; Staubwasser et al., 2006 ; Johnson et al., 2008a ; Tangalos et al.,  
 2010b). In modern marine and freshwater environments, low  $\delta^{56}\text{Fe}$  values of aqueous Fe(II) are  
 generally attributed to DIR (Staubwasser et al., 2005 ; Severmann et al., 2006 ; Teutsch et al., 2009 ;  
 55 Tangalos et al., 2010b). However, some of the lowest  $\delta^{56}\text{Fe}$  values reported so far for dissolved Fe  
 may also result from partial Fe(II) oxidation and Fe(III) oxide precipitation (Rouxel et al., 2008b ;  
 Severmann et al., 2010) with further fractionation resulting from Fe(II) adsorption onto newly formed  
 Fe(III) oxide (Teutsch et al., 2009). For ancient marine environments, previous studies of Archean  
 sedimentary rocks suggest the existence of an isotopically negative, anoxic, Fe-rich seawater pool.  
 60 This negative pool may be either fueled by dissimilatory Fe reduction (Johnson et al., 2008a ;  
 Heimann et al., 2010a ; Craddock and Dauphas, 2011) or fueled by hydrothermal venting followed by  
 partial Fe oxidation in the water column (Rouxel et al., 2005a ; Tsikos et al., 2010 ; Planavsky et al.,  
 2012).

Recent experimental work has provided importance insights in our understanding of Fe isotope  
 65 fractionation mechanisms during DIR and Fe(II)<sub>aq</sub>-Fe(III)oxide interactions. Coupled electron and atom  
 exchange has been shown to be the mechanism for Fe isotope fractionation during microbial  
 dissimilatory iron reduction (Crosby et al., 2007a ; Wu et al., 2009b ; Percak-Dennett et al., 2011b), as  
 well as a biological interaction between Fe(II)<sub>aq</sub> and various Fe(III) oxides (Beard et al., 2010 ; Wu et  
 al., 2011b). It has been demonstrated that  $\delta^{56}\text{Fe}$  values for Fe(II) is largely controlled by equilibrium



70 isotope exchange with a reactive surface layer on Fe(III)-oxides (Icopini et al., 2004a ; Crosby et al., 2005a ; Wu et al., 2011b).

The majority of previous experimental studies of Fe isotope fractionations produced during DIR have used conditions analogous to freshwater systems (Icopini et al., 2004a ; Crosby et al., 2005a ; Johnson et al., 2005b ; Crosby et al., 2007a) and have been conducted in relatively simple  
 75 geochemical systems using pure microbial strains (e.g. *Geobacter sp.* or *Shewanella sp.*) and Fe(III) oxide substrate. Enrichment culture of marine mud-flat surface sediments have been also employed in some experiments (Percak-Dennett et al., 2011a). Two recent studies have looked at the effects of culture media conditions, such as pH, temperature and the presence of dissolved silica on DIR-driven Fe isotope fractionation (Wu et al., 2009b ; Percak-Dennett et al., 2011a). In particular, Fe isotope  
 80 fractionation was investigated during microbial reduction of Fe(III) oxide in simulated anoxic, high-silica and low-sulfate Archean seawater at 30°C. However, to date, no experimental work has investigated Fe-isotope fractionation by thermophilic microorganisms in both static batch culture and through continuous enrichment culture in bioreactor with complex mineral substrate.

Microbial dissimilatory iron-reduction (DIR) is an energetic metabolism occurring in anaerobic  
 85 conditions and in a wide variety of environmental niches. In order to obtain energy gain, ferric iron Fe(III) is used as terminal electron acceptor and it is reduced to aqueous ferrous iron. In modern marine sediments, amorphous ferric iron are the major components of the iron cycle (Lovley, 1991) and can be used as substrates for the microbial dissimilatory iron reduction (Cornell and Schwertmann, 2003 ; Zavarzina et al., 2007). Thus in sediments where reactive amorphous Fe(III)  
 90 oxy/hydroxides are abundant, DIR is the main process for degradation and oxidation of organic carbon (Lovley, 1991).

To date, many representatives of thermophilic and hyperthermophilic dissimilatory iron-reducing prokaryotes have been isolated in pure culture from deep-sea hydrothermal vent systems. Those include strains belong both to the bacterial domain such as *Geothermobacter ehrlichii* (Kashefi et al.,  
 95 2003), *Deferribacter abyssi* (Miroshnichenko et al., 2003), *Deferribacter autotrophicus* (Slobodkina et al., 2009a), *Deferrisoma camini* (Slobodkina et al., 2011) or Thermotogales and from the archaeal domain as *Geoglobus ahangari* (Kashefi et al., 2002b), *Geoglobus acetivorans* (Slobodkina et al., 2009b), the DHVE2 *Aciduliprofundum boonei* (Reysenbach et al., 2006) or few *Thermococcus* species. isolate (Slobodkin et al., 2001). In hydrothermal environment, DIR can be associated with the  
 100 oxidation of inorganic compounds such as hydrogen albeit organic compounds can be also utilized in many cases.

In order to investigate Fe isotope fractionation during DIR in hydrothermal conditions, we performed 2 parallel continuous enrichment cultures targeting the growth of thermophilic Fe reducers in condition as close as possible to *in situ* hydrothermal conditions. Our approach involves the use of a

105 continuous gas-lift bioreactor using a crushed sample of an active hydrothermal chimney and hydrothermal sediments as inocula. This technique has already proved its efficiency for long term cultivation investigating hydrothermal microbial community dynamics, inter-species interactions in both stable and changing environmental conditions ((Postec et al., 2005 ; Postec et al., 2007b ; Byrne et al., 2009) (Callac et al., 2013 submitted)).

110 The present work is motivated by the evidence for microorganisms involved in dissimilatory iron reduction in hydrothermal systems and by the lack of information about their effects on Fe isotope fractionation. Yet, this information is crucial for exploring potential biosignatures in hydrothermal iron bearing rocks or sediments. The aims of this study are, 1) to cultivate community of iron-reducers from two contrasted ecosystems from the Guaymas Basin hydrothermal field: sulfide-sulfate-rich chimney and hydrothermally affected sediment, 2) to evaluate biotic *versus* abiotic processes in affecting Fe isotope composition in bioreactor culture and 3) to compare these signatures with abiotic controls and pure strain cultures of pure microbial strains.

## 2. Materials and Methods

120

### 2.1. Continuous enrichment cultures in gas-lift bioreactors

#### 2.1.1. Sample collection and mineralogical determination

Sediments and hydrothermal chimneys from the Guaymas Basin were collected during the oceanographic cruise BIG (RV *l'Atalante* June 2010) using the *Nautilus* DSV. All samples were handled under anoxic conditions in an anaerobic chamber under N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 90:5:5 gas atmosphere using sterile vials and utensils.

An active hydrothermal chimney was collected from the hydrothermal site "Rebecca Roost" (27°00.634' N 111°24.405' W; 1997 m depth) into an aseptic insulated box. Immediately upon recovery on board, the sample was crushed to obtain grain size of less than 1 cm. Crushed fragments were subsequently stored at 4°C in vials filled with sterile NaCl solution at 23 g.L<sup>-1</sup>, for cultivation. Additional sub-samples were also frozen at -20°C for mineralogical analyzes or frozen at -80°C for microbial diversity survey.

On shore before experiment, the chimney sample was further crushed to grain size lesser than 3mm and stored in sterile NaCl solution under anaerobic condition at 4°C.

135 Sediment push core (sample PI 1766 CT2), was collected from "Marker 27" site (27° 74' N 111° 41' W; 2010 m depth). The recovered sediment core had a total length of 21.5 cm and was split into four sections from different depth intervals. A sub-sample from the deepest core interval (17.5 to 21.5 cm)

was stored in sterile anoxic synthetic sea-water at 4°C until further processing. Other sub-samples of  
140 were also stored at -20°C for mineralogical analyzes or at -80°C for microbial diversity survey.

Mineralogical and geochemical analyses were performed on both sediment and chimney samples at  
the beginning and at the end of the incubation experiments. Before analysis, crushed samples were  
rinsed 6 times with dionized water (MilliQ™ 18mΩ), air-dried at 60°C and powdered in agate mortar.  
Pseudo-quantitative mineralogy was achieved by X-ray diffraction with a D8 ADVANCE diffractometer  
145 Bruker AXS coupled with the XRD commander system for data acquisition. Minerals were determined  
according their diffraction spectra using the Eva™ and Topas™ softwares.

### 2.1.2. Incubation experiments and enrichment cultures conditions

150 The culture medium consist of artificial seawater without sulfate, supplemented by several organic  
compounds: acetate and formate to a final concentration of 10 mM, benzoate at 2 mM final and  
yeast extract at 0.1 g.L<sup>-1</sup> final. The artificial seawater, sterilized by filtration, contained the following  
components: NaCl at 23g/L; KCl at 0.5g/L; NH<sub>4</sub>Cl at 0.5g/L; MgCl<sub>2</sub> at 0.5g/L; CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O at 0.5g/L;  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at 0.25g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at 0.25g/L. Trace elements without chelator (Balch et al., 1979), vitamins  
155 (Balch et al., 1979) and a L-Cysteine as a reducing agent were also added to the medium. A poorly  
crystalline iron(III) oxide-hydroxide solution (hereafter referred as Fe(III)<sub>am</sub>) was added directly in  
each bioreactor three days before inoculation to obtain a total Fe concentration of about 10 to 8 mM.  
The Fe(III)<sub>am</sub> solution was prepared using previously described methods (Lovley and Phillips, 1986a ;  
b). Briefly, it consists in the neutralization to pH 7 of a ferric chloride hexahydrate solution at 0.45  
160 mol/L using the addition of NaOH. The final Fe(III) solution was obtained after several centrifugation  
and agitation steps in distilled water to obtained clean amorphous Fe precipitates.

The enrichment cultures were performed in anaerobic condition, in the dark, at 80°C and pH 7 during  
27 days. The continuous gas-lift bioreactor set up has been already previously described (Raven et al.,  
1992 ; Postec et al., 2005 ; Godfroy et al., 2006 ; Postec et al., 2007a ; Byrne et al., 2009).  
165 Temperature and pH were constantly monitored and controlled in each bioreactor the AFS  
Biocommand™ system from New Brunswick and the Infors HT™ system. The pH was automatically  
adjusted using acid (0.5 mol/L HCl) or base solutions (0.5 mol/L NaOH) delivered to the bioreactor  
using peristaltic pumps. Fresh culture media was dispensed into each bioreactor one week before  
inoculation experiment to allow sufficient gas sweeping to establish anaerobic conditions and the  
170 homogenization of the Fe(III)<sub>am</sub> slurry.

The bioreactor containing the chimney sample, hereafter referred as “BC” experiment, was  
inoculated with 150 mL of an active hydrothermal flange (1743-BIG03E01) suspension (7.5g in

100mL). The bioreactor containing the sediment sample, hereafter referred as “BS” experiment was inoculated with 150 mL of Marker 27 sediment sample (PI 1766 CT2 S4) suspension (7.5 g in 100mL).  
175 Throughout the incubation experiments, both bioreactors were continuously fed by fresh medium (but without Fe (III)<sub>am</sub>) with a low flow rate of 50mL/day (equivalent to a dilution rate of about 0,001 h<sup>-1</sup>). This replaces the volume of culture medium that was collected in the bioreactor by every day sampling (i.e. 50mL sample size). Hence, the total volume of the bioreactor of 2.L is renewed within a 40 days period. Both experiments were run for up to 27 days with the same experimental conditions.  
180 *However, an electrical equipment failure occurs during the night of day 13 for the BS bioreactor that resulted in a pH drop of the culture medium due to uncontrolled addition of HCl solution.*

### 2.1.3. Bioreactor sampling and analysis procedures

185 Samplings from the bioreactors were done daily, using sterile syringes, under anoxic conditions. A total of 50mL of medium was sampled every day for both geochemical and microbiological analysis as described below.

Fe(II) concentrations were determined using the ferrozine method (Stookey, 1970) using 5 mL of filtered medium.

190 For geochemical analysis and Fe isotopic composition, 10 mL of culture was filtered through 0.22 µm (Millex®, Millipore) and immediately acidified to pH 2 and stored at -20°C; and another 5 ml of culture were collected without filtration and acidified to pH 2 and stored at -20°C.

For geochemical analysis, two types of samples were considered: (1) the “filtered pool” which contain soluble dissolved major elements and Fe which passed through 0.22 µm filter; and the (2)  
195 unfiltered pool as “total pool” which contain dissolved and particular major elements as well as dissolved and colloidal iron. Major element concentrations were measured using Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometry (ICP-AES, Ultima 2, Horiba JobinYvon) and trace element concentrations using High-Resolution ICP Mass Spectrometer (HR-ICP-MS, Element 2, ThermoFisher), both operated at the Pole Spectrometry Ocean Brest (PSO, Brest). Prior to elemental  
200 analysis, filtered and unfiltered samples were acidified at least 1 month in advance with HNO<sub>3</sub> (concentrated ultra-pure reagent grades) at a final concentration of 0.28 mol.L<sup>-1</sup>. Solutions for ICP-AES and ICP-MS analysis were diluted 100-fold with 0.28 mol.L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>. Three water solution standards: Slew 3, Cass 4 and Nass 5 (National Research Council Canada) were also prepared along with the samples. For both ICP-AES and ICP-MS analysis, two sets of calibrating standards were used  
205 by adding multi-elemental standard solutions either with pure Milli-Q™ water or with 100-fold diluted Cass 4 in 0.28 mol.L<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub>.

Cell density was determined using a Thoma chamber (depth 0.02 mm) viewed with an Olympus™ BX60 phase contrast microscope (X400), by direct cell counting or by counting after fixation with 1 % (v/v) glutaraldehyde and storage at -20°C.

210 For DNA and RNA analysis, cells were recovered from 25 mL of cultures, centrifuged (30 min at 8000 g at 4°C) and cell pellets were stored at -80°C.

#### 2.1.4. Microbial diversity

##### 215 2.1.4.1. Nucleic acids extraction

DNA and RNA were extracted with the same protocol. The extractions that combined chemical and enzymatic lysis were performed on frozen pellets resuspended in lysis buffer TE-Na 1X (Tris-HCl pH8, 100 mM; NaCl 100 mM; EDTA pH8, 50 mM) in which sarkosyl (1% final), SDS (1% final) and proteinase K (0.4 mg.ml<sup>-1</sup> final) were added and incubated at 55°C for 3h. Supernatant were removed and  
220 treated one time with equal volume of PCI (phenol/chloroform/isoamyl alcohol: 25/24/1, v/v/v) and one time with an equal volume of chloroform. Then nucleic acids were precipitated in 0.7 volume of isopropanol. After centrifugation at 10000 g during 10 min, nucleic acids were dried and finally re-suspended in 100 µL of TE 1X buffer (Tris-HCl pH8, 100 mM, EDTA pH 8.2 mM).

##### 225 2.1.4.2. PCR-ARISA

PCR-ARISA was carried out using the archaeal ARISA primers: 915F and 71R (Table 1) (Ikeda et al., 2006) and the bacterial ARISA primers: ITSF and ITSReub (Table 1) (Cardinale et al., 2004). Both archaeal and bacterial IST amplification reaction was performed in 25 µl reaction mixture containing: 5 µl of 5X GO Taq® DNA polymerase buffer (Promega), 2.5 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub> solution (Promega), 0.5 µl  
230 of 10 mM dNTPs (Eurogentec), 0.1 µl of each primers at 100 µM and 0.12 µl of 5 U.µl<sup>-1</sup> GO Taq® DNA polymerase (Promega). All amplifications were realized in 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing for 1 min 30 s at 55°C, and extension at 72°C for 7 min. All PCR reactions were carried out using a GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems) thermal cycler, and PCR products were visualized using gel electrophoresis. Then positive DNA amplifications were analyzed using the Kit DNA  
235 7500 LabChip® Kit (Agilent) using the manufacturer instructions, read using the bionalyzer Agilent 2100; the results were treated with the Agilent 2100 Expert Software.

240

**Table 1:** List and properties of the PCR primers used during the study.

Primers	Target	Sequence (5'-3')	Annealing temperature °C	Reference
<b>915F</b> <b>71R</b>	Archaeal ITS (ARISA)	AAA-GGA-ATT-GCG-GGG-GAG-CAC TCG-GYG-CCG-AGC-CGA-GCC-ATC-C	55	Ikeda et al., 2006
<b>ITSF</b> <b>ITSReub</b>	Bacterial ITS (ARISA)	GTC-GTA-ACA-AGG-TAG-CCG-TA GCC-AAG-GCA-TCC-ACC	55	Cardinale et al., 2004
<b>A8F</b> <b>ARC915R</b>	Archaeal 16S rRNA	CGG-TTG-ATC-CTG-CCG-GA CTG-CTC-CCC-CGC-CAA-TTC-CT	58	Kolganova et al., 2002 Casamayor et al., 2000a
<b>E8F</b> <b>U907R</b>	Bacterial 16S rRNA	AGA-GTT-TGA-TCA-TGG-CTC-AG CCG-TCA-ATT-CMT-TTG-AGT-TT	52	Lane, 1991 Lane et al., 1985b
<b>ARC787f</b> <b>ARC1059r</b>	Archaeal 16S Q-PCR	ATT-AGA-TAC-CCS-BGT-AGT-CC GCC-ATG-CAC-CWC-CTC-TC	58	(Yu et al., 2005)
<b>BACT1369f</b> <b>BACT1492r</b>	Bacterial 16S Q-PCR	CGG-TGA-ATA-CGT-TCY-CGG GGW-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T	60	(Suzuki et al., 2000)

#### 2.1.4.3. Reverse transcription, molecular diversity and phylogenetic analysis

245 According to PCR-ARISA analysis, some samples were selected to construct clone libraries. Prior to reverse transcription, RNA was purified using NucleoSpin® RNA II kit (Macherey nagel) according to the manufacturer instructions.

Reverse transcription was performed using the qScript™ cDNA SuperMix reagent and manufacturer precaution with 2µL of RNA. After RT-PCR for all samples, 16S rRNA gene was PCR-amplified using  
250 specific archaeal or bacterial domains: respectively couple primers A8F and ARC915R (Table 1) (Casamayor et al., 2000b ; Kolganova et al., 2002) and E8F and U907R (Table 1) (Lane et al., 1985a ; Lane D, 1991). Both archaeal and bacterial 16S rRNA gene amplification reaction was performed in 50 µl reaction mixture containing: 10 µl of 5X GO Taq® DNA polymerase buffer (Promega), 5 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub> solution (Promega), 1 µl of 10 mM dNTPs (Eurogentec), 0.2 µl of each primers at 100 µM  
255 and 0.24 µl of 5 U.µl<sup>-1</sup> GO Taq® DNA polymerase (Promega). All amplifications were realized in 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing for 1 min 30 s at 58°C or 52°C for the archaeal or bacterial 16S rRNA gene respectively, and extension at 72°C for 7 min. All PCR reactions were carried out using a GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems) thermal cycler, and PCR products were visualized using gel electrophoresis.

260 Prior to cloning, positively amplified PCR products were gel purified using NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel) according the manufacturer's instructions.

Clone libraries were carried out with pGEM®-T cloning kit (Promega) following manufacturer recommendations. Plasmid extractions, purification and sequencing were realized with GATC Biotech

(Konstanz, Germany) using M13 primers. Sequences were imported into the BLAST nucleotide search program through the National Center for Biotechnology Information (NCBI website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) to find closely related sequences within the GenBank database. The clone library 16S rRNA sequences were aligned edited and analyzed using Bioedit version 7.1.3 software. Phylogenetic trees were constructed using the MEGA 5 program (Kumar et al., 2008). The robustness of inferred topologies was tested using 1000 bootstrap resampling of the trees calculated on the basis of neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987) with Kimura two-parameter correction matrix (Kimura, 1980). All sequences presenting more than 97% similarity were considered to belong to the same phylotype (OTU) and were clustered together in the alignment (Schloss and Handelsman, 2004). The sequence data reported in this study have been submitted to GenBank nucleotide sequence databases under accession number XXX to XXX for Archaea and XXX to XXX for Bacteria.

#### 2.1.5. Abundance of archaeal and bacterial community by quantitative PCR (Q-PCR)

Bacterial and archaeal 16S rRNA gene copy quantification in whole DNA extract from each day culture samples were performed by Q-PCR, using SybrGreen fluorochrome system. Detection of bacterial or archaeal 16S rRNA gene was determined using specific primers set BACT1369f / BACT1492r (Table 1)(Suzuki et al., 2000) and ARC787f / ARC1059r (Table 1) (Yu et al., 2005) in 35 cycles at an annealing temperature of 60°C for the bacteria or 58°C for the archaea. Q-PCR conditions were: 500 nM of each archaeal primer and 600 nM for bacterial primers, 6.25 µL of PerfeCta™ SYBR® Green SuperMix, ROX™ (Quanta Biosciences), 5 µl µL of DNA template and nuclease free sterile deionized water was added to a final volume of 25 µL. Bacterial and archaeal standard curve were calibrated in ten-fold dilutions ranging from 10<sup>0</sup> to 10<sup>-5</sup> using DNA from *Citricella thiooxidans* (Sorokin et al., 2005) or DNA from *Methanoculleus marisnigri* (Maestrojuan et al., 1990) respectively. All reactions were realized in 96 well Q-PCR plates using Applied Biosystems StepOnePlus™ Instrument and its software. Q-PCR quantifications of 16S rRNA genes in sample extracts and in standard series were performed in triplicate. Q-PCR, amplification efficiency was 92% and 97.7%, slope was -3.53 and -3,38 and R<sup>2</sup> was 0.999 and 1 for *Archaea* and *Bacteria* respectively.

## 2.2. Batch experiments with pure cultures

### 2.2.1. Strains collection and growth media

Pure cultures of thermophilic dissimilatory iron-reducers: *Geoglobus acetivorans* strain SBH8<sup>T</sup> (DSM 21716<sup>T</sup>) and *Thermotoga maritima* strain MSB8 (DSM 3109<sup>T</sup>) were obtained from the DSMZ.

***Geoglobus acetivorans*** is a hyperthermophilic (optimal growth temperature at 81°C) and anaerobic *Archaea* isolated from a hydrothermal chimney from the Ashadze hydrothermal field (Mid-Atlantic Ridge). It is a dissimilatory iron reducer able to use a wide range of substrates: acetate, formate, pyruvate, fumarate, malate, propionate, butyrate, succinate, glycerol, stearate, palmitate, peptone and yeast extract as electron donor (Slobodkina et al., 2009b). The culture medium used for *Geoglobus acetivorans* consists of NaCl at 25 g/L; KCl at 0.33 g/L; NH<sub>4</sub>Cl at 0.33 g/L; MgCl<sub>2</sub> at 0.33 g/L; CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O at 0.33 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at 0.33 g/L; NaHCO<sub>3</sub> at 2.5 g/L. The pH was adjusted to 6.8 at room temperature. Prior to sterilization, medium was boiled and cooled under N<sub>2</sub> gas sweeping to avoid using reducing agent as described by (Slobodkin et al., 1999b). The medium was then transferred into an anaerobic chamber (La Calhène, France) containing N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (90:10) gas atmosphere before the addition of sterilized and anaerobic solutions of poly-vitamins (Balch et al., 1979); selenite-tungstate and trace elements without chelator (Balch et al., 1979). The medium was then dispensed into 50 mL penicillin vials closed with a butyl rubber and an aluminum cap. Fe(III)<sub>am</sub> and yeast extract solutions were respectively added at 11 mM and 0.1% (w/v) final concentration.

***Thermotoga maritima*** was initially described as a hyperthermophilic (optimal growth temperature 80°C) anaerobic fermentative bacterium, isolated from geothermal marine sediment at Vulcano, Italy (Huber et al., 1986). Then, following the Vargas and collaborators works, it was showed that *Thermotoga maritima* is also able to reduce Fe(III) with H<sub>2</sub> (Vargas et al., 1998). In this study we cultivated *Thermotoga maritima* in the presence of ferric iron using yeast extract but without H<sub>2</sub>. The medium used for *T. maritima* growth consist of NaCl at 27 g/L; KCl at 0.5 g/L; NH<sub>4</sub>Cl at 0.5 g/L; MgCl<sub>2</sub> at 0.5 g/L; MgSO<sub>4</sub> at 0.5 g/L; CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O at 0.5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at 0.25 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at 0.25 g/L. The pH was adjusted to 6.5 at room temperature. Prior to sterilization, the medium was boiled and cooled under N<sub>2</sub> atmosphere. During cooling, 0.5g.L<sup>-1</sup> of L-Cysteine HCl (Sigma) was added in order to achieve anaerobiosis. The medium was then transferred into an anaerobic chamber (La Calhène, France) containing N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (90:10) gas atmosphere. Concentrated solution of poly-vitamins (Balch et al., 1979), and trace elements without chelator (Balch et al., 1979) were added to the medium to final concentrations of 0.08 % (w/v). The medium was then distributed into 50 mL penicillin vials which were closed with a butyl rubber and an aluminum cap. Fe(III)<sub>am</sub> and yeast extract solutions provide from stock solution was respectively added at 11 mM and 0.1% (w/v) final concentration.

### 2.2.2. Batch culture experiments

In order to ensure reproducible growth conditions, each strain were cultivated and successfully transferred into fresh medium four times. Cultures were done anaerobically at atmospheric pressure, in batch mode in 20 ml of medium at optimal growth conditions in the dark.

All biotic experiments were inoculated at 5% with a pre-culture in exponential growth phase.



Two types of abiotic controls were done: (1) the first one consisted of non-inoculated culture medium and (2) the second one consisted of the addition in the culture medium of 1 mL of a pre-culture filtered through 0.22µm filter (Millex®, Millipore). Each set of batch culture experiment were done in duplicate, including abiotic controls.

Sample collections were performed for both culture and abiotic controls: immediately after inoculation, and 5h, 9h, 24h and 48 hours of incubation, to determine cell density, Fe concentrations and isotopic signatures as described above (see bioreactor sampling).

340

### 2.3. Fe isotopes analysis

Fe isotope compositions were determined for both dissolved and total Fe pools in both pure cultures and enrichment cultures in bioreactor. In contrast to previous studies (Crosby et al., 2005b ; Huo et al., 2009 ; Tangalos et al., 2010b ; Percak-Dennett et al., 2011a), no attempt were made to separate solid-phase Fe pools, such as adsorbed Fe(II). Although adsorbed Fe(II) onto crystalline Fe(III) oxide-hydroxides may be selectively recovered using sequential extraction in Na-acetate buffer at pH 4.85 and 0.1 mol/L HCl (Crosby et al., 2007b), this approach is not suitable for amorphous colloidal Fe(III) solutions due to the high reactivity and dissolution even in mild acidic solution. In addition, dissolved Fe(II) produced in our experiments represent only a small amounts of the total Fe(III) pool (less than 5%), so that the selectivity of the extraction procedure of adsorbed Fe(II) is not sufficient to derive meaningful Fe isotope composition of each Fe pools.

Before sample purification through anion exchange chromatography, 2 ml of each solution was totally digested with a mix of concentrated HCl solution and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ultrapure grade). Chromatography columns were filled with 2.5 mL of AG1-X8 (Biorad) anion resin and samples were processed following previously published methods (Rouxel et al., 2008a ; Escube et al., 2009). For all sample batches, an internal isotopic standard, SRM 3126 in saline seawater matrix was treated in the same condition as the samples.

Fe isotope measurements were conducted with the *Neptune* multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS; Neptune, Thermo Scientific) operated at the Pôle Spectrometry Ocean (PSO) Brest, using the method previously described by Rouxel et al (Rouxel et al., 2008a ; Rouxel et al., 2008c). Before isotopic analysis, all samples diluted at 200 ppb were spiked with a Ni standard solution at a final concentration of 200 ppb, in order to correct the instrumental mass bias). Isobaric interferences on Fe isotopes, such as <sup>40</sup>ArN<sup>+</sup> on <sup>54</sup>Fe, <sup>40</sup>ArO<sup>+</sup> on <sup>56</sup>Fe and <sup>40</sup>ArOH<sup>+</sup> on <sup>57</sup>Fe, were resolved in medium mass resolution mode (Arnold et al., 2003 ; Weyer and Schwieters, 2003 ; Dauphas and Rouxel, 2006). All Fe isotope ratios measured were reported to the relative Fe isotope standard IRMM-14 as the following equation:

$$\delta^{56}\text{Fe}(\text{‰})=1000*[(^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe})_{\text{sample}}/(^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe})_{\text{IRMM-14}}-1] \quad (1)$$

To determine the Fe isotope composition of Fe(II) and Fe(III) pools, we employed an isotopic mass balance approach:

$$370 \quad \Delta^{56}\text{Fe}_{\text{FeTotal}} = X_{\text{Fe(II)}} \times \delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}} + (1 - X_{\text{Fe(II)}}) \times \delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)}} \quad (2)$$

Where  $X_{\text{Fe(II)}}$  is the mole fraction for Fe(II) in the system.

As mentioned earlier, ferrozine assay of dissolved Fe confirm that dissolved Fe (DFe) is essentially as Fe(II) species. Hence, Fe(III) occurs mainly in the particulate pool, so that Fe(III) can be calculated as follow:

$$375 \quad \text{Fe(III)} = \text{FeT} - \text{Fe(II)} = \text{FeT} - \Delta\text{Fe}$$

Likewise, Fe isotopic fractionation between Fe(II) and Fe(III) is expressed as:

$$\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-Fe(III)}} = \delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}} - \delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)}} \quad (3)$$

### 3. Results

380

#### 3.1. Enrichment cultures in bioreactor

##### 3.1.1. Samples mineralogy

Quantitative XRD analysis and petrographic observations showed that the hydrothermal chimney (Sample 1747-BIG03E01, Table 2) was mainly composed of calcite and barite associated with fine grained sulfide minerals such as pyrrhotite, sphalerite and galena. Anhydrite, although initially present in the sample was not detected due to dissolution during sample preparation. This mineral assemblage is similar to previous mineral description of hydrothermal structures of Guaymas Basin (Peter and Scott, 1988). The XRD analysis also showed the presence of nontronite (possibly associated to amorphous silica) and aragonite (Table 2).

390

The main difference of mineral composition before and after incubation was in the lower abundance of calcite and the precipitation of ferrihydrite (Table 2).

Quantitative XRD analysis of the sediment (sample PI 1766 CT2 S4) showed the occurrence of various clay minerals with detrital minerals such as plagioclase, potassium feldspar and quartz (Table 2).

395

Total organic C content was not determined but is expected to be comprised between 2 to 4% as previously determined (Kastner, 1982). After incubation, the apparition of a hydrated iron sulfate mineral (copiapite) was observed (Table 2).

400 **Table 2:** Relative abundance of each mineral phase expressed in percentage of total abundance before (from ample stored for cultivation) and after enrichment culture (ex-situ sample). In bold are mineral phases having their relative abundances modified after the enrichment culture.

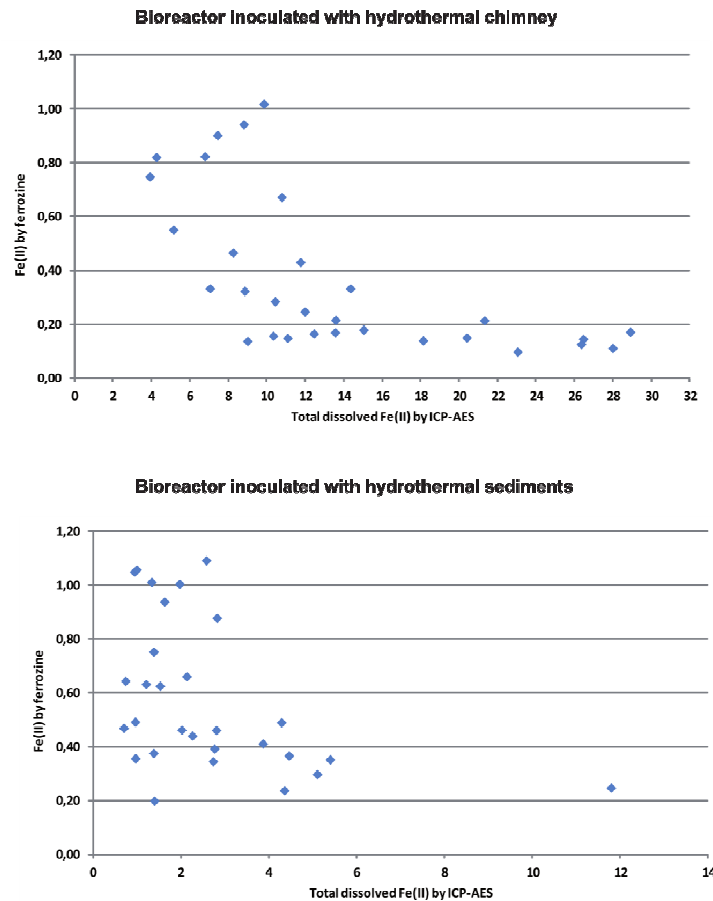
Mineral	Chemical formula	Raw flange sample	Bulk sample (end of the culture)
Anhydrite	CaSO <sub>4</sub>	0	0
<b>Calcite</b>	CaCO <sub>3</sub>	65	51
<b>Barite</b>	BaSO <sub>4</sub>	13	10
<b>Pyrrhotite</b>	Fe <sub>(1-x)</sub> S	9	7
Nontronite	(CaO <sub>0.5</sub> ·Na) <sub>0.3</sub> Fe <sup>3+</sup> <sub>2</sub> (Si·Al) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> ·nH <sub>2</sub> O	8	7
<b>Ferrihydrite</b>	(Fe <sup>3+</sup> ) <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·0.5H <sub>2</sub> O	<5	10
Sphalerite	ZnS	<5	<5
Aragonite	CaCO <sub>3</sub>	<5	<5
Galena	PbS	<5	<5

Mineral	Chemical formula	Raw sediment sample	Bulk sample (end of the culture)
<b>Clay / mica</b>		40	36
Potassium feldspar	(Ba,Ca,Na,K,NH <sub>4</sub> )(Al,B,Si) <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	16	16
<b>Plagioclase</b>		22	19
<b>Quartz</b>	SiO <sub>2</sub>	11	8
Pyrite	FeS <sub>2</sub>	6	6
<b>Clinopyroxene</b>		<5	9
Halite	NaCl	<5	0
Zircon	ZrSiO <sub>4</sub>	<5	<5
<b>Copiapite</b>	Fe <sup>2+</sup> Fe <sup>3+</sup> <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub> ·20(H <sub>2</sub> O)	0	<5

405 **3.1.2. Medium geochemistry and iron isotopes**

The comparison between Fe(II) analysis using the ferrozine method and total dissolve Fe measured by ICP-AES suggested that aqueous iron is mainly in the form of ferrous iron (Figure 1).

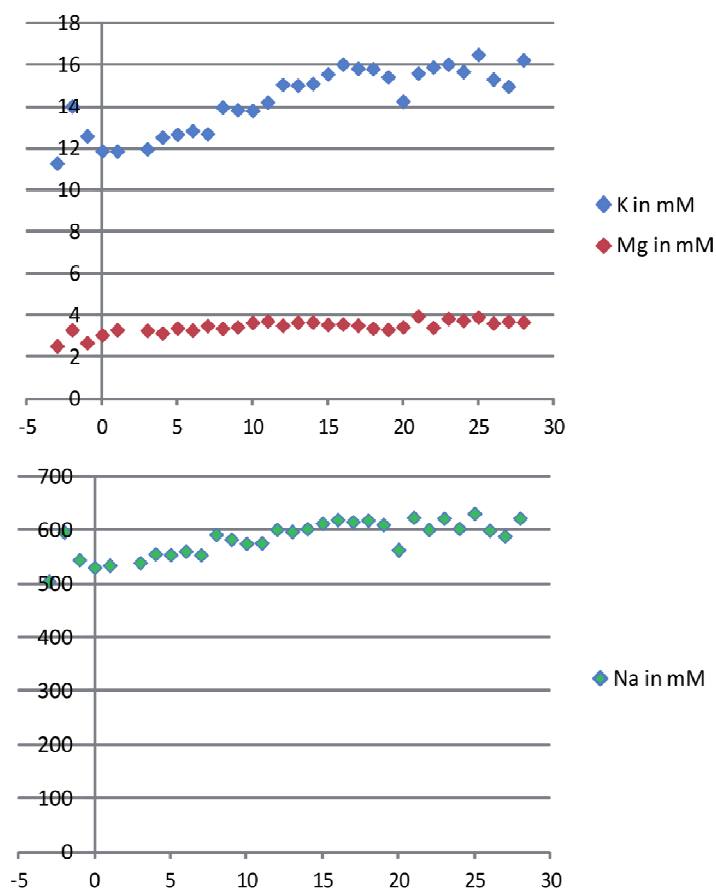


410 **Figure 1:** Dissolved iron measured with the Ferrozine method versus total dissolved Fe concentrations measured with the ICP-AES. In the top from the bioreactor inoculated with the hydrothermal chimney and in the bottom from the bioreactor inoculated with the hydrothermal sediments.

Results for the **chimney incubation (CB)** showed a rapid increase of dissolved and total Ba, Ca and Sr due to the partial dissolution and resuspension of carbonate and barite-rich chimney substrate. The increase of dissolved Ba concentration was more prominent after 15 days while total Ba concentration tends to decreased at the same time. Dissolved Mn slightly increased until day 6 then it decreased while total Mn decreased steadily throughout the experiment. In contrast, total and dissolved P and Si increased through time.

420 Total Fe showed a steady decrease through time, from about 500 mg/L to 200 mg/L which result mainly from dilution of the initial Fe(III)<sub>am</sub> solution with fresh medium. In contrast, results of dissolved Fe concentration showed a sharp increase from days 3 to 8 reflecting active production of Fe(II) in the bioreactor, while concentrations decreased after to almost initial values.

425 The steady increase of dissolved Na, K and Mg concentrations throughout the experiment (Figure 2) was considered to result predominantly from the evaporation of the culture medium due to vigorous heating at 80°C and continuous gas sweeping.



**Figure 2:** Time series of sodium (Na), potassium (K) and magnesium (Mg) concentrations in the chimney enrichment culture.

430

Results for the **sediment incubation** (SB) showed similar but also different features than for the CB experiment, such as (1) rapid increased of Ca, but not Ba and Sr due to lower carbonate content in the original sample; (2) steady decreased of total Fe concentration through time; (3) dissolved Si increased due to silicates phases dissolution; and (4) Al and Zn are mostly under particulate form (dissolved Cu below detection), sharp increased of total concentrations due to re-suspension.

435

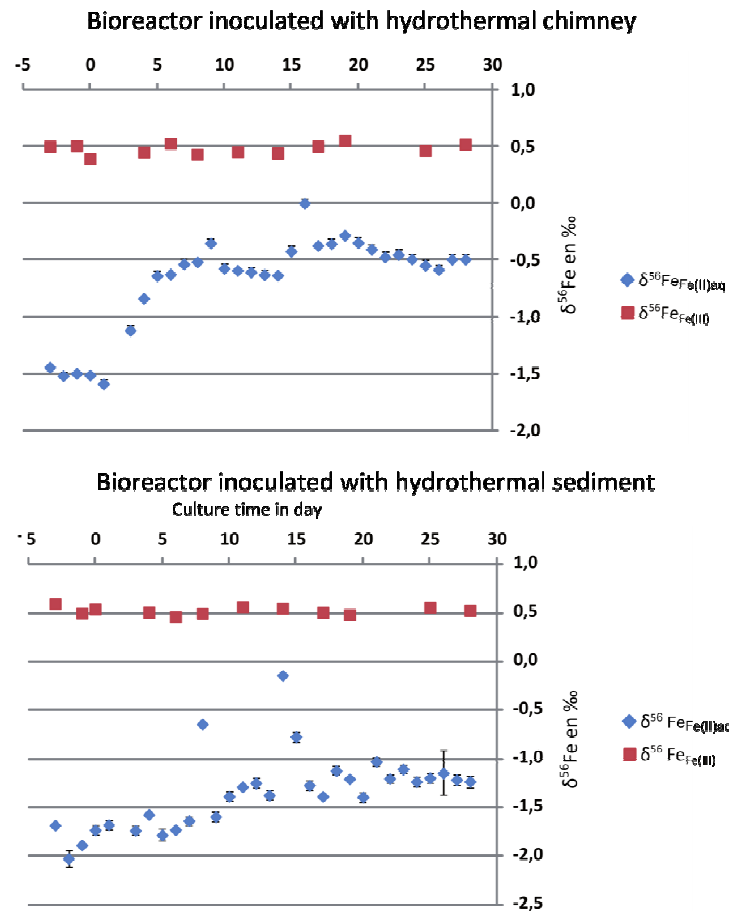
As mentioned above, the pH dropped below 6, during the night of day 13 due to electrical failure. This resulted in concentration spike of many dissolved elements, such as Fe, Al, Ca, Mn, Sr due to enhanced mineral dissolution at low pH. K also increased but only when pH returns to normal in day 15. In general, particulate element concentration remained unaffected by pH change but rather by stirring efficiency and sedimentation in the bioreactor.

440

In contrast to CB experiment, evaporation was almost negligible through the SB experiment.

Before inoculation, the Fe isotope composition of total Fe corresponding to the  $\text{Fe(III)}_{\text{am}}$  pool yielded  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)}}$  value at around 0.5‰ ( $\pm 0.06$ ). This value remained unchanged through the experiment

445 (Figure 3). Note that  $\delta^{56}\text{Fe}_T \sim \delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)}}$  considering that dissolved Fe(II) always represent a small fraction of the total Fe pool.



**Figure 3:** Isotopic signature of total and ferrous iron in the two bioreactors, before and after inoculation. 0 corresponds to the inoculation.

450 Initial  $\delta^{56}\text{Fe}$  values for  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  before inoculation were negative, and ranged from -1.5‰ for CB experiment down to -1.8‰ for SB experiment. This corresponded to  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}-\text{Fe(III)}}$  between -2.0 and -2.4‰, reflecting rapid Fe isotope exchange between the initial Fe(II) pool in the culture medium and  $\text{Fe(III)}_{\text{am}}$  at 80 °C.

455 After inoculation of the chimney (CB),  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}}$  values increased rapidly from -1.6‰ at day 1 to -0.4‰ at day 9. This period corresponded to the production phase of FeII in the CB bioreactor, where FeII increased from 7 mg/L to 28 mg/L. After this period,  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}}$  values remained nearly constant until the end of the experiment ( $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}} = -0.47\text{‰} \pm 0.11$ ) while Fe decreased to values at around 8 to 10 mg/L.

460 After inoculation of the sediment (SB),  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}}$  values did not display the same rapid increase as for the chimney incubation. Instead, values were steadily increasing from -2.0 to -1.2‰ over the 27 days of incubation. The results also showed that the pH drop at day 14-15 affected not only Fe concentrations, but also  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}}$  values (Figure 3). During this transient event,  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}}$  values increased to up to -0.1‰, before returning to values of 1.2‰.

**3.1.3. Active microbial communities diversity “in situ” and “in culture”: evidence for potential DIR**

465

**Microbial diversity in the hydrothermal chimney (sample 1747-BIG01E03):** As previously described (Callac et al., 2013 submitted), the active archaeal community was composed of *Thermococcus sp.*, *Archeoglobus sp.*, *Methanococcus sp.*, *Methanothermococcus sp.* and *Methanopyrus sp.* representatives. The bacterial sequences were mostly affiliated to the *Epsilonproteobacteria*. Some *Deltaproteobacteria* were also retrieved, as well as, the Guaymas bacterial group (Teske et al., 2002), *Aquificales*, *Thermodesulfobacteriales* and members of the *Chloroflexi* division. According to the Q-PCR data (Figure 4), *Bacteria* were widely dominant in the sample.

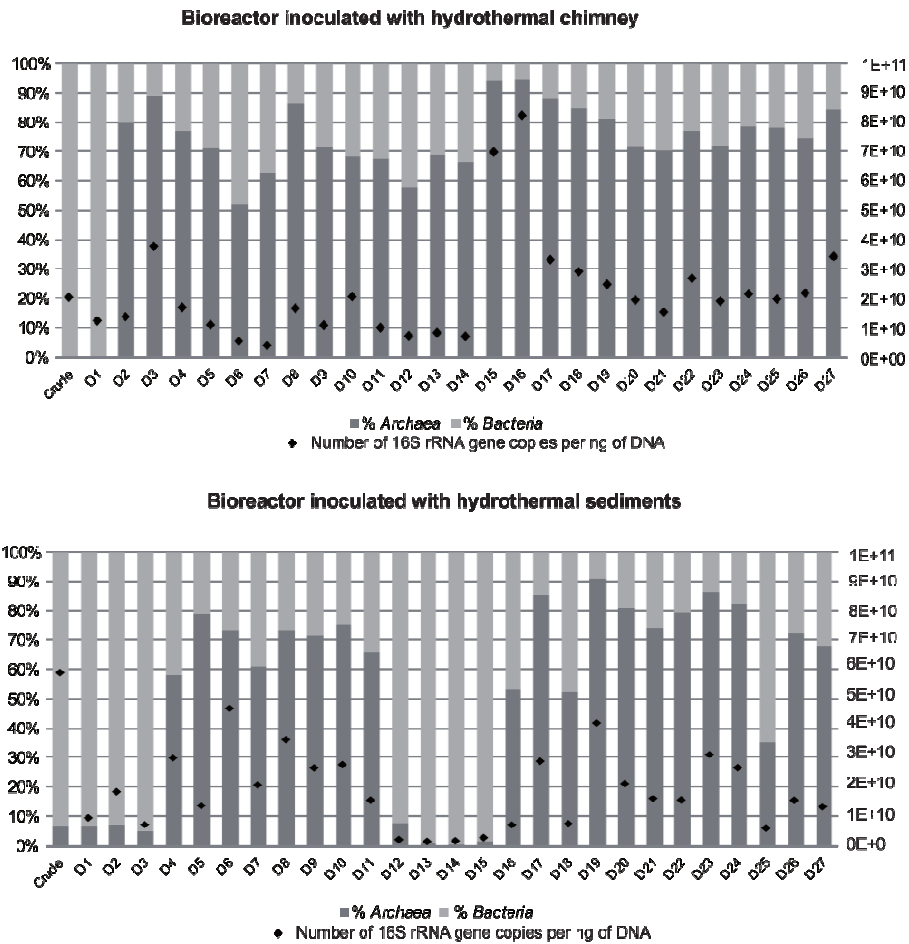
470

475

**Microbial diversity in the hydrothermal sediments (sample PI 1766 CT2 S4):** The archaeal sequences retrieved from cDNA were in majority affiliated to the ANME especially to ANME-1a and ANME-1GBa (Merkel et al., 2013), few MBG-C (Marine Benthic Group C), as well as uncultured *Euryarchaeota* and uncultured *Crenarchaeota* were also found. The active bacterial community was composed of *Deltaproteobacteria*, *Thermotogales*, *Thermodesulfobacteriales*, Guaymas Bacterial group, *Chloroflexi* division, Candidate division OP1 and OP3 and uncultured bacteria.

480

Like for the chimney sample, the Q-PCR data showed that *Bacteria* were widely dominant in the sediment sample (Figure 4).



**Figure 4:** Total of number of 16S rRNA gene copies per ng of whole DNA in the in-situ sample and in the bioreactor culture determined by Q-PCR results. Archaea and Bacteria ratio expressed in percentages of number of 16S rRNA gene copies per ng of whole DNA determined by Q-PCR in the two bioreactors.

485

Throughout all incubation experiments, growth was observed and low (i.e. below  $10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>) and variable cell densities were observed. Active archaeal and bacterial communities were investigated by constructing RNA transcript libraries from selected samples according to PCR-ARISA profiles. So :  
 490 Active archaeal and bacterial communities were investigated using PCR-ARISA fingerprints on all samples and constructing RNA transcripts libraries from selected samples.

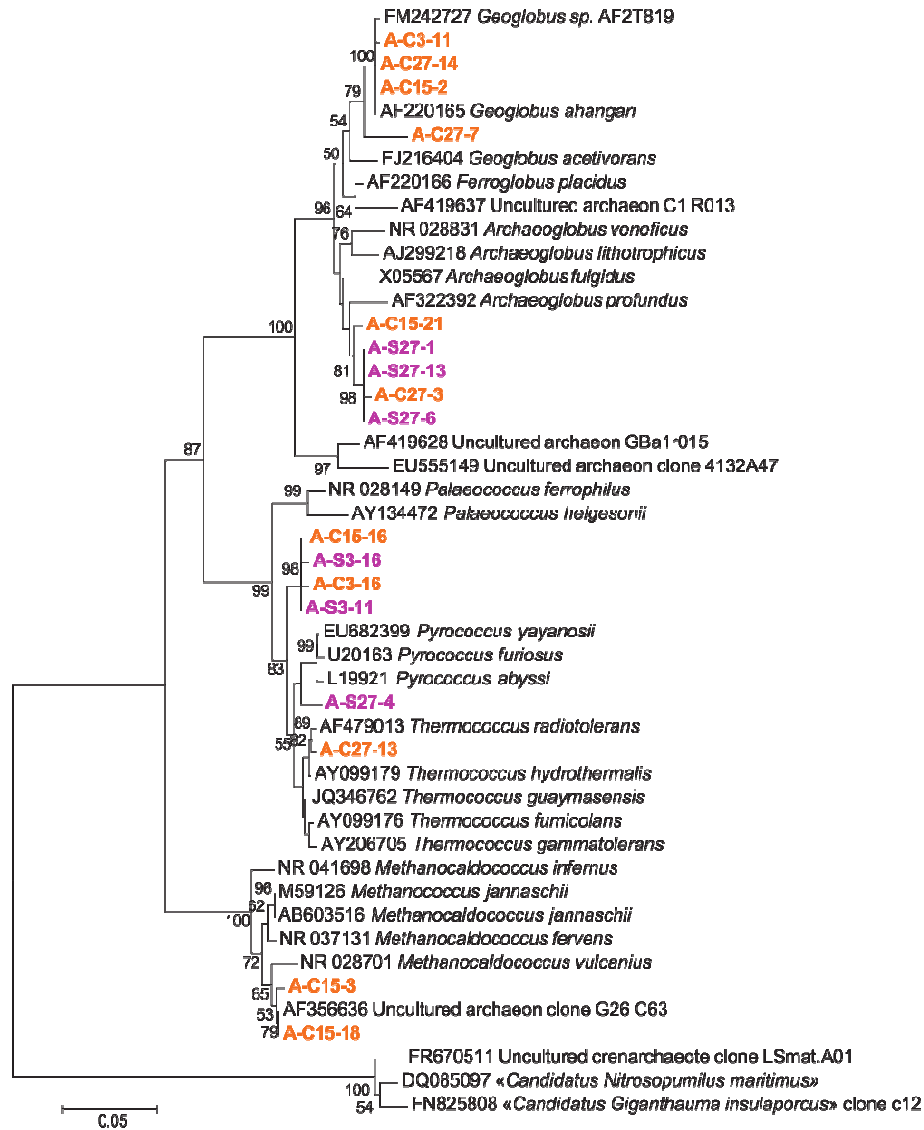
490

**In CB:** According to Q-PCR data, bacterial community is dominant at the beginning while archaeal community becomes dominant throughout most of the cultivation time (Figure 4). The PCR-ARISA profiles show that both archaeal and bacterial communities are similar from day 3 to 27; samples choose for the diversity analysis was D3, D15 and D27. At day 3, archaeal community was composed by *Thermococcus sp.* and *Geoglobus sp.*; while *Thermococcus sp.*, *Geoglobus sp.*, *Archaeoglobus sp.* and *Methanococcus sp.* were present at day 15. At the end of the culture (day 27), *Thermococcus sp.*, *Geoglobus sp.*, and *Archaeoglobus sp.* were also present. With respect to bacterial communities,  
 500 sequences affiliated to the *Betaproteobacteria*, the *Gammaproteobacteria* and to the

500



*Actinomycetales* were retrieved in day 3, while at the end of the culture, bacterial community was mainly composed by *Thermotoga sp.* The occurrence throughout the culture of phylotypes closely affiliated to the genera *Geoglobus* and *Thermotoga* were an evidence of active dissimilatory iron reduction (Figures 5 and 6).



505

**Figure 5:** Neighbor-joining distance phylogeny of the Archaea based on 16S rRNA gene sequences obtained in the enrichment culture in orange phylotype from the bioreactor chimney and purple for the bioreactor sediments. Bootstrap values above 50% based on 1000 replicates are reported. The Thaumarchaeota are used as outgroup.

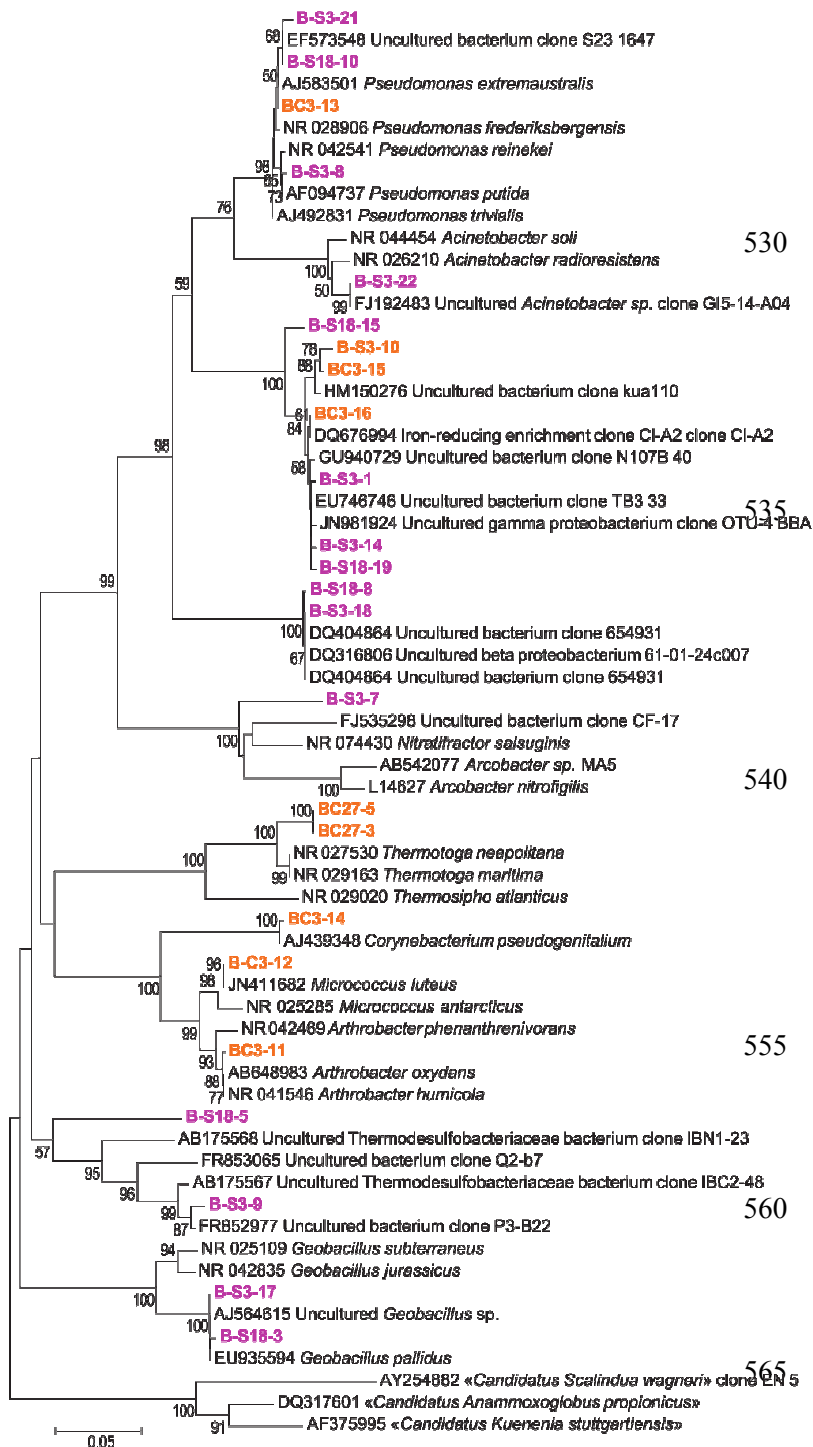
510

**In the SB:** Q-PCR data indicated that bacterial community is dominant in the initial sample and the archaeal were dominant throughout the incubation experiment (Figure 4).

515

The PCR-ARISA profile of *Archaea* similar was for all samples while data are more complex for *Bacteria*; samples choose for the diversity analysis was D3, D15 and D27 for the archaeal diversity

and D3, D18 and D27 for bacterial diversity. The archaeal community was composed of *Thermococcus sp.* at the beginning of the experiment (day 1 and 3) while *Thermococcus sp.*, *Geoglobus sp.*, and *Archaeoglobus sp.* are present in day 18. At day 3, the bacterial sequences were  
 520 affiliated to the *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Firmicutes* division and to uncultured *Bacteria*; and at day 18, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* and also to the *Firmicutes* division are present. The occurrence throughout the culture of phylotypes closely affiliated to the genus *Geoglobus* is a putative evidence of active dissimilatory iron reduction (Figures 5 and 6).



**Figure 6:** Neighbor-joining distance phylogeny of the Bacteria based on 16S rRNA gene sequences obtained in the enrichment culture in orange phylotype from the bioreactor chimney and purple for the bioreactor sediments. Bootstrap values above 50% based on 1000 replicates are reported. The Planctomycetes are used as outgroup.

### 3.2. Batch experiments with pure cultures

In each vial, the total concentration of Fe was around 10mM. This concentration correspond to the amount of ferric iron oxy-hydroxide (Fe(III)<sub>am</sub>) that was added to each vials in the culture medium. The variation of Fe concentrations between 9 and 11 mM was due to the heterogeneity of the poorly crystalline ferric iron oxy-hydroxide solution) (Table x).

560

The initial Fe isotope composition of the total Fe corresponding to Fe(III)<sub>am</sub> is 0.51‰ ±0.03 (Table 3) and remained constant throughout the experiment.

Ferrozine essay of dissolved Fe also show that Fe(II) was the predominant dissolved species in all experiments (Table). Hence, δ<sup>56</sup>Fe values for dissolved Fe were considered to be a good proxy for Fe(II) isotope composition.

565

At t<sub>0</sub> (room temperature, 20°C) immediately after inoculation of the culture, dissolved iron concentrations were measured at 0.06 mM to 0.1 mM for *Geoglobus acetivorans* and *Thermotoga maritima* cultures respectively. Initial δ<sup>56</sup>Fe values for Fe(II)<sub>aq</sub> were negative, and ranged from -1.7 to -2.0‰ for both biotic experiment and abiotic controls. This corresponds to Δ<sup>56</sup>Fe(III)-(II) between -2.2 and -2.5‰, reflecting rapid coupled Fe atom electron exchange (see Discussion) between the initial Fe(II) pool introduced in the culture medium and Fe(III)<sub>am</sub> at 20°C.

570

Subsequently, culture medium and abiotic controls were incubated at 80°C and sampled at regular time intervals (5h, 9h, 24, 48h).

575 **Table 3:** Cell concentration and iron isotopic data from *Geoglobus acetivorans* cultures and abiotic controls and for *Thermotoga maritima* cultures and abiotic controls. Control 1 corresponds to the pre-culture filtered supernatant used as inoculum and the control 2 to the abiotic condition

		nb cellx <sup>ml</sup> <sup>-1</sup>	Time (hour)	Fe(II) μM	Fe(III) mM	δ <sub>56</sub> Fe Fe(II)	2σ	δ <sup>56</sup> Fe Fe(III)	2σ	Δ <sup>56</sup> Fe (F-NF)
<b><i>Geoglobus acetivorans</i></b>	Culture		0	61.69	10.41	-1.91	0.03			-2.41
	Culture	1.1 10 <sup>7</sup>	8	49.42	10.88	-1.38	0.03			-1.88
	Culture	7.80x10 <sup>7</sup>	9	55.33	8.83	-1.25	0.03			-1.75
	Culture	6,36x10 <sup>7</sup>	24	68.35	9.31	-1.17	0.03			-1.67
	Culture	1.40x10 <sup>8</sup>	48	54.35	9.10	-1.72	0.03	0.50	0.06	-2.22
	Control 1		48	84.18	9.14	-1.15	0.03	0.51	0.06	-1.65
	Control 2		48	73.15	8.67	-0.99	0.03	0.49	0.06	-1.49
<b><i>Thermotoga maritima</i></b>	Culture		0	89.66	9.51	-1.96	0.03	0.51	0.06	-2.46
	Culture	4.00 x10 <sup>6</sup>	5	116.66	9.74	-0.85	0.03	0.51	0.06	-1.35
	Culture	8.80Ex10 <sup>7</sup>	9	162.78	8.61	-0.64	0.05	0.52	0.06	-1.14
	Culture	1.32x10 <sup>8</sup>	24	256.27	10.70	-0.41	0.03	0.50	0.06	-0.91
	Culture	2.00x10 <sup>8</sup>	48	297.58	8.59	-0.32	0.03	0.48	0.06	-0.82
	Control 1		48	116.93	9.12	-0.75	0.03	0.47	0.06	-1.25
	Control 2		48	116.51	9.88	-0.77	0.03	0.50	0.06	-1.27

580 ***Geoglobus acetivorans*** growth from  $4 \times 10^6$  cells.ml<sup>-1</sup> at 5h to  $2 \times 10^8$  cells.ml<sup>-1</sup> after 48 h of culture was observed and was associated to dissolved iron concentration varying from 2.76 mg/L to 3.03 mg/L.

Despite evidence of effective growth, cultures of *Geoglobus acetivorans* and their abiotic controls (i.e. using culture filtrate and sterile control) yielded similar Fe(II) concentrations (Table3). This showed a none detectable – or absence of production of Fe(II) by *Geoglobus acetivorans* cultures. By 585 contrast,  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}}$  values at 48h are different between biotic experiments and abiotic controls,  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}} = -1.7\text{‰}$  and  $\sim -1.1\text{‰}$  respectively. In the case of biotic experiment, the difference  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-Fe(III)}}$  remain constant at  $-1.7\text{‰}$  during the first 24h, before decreasing back to  $-2.2\text{‰}$  at T+48h.

***Thermotoga maritima*** growth from  $1 \times 10^7$  cells.ml<sup>-1</sup> at 5h to  $1.4 \times 10^8$  cells.ml<sup>-1</sup> after 48 hours of 590 culture was observed and was respectively associated to dissolved iron concentration varying from 6.51 mg/L and to 16.60 mg/L.

So with respect to the *Thermotoga maritima* growth, Fe(II)<sub>aq</sub> concentrations increased in contrast with the abiotic controls prepared using culture filtrate and sterile medium, where Fe(II)<sub>aq</sub> concentration remained at 5 mg/L. Those results, together with increased cell counts suggested 595 active production, albeit limited, of Fe(II) through dissimilatory Fe reduction of Fe(III)<sub>am</sub> substrate. In the case of abiotic controls,  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-Fe(III)}}$  was slightly higher than for *Geoglobus acetivorans* controls, with values at  $-1.25\text{‰}$  (compared to  $-1.49\text{‰}$ ).  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-(III)}}$  values measured for *Thermotoga maritima* cultures showed a rapid decrease at T=5h (from  $-2.5\text{‰}$  at 20°C, T=0 to  $-1.35\text{‰}$  at 80°C). From T=5h to T=48h, Fe(II) concentration increased while  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-(III)}}$  values decreased down to - 600 0.8‰.

#### 4. Discussion (in progress)

##### 4.1. Communities cultures

605

##### 4.1.1. Microorganisms involved directly or indirectly in iron reduction

In both bioreactors, active members of the genus *Geoglobus* (closely affiliated to *Geoglobus ahangari*) were detected. The detection of this phylotypes, associated with the production of Fe(II) strongly point out that dissimilatory iron reduction have took place in the bioreactors. To date, only two 610 *Geoglobus species* were isolated from hydrothermal vents: *Geoglobus ahangari* (Kashefi et al., 2002a) and *G. acetivorans* (Slobodkina et al., 2009b). They are hyperthermophilic anaerobic *Archaea* able to growth on poorly crystalline ferric iron (Fe (III)) as sole electron acceptor through dissimilatory iron-reduction (DIR). Both are also facultative chemolithoautotrophs able to grow chemoorganotrophically

on organic compounds as organic acids or amino acids and to oxidize long-chain fatty acids. In  
615 addition, in the CB, members of the genus *Thermotoga* were detected. They are hyperthermophilic  
bacteria, initially considered as fermentative, sulfur-reducers (Huber et al., 1986). But it was proved  
that some *Thermotogales* as *Thermotoga maritima* is also able to use Fe (III) as electron acceptor  
with H<sub>2</sub> as electron donor and organic compounds as carbon sources (Vargas et al., 1998).

Also it is interesting to note the occurrence of *Thermococcus* species in both bioreactor, members of  
620 this genus were shown to reduce ferric iron (Slobodkin et al., 1999a ; Slobodkin et al., 2001 ; Byrne et  
al., 2009 ; Davidova et al., 2012).

Another interesting point is the presence of sequences affiliated to *Methanococcus sp.* in "BC". While  
methanogenesis was shown to be inhibited in the presence of ferric iron (van Bodegom et al., 2004),  
it has been described that some *Methanoarchaea* (e.g. *Methanococcus voltaei* and *Methanococcus*  
625 *thermolithotrophicus*) are able to reduce ferric iron (Vargas et al., 1998 ; Bond and Lovley, 2002 ; van  
Bodegom et al., 2004).

These microbial surveys demonstrate that dissimilatory iron reduction was active in both bioreactors.  
The continuous intake of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> as well as the availability of yeast extract acetate and formate  
offered convenient conditions for a range of iron reducers such as *Geoglobus* and *Thermotoga*  
630 species.

Phylotypes closely affiliated with the genus *Archaeoglobus* were detected in both bioreactors. In  
particular, all the members of this genus are sulfate-reducers (Burggraf et al., 1990 ; Beeder et al.,  
1994 ; Huber et al., 1997 ; Mori et al., 2008 ; Steinsbu et al., 2010). So the occurrence of  
*Archaeoglobus*-related species, in the absence of addition of sulfate or sulfur in the culture medium  
635 suggests that they found convenient sulfate substrates, presumably from mineral dissolution.

Besides Fe reducers, sulfate and sulfur reducers may also affect Fe biogeochemistry in many ways: (1)  
by inhibiting DIR; (2) by enhancing chemical reduction of Fe(III) with H<sub>2</sub>S; (3) by decreasing FeII due  
to precipitation with H<sub>2</sub>S into insoluble FeS precipitate.

#### 640 **4.1.2. Geochemistry of iron in bioreactors: evidence of dissolution, precipitation phase and DIR**

During the experiment, the medium interacted with the mineral substrate used as inoculum. These  
fluid / mineral interactions may have induced mineral dissolution and/or precipitation due to a  
combination of parameters, such as changes in chemical species reactivity, temperature, pH and  
645 microbial activity. In addition, due to continuous input of fresh medium in the bioreactor together  
with gas purge, dilution and evaporation effects can also contribute to the evolution of observed  
chemical concentrations. Hence, it is essential to first correct the effect of medium evaporation by  
correcting all elemental concentrations by normalization to the same Na concentrations taken at Na

650 = 9 g/L (the concentration of the initial artificial seawater medium). Since Na is generally conservative, this approach allowed discussing Na-normalized values of other elements as solely the result of mineral-medium interactions or dilution with fresh culture medium.

655 **In BC**, dissolved iron increased during the first 8 days of culture consistently with biological production of Fe(II) from DIR. Dissolved Fe concentration then decreases. In order to address the effect of dilution with fresh culture medium devoid of Fe, dissolved Fe concentrations are normalized to total Fe (**Figure X**). It shows that Fe(II) concentrations decreases from day 8 to 13 and remain constant until the end of the experiment. The decrease of FeII may result from the combination of several effects: a decreases of the rate of DIR, adsorption processes of the dissolved iron onto the poorly insoluble crystalline ferric iron oxy-hydroxide (Fe(III)), ferrihydrite or/and co-precipitation into insoluble FeS precipitate. Since an increase of the concentration of dissolved Ba was observed throughout the culture (**Figure X**), it is possible that barite dissolution provided enough sulfate to the medium to stimulate sulfate reducers and precipitate Fe(II) as Fe-sulfides. In general, FeS precipitation produces Fe isotope fractionation (Butler et al., 2005 ; Guilbaud et al., 2011b) toward negative values, leaving remaining Fe(II) depleted in light Fe isotopes. The lack of increase of  $\delta^{56}\text{Fe}$  Fe(II) in the interval Days 8 to 15 therefore argue against such effect.

665 **In BS**, the lack of Fe(II) enrichment in the early stage of the experiment and the pH drop at day 14 preclude discussing further the results.

## 4.2. Batch cultures

670

### 4.2.1. Abiotic Fe isotopic fractionation

For all culture experiments with pure strains (ie. batch experiments), we performed several sets of abiotic experiments using both culture filtrate and sterile control. The experiment using culture filtrate involved the addition of initial growth culture used as inoculum but filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  filter. This allows testing the effect of culture medium and produced metabolites on Fe isotope fractionation. In contrast, the sterile control consisted of non-inoculated culture composed only of growth medium and Fe(III) substrate. Results show that significant quantity of Fe(II) is present in the medium without the activity of DIR. In addition, Fe(II) was also present at the beginning of all biotic experiments immediately after inoculation, suggesting that the growth medium contain about 1% of total Fe as dissolved Fe (ie. 99% of total Fe is present as Fe(III) particulate). In addition, the ferrozine essay of total dissolved Fe pool revealed the predominance of Fe(II).

680

The determination of Fe isotope fractionation factors between Fe(II) and Fe(III)<sub>am</sub> ( $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-Fe(III)}_{\text{am}}}$ ) shows important features: (1) culture filtrate and sterile control of *Thermotoga maritima* and

*Geoglobus acetivorans* done at 80°C yielded  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-Fe(III)am}} = -1.25$  and  $-1.57\text{‰}$  respectively. (2)  
 685 initial  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-Fe(III)am}}$  values at 20°C were  $\sim -2.4\text{‰}$  for all experiments, including both biotic and abiotic experiments.

Previous abiotic experiments and theoretical calculation have determined the equilibrium Fe isotope fractionation between dissolved Fe(II) (i.e.  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ ) and Fe(III) (i.e.  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ ) (Johnson, et al., Welch et al., Anbar et al) at about 3‰ at 20°C. Other experiments done with hematite at pH 7 in the  
 690 absence of Si or in the presence of Si, also reported  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq-Fe(III)reac}}$  at  $-2.96 \pm 0.12\text{‰}$  and  $-3.21 \pm 0.50\text{‰}$  respectively (Wu et al., 2010a). Extrapolated  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-Fe(III)}}$  values at higher temperature can be determined using the empirical fit to experimental data, using the equation  $10^3 \cdot \ln(\alpha) = ([0.334 \pm 0.032] \times 10^6)/T^2 - 0.88 \pm 0.38$ , with T in Kelvin. This yields  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-Fe(III)}}$  values  $\sim 1.8\text{‰}$  at 80°C which is identical within uncertainties to the maximum fractionation factors obtained in abiotic  
 695 experiments at this temperature ( $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq-Fe(III)aq}}$  between  $-1.2$  to  $-1.7\text{‰}$ ). In contrast, calculated  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-Fe(III)am}}$  values  $\sim 2.4\text{‰}$  at 20°C lies between Fe isotope fractionation factors for Fe(II)aq – goethite ( $\Delta^{56}\text{Fe} \sim -1.05$ ) and Fe(II)aq – hydrous ferrous oxide ( $\Delta^{56}\text{Fe} \sim -1.05$ ) and is identical to Fe(II)aq-Si-HFO fractionation factor ( $\Delta^{56}\text{Fe} \sim -2.6\text{‰}$ ) (Wu et al., Beard et al.).

Equilibrium isotope fractionation is driven by fundamental changes in bonding environments  
 700 (Schauble etc.). Hence, it is likely that differences observed for Fe isotope fractionation factors between Fe(II) and ferrihydrite (i.e. amorphous hydrous ferric oxide) is due to differences in Fe bonding environments. It is also likely that our Fe(III)am substrate recrystallized, at least partially, to various forms of hydrous ferric oxides (e.g. 6-line ferrihydrite) or even goethite during the extended incubation period and increase of temperature. This will lead to differences in estimated Fe isotope  
 705 fractionation factors between Fe(II)aq and solid-phase Fe(III).

Numerous studies have highlight that Fe(II)<sub>aq</sub> produced by pure DIR strain or DIR microbial communities, had a negative and a lower  $\delta^{56}\text{Fe}$  signature than the Fe(III) used as substrate (Icopini et al., 2004b ; Crosby et al., 2005b ; Johnson et al., 2005a ; Crosby et al., 2007b ; Wu et al., 2009a).

710 Also, other studies have reported that abiotic Fe(II)<sub>aq</sub>-Fe(III) oxides interaction produce small amount of low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  signature than the Fe(III) used as substrate (Wu et al., 2010a). Thus in natural modern and ancient systems, the origin: DIR or abiotic, of negative  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  signature is still debated (Rouxel et al., 2005b ; Anbar and Rouxel, 2007 ; Johnson et al., 2008b ; Johnson et al., 2008c). Moreover, to date, this debate is focused on the generated quantities of low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$   
 715 produced where it was postulated that DIR produced bigger quantities of low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  than the abiotic reactions which on the contrary generate small amount of low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$ .

Several mechanisms have been envisioned to explain Fe isotope fractionation during the DIR. The first, the “ligand fractionation model”, proposed by Beard and colleagues (Beard et al., 2003b) and

Johnson and colleagues (Johnson et al., 2004), was based on the isotopic fractionation between a  
 720 pool of ligand-Fe(III) and the dissolved Fe(II).

The “electron transfer and atom exchange model” made by Crosby suggest that the Fe isotope  
 signature of the Fe(II)<sub>aq</sub> is due to the electron transfer and isotope (atom) exchange between the  
 adsorbed or aqueous Fe(II) and the reactive layer (Fe(III)<sub>reac</sub>) on the Fe(III) oxide substrate (Crosby et  
 al., 2005b ; Crosby et al., 2007b). These reaction lead to produce a Fe(II)<sub>aq</sub> pool with a low  $\delta^{56}\text{Fe}$  values  
 725 compare to the  $\delta^{56}\text{Fe}$  value of the reactive ferric surface and estimate a lower effect of the sorption  
 in the Fe isotope variation. Another model consider that the Fe isotope fractionation is driven by the  
 sorption of Fe(II) onto ferric oxides; and that is during this bonding that occurs the electron transfer  
 (Icopini et al., 2004b ; Jang et al., 2008). It was also showed, in abiotic system where Fe(II) and Fe(III)  
 oxide are in close vicinity, that isotopic exchange occurs probably by the involvement of sorbed  
 730 Fe(II)(Wu et al., 2010a).

#### 4.2.2. DIR and mechanisms of Fe isotope fractionation

*Geoglobus acetivorans* and *Thermotoga maritima* were initially selected because (1) many sequences  
 detected in enrichment cultures of hydrothermal chimneys and sediments were closely affiliated  
 735 with the genera *Geoglobus* and *Thermotoga* and (2) members of these two genera are known to be  
 iron-reducers (Vargas et al., 1998 ; Kashefi et al., 2002a ; Slobodkina et al., 2009b).

However, despite many attempts and selection of appropriate culture medium, it appears that  
*Geoglobus acetivorans* exhibit rather a fermentative metabolism rather than an iron-reduction  
 metabolism in contrast to previous studies (Slobodkina et al., 2009b). Hence, only experiments with  
 740 *Thermotoga maritima*, for which significant production of Fe(II) has been observed, will be discussed  
 in this section.

For the duration of the experiment and during all the step of the culture: latency (5 hours of culture),  
 exponential (9 hours), late exponential to stationary (24 hours) or decline phase (48 hours), the  
 $\delta^{56}\text{Fe}_{(\text{Fe(II)})}$  value increases gradually respectively as -0.85‰ after 5h of incubation, -0.64‰ after 9h, -  
 745 0.41‰ at 24h of culture to -0.32‰ at the end (Table X).

A general increase of  $\delta^{56}\text{Fe}$  values for aqueous Fe(II) (or adsorbed Fe(II)) has been also reported in  
 previous experiments with *Geobacter sulfurreducens* (Crosby et al., 2005b ; Johnson et al., 2005a),  
*Shewanella putrefaciens* (Crosby et al., 2007b) and *Shewanella algae* (Johnson et al., 2005a) using  
 hematite as substrate. In contrast, our data differ from those obtained during experiments with *G.*  
 750 *sulfurreducens* (Crosby et al., 2005b) and *S. putrefaciens* (Crosby et al., 2007b) using goethite as  
 substrate for which a decreased of the  $\delta^{56}\text{Fe}_{(\text{Fe(II)})}$  value was observed at the end of incubation. Owing  
 to mass balance considerations, those changes of  $\delta^{56}\text{Fe}_{(\text{Fe(II)})}$  values are compensated by changes in



$\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(III)}_{\text{reac}}}$  values for reactive Fe(III) which represent a small amount of the ferric oxide surface. Hence,  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}_{\text{aq}}-\text{Fe(III)}_{\text{reac}}}$  obtained with *G. sulfurreducens* and *S. putrefaciens*, with hematite or goethite remained constant over the experiments (Crosby et al., 2005b ; Crosby et al., 2007b).

Using hematite as iron substrate and *G. sulfurreducens* or *S. putrefaciens*, at 30°C, the  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}_{\text{aq}}-\text{Fe(III)}_{\text{reac}}}$  was determined  $-2.95 \pm 0.19\text{‰}$ . After 48h of incubation with *T. maritima* the Fe isotope fractionation between the  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  and the  $\text{Fe(III)}_{\text{am}}$  was  $-0.81 \pm 0.03\text{‰}$  which is about 0.5‰ smaller than for abiotic controls and 1‰ smaller than for equilibrium isotope fractionation between  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ - $\text{Fe(III)}_{\text{aq}}$ .

Two mechanisms of dissimilatory iron-reduction are distinguished : the first which consist in a direct contact between the cells and the surface of the Fe(III)-bearing mineral (i.e. for *G. sulfurreducens*); and the second, which occurs without direct contact between the cells and the Fe(III) mineral and in this case, Fe(III) is reduced indirectly by extracellular electron shuttling compounds (i.e. quinones for *Shewanella oneidensis* (Newman and Kolter, 2000), flavins for *S. oneidensis* MR-1 and *Schewanella sp.* MR-4 (Marsili et al., 2008)). Nothing is known about the process used by *T. maritima* to reduced Fe(III): direct or indirect contact. However, data obtained for abiotic control using culture filtrate suggests no production of Fe(II). In the case of the production of extracellular electron shuttles *T. maritima* , an increase of dissolved Fe concentration would be expected using the culture filtrate. Hence, it can suggested that *T. maritima* requires direct contact with Fe(III) oxide for Fe(III) reduction. The mechanism of Fe isotope fractionation during iron reduction by *T. maritima* may occur during the electron transfer and atom exchange between  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  produced and the pool of  $\text{Fe(III)}_{\text{am}}$  oxides. Unfortunately, since the pool of reactive  $\text{Fe(III)}_{\text{reac}}$  has not been determined isotopically, the exact Fe isotope fractionation factor during DIR remains unsure. However, considering that our estimated  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}_{\text{aq}}-\text{Fe(III)}_{\text{am}}}$  values for biotic controls are globally in agreement with previous report of  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}_{\text{aq}}-\text{Fe(III)}_{\text{reac}}}$  it is likely that measuring the  $\text{Fe(III)}_{\text{reac}}$  pool would not change our results.

It has been previously suggested that the role of bacteria in producing Fe isotope fractionations during DIR lies in catalyzing coupled atom and electron exchange between  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  and  $\text{Fe(III)}_{\text{reac}}$  so that equilibrium Fe isotope partitioning occurs (Crosby et al., 2007). However, it is important to stress that our abiotic controls approach equilibrium Fe isotope partitioning while biotic experiments deviate more from equilibrium. It is possible that measured  $\delta^{56}\text{Fe}$  values for  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  varied as a function of the relative proportions of  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  ,  $\text{Fe(II)}_{\text{sorb}}$ , and  $\text{Fe(III)}_{\text{reac}}$  during biotic reduction which is different that fore abiotic experiments.

Unlike other studies of iron isotope fractionation by pure DIR strains where greater quantities of low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{(Fe II)}}$  are produced (Crosby et al., 2005b ; Johnson et al., 2005a ; Crosby et al., 2007b ; Wu et al., 2009a), it appears that thermophilic organisms such as *T. maritima* exhibits much smaller Fe(II) production, with lower  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{(Fe II)}}$  value.

### 4.3. Significance of Fe isotope biosignatures in modern hydrothermal systems

790

#### 4.3.1. In search for Fe isotope biosignatures in enrichment culture

795

Throughout the enrichment culture in both CB and SB, the  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  isotope composition become less and less negative and at 27 days of culture,  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}}$  from the CB is  $-0.49 \pm 0.04\text{‰}$  and from the SB is  $-1.21 \pm 0.06\text{‰}$ . These results have the same trend but not identical, as those obtain in previous sediment enrichment cultures, in which isotopically light  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  were produced and as in our experiment the  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  signature vary during the duration of the experiment (Tangalos et al., 2010a ; Percak-Dennett et al., 2011a).

800

In contrast to previous sediment incubation experiments (Tangalos et al., 2010a), we added large amount of  $\text{Fe(III)}_{\text{am}}$  as substrate in the culture medium, so that  $\delta^{56}\text{Fe}$  values of  $\text{Fe(III)}_{\text{am}}$  remain constant over time.

805

In our bioreactor experiments, in the same time, various active microbial populations with various metabolisms as DIR, sulfate-reducers, sulfur-reducers, fermenters and methanogens were detected. The Fe isotope signature could not be assigned only to the active DIR members but as well as in a natural ecosystem it is the signature of all the active microbial communities and their interactions between these and with the culture medium which was detected.

#### 4.3.2. In situ diversity versus ex situ diversity

810

The choice of the medium, enriched in poorly insoluble crystalline ferric iron oxy-hydroxide ( $\text{Fe(III)}$ ) and containing a choice of carbon and energy sources (eg: acetate, formate, benzoate and yeast extract), had could also contributed to select certain microbial populations, able to used these substrates and which were underrepresented, poor active or inactive at the sampling time.

815

These enrichment cultures had allowed to cultivate microorganisms able to realized dissimilatory iron reduction, such as prokaryotic genera *Geoglobus* and *Thermotoga*. This data, reinforcing the hypothesis that iron-reducing thermophilic micro-organisms have an important role in the hydrothermal ecosystems; and as suggested by Slobodkin and collaborators (Slobodkin et al., 2001), they are significant players in the degradation of organic matter.

820

The microbial diversity results imply that in each bioreactor, sulfo- and sulfate-reduction and iron-reduction took place. Also, interestingly, that indicates that at the scale of our cultures and in these conditions: semi-continuous mode with intake in organic carbon and energy sources and continuous intake of inorganic carbon and energy sources, sulfate-reducers and iron-reducers are likely not in

competition. Also their activities could have affect the mineral phase dissolution/precipitation and by far the could have an effect on the  $\delta^{56}\text{Fe}$  especially on the  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  signature.

825 **4.4. Fe isotope as biosignatures**

In the debate between the origin of the negative and low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  signature, one aspect deals on the difference of the quantities of low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  produced during the DIR or the abiotic reaction. To date, it is recognized that DIR produced greater amount of low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  than the abiotic reactions which generate only small quantities of low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$ .

830 In the light of our experiments done with *T. maritima* and with microbial communities, it appears that low quantities of  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  was produced. That result differ from those obtained in mesophilic condition with *G. sulfurreducens*, *S. putrefaciens* and *S. algae* (Crosby et al., 2005b ; Johnson et al., 2005a ; Crosby et al., 2007b ; Wu et al., 2009a) or in sediment incubation (Tangalos et al., 2010a) where greater quantities of  $\text{Fe(II)}$  were produced. Low  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  was also measurement in abiotic  
835 incubations.

The Fe isotope signature from our abiotic experiments have a low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{(Fe II)}}$  value and are also more enriched in light isotope than the signature obtained in biotic incubations.

In the light of our determined  $\delta^{56}\text{Fe}$  signatures in both biologic and abiotic systems and as previously point out by Rouxel and colleagues (Rouxel et al., 2003) and Wu and colleagues (Wu et al., 2010a ;  
840 Wu et al., 2011a), a negative and low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  cannot always be assigned as biosignatures and using Fe isotope to investigate life must be used with precaution. In addition, that signifies that recorded Fe isotope signatures in modern and former sedimentary rock have probably not only a biotic contribution but also an abiotic origin.

845 **4.5. Implication for interpretation of Fe isotope biosignatures and Fe biogeochemical cycling in modern and ancient hydrothermal systems**

The marine system in the Precambrian age contained low sulfate and high silica and dissolved iron and by extension, the sedimentary rock named BIF (Banded Iron Formation) are characterized by laminated layers rich in iron or in silica. The model for BIFs genesis are mostly based on two steps  
850 (Tangalos et al., 2010a): 1) the first consisted in the oxidation in the photic ocean area of the  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  originated from hydrothermal system and the result of this oxidation is the production  $\text{Fe(III)}$  oxides which sink and deposited on the seafloor ; 2) the second step occur during the diagenetic processes where  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  react with the deposited  $\text{Fe(III)}$  oxides and produced mineral phases such as siderite or magnetite. During the first step, a pool of  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  have been partially oxidized, and generate  $\text{Fe(III)}$   
855 oxides with a positive  $\delta^{56}\text{Fe}$  signature; whereas complete oxidation makes the remaining  $\text{Fe(II)}$  pool

isotopically light with a low  $\delta^{56}\text{Fe}$  signature. However, in the BIF formations, magnetite and siderite exhibiting low  $\delta^{56}\text{Fe}$  signature were found. Indeed, magnetite and siderite from BIF have overall a  $\delta^{56}\text{Fe}$  signature from -2.5 to 1‰ (Johnson et al., 2003). Thus another process was implied in BIF formation. Owing the amount quantities of ferric hydroxides are present in BIF deposits during the Precambrian, it was proposed that the ferric hydroxides could be used as electron acceptor by former micro-organisms. In addition, based on geochemical data and microbial analysis, together argue that Fe(III) was probably one of the first electron acceptor to fuel microbial life and so that DIR was one of the first metabolism occurring on the early Earth, in particularly during the Archean and probably that these DIR communities were thermophiles (Walker, 1984 ; Baur et al., 1985 ; Vargas et al., 1998 ; Kashefi and Lovley, 2003 ; Konhauser et al., 2005 ; Johnson and Beard, 2006 ; Heimann et al., 2010b). Indeed the isotopic signature of  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  produced during the DIR by thermophilic strain or by thermophilic communities is comprised between the  $\delta^{56}\text{Fe}$  magnetite and siderite from BIF signature.

Also, in our experiment and as previously shown by Wu and colleagues (Wu et al., 2010a) and envisioned by Rouxel and colleagues (Rouxel et al., 2005b) abiotic  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$ -Fe(III) oxides interactions generate negative and low  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  which could be recorded in Fe sedimentary rock.

In addition, in our experiment, at high temperature, abiotic interaction produced isotopically light  $\text{Fe(II)}_{\text{aq}}$  exhibiting a  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  signature more negative than those obtained in biotic experiments done at the same temperature.

In the light of these data, it appears to be difficult to infer in the origin of negative and low  $\delta^{56}\text{Fe}$  signature recorded in modern and in Precambrian rock.

Also, again, in natural system, the determination of the Fe pattern involve in modern and ancient Fe sedimentary rock genesis and the determination of the role of both biologic and abiotic processes and the evaluation of each contribution using the  $\delta^{56}\text{Fe}$  signature.

880

## 5. Conclusion

This enrichment cultures in bioreactors allowed to study microbe-Fe(III) oxide interactions in the environment of deep-sea hydrothermal vent: chimney and sediments and to follow dynamic of microbial community over time.

885 In the two bioreactors, we reported the evidence of cultivation of thermophilic iron-reducers with phylotypes closely related to the genera *Geoglobus* and *Thermotoga*.

In all experiments condition: abiotic and biotic with pure DIR strains or microbial community low quantities of aqueous  $\text{Fe(II)}$  with a negative and low  $\delta^{56}\text{Fe}$  were produced, contrary to those observed in previous experiment done in mesophilic conditions. Also in our conditions thermophilic DIR produced lesser negative  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  signatures than the abiotic control.

890

Thus, used Fe isotope signature to distinguish biotic to abiotic processes in the modern and ancient sedimentary rock formation or to detect microbial life or microbial role in rock alteration must be used with caution

895

### Acknowledgements

The authors acknowledge the BIG shipboard cruise party for their work and support during the BIG cruise: officers, crew and technicians of the *R/V L'Atalante*, the DSV *Nautille* team and scientific team, in particular Céline Rommevaux-Jestin for her precious help during the hydrothermal flange sampling and processing. Sonia Laigle is thanked for their help during bioreactor sampling processing and chemical analysis. Yoan Germain is thanked for clean laboratory assistance, as well as Céline Liorzou and Claire Bassoulet for the major and trace elements analysis. Members of the LMEE, the PSO or the GM laboratory are thanked for their helpful comments, their suggestions and their advices. The cruise BIG was funded by IFREMER (France) and has benefited from a work permit in Mexican waters (DAPA/2/281009/3803, October 28th, 2009). This work was supported by Ifremer, the GIS Européle Mer, UEB, CNRS, INSU and has benefited from state aid managed by the Agence Nationale de la Recherche under the program "Investments for the Future" with the reference ANR-10-LabX-19-01.

900

905

### References

- 910 Anbar, A.D., Jarzecki, A.A., and Spiro, T.G. (2005). Theoretical investigation of iron isotope fractionation between  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  and  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ : Implications for iron stable isotope geochemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 825-837.
- Anbar, A.D., Roe, J.E., Barling, J., and Neelson, K.H. (2000). Nonbiological Fractionation of Iron Isotopes. *Science* 288, 126-128.
- 915 Anbar, A.D., and Rouxel, O. (2007). Metal stable isotopes in paleoceanography. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 35, 717-746.
- Archer, C., and Vance, D. (2006). Coupled Fe and S isotope evidence for Archean microbial Fe(III) and sulfate reduction. *Geology* 34, 153-156.
- Arnold, G.L., Weyer, S., and Anbar, A.D. (2003). Fe Isotope Variations in Natural Materials Measured Using High Mass Resolution Multiple Collector ICPMS. *Analytical Chemistry* 76, 322-327.
- 920 Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., and Wolfe, R.S. (1979). Methanogens : Reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43, 260-296.
- Balci, N., Bullen, T.D., Witte-Lien, K., Shanks, W.C., Motelica, M., and Mandernack, K.W. (2006). Iron isotope fractionation during microbially stimulated Fe(II) oxidation and Fe(III) precipitation. *Geochem. Cosmochim. Acta* 70, 622-639.
- 925 Baur, M.E., Hayes, J.M., Studley, S.A., and Walter, M.R. (1985). Millimeter-scale variations of stable isotope abundances in carbonates from banded iron-formations in the Hamersley Group of Western Australia. *Economic Geology* 80, 270-282.
- Beard, B.L., Handler, R.M., Scherer, M.M., Wu, L., Czaja, A.D., Heimann, A., and Johnson, C.M. (2010). Iron isotope fractionation between aqueous ferrous iron and goethite. *Earth and Planetary Science Letters* 295, 241-250.
- 930 Beard, B.L., Johnson, C.M., Cox, L., Sun, H., Neelson, K.H., and Aguilar, C. (1999). Iron Isotope Biosignatures. *Science* 285, 1889-1892.
- Beard, B.L., Johnson, C.M., Skulan, J.L., Neelson, K.H., Cox, L., and Sun, H. (2003a). Application of Fe isotopes to tracing the geochemical and biological cycling of Fe. *Chemical Geology* 195, 87-117.
- 935

- Beard, B.L., Johnson, C.M., Skulan, J.L., Neelson, K.H., Cox, L., and Sun, H. (2003b). Application of Fe isotopes to tracing the geochemical and biological cycling of Fe. *Chemical Geology* 195, 87-117.
- Beeder, J., Nilsen, R.K., Rosnes, J.T., Torsvik, T., and Lien, T. (1994). *Archaeoglobus fulgidus* isolated from hot North Sea oil field waters. *App. Environ. Microbiol.* 60, 1227-1231.
- 940 Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2002). Reduction of Fe (III) oxide by methanogens in the presence and absence of extracellular quinones. *Environmental Microbiology* 4, 115-124.
- Bullen, T.D., White, A.F., Childs, C.W., Vivit, D.V., and Schulz, M.S. (2001). Demonstration of significant abiotic iron isotope fractionation in nature. *Geology* 29, 699-702.
- 945 Burggraf, S., Jannasch, H.W., Nicolaus, B., and Stetter, K.O. (1990). *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 13, 24-28.
- Butler, I.B., Archer, C., Vance, D., Oldroyd, A., and Rickard, D. (2005). Fe isotope fractionation on FeS formation in ambient aqueous solution. *Earth and Planetary Science Letters* 236, 430-442.
- 950 Butler, I.B., Bottcher, M.E., Rickard, D., and Oldroyd, A. (2004). Sulfur isotope partitioning during experimental formation of pyrite via the polysulfide and hydrogen sulfide pathways: implications for the interpretation of sedimentary and hydrothermal pyrite isotope records. *Earth Planet. Sci. Lett.* 228, 495-509.
- Byrne, N., Lesongeur, F., Bienvenu, N., Geslin, C., Alain, K., Prieur, D., and Godfroy, A. (2009). "Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor", in: *Extremophiles*. Springer Japan).
- 955 Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A.M., Rizzi, A., Zanardini, E., Sorlini, C., Corselli, C., and Daffonchio, D. (2004). Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities. *Appl. AEnviron. Microbiol.* 70, 6147-6156.
- 960 Casamayor, E.O., Schafer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, C., and Muyzer, G. (2000a). Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 499-508.
- 965 Casamayor, E.O., Schafer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, C., and Muyzer, G. (2000b). Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. AEnviron. Microbiol.* 66, 499-508.
- Cornell, R.M., and Schwertmann, U. (2003). *The Iron oxides : structure, properties, reactions, occurrences and uses (2nd ed.)*. Wiley-VCH.
- 970 Craddock, P.R., and Dauphas, N. (2011). Iron and carbon isotope evidence for microbial iron respiration throughout the Archean. *Earth and Planetary Science Letters* 303, 121-132.
- 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, 1227-1242.
- Crosby, H.A., Johnson, C.M., Roden, E.E., and Beard, B.L. (2005a). Coupled Fe(II)-Fe(III) electron and atom exchange as a mechanism for Fe isotope fractionation during dissimilatory iron oxide reduction. *Environmental Science & Technology* 39, 6698-6704.
- 975 Crosby, H.A., Johnson, C.M., Roden, E.E., and Beard, B.L. (2005b). Coupled Fe(II)-Fe(III) Electron and Atom Exchange as a Mechanism for Fe Isotope Fractionation during Dissimilatory Iron Oxide Reduction. *Environmental Science & Technology* 39, 6698-6704.
- 980 Crosby, H.A., Roden, E.E., Johnson, C.M., and Beard, B.L. (2007a). The mechanisms of iron isotope fractionation produced during dissimilatory Fe(III) reduction by *Shewanella putrefaciens* and *Geobacter sulfurreducens*. *Geobiology* 5, 169-189.
- Crosby, H.A., Roden, E.E., Johnson, C.M., and Beard, B.L. (2007b). The mechanisms of iron isotope fractionation produced during dissimilatory Fe(III) reduction by *Shewanella putrefaciens* and *Geobacter sulfurreducens*. *Geobiology* 5, 169-189.
- 985 Dauphas, N., and Rouxel, O. (2006). Mass spectrometry and natural variations of iron isotopes. *Mass Spectrometry Reviews* 25, 515-550.
- Davidova, I.A., Duncan, K.E., Perez-Ibarra, B.M., and Suflita, J.M. (2012). Involvement of thermophilic archaea in the biocorrosion of oil pipelines. *Environmental Microbiology*.
- 990 Escoube, R., Rouxel, O.J., Sholkovitz, E., and Donard, O.F.X. (2009). Iron isotope systematics in estuaries: The case of North River, Massachusetts (USA). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 4045-4059.

- Godfroy, A., Postec, A., and Raven, N. (2006). "Growth of hyperthermophilic microorganisms for physiological and nutritional studies," in *Methods in Microbiology, Extremophiles*, eds. F.A. Rainey & A. Oren. (Oxford, England: Academic Press.).
- 995 Guilbaud, R., Butler, I.B., and Ellam, R.M. (2011a). Abiotic Pyrite Formation Produces a Large Fe Isotope Fractionation. *Science* 332, 1548-1551.
- Guilbaud, R., Butler, I.B., and Ellam, R.M. (2011b). Abiotic pyrite formation produces a large Fe isotope fractionation. *Science* 332, 1548-1551.
- Guilbaud, R., Butler, I.B., and Ellam, R.M. (2012). Response to Comment on "Abiotic Pyrite Formation Produces a Large Fe Isotope Fractionation". *Science* 335,, 538.
- 1000 Heimann, A., Johnson, C.M., Beard, B.L., Valley, J.W., Roden, E.E., Spicuzza, M.J., and Beukes, N.J. (2010a). Fe, C, and O isotope compositions of banded iron formation carbonates demonstrate a major role for dissimilatory iron reduction in ~2.5 Ga marine environments. *Earth and Planetary Science Letters* 294 8-18.
- 1005 Heimann, A., Johnson, C.M., Beard, B.L., Valley, J.W., Roden, E.E., Spicuzza, M.J., and Beukes, N.J. (2010b). Fe, C, and O isotope compositions of banded iron formation carbonates demonstrate a major role for dissimilatory iron reduction in ~ 2.5 Ga marine environments. *Earth and Planetary Science Letters* 294, 8-18.
- 1010 Huber, H., Jannash, H., Reinhard, R., Fuchs, T., and Stetter, K.O. (1997). *Archaeoglobus veneficus*, sp. nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, isolated from abyssal black smokers. *Sytem. Appl. Microbiol.* 20, 374-380.
- Huber, R., Langworthy, T.A., König, H., Thomm, M., Woese, C.R., Sleytr, V.B., and Stetter, K.O. (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Archives of Microbiology* 144, 324-333.
- 1015 Huo, Y.-Y., Xu, X.-W., Cao, Y., Wang, C.-S., Zhu, X.-F., Oren, A., and Wu, M. (2009). *Marinobacterium nitratreducens* sp. nov. and *Marinobacterium sediminicola* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1173-1178.
- Icopini, G.A., Anbar, A.D., Ruebush, S.S., Tien, M., and Brantley, S.L. (2004a). Iron isotope fractionation during microbial reduction of iron: The importance of adsorption. *Geology* 32, 205-208.
- 1020 Icopini, G.A., Anbar, A.D., Ruebush, S.S., Tien, M., and Brantley, S.L. (2004b). Iron isotope fractionation during microbial reduction of iron: The importance of adsorption. *Geology* 32, 205-208.
- Ikeda, S., Ytow, N., Ezura, H., Minamisawa, K., and Fujimura, T. (2006). Soil microbial community analysis in the environmental risk assessment of transgenic plants. *Plant Biotechnology* 23, 137-151.
- Jang, J.-H., Mathur, R., Liermann, L.J., Ruebush, S., and Brantley, S.L. (2008). An iron isotope signature related to electron transfer between aqueous ferrous iron and goethite. *Chemical Geology* 250, 40-48.
- 1025 Johnson, C.M., and Beard, B.L. (2006). Fe isotopes: An emerging technique for understanding modern and ancient biogeochemical cycles. *GSA TODAY* 16, 4.
- Johnson, C.M., Beard, B.L., Beukes, N.J., Klein, C., and O'leary, J.M. (2003). Ancient geochemical cycling in the Earth as inferred from Fe isotope studies of banded iron formations from the Transvaal Craton. *Contributions to Mineralogy and Petrology* 144, 523-547.
- 1030 Johnson, C.M., Beard, B.L., Klein, C., Beukes, N.J., and Roden, E.E. (2008a). Iron isotopes constrain biologic and abiologic processes in banded iron formation genesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 151-169.
- Johnson, C.M., Beard, B.L., Klein, C., Beukes, N.J., and Roden, E.E. (2008b). Iron isotopes constrain biologic and abiologic processes in banded iron formation genesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 151-169.
- 1035 Johnson, C.M., Beard, B.L., and Roden, E.E. (2008c). The Iron Isotope Fingerprints of Redox and Biogeochemical Cycling in Modern and Ancient Earth. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 36, 457-493.
- Johnson, C.M., Beard, B.L., Roden, E.E., Newman, D.K., and Nealson, K.H. (2004). Isotopic Constraints on Biogeochemical Cycling of Fe. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 55, 359-408.
- Johnson, C.M., Roden, E.E., Welch, S.A., and Beard, B.L. (2005a). Experimental constraints on Fe isotope fractionation during magnetite and Fe carbonate formation coupled to dissimilatory hydrous ferric oxide reduction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 963-993.
- 1040 Johnson, C.M., Roden, E.E., Welch, S.A., and Beard, B.L. (2005b). Experimental constraints on Fe isotope fractionation during magnetite and Fe carbonate formation coupled to dissimilatory hydrous ferric oxide reduction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 963-993.
- 1045 Johnson, C.M., Skulan, J.L., Beard, B.L., Sun, H., Nealson, K.H., and Braterman, P.S. (2002). Isotopic fractionation between Fe(III) and Fe(II) in aqueous solutions. *Earth Planet. Sci. Lett.* 195, 141-153.

- Kashefi, K., Holmes, D.E., Baross, J.A., and Lovley, D.R. (2003). Thermophily in the Geobacteraceae: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Member of the Geobacteraceae from the "Bag City" Hydrothermal Vent. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2985-2993.
- Kashefi, K., and Lovley, D.R. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science* 301, 934.
- 1050 Kashefi, K., Tor, J.M., Holmes, D.E., Gaw Van Praagh, C.V., Reysenbach, A.L., and Lovley, D.R. (2002a). *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 719-728.
- 1055 Kashefi, K., Tor, J.M., Holmes, D.E., Gaw Van Praagh, C.V., Reysenbach, A.L., and Lovley, D.R. (2002b). *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor  
10.1099/ijs.0.01953-0. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 719-728.
- 1060 Kastner, M. (1982). Evidence of two distinct hydrothermal systems in the Guaymas Basin. In J. R. Curray (ed.), *Initial reports of the Deep Sea Drilling Project, Leg 64. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.* 64.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.
- 1065 Kolganova, T.V., Kuznetsov, B.B., and Tourova, T.P. (2002). Designing and Testing Oligonucleotide Primers for Amplification and Sequencing of Archaeal 16S rRNA Genes. *Microbiology* 71, 243-246.
- Konhauser, K.O., Newman, D.K., and Kappler, A. (2005). The potential significance of microbial Fe(III) reduction during deposition of Precambrian banded iron formations. *Geobiology* 3, 167-177.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., and Tamura, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9, 299-306.
- 1070 Lane D, J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*.  
Lane, D., J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., and Pace, N.R. (1985a). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 6955-6959.
- 1075 Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Sthal, D.A., Sogin, M.L., and Pace, N.R.O. (1985b). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6955-6959.
- Lovley, D.R. (1991). Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 55, 259-287.
- Lovley, D.R., and Phillips, E.J.P. (1986a). Availability of Ferric Iron for Microbial Reduction in Bottom Sediments of the Freshwater Tidal Potomac River. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 751-757.
- 1080 Lovley, D.R., and Phillips, E.J.P. (1986b). Organic Matter Mineralization with Reduction of Ferric Iron in Anaerobic Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 683-689.
- Maestrojuan, G.M., Boone, D.R., Xun, L., Mah, R.A., and Zhang, L. (1990). Transfer of *Methanogenium bourgense*, *Methanogenium marisnigri*, *Methanogenium olentangyi*, and *Methanogenium thermophilicum* to the Genus *Methanoculleus* gen. nov., Emendation of *Methanoculleus marisnigri* and *Methanogenium*, and Description of New Strains of *Methanoculleus bourgense* and *Methanoculleus marisnigri*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 117-122.
- 1085 Marsili, E., Baron, D.B., Shikhare, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., and Bond, D.R. (2008). *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 3968-3973.
- 1090 Merkel, A.Y., Huber, J.A., Chernyh, N.A., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Lebedinsky, A.V. (2013). Detection of Putatively Thermophilic Anaerobic Methanotrophs in Diffuse Hydrothermal Vent Fluids. *Appl. AEnviron. Microbiol.* 79, 915-923.
- Miroshnichenko, M.L., Slobodkin, A.I., Kostrikina, N.A., L'haridon, S., Nercessian, O., Spring, S., Stackebrandt, E., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Jeanthon, C. (2003). *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1637-1641.
- 1095 Mori, K., Maruyama, A., Urabe, T., Suzuki, K.-I., and Hanada, S. (2008). *Archaeoglobus infectus* sp. nov., a novel thermophilic, chemolithoheterotrophic archaeon isolated from a deep-sea rock collected at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, western Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 810-816.
- 1100 Newman, D.K., and Kolter, R. (2000). A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature* 405, 94-97.



- 1105 Percak-Dennett, E., Beard, B., Xu, H., Konishi, H., Johnson, C., and Roden, E. (2011a). Iron isotope fractionation during microbial dissimilatory iron oxide reduction in simulated Archean seawater. *Geobiology* 9, 205-220.
- Percak-Dennett, E.M., Beard, B.L., Xu, H., Konishi, H., Johnson, C.M., and Roden, E.E. (2011b). Iron isotope fractionation during microbial dissimilatory iron oxide reduction in simulated Archean seawater. *Geobiology* 9, 205–220.
- 1110 Peter, J.M., and Scott, S.D. (1988). Mineralogy, composition, and fluid inclusion microthermometry of sea-floor hydrothermal deposits in the southern trough of Guaymas Basin, Gulf of California. *The Canadian Mineralogist* 26, 567-587.
- Planavsky, N.J., Rouxel, O., Bekker, A., Hofmann, A., Little, C., and Lyons, T.W. (2012). Iron isotope composition of some Archean and Paleoproterozoic iron formations. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 80, 158–169.
- 1115 Postec, A., Lesongeur, F., Pignet, P., Ollivier, B., Querellou, J., and Godfroy, A. (2007a). Continuous enrichment cultures: insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent chimneys. *Extremophiles* 11, 747-757.
- Postec, A., Lesongeur, F., Pignet, P., Ollivier, B., Quérellou, J., and Godfroy, A. (2007b). Continuous enrichment cultures: insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent chimneys. *Extremophiles* 11, 747-757.
- 1120 Postec, A., Urios, L., Lesongeur, F., Ollivier, B., Quérellou, J., and Godfroy, A. (2005). Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting the deep-sea hydrothermal ecosystems. *Current Microbiology* 50, 138-144.
- 1125 Raven, N., Ladwa, N., Cossar, D., and Sharp, R. (1992). Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 263-267.
- Reysenbach, A.-L., Liu, Y., Banta, A.B., Beveridge, T.J., Kirshtein, J.D., Schouten, S., Tivey, M.K., Von Damm, K.L., and Voytek, M.A. (2006). A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature* 442, 444-447.
- 1130 Rouxel, O., Bekker, A., and Edwards, K. (2005a). Iron Isotope Constraints on the Archean and Paleoproterozoic Ocean Redox State. *Science* 307, 1088-1091.
- Rouxel, O., Dobbek, N., Ludden, J., and Fouquet, Y. (2003). Iron isotope fractionation during oceanic crust alteration. *Chemical Geology* 202, 155-182.
- Rouxel, O., Shanks Iii, W.C., Bach, W., and Edwards, K.J. (2008a). Integrated Fe- and S-isotope study of seafloor hydrothermal vents at East Pacific Rise 9-10°N. *Chemical Geology* 252, 214-227.
- 1135 Rouxel, O., Sholkovitz, E., Charette, M., and Edwards, K. (2008b). Iron Isotope Fractionation in Subterranean Estuaries. *Geochem. Cosmochim. Acta* 72, 3413-3430.
- Rouxel, O., Sholkovitz, E., Charette, M., and Edwards, K.J. (2008c). Iron isotope fractionation in subterranean estuaries. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 3413-3430.
- 1140 Rouxel, O.J., Bekker, A., and Edwards, K.J. (2005b). Iron Isotope Constraints on the Archean and Paleoproterozoic Ocean Redox State. *Science* 307, 1088-1091.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2004). Status of the Microbial Census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 686-691.
- 1145 Severmann, S., Johnson, C.M., Beard, B.L., and Mcmanus, J. (2006). The effect of early diagenesis on the Fe isotope compositions of porewaters and authigenic minerals in continental margin sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 2006-2022.
- Severmann, S., Mcmanus, J., Berelson, W.M., and Hammond, D.E. (2010). The continental shelf benthic iron flux and its isotope composition. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 3984-4004.
- 1150 Skulan, J.L., Beard, B.L., and Johnson, C.M. (2002). Kinetic and equilibrium Fe isotope fractionation between aqueous Fe(III) and hematite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, 2995-3015.
- Slobodkin, A., Campbell, B., Cary, S.C., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Jeanthon, C. (2001). Evidence for the presence of thermophilic Fe(III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13°N (East Pacific Rise). *FEMS Microbiology Ecology* 36, 235-243.
- 1155 Slobodkin, A.I., Jeanthon, C., L'haridon, S., Nazima, T., Miroshnichenko, M., and Bonch-Osmolovskaya, E. (1999a). Dissimilatory reduction of Fe(III) by thermophilic bacteria and archaea in deep surface petroleum reservoirs of Western Siberia. *Current Microbiology* 39, 99-102.

- 1160 Slobodkin, A.I., Tourova, T.P., Kuznetsov, B.B., Kostrikina, N.A., Chernyh, N.A., and Bonch Osmolovskaya, E.A. (1999b). *Thermoanaerobacter siderophilus* sp nov., a novel dissimilatory Fe(III)-reducing, anaerobic, thermophilic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 Part 4, 1471-1478.
- Slobodkina, G.B., Kolganova, T.V., Chernyh, N.A., Querellou, J., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Slobodkin, A.I. (2009a). *Deferribacter autotrophicus* sp. nov., an iron(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent  
10.1099/ijs.0.006767-0. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1508-1512.
- 1165 Slobodkina, G.B., Kolganova, T.V., Querellou, J., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and Slobodkin, A.I. (2009b). *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2880-2883.
- Slobodkina, G.B., Reysenbach, A.-L.I., Panteleeva, A., Kostrikina, N., Wagner, I., Bonch-Osmolovskaya, E., and Slobodkin, A.I. (2011). *Deferrisoma camini* gen. nov., sp. nov. a novel moderately thermophilic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent that forms a distinct phylogenetic branch in Deltaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- 1170 Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., and Muyzer, G. (2005). *Citricella thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a novel lithoheterotrophic sulfur-oxidizing bacterium from the Black Sea. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 679-687.
- 1175 Staubwasser, M., Blanckenburg, F.V., and Schoenberg, R. (2006). Iron isotopes in the early marine diagenetic iron cycle. *Geology* 34, 629-632.
- Staubwasser, M., Schoenberg, R., and Vonblanckenburg, F. (2005). Fe-isotope fractionation during early diagenetic Fe-reduction. *Geophysical Research Abstracts, Vol. 7, 09176, 2005*.
- 1180 Steinsbu, B.O., Thorseth, I.H., Nakagawa, S., Inagaki, F., Lever, M.A., Engelen, B., Øvreås, L., and Pedersen, R.B. (2010). *Archaeoglobus sulfaticallidus* sp. nov., a thermophilic and facultatively lithoautotrophic sulfate-reducer isolated from black rust exposed to hot ridge flank crustal fluids. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2745-2752.
- Stookey, L.L. (1970). Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry* 42, 779-781.
- 1185 Suzuki, M.T., Taylor, L.T., and Delong, E.F. (2000). Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4605-4614.
- Tangalos, G., Beard, B., Johnson, C., Alpers, C.N., Shelobolina, E., Xu, H., Konishi, H., and Roden, E. (2010a). Microbial production of isotopically light iron (II) in a modern chemically precipitated sediment and implications for isotopic variations in ancient rocks. *Geobiology* 8, 197-208.
- 1190 Tangalos, G.E., Beard, B.L., Johnson, C.M., Alpers, C.N., Shelobolina, E.S., Xu, H., Konishi, H., and Roden, E.E. (2010b). Microbial production of isotopically light iron(II) in a modern chemically precipitated sediment and implications for isotopic variations in ancient rocks. *Geobiology* 8, 197-208.
- Teske, A., Hinrichs, K.-U., Edgcomb, V., De Vera Gomez, A., Kysela, D., Sylva, S.P., Sogin, M.L., and Jannasch, H.W. (2002). Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1994-2007.
- 1195 Teutsch, N., Schmid, M., Muller, B., Halliday, A.N., Burgmann, H., and Wehrli, B. (2009). Large iron isotope fractionation at the oxic-anoxic boundary in Lake Nyos. *Earth and Planetary Science Letters* 285, 52-60.
- Tsikos, H., Matthews, A., Erel, Y., and Moore, J.M. (2010). Iron isotopes constrain biogeochemical redox cycling of iron and manganese in a Palaeoproterozoic stratified basin. *Earth and Planetary Science Letters* 298, 125-134.
- 1200 Van Bodegom, P.M., Scholten, J.C.M., and Stams, A.J.M. (2004). Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron. *FEMS Microbiology Ecology* 49, 261-268.
- Vargas, M., Kashefi, K., Bluntharris, E.L., and Lovley, D.R. (1998). Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature* 395, 65-67.
- 1205 Walker, J.C. (1984). Suboxic diagenesis in banded iron formations.
- Welch, S.A., Beard, B.L., Johnson, C.M., and Braterman, P.S. (2003). Kinetic and equilibrium Fe isotope fractionation between aqueous Fe(II) and Fe(III). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 4231-4250.
- Weyer, S., and Schwieters, J.B. (2003). High precision Fe isotope measurements with high mass resolution MC-ICPMS. *International Journal of Mass Spectrometry* 226, 355-368.
- 1210 Wu, L., Beard, B.L., Roden, E.E., and Johnson, C.M. (2009a). Influence of pH and dissolved Si on Fe isotope fractionation during dissimilatory microbial reduction of hematite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 5584-5599.
- Wu, L., Beard, B.L., Roden, E.E., and Johnson, C.M. (2011a). Stable iron isotope fractionation between aqueous Fe (II) and hydrous ferric oxide. *Environmental Science & Technology* 45, 1847-1852.

- 1215 Wu, L., Beard, B.L., Roden, E.E., Kennedy, C.B., and Johnson, C.M. (2010a). Stable Fe isotope fractionations produced by aqueous Fe (II)-hematite surface interactions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 4249-4265.
- Wu, L.L., Beard, B.L., Roden, E.E., and Johnson, C.M. (2009b). Influence of pH and dissolved Si on Fe isotope fractionation during dissimilatory microbial reduction of hematite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*
- 1220 73, 5584-5599.
- Wu, L.L., Beard, B.L., Roden, E.E., and Johnson, C.M. (2011b). Stable Iron Isotope Fractionation Between Aqueous Fe(II) and Hydrated Ferric Oxide. *Environmental Science & Technology* 45, 1847-1852.
- Wu, L.L., Beard, B.L., Roden, E.E., Kennedy, C.B., and Johnson, C.M. (2010b). Stable Fe isotope fractionations produced by aqueous Fe(II)-hematite surface interactions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74,
- 1225 4249-4265.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., and Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 89, 670-679.
- 1230 Zavarzina, D., Sokolova, T., Tourova, T., Chernyh, N., Kostrikina, N., and Bonch-Osmolovskaya, E. (2007). *Thermincola ferriacetica* sp. novl., a new anaerobic, thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium capable of dissimilatory Fe(III) reduction. *Extremophiles* 11, 1-7.

## 4. Synthèse de l'étude

### 4.1. Rappel des principaux résultats

Comme pour l'étude « Aperçus des interactions micro-organismes / minéraux lors d'une culture d'enrichissement en continu » (cf. chapitre V), ces deux cultures d'enrichissements, ont mis en évidence des communautés microbiennes actives sous-représentées et/ou non actives dans les échantillons bruts. Elles ont aussi permis de cultiver des micro-organismes réalisant la réduction dissimilative du fer, tels que des procaryotes des genres *Geoglobus* et *Thermotoga*. Ceci, renforçant l'idée que les procaryotes thermophiles ferri-réducteur ont un rôle important dans les écosystèmes hydrothermaux et comme suggéré par Slobodkin et collaborateurs (Slobodkin et al. 2001), ceux sont des acteurs important dans la dégradation de la matière organique.

**Les communautés :** des micro-organismes connus pour réaliser la réduction dissimilatrice du fer ont été cultivés dans les deux cultures d'enrichissements : *Geoglobus* et *Thermotoga* dans le bioréacteur inoculé avec la cheminée et *Geoglobus* dans celuiensemencé avec les sédiments. Des différences de signatures isotopique du Fe(II)  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  sont observées tout au long des deux cultures. Par comparaison avec le bioréacteur inoculé avec du sédiment, Il apparait que seul le bioréacteur inoculé avec un broyat de cheminée, a produit du fer ferreux.

**Les souches pures :** dans nos conditions de culture, *Geoglobus acetivorans* ne produit pas de Fe(II) et semble plutôt présenter un métabolisme type fermentaire que de réduction dissimilative du fer. *Thermotoga maritima*, quant à elle, réduit bien le Fe(III) en Fe(II) et présente une signature isotopique en Fe(II) enrichie en isotope léger par rapport au substrat initial de Fe(III).

**Les témoins abiotiques :** dans nos conditions, les signatures isotopiques  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}}$  sont plus négatives que celles obtenues avec *Thermotoga maritima* et les cultures en bioréacteurs.

Enfin, à la lumière des signatures isotopiques  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  déterminées ici à partir de systèmes biologiques (souches pures et communautés) et des contrôles abiotiques, il est possible de générer des valeurs négatives en  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}}$  par simple échange isotopique abiotique entre le Fe(II) en solution et un substrat riche Fe(III). Ainsi, les processus de fractionnement des isotopes du fer diffère radicalement des autres systèmes isotopiques (ex soufre) lors des changements redox. Dans le cas du Fer, des échanges isotopiques proches de l'équilibre entre les espèces de Fe(II) et Fe(III) sont observés à l'échelle de l'heure, alors qu'un échange isotopique du S entre  $\text{H}_2\text{S}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  prendrait plus de  $10^5$  années à la même température. Il est donc évident que les fractionnements biotiques devraient dominées ceux du Soufre alors que les fractionnements abiotiques devraient dominer ceux du Fer à des températures  $< 100^\circ\text{C}$ . En revanche, les résultats obtenus pour *Thermotoga maritima* ou

lors de l'incubation de cheminées hydrothermales en bioréacteur montrent clairement un effet « biotique », avec des compositions isotopiques du Fer aqueux moins négatifs que ceux observés en conditions d'équilibre. L'étude plus poussées des mécanismes d'interactions entre microorganismes ferri-réducteurs et les particules d'oxy-hydroxides de Fer est maintenant nécessaire pour comprendre ces signatures isotopiques. Dans tous les cas, il est clair que des valeurs négatives de  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)}_{\text{aq}}}$  ne doivent pas être toujours être considérées comme une bio-signature de réduction dissimilatrice du fer.

## 4.2. Perspectives

Comme lors de l'étude « Aperçus des interactions micro-organismes / minéraux lors d'une culture d'enrichissement en continu » (cf. chapitre XX), un des problèmes rencontré lors des expérimentations en bioréacteur est l'absence de dosage, dans le milieu, des espèces dissoutes du soufre et du fer:  $\text{S}^{\circ}$  soluble,  $\text{HS}^-$  et  $\text{H}_2\text{S}$ , et  $\text{FeS}_{\text{aq}}$ . Ces informations auraient permis d'une part de nous renseigner sur l'activité (par rapport à la quantité d' $\text{H}_2\text{S}$  mesurée) des micro-organismes sulfo- et sulfato-réducteurs détecté dans les deux cultures d'enrichissements. Ceci aurait aussi permis de déterminer le degré d'interaction entre l' $\text{H}_2\text{S}$  dissous et le  $\text{Fe(II)}$  *via* la mesure du  $\text{FeS}$  et ainsi contraindre certaines réactions entre le fer et le soufre, réactions pouvant influencer les rapports isotopiques du Fe. Ainsi, l'utilisation de sonde basée sur la méthode de la voltamétrie pourrait être envisagée lors de futures expérimentations en bioréacteur. De plus, même si la méthode de ferrozine permet de déterminer correctement la concentration en  $\text{Fe(II)}$  vs. Fer totale en solution, il faudrait affiner la détermination de la fraction de  $\text{Fe(II)}$  adsorbé sur les particules d'oxy-hydroxide ainsi que la fraction réactive de  $\text{Fe(III)}$  qui échange isotopiquement avec le  $\text{Fe(II)}$  aqueux. Les méthodes de dissolution progressive à l'acide, bien que pas toujours sélectives, permettrait d'apporter des éléments de réponse. De même, les changements minéralogiques des hydroxides de Fer lors des expériences n'ont pas été spécifiquement étudiés. Les techniques modernes de diffraction X à source synchrotron permettraient de répondre parfaitement à cette question (Toner et al. 2012) et d'accéder aux informations de spéciation, état redox, coordination et structure minéralogique du Fer à faible échelle spatiale.

Enfin, il est important de noter que nos études de fractionnement isotopique du fer ont duré : 27 jours pour les cultures d'enrichissement et 48h pour les souches pures ; ce qui, comparé, à la plupart des études réalisées avec des communautés et souches mésophiles, est relativement court (ex. 280 jours pour des expériences avec *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella putrefaciens* (Crosby et al. 2005; Crosby et al. 2007) et 60 jours pour une culture d'enrichissement (Tangalos et al. 2010)). Ainsi, des expériences en bioréacteur sur de plus grandes durées permettraient également de

discuter des modifications minéralogiques (e.g. bioleaching, biominéralisation) des substrats et de pouvoir comparer les résultats avec des échantillons naturels. Techniquement, les cultures en bioreacteurs de longues durées sont difficiles et nécessitent un contrôle parfait des paramètres physico-chimiques du milieu afin d'éviter les mêmes problèmes rencontrés lors de notre étude (ex chute de pH etc.).



## VII. Résultats des cultures en fioles

---

1. Etude A : cultures en fioles

2. Etude B : Article 5 - Caractérisation d'une nouvelle souche d'*Archaea* anaérobie et hyperthermophile isolée d'un édifice hydrothermal du Bassin de Guaymas: *Pyrococcus kukulkanii sp. nov.*





## 1. Etude A : Cultures en fioles

### 1.1. Préambule

En vue de cultiver et d'isoler des micro-organismes impliqués dans les cycles du soufre et du fer en anaérobiose, des cultures ciblant la sulfato-réduction, la sulfo-réduction, la sulfo-oxydation ou la ferri-réduction ont été réalisées. Ces cultures permettraient d'obtenir des informations sur le métabolisme et la physiologie de certains procaryotes hydrothermaux du Bassin de Guaymas. Pour cela, des cultures d'enrichissement utilisant différentes températures, milieux et inocula ont été réalisées (pour rappel Tableau VII-1) ;

**Tableau VII-1** : Tableau résumant le type d'échantillon, le métabolisme ciblé lors de l'enrichissement ainsi que les milieux de culture et les températures d'incubation testés.

Site	Edifices hydrothermaux	Métabolisme cible, milieux et température d'incubation
<b>Rebecca's Roost</b>	1747-BIG01E03	<b>Sulfato-réduction</b> : BSR-BIG à 70, 80, 90 et 100°C ; GYPS + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , GYPS + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> à 50, 60 et 70°C <b>Sulfo-réduction</b> : SME à 70, 80, 85, 90 et 100°C ; GYPS+S° à 50, 60 et 70°C <b>Sulfo-oxydation anaérobie</b> : SME+NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> à 70, 80, 85 et 90°C <b>Ferri-réduction</b> : <i>Geoglobus</i> modifié et BIG-Fe(III) à 70, 80, 90 et 100°C <b>Hétérotrophie aérobie</b> : Iron sulfite agar à 30, 40 et 50°C
<b>BIG 2</b>	1746-BIG01E02	<b>Sulfato-réduction</b> : BSR-BIG à 60, 70, 85°C <b>Sulfo-réduction</b> : SME à 70, 80, 85, 90 et 100°C ; BIG-S à 60, 70 et 85°C <b>Sulfo-oxydation anaérobie</b> : BIG-Sox à 60, 70 et 85°C <b>Hétérotrophie aérobie</b> : Iron sulfite agar à 30, 40 et 50°C
Site	Carottes sédimentaires	Métabolisme cible, milieux et température d'incubation
<b>BIG 1</b>	PI 1764-20 CT3	<b>Sulfato-réduction</b> : BSR-BIG à 70, 80, 90 et 100°C ; GYPS + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> et GYPS + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> à 50, 60 et 70 <b>Sulfo-réduction</b> : SME à 70, 80, 85, 90 et 100°C ; GYPS+S° à 50, 60 et 70°C <b>Sulfo-oxydation anaérobie</b> : SME+NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> à 70, 80, 85 et 90°C <b>Ferri-réduction</b> : <i>Geoglobus</i> modifié et BIG-Fe(III) à 70, 80, 90 et 100°C <b>Hétérotrophie aérobie</b> : Iron sulfite agar à 30, 40 et 50°C
<b>Marker 27</b>	PI 1766-22 CT2	<b>Sulfato-réduction</b> : BSR-BIG à 70, 80, 90 et 100°C ; GYPS + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> et GYPS + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> à 50, 60 et 70 <b>Sulfo-réduction</b> : SME à 70, 80, 85, 90 et 100°C ; GYPS+S° à 50, 60 et 70°C <b>Sulfo-oxydation anaérobie</b> : SME+NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> à 70, 80, 85 et 90°C <b>Ferri-réduction</b> : <i>Geoglobus</i> modifié et BIG-Fe(III) à 70, 80, 90 et 100°C <b>Hétérotrophie aérobie</b> : Iron sulfite agar à 30, 40 et 50°C

Site	Édifices hydrothermaux	Métabolisme cible, milieux et température d'incubation
	PI 1767-23 CT12	<b>Sulfato-réduction</b> : BSR-BIG à 70, 80, 90 et 100°C ; GYPS + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> et GYPS + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> à 50, 60 et 70 <b>Sulfo-oxydation anaérobie</b> : SME+NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> à 70, 80, 85 et 90°C <b>Hétérotrophie aérobie</b> : Iron sulfite agar à 30, 40 et 50°C
<b>Mega Mat</b>	PI 1765-21 CT6	<b>Sulfato-réduction</b> : BSR-BIG à 70, 80, 90 et 100°C ; GYPS + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> et GYPS + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> à 50, 60 et 70 <b>Sulfo-réduction</b> : SME à 70, 80, 85, 90 et 100°C ; GYPS+S° à 50, 60 et 70°C <b>Sulfo-oxydation anaérobie</b> : SME+NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> à 70, 80, 85 et 90°C <b>Hétérotrophie aérobie</b> : Iron sulfite agar à 30, 40 et 50°C

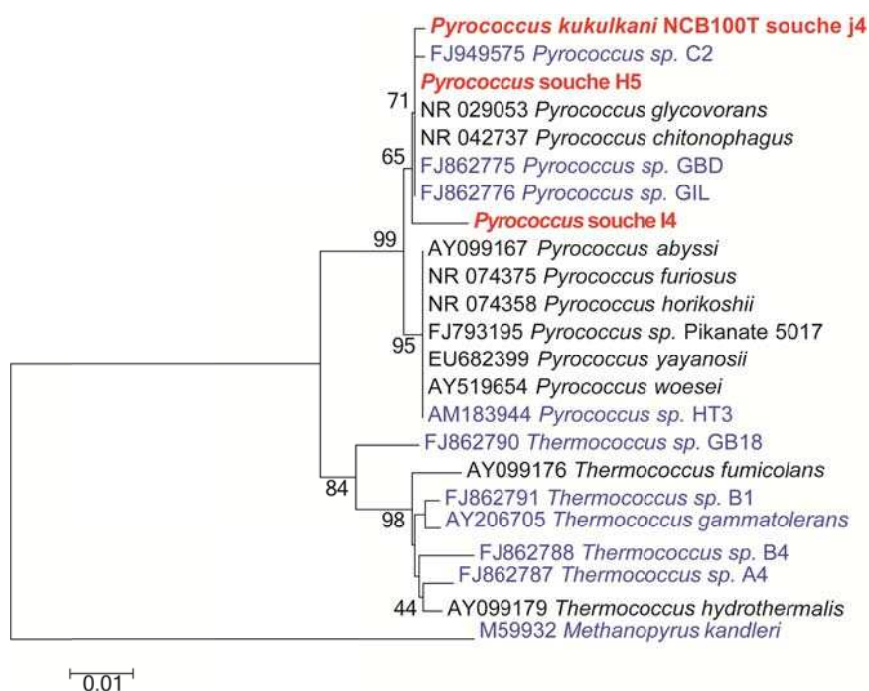
## 1.2. Résultats et discussion

De nombreuses cultures d'enrichissements utilisant une large gamme de milieux, de substrats et de températures ont donc été réalisées : 17 souches pures, ont pu être isolées, sur les milieux ciblant la sulfo-réduction et la sulfato-réduction.

Toutes les cultures d'enrichissements réalisées étaient positives et ont été utilisées pour réaliser des isolements en utilisant la technique de dilution jusqu'à extinction (Baross 1995). Lors de ces séries, des pertes de culture ont eut lieu. Ces pertes ont deux origines, 1) une mortalité soudaine des micro-organismes dans des cultures positive ; 2) l'absence de croissance lors des séries de dilution alors que la fiole servant d'inoculum était positive. Ceci a été le cas pour beaucoup de cultures indifféremment inoculées avec les broyats d'édifices hydrothermaux ou de sédiments, menées sur les différents milieux et températures listés.

Parmi les souches pures obtenues, 12 ont été isolées à partir des broyats des structures hydrothermalesensemencées sur le milieu SME. Elles ont toutes été identifiées comme appartenant à l'ordre des *Thermococcales*. Nous avons isolés 8 *Thermococcus sp.* à 70, 80, 85 et 90°C, 4 *Pyrococcus sp.* à 100°C (Tableau VII-2). A l'exception d'une souche qui représente une nouvelle espèce au sein des *Pyrococcus*, les autres isolats sont très proches (99% de similarité entre les ADNr 16S) d'espèces déjà décrites (Figure VII-1). Chez les *Thermococcales* et en particulier au sein de chaque genre (*Thermococcus* et *Pyrococcus*), les ADNr 16S sont très peu discriminant pour déterminer ou non s'il s'agit d'une nouvelle espèce. Ainsi, il serait intéressant d'identifier et de caractériser par approches poly-phasiques ces isolats et dans le cas où il ne s'agirait pas de nouvelles espèces, de les considérer comme des écotypes de « Guaymas ».

L'isolat NCB100<sup>T</sup>, quant à lui, est une nouvelle espèce *Pyrococcus*, et a été décrite (voir Etude B de ce chapitre).



**Figure VII-1:** Arbre phylogénétique de distance minimale évolution, réalisé à partir des gènes codant les ARNr 16S (gène partiel) montrant la position des souches de *Pyrococcus* isolées (en gras rouge). Les autres souches isolées du Bassin de Guaymas sont indiquées en bleu foncée. L'analyse a été réalisée en utilisant la méthode du Neighbor Joining et la correction de Kimura (2 paramètres), sur 1000 bootstrap (les valeurs au dessus de 50% sont indiquées). *Methanopyrus kandleri* a été utilisé comme outgroup

A partir des cultures d'enrichissements réalisées avec des sédiments hydrothermaux, 5 souches ont été isolées (Tableau VII-2) :

- 4 à 60°C sur différentes variantes du milieu GYPS (+ sulfate et + thiosulfate) à partir des sections sédimentaires superficielles : S1, S3 et un mélange S3-S4, appartiennent au genre *Caminicella* (proches à 99% de *Caminicella sporogenes*)
- 1 à 90°C sur milieu SME est affilié au genre *Thermococcus*.

Par ailleurs, les cultures réalisées avec des milieux gélosés en aérobioseensemencés avec des sédiments de surface (sections S0, S1, soit jusqu'à 2 cm de profondeur), ont permis le développement de champignons. Des thalles blanchâtres ou crémeux ont été observés aux trois températures testées : 30, 40 et 50°C. Ces champignons sont en cours d'identification au LUBEM l'ESIAB (École Supérieure d'Ingénieurs en Agroalimentaire de Bretagne atlantique).

**Tableau VII-2 :** Isolats obtenus en fonction de l'inoculum, du milieu de culture utilisé et de la température d'isolement.

Inocula	Milieu de culture	Température °C d'isolement	Isolats : nombre et affiliation	
Broyat d'une flange hydrothermale du site Rebecca's Roost échantillon 1747-BIG01E03	SME	70	1 <i>Thermococcus</i> sp.	
		80	1 <i>Thermococcus</i> sp.	
		85	1 <i>Thermococcus</i> sp.	
		90	1 <i>Thermococcus</i> sp.	
		100	2 <i>Pyrococcus</i> sp. (dont une nouvelle espèce souche J4) (et souche I4)	
Broyat d'une cheminée hydrothermale BIG 2 échantillon 1746-BIG01E02	SME	70	1 <i>Thermococcus</i> sp.	
		80	1 <i>Thermococcus</i> sp.	
		85	1 <i>Thermococcus</i> sp.	
		90	1 <i>Thermococcus</i> sp.	
		100	2 <i>Pyrococcus</i> sp. (souche H5)	
Sédiments du site Marker 27 : PI 1766 CT2 S3	SME	90	1 <i>Thermococcus</i> sp.	
Sédiments du site BIG 1 : PI 1764 CT3 S3-S4	GYPS + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	60	1 <i>Caminiella</i> sp.	
Sédiments du site Marker 27 PI 1766 CT2	S3	GYPS + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	60	1 <i>Caminiella</i> sp.
	S1	GYPS + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	60	1 <i>Caminiella</i> sp.
	S1	GYPS + S°	60	1 <i>Caminiella</i> sp.

### 1.3. Synthèses et perspectives

Le petit nombre de souches pures obtenu et les échecs lors de la réalisation des dilutions jusqu'à extinction suggèrent que les conditions de culture utilisées n'étaient pas optimales pour la culture des procaryotes impliqués dans les différents métabolismes ciblés :

- soit par absence d'un élément nécessaire à leur croissance (ex éléments traces nécessaire à certaine enzyme ou facteurs) qui aurait été apporté par l'inoculum puis épuisé au cours des repiquages successifs
- soit par la perte d'une association syntrophique : un des partenaires et par extension ses métabolites libérés dans le milieu, ont été perdus au cours des différents repiquages
- soit par excès d'un composé qui leur est toxique

Connaissant maintenant la composition multi-élémentaire du fluide hydrothermal, de l'eau de mer profonde ainsi que celle des eaux interstitielles, concevoir des milieux de cultures recréant les conditions *in situ* pourrait permettre d'accéder à plus grande diversité cultivable. De plus, ces informations couplées aux données de diversité microbienne obtenues lors des inventaires moléculaires réalisés pour tous les échantillons : structures hydrothermales et sédiments, nous

permettraient de choisir des inocula et d'orienter les milieux de culture afin de cibler un ou des micro-organismes potentiellement impliqué dans une réaction du cycle du soufre ou du fer.

Afin de cultiver et d'isoler une plus large fraction des micro-organismes présents dans ces échantillons et impliqués dans les cycles du soufre et du fer, il pourrait être également envisagé de multiplier les conditions de culture en faisant varier certains paramètres physico-chimiques tels que :

- la température,
- les sources et concentration en carbone,
- les sources et concentration en accepteurs et donneurs d'électrons,

en réalisant, par exemple, des cultures en autotrophie et lithoautotrophie non effectué jusqu'à présent. En effet, dans tous nos essais, afin de se rapprocher au maximum des conditions *in situ* (les sédiments du Bassin de Guaymas contiennent entre 2 et 4% de matière organique (Von Damm et al. 1985)), des substrats organiques ex : extrait de levure, peptone acétate, pyruvate, glucose, ont été utilisés comme sources de carbone et/ou d'énergie dans tous nos milieux de cultures. Une autre alternative serait donc de tester d'autres sources de carbone que celles utilisées telles que des sucres (fructose, maltose, amidon, glycogène), des alcools (glycérol, éthanol, méthanol), des substrats protéiques (chitine, gélatine, acides aminés) ou des acides organiques à longue chaîne ramifiée ou non (palmitate, valérate, isopalmitate) ou aromatiques (benzoate).

Le Bassin de Guaymas étant un environnement très riche en hydrocarbures (Simoneit 1985; Bazylinski et al. 1988; Whelan et al. 1988; Didyk and Simoneit 1990), une autre piste serait donc d'utiliser des hydrocarbures comme des alcanes, alcènes à plus ou moins longues chaînes ou des hydrocarbures cycliques (ex benzoate, alkyl-benzène, naphthalène) comme donneurs d'électrons lors de la sulfato-réduction ou ferri-réduction. L'utilisation d'hydrocarbures pour enrichir et isoler des micro-organismes sulfato-réducteurs de la Dépression sud du Bassin de Guaymas a déjà porté ces fruits. En effet, des cultures ont permis d'enrichir des micro-organismes sulfato-réducteurs utilisant du benzène comme source d'énergie (Phelps et al. 1998) ; d'autres ont permis d'isoler des souches pures qui oxydent l'éthyl-benzène (souche EbS7 (Kniemeyer et al. 2003)), le butane (souche BuS5 (Kniemeyer et al. 2007)) ou les n-alcanes (souche *Desulfothermus naphthae* TD3 (Rueter et al. 1994)) (Teske 2010).

Il a également été prouvé, à partir de différents échantillons d'eau de mer ou de sol, qu'employer des milieux pauvres en nutriments permettaient d'augmenter la cultivabilité et par là, l'isolement de micro-organismes (Connon and Giovannoni 2002; Sangwan et al. 2005; Alain and Querellou 2009). Il a également été démontré que la durée d'incubation (en l'augmentant), ainsi que le taux d'inoculation, de même l'utilisation de molécules impliquées dans la signalisation intercellulaire comme l'AMPC, pouvaient avoir des conséquences sur l'enrichissement et l'isolement

de micro-organismes (Bruns et al. 2002; Bruns et al. 2003; Stevenson et al. 2004; Alain and Querellou 2009).

Une autre alternative pour élargir les conditions de cultures et permettre potentiellement d'isoler des micro-organismes présents aux interfaces : sédiments-eau de mer, cheminée-eau de mer et susceptibles d'être impliqués dans l'oxydation du soufre, de l'hydrogène sulfuré ou du fer ferreux, serait de réaliser des cultures en aérobiose ou en micro-aérophilie. Par exemple *Persephonella guaymasensis* est une souche hydrogène-oxydante micro-aérophile isolée d'une cheminée hydrothermale du site Rebecca's Roost du Bassin de Guaymas (Gotz et al. 2002). De même, la mise en place de cultures en double gradient de concentration de substrat entre un donneur d'électron et l'oxygène, à haute température pourrait notamment être utilisé pour l'enrichissement, voire l'isolement de communautés ferro-oxydantes ou sulfo-oxydantes. Ceci pourrait être réalisable notamment en utilisant par exemple du Gelzan™ (Gelrite®) ou un autre agent gélifiant résistant aux hautes températures, à la place de l'agar. Ainsi, adapter aux hautes températures (> 60°C) les milieux de culture utilisés pour isoler *Mariprofundus ferrooxydans* PV1 (Emerson et al. 2007) ou d'autres FeOB (iron-oxidizing bacteria, bactérie ferro-oxydante) (Edwards et al. 2003) tout en faisant varier les sources de fer ferreux en solution comme du FeCl<sub>2</sub> ou du FeSO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ou minérales ex : sidérite, pyrite, chalcopyrite, marcasite ou de la pyrrhotite typique des édifice hydrothermaux ou non comme des substrats basaltiques pourraient être une voie pour tenter d'isoler des micro-organismes ferro-oxydants thermophiles. De la même façon, réaliser à des températures supérieures à 60°C, des cultures en double gradient oxygène-hydrogène sulfuré en modifiant les milieux de cultures conçus notamment pour cultiver des *Beggiatoa* (Jørgensen and Revsbech 1983; Nelson and Jannasch 1983; Hagen and Nelson 1996) pourraient être utilisés en vue de cultiver tout type de micro-organismes sulfo-oxydants.

Une autre piste, serait de tenter, à partir d'une culture de communauté réalisée en bioréacteur Gas-Lift, d'isoler des populations enrichies soit en utilisant le même milieu que celui du bioréacteur, soit en sélectionnant un milieu en fonction des connaissances actuelles sur la communauté ciblée (par exemple : un milieu contenant des oxydes de Fer(III) pour tenter d'isoler des *Geoglobus species* car les espèces isolées à ce jour, ne sont capable d'utiliser que du Fer(III) comme accepteur d'électrons (Kashefi et al. 2002; Slobodkina et al. 2009)).

Ces perspectives ont plusieurs buts : tout d'abord, d'enrichir et d'isoler de nouveaux micro-organismes thermophiles ou non, afin d'accroître notre vision de la diversité microbienne des écosystèmes hydrothermaux marins profonds et ainsi d'obtenir des informations sur leurs métabolismes. Ceci, afin de mieux connaître leurs fonctions, rôles écologiques et également leurs potentielles interactions avec leur environnement : autres communautés microbienne et/ou biotope : altération minérale, production directe ou indirecte de minéraux, fluide, rôle dans la diagénèse.

## **2. Etude B : Article 5 - Caractérisation d'une nouvelle souche d'*Archaea* anaérobie et hyperthermophile isolée d'un édifice hydrothermal du Bassin de Guaymas: *Pyrococcus kukulkanii* sp. nov.**

### **Préambule**

Le travail de caractérisation de cette nouvelle espèce est en cours. Cette caractérisation sera entièrement terminée après obtention du contenu en G+C% de l'ADN génomique du nouvel isolat et après séquençage, annotation et comparaison in silico de son génome avec ceux des autres souches de *Pyrococcus* décrites, pour lesquelles, les génomes ont déjà été séquencés et annotés. Ainsi, comme cela a été réalisé pour la description de *Pyrococcus yanosii* (Birrien et al. 2011), les gènes encodant pour les protéines ribosomiques pourront être concaténés et comparés avec ceux des autres *Pyrococcus* décrits afin de construire un arbre phylogénétique (Jolley et al. 2012).

### ***Pyrococcus kukulkanii* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent at the Guaymas Basin**

***Projet de publication pour : International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM).***

*Par souci de clarté, cet article n'est pas présenté selon le format imposé par IJSEM*

#### **Authors & Affiliations:**

Nolwenn Callac<sup>abcd</sup>, Françoise Lesongeur<sup>abc</sup>, Pauline Vannier<sup>abc</sup>, Grégoire Michoud<sup>abc</sup>, Mickael Beauverger<sup>abc</sup>, Olivier Rouxel<sup>de</sup>, Mohammed Jebbar<sup>abc</sup> and Anne Godfroy<sup>abc</sup>

<sup>a</sup>Université de Brest, UEB, IUEM, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197 place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France.

<sup>b</sup>Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, 29280 Plouzané, France.

<sup>c</sup>CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197, 29280 Plouzané, France.

<sup>d</sup>Université de Brest, Domaines Océaniques IUEM, UMR6538, Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané, France.

<sup>e</sup>Ifremer, Laboratoire de Géochimie et de Métallogénie, 29280 Plouzané, France.



## Abstract

A novel hyperthermophilic, anaerobic archaeon, designed as NCB-100<sup>T</sup>, was isolated from a hydrothermal vent sample collected on the Guaymas basin at a depth of 1997 m on the hydrothermal vent site named "Rebecca's Roost". The cells are irregular and highly motile cocci. The enrichment and isolation were done at 100°C under atmospheric pressure. Growth was observed between 70 and 112°C (optimum 105°C). The pH range for growth at 100°C was between 3.5 and 8.5 (optimum at 7). The isolate require for growth a salt concentration ranging between 1.5% and xxx% (optimum at xx%). Strain NCB-100<sup>T</sup>, is also able to growth under hydrostatic pressure at 20, 30, 40 or 50 Mpa at 100°C, 105°C and at 20 and 30 Mpa (not test above) at 110°C.

The new isolate is strictly anaerobe and chemoorganoheterotroph growing by fermentation of complex protineaceous substrates as yeast extract, peptone, tryptone and also on glycogen and starch along with sulfur-reduction. Elemental sulfur was required for growth and was reduced to hydrogen sulfide. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequencing, revealed that the strain NCB-100<sup>T</sup> belonged to the genus *Pyrococcus*. However, based on the physiological characteristics of the strain NCB100<sup>T</sup>, which differ from those of the other described and published *Pyrococcus* strain, this new organism represents a novel species for which, the name of *Pyrococcus kukulkanii* sp. nov. is proposed. The type strain is NCB100<sup>T</sup> (=DSM XXX, =).

## Introduction

To date, among the anaerobic and hyperthermophilic deep-sea hydrothermal vent strains, the most frequently isolated belongs to the *Thermococcales* order especially to the *Thermococcus* genus. Members of the *Thermococcales* are currently divided among three genera: *Thermococcus* (Zillig et al. 1983), *Pyrococcus* (Fiala and Stetter 1986) and *Paleococcus* (Takai et al. 2000). Isolated strains belonging to the *Thermococcales* share the same physiologic and metabolic properties: strictly anaerobes and hyperthermophiles chemoorganoheterotrophs growing by fermentation and sulfur-reduction. They grow on complex organic substrates like as yeast extract, tryptone or peptone by fermentation often associated to sulfur-reduction with a concomitant H<sub>2</sub>S formation. Elemental sulfur is required for the growth of some species; for other strains, it improves their growth. Compared to the *Thermococcus*, which are, according to their occurrence in clone libraries (Reysenbach et al. 2000; Slobodkin et al. 2001) and the number of strain in collection frequently found in marine hydrothermal vents (for example (Huber et al. 1995; Godfroy et al. 1996; Godfroy et al. 1997; Jolivet et al. 2004; Gorlas et al. 2013)), members of *Pyrococcus* and *Palaeococcus* are currently lesser retrieved by molecular survey and in culture (Barbier et al. 1999; Takai et al. 2000; Birrien et al. 2011).

35 To date, only seven described *Pyrococcus* species have been isolated from shallow and deep-sea hydrothermal chimneys: *P. furiosus* (Fiala and Stetter 1986), *P. horikoshii* (Gonzalez et al. 1998), *P. abyssi* (Erauso et al. 1993), *P. glycovorans* (Barbier et al. 1999), *P. yayanosii* (Birrien et al. 2011) and *Pyrococcus* GB-D (Jannasch et al. 1992) as well as the reclassified *Thermococcus chitinophagus* (Huber et al. 1995). In addition two other *Pyrococcus* were isolated from a terrestrial environment:  
40 “El Biban” hot spring in Algeria for *Pyrococcus* strain HT3 (Kecha et al. 2007) and from sediment collected near the Pong Duet Hot Spring, in Thailand for *Pyrococcus* strain Pikanate PK 5017 (Pasomsup et al. 2011; Kanoksilapatham et al. 2012).

Also, some deep-sea *Pyrococcus* were isolated from the Guaymas Basin and studied in term of temperature growth condition and carbon substrate requirements (Teske et al. 2009). In this  
45 experiment, all strains were shown to grow at 90°C or 96°C and/or 99°C and are able to use yeast extract, peptone, tryptone, casatone or a 20 amino-acids mixture but no growth was observed on casamino-acids, sugars, organic acids and hydrocarbon.

Thus, owing the *Pyrococcus* strains isolated from the Guaymas basin from both hydrothermal chimneys as *Thermococcus chitinophagus* (Huber et al. 1995) and *Pyrococcus* strain GB-D (Jannasch  
50 et al. 1992) and hydrothermally-heated sediments (Teske et al. 2009), it seems that *Pyrococcus* are one of the hyperthermophile and chemoorganoheterotroph key player in the hydrothermal area of the Guaymas Basin.

In this study, a novel hyperthermophilic *Archaea* belonging to the genus *Pyrococcus*, was isolated from a deep-sea hydrothermal vent and described.

55

## Materials and methods

### Sample collection

A fragment of an active hydrothermal flange sample was collected at a depth of 2004 m during the oceanographic cruise BIG (RV *L'Atalante* June-July 2010), on the “Rebecca’s Roost” vent site (27°  
60 00.634’ N 111° 24.405’ W; 1997 m depth) in the Southern trough area in the Guaymas Basin (Gulf of California, Mexico) using the manned submersible *Nautilie* (dive 1747). The chimney fragment was brought to the surface into an aseptic insulated box previously filled on board with sterile freshwater. Once on board, the sample (PI1747-BIG03E01) was immediately crushed and sub-sampled under sterile conditions into an anaerobic chamber (La Calhène, France) under N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 90:5:5 gas  
65 atmosphere, and stored in sterile vials filled with sterile NaCl solution at 23 g.L<sup>-1</sup>, under anaerobic condition (N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 90:5:5) at 4°C for further microbial cultivation.

70 **Culture conditions**

The SME medium contains per liter of deionized water: 23 g of NaCl; 1 g of yeast extract; 1 g of peptone; 3.46 g of PIPES buffer 10 ml of magnesium solution (for 1 liter of deionized water: MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O 180g; MgCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O 140g), 1 ml of each A, B, C and D solutions (composition for each solution, for 1 liter of deionized water, A solution: MnSO<sub>4</sub>.4 H<sub>2</sub>O, 9g; ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 2.5g; NiCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O, 2.5 g; 75 AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12 H<sub>2</sub>O, 0.3 g; CoCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O, 0.3 g; CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O, 0.15g, B solution: CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O, 5, 6 g; NaBr, 25 g; KCl, 16 g; KI, 10 g; SrCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O, 4 g, C solution: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 7.5 g, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O, 3.3g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O, 0.15 g, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.005g, and D solution: FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 10g), and 1 mg of rezasurin (all compounds from Sigma Aldrich, except yeast extract from Difco). The pH was adjusted to 6.5 at room temperature. Once prepared, this medium was autoclaved and then cooled to room temperature. 80 Then, it was transferred into an anaerobic chamber (La Calhène, France) containing N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (90:10) gas atmosphere. Concentrated anaerobic filter sterilized solution of poly-vitamins (Balch et al. 1979) and sterilized elemental sulfur (sterilized by tyndallization at 100°C for 30 min on two successive days) were added to the medium to final concentrations of 0.04 % (w/v), and 10g.L<sup>-1</sup>, respectively. The medium was reduced with 10 ml of a sterile stock solution of Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O at 5% (w/v) and then 85 distributed into 50 mL penicillin vials which were closed with a butyl rubber and an aluminum cap. Unless stated otherwise, incubations were done anaerobically at atmospheric pressure, in the dark and without agitation.

**Enrichment and purification procedures**

90 The chimney sample was used to inoculate SME medium (10% v/v) in anaerobic condition at various temperatures 70, 80, 85, 90 and 100°C. After 15 h of incubation, dense populations of coccoid motile cells were observed in all culture conditions. The cultures were then purified by six to eight repeated serial of dilution-to extinction series (1:10) (Baross 1995) in SME medium at their enrichment temperature. The purity of this isolate was confirmed routinely by microscopic examination and by 95 repeated cloning and sequencing of 4 16S rRNA genes.

Within the numerous thermophilic strains obtained from this sample inoculated in SME medium one strain, strain NCB100<sup>T</sup> was isolated at 100°C and is described in this study.

**Storage**

100 Cultures harvested in exponential growth phase were stored at 4°C and remain active for at least 1 year. For long time storage, stock cultures, in SME medium, were stored anaerobically in cryotube at -80°C after addition of DMSO (dimethyl sulfoxide 5%v/v) as cryoprotectant.

**Observation of the culture, quantification and morphology**

105 Cells were observed under an Olympus™ BX60 phase contrast microscope (X400) equipped with a phase contrast oil-immersion objective. Cell quantification was monitored by direct cell counting using a Thoma chamber (depth 0.02 mm) on fresh culture or after cell fixation with 1 % glutaraldehyde (v/v) and storage at -20°C. Scanning electron microscopy (SEM, Quanta 200; FEI) was used to determine the cell diameter and the position of archaella (archaeal flagella).

110 Growth rates were calculated using linear regression analysis of four points along the logarithmic portions of the resulting growth curves.

#### **Determination of growth parameters**

The physiological characterization of the new isolate was performed in triplicate, anaerobically in 50 ml penicillin flask containing 20 ml of SME medium with elemental sulfur. The determination of the temperature range for growth was tested over the range 60–115°C (i.e. 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 112 and 115°C). The pH range for growth was performed between pH 3 and 9.5, at 105°C in the SME medium buffered and adjusted to the required initial pH with 10 mM of the following buffer: for pH 3, 3.3, 4 and above 9.5, no buffer; for pH 4.5, 5, 5.5 and 6, MES buffer (Sigma); for pH 6.5 and 7 PIPES buffer (Sigma); pH 7.5 and 8 HEPES buffer (Sigma); for pH 8.5, 9 and 9.5 AMPSO buffer (Sigma). The pH was adjusted with NaOH or HCl. The salt concentration range for growth was tested at 105°C in SME medium containing: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.3, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7 and 7.5 of NaCl % (w/v).

#### **Growth under hydrostatic pressure**

The ability of the strain to growth under hydrostatic pressure was tested in triplicate at 20, 30, 40 and 50 Mpa at 100 and 105°C; and at 20 and 30 Mpa at 110°C. For these experiments, the cultures were performed anaerobically, in 5 mL syringes (Thermo) which contained SME medium with yeast extract (5 g.L<sup>-1</sup>) and elemental sulfur (10 g.L<sup>-1</sup>) and inoculated with 2.5 % (v/v) of an atmospheric pre-culture in mid-exponential growth phase. As described by Erauso and colleagues (Erauso et al. 1993), prior to seal the syringe, gas phase was expelled. Afterwards, the syringes were placed in a pre-heated stainless steel pressure vessel (high-pressure/high-temperature incubation system, custom-built by Top-Industrie (Vaux le Pénil Cedex, France), and were brought to the required couple of pressure and temperature.

135

#### **Determination of growth requirements**

The determination of growth requirement and substrates utilization were done in 27 mL Hungate tubes containing 10 mL of SME medium at pH 6.5 and at 100°C in order to avoid sugar reduction (and inability for the strain to metabolize these substrates).

140 All growth requirement tests were performed in triplicate and the result was determined after three successively cultures successfully transferred into fresh medium; each culture was done overnight. Various individual carbon sources were tested using the SME prepared without yeast extract and peptone in the presence of sulfur. Carbone sources: yeast extract, peptone, tryptone, maltose, glucose, sucrose, galactose, cellobiose, starch, glycogen, acetate, formate, pyruvate, succinate, 145 casein, casamino-acids and chitin, were added at a final concentration of 5g.L<sup>-1</sup>, excepting for ethanol and glycerol which were added at 5 mL.L<sup>-1</sup>. Growth on 20 amino-acids mixture each at 0.1 mM was also tested. Negative controls were done using medium without carbon sources.

To examine the ability of the isolate to grow without elemental sulfur, cells were cultivated in SME 150 medium without sulfur but with glycogen as carbon source (5 g.L<sup>-1</sup>). For this experiment, individual electron acceptor were tested : sulfate, thiosulfate, sulfite and nitrates at 10 mM final, elemental sulfur and L-cystine at 10 g.L-1 each, ferric iron (poorly crystalline Fe(III) oxides), in the presence of oxygen or under gas phase of N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90:10, 150 kPa). Negative controls using medium without electron acceptor.

Various nitrogen sources were tested in nitrogen-depleted medium using the SME medium prepared 155 without yeast extract and peptone but with glycogen (5 g.L<sup>-1</sup>) as carbon source and elemental sulfur (10 g.L<sup>-1</sup>) as electron acceptor. NH<sub>4</sub>Cl (20 mM), nitrates (10 mM), urea (2 g.L<sup>-1</sup>), gelatin (2 g.L<sup>-1</sup>), yeast extract (0.5% v/v), peptone (0.5% v/v), tryptone (0.5% v/v), 20 amino-acids mixture each at 0.1 mM as well as under N<sub>2</sub> gas phase, were tested as potential nitrogen sources.

#### 160 **Sulfide determination**

H<sub>2</sub>S production was determined using the Cord-Ruwisch test (Cord-Ruwisch 1985) : by addition of 0.2 mL of culture in 1.8 mL of a mix containing 5 mM of CuSO<sub>4</sub> and 50 mM of HCl. A dark brown precipitate confirmed the presence of sulfide and was compared with the non inoculated control medium incubated under the same conditions.

165

#### **DNA extraction**

Cells were grown in SME medium with yeast extract (5 g.L<sup>-1</sup>) and sulfur (10 g.L<sup>-1</sup>) at 105°C. The culture was harvested at the end of the exponential growth phase. After centrifugation, genomic DNA was extract from the cell pellets using a traditional chemical and enzymatic lysis method. Extractions 170 were performed on frozen samples (i.e. crushed samples or filters), in TE-Na 1X lysis buffer (Tris-HCl pH8, 100 mM; NaCl 100 mM; EDTA pH8, 50 mM) which Sarkosyl (1% final), SDS (1% final) and proteinase K (0.4 mg.mL<sup>-1</sup> final) were added and incubated at 55°C for 3h. Supernatant were removed and treated once with equal volume of PCI (phenol/chloroform/isoamyl alcohol: 25/24/1, v/v/v) and once with an equal volume of chloroform. Then nucleic acids were precipitated in 0.7

175 volume of isopropanol and wash in an equal volume of ethanol 96%. After centrifugation at 10000 *g* during 10 min, nucleic acids were dried and finally re-suspended in 200 µL of TE 1X buffer (Tris-HCl pH8 at 100 mM, EDTA pH 8 at 2 mM).

#### DNA base content

180 The genomic DNA G+C content was determined by the Identification Service of the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany).

#### 16S rRNA gene amplification and sequence analysis

185 The partial 16S rRNA gene was amplified using the specific archaeal primers combination of A8F (5'-CGGTTGATCCTGCCGGA-3') and ARC915R (5'-CTGCTCCCCGCCAATTCCT-3') (Casamayor et al. 2000; Kolganova et al. 2002). Prior to cloning, positively amplified PCR products were gel purified using NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel) according the manufacturer's instructions. The 16S rDNA clone libraries were carried out with the TOPO XL cloning kit (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. Positive clones were processed for sequencing at GATC Biotech  
190 (Konstanz, Germany) using M13F primers.

Sequences were compared with a set of selected sequences of formerly described *Pyrococcus* species: *P. abyssi*, ; *P. furiosus*; *P. horikoshii*, *P. glycovorans*; *P. yayanosii*; *P.* strain HT3; *Pyrococcus* strain Pikanate PK 5017; *Thermococcus chitinophagus*; *P. woesei* AY519654 or from strains isolated from the Guaymas Basin: *Pyrococcus* strain GBD, FJ862775; *P.* strain GIL, FJ862776; *Pyrococcus.* strain C2, FJ949575; *Thermococcus* strain GB18, FJ862790; *T.* strain B4, FJ862788; *T.* strain A4, FJ862787; *T.* strain B1, FJ862791 (Jannasch et al. 1992; Teske et al. 2009). The 16S rDNA of *T. fumicolans*, *T. hydrothermalis* and *T. gammatolerans* were also included and used as out group. Together, the 16S rRNA gene sequences were aligned edited and analyzed using Bioedit version 7.1.3 software. Phylogenetic tree was constructed using the MEGA 5 program (Kumar et al. 2008). The robustness of  
200 inferred topologies was tested using 1000 bootstrap resampling of the trees calculated on the basis of the minimum evolution distance with Kimura two-parameter correction matrix (Kimura 1980).

Because, all *Pyrococcus* species have very similar 16s rRNA gene sequences, sharing more than 97% similarity, the DNA-DNA hybridization must be carried out between all close strains to ensure that the dissimilarity between them is sufficient to approve that this isolate is a new strain (Rossello Mora and Amann 2001; Tindall et al. 2010).  
205

However the strain *Pyrococcus yayanosii* CH1 grew only under pressure with a low cell density providing poor yield of DNA (Birrien et al. 2011). An alternative method described by Birrien and colleagues (Birrien et al. 2011), based on the comparison of concatenated ribosomal protein sequences was used.

210

**Results**

**Morphological**

Phase-contrast microscopy and scanning electron microscopy show that strain NCB-100<sup>T</sup> cells are slightly irregular cocci, generally singly, occasionally in pairs. Cells diameter is xxx μm (mean xxx ±xxx μm for n=xx).

215

Cells were highly motile and xxx archaella (archaeal flagella) were observed by scanning electron microscopy. They divide by constriction

**Physiological and metabolic properties**

220

The isolate NCB100<sup>T</sup>, grows from 70 to 112°C, with an optimum growth at 105°C; no growth was observed at 65°C or 115°C. It grows from pH 3.5 to 8.5, with an optimum around pH 7.0; no growth was observed at pH 3.0 and at pH 9.0. The strain NCB100<sup>T</sup> grows at salt concentrations ranging from 1.5% to xxx% (w/v) NaCl with an optimum at xx%; no growth was observed at 1% and at XXX%.

225

Growth under hydrostatic pressure was tested at 100°C and 105°C at 20, 30, 40 and 50 Mpa, and growths occurred in all condition; as well as at 110°C at 20 and 30 Mpa (not test above 30 Mpa). A heterotrophic growth was observed only with yeast extract, peptone, tryptone, starch and glycogen; and in all case, associated with a production of H<sub>2</sub>S. The strain NCB100<sup>T</sup> grows exclusively with elemental sulfur as electron acceptor with a concomitant H<sub>2</sub>S production. Growth was observed with all nitrogen sources tested except with NH<sub>4</sub>Cl.

230

The characteristic of growth of the strain NCB100T are summarized in the Table 1.

**Table 1:** Growth requirement of the strain NCB100T in term of carbon sources, electron acceptor and nitrogen sources.

Carbon sources <sup>a</sup>			
Yeast extract	+++	Glycogen	++
Peptone	+++	cellobiose	-
Tryptone	++	Formate	-
Casein	-	Acetate	-
Casamino Acids	-	Pyruvate	-
20 Amino acids	-	Propionate	-
Chitin	-	Succinate	-
Maltose	-	Ethanol	-
Glucose	-	Glycerol	-
Sucrose	-	None (under N <sub>2</sub> )	-
Galactose	-	None (under N <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> )	-
Starch	++		

Electron acceptors <sup>b</sup>		Nitrogen sources <sup>c</sup>	
Sulfur	++	NH <sub>4</sub> Cl	-
L-Cystine	-	Nitrate	++
Cysteine	-	Urea	++
Thiosulfate	-	Glutamate	++
Sulfite	-	Gelatin	++
Formate	-	YE	+++
Nitrate	-	Peptone	+++
Fer III	-	Tryptone	++
Oxygen	-	20 amino acids	++
None (under N <sub>2</sub> )	-	None (under N <sub>2</sub> )	+
None (under N <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> )	+		

235 Cell counts after 15h, per mL of culture: -, no growth; +, 1.5x10<sup>6</sup>-1.5x10<sup>7</sup>; ++, 1x10<sup>7</sup>-1x10<sup>8</sup> and +++, ≥ 2x10<sup>8</sup> and above

<sup>a</sup> Concentration of carbon sources: yeast extract, peptone, tryptone, maltose, glucose, sucrose, galactose, cellobiose, starch, glycogen, acetate, formate, pyruvate, succinate, casein, casamino-acids and chitin, were 5g.L<sup>-1</sup>; ethanol and glycerol were 5 mL.L<sup>-1</sup>; 20 amino-acids mixture at 0.1 mM each.

240 <sup>b</sup> Electron acceptor were tested on SME medium (prepared without elemental sulfur, yeast extract and peptone, but with glycogen as carbon source at 5 g.L<sup>-1</sup>) at 10 mM for sulfate, thiosulfate, sulfite and nitrates; at 10 g.L<sup>-1</sup> for elemental sulfur, L-cystine and ferric iron (poorly crystalline Fe(III) oxides); or under gas phase : oxygen or of N<sub>2</sub> or N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (90:10, 150 kPa).

245 <sup>c</sup> Nitrogen sources were tested on SME medium (prepared without yeast extract and peptone, but with glycogen as carbon source at 5 g.L<sup>-1</sup> and elemental sulfur as electron acceptor at 10 g.L<sup>-1</sup>) at 20 mM for NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM for nitrates; 2 g.L<sup>-1</sup> for urea and gelatin; 0.5% (v/v) for yeast extract, and tryptone; 20 amino-acids mixture at 0.1 mM each or under N<sub>2</sub> gas.

### DNA base composition

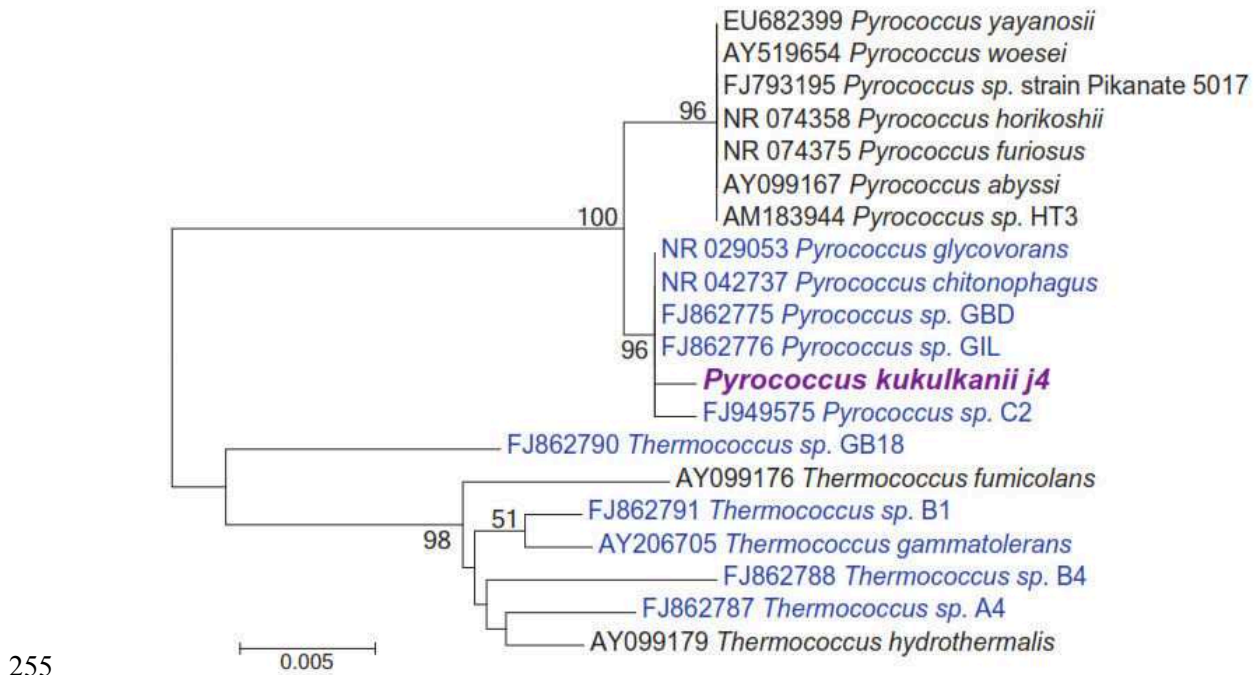
The genomic DNA G+C content of the NCB100<sup>T</sup> was XXX%

250

### Phylogenetic analysis: taxonomic position of the novel isolate

The analysis of the partial 16S rRNA gene sequence of the NCB100<sup>T</sup> (730 bp) specified that the new isolate belonged to the order *Thermococcales* in particular to the *Pyrococcus* genus (Figure 2).





255

**Figure 1:** Minimum-evolution distance tree made with the partial length of the 16S rRNA gene showing position of the *Pyrococcus kukulkanii* strain (in bold purple), to other characterized or isolated species in the genera *Thermococcus* and *Pyrococcus*. In blue, species isolated from the Guaymas Basin. Bootstrap values are reported for all groups with over 50% bootstrap support on the basis of 1000 replicates.

260

### Discussion

Despite 16S rRNA gene sequences very close between the new strains and other formally described *Pyrococcus* species, the strain NCB100<sup>T</sup> differs from others on the basis of numerous physiological and metabolic features. These characteristics are described and compared in detail in Table 2.

265

Thus, the new strain differs from its closest relatives in term of range and optimum of temperature, pH and salt concentration.

Indeed, compared to the other described *Pyrococcus* strains, the isolate NCB100<sup>T</sup> is the most thermophilic with an optimal growth temperature at 105°C against 100°C for *P. furiosus* the formerly records among the *Pyrococcus* and present the widest temperature range for growth.

270

In addition, differences in the metabolic properties utilization of carbon and nitrogen sources and electron acceptor were observed. In contrast to *Pyrococcus yayanosii*, *P. furiosus*, *P. abyssi* and *P. horokoshii*, the novel strain is unable to used casein, and compared to *Pyrococcus yayanosii*, *P. furiosus* and *P.glycovorans* the NCB100<sup>T</sup> strain is not able to use cellobiose or sucrose. It differ from *Pyrococcus yayanosii*, *P. furiosus* and *P. abyssi*, NCB100<sup>T</sup> as being unable to grow on pyruvate (as any other organic acids tested) as carbon source.

275

Additionally, by contrast with *Pyrococcus yayanosii*, *P. furiosus*, *P. abyssi* and *P.glycovorans*, and like for strain GB-D sulfur is necessary for the growth of NCB100<sup>T</sup>.

Finally, another distinctive feature lies in the DNA G+C content.

280 In conclusion owing all the distinctive properties, it is proposed that the strain NCB100T is a novel species belonging to the *Pyrococcus* genus, for which the name *Pyrococcus kukulkanii* sp. nov. is proposed.

**Table 2:** Comparison of characteristics of strain NCB100T and related members of the *Pyrococcus* genus.

Data for *Pyrococcus yayanosii* were taken from Birrien et al., 2011; *P. glycovorans* from Barbier et al., 1999; *P. abyssi* from Erauso et al., 1999; *P. horikoshii* from Gonzalez et al., 1998; *P. furiosus* from Fiala and Stetter, 1986; *Pyrococcus* GB-D from Jannasch et al., 1992; *Pyrococcus* strain HT3 from Kecha et al., 2007 and for *Pyrococcus* strain Pikanate PK 5017 from Kanoksilapatham et al., 2012. +, Positive; -, negative; W, weak growth; ND, not determined

Characteristic	NCB 100 <sup>T</sup>	<i>P. yayanosii</i>	<i>P. glycovorans</i>	<i>P. abyssi</i>	<i>P. horikoshii</i>	<i>P. furiosus</i>	strain GB-D	strain HT3	strain Pikanate PK 5017
Geographical origin	Rebecca's Roost, Guaymas Basin	Ashadze, Mid-Atlantic Ridge	13°N, East Pacific Rise	North Fidji Basin, Pacific Ocean	Okinawa Trough, Pacific Ocean	Vulcano, Italy	Guaymas Basin	El Biban hot spring, Algeria	Pong Duet Hot Spring, Thailand
depth (m)	1997	4100	2650	2000	1395	0	2020	0	1000 above sea level
Motility/morphology	Motile and irregular cocci	Motile cocci	Motile cocci	Motile cocci	Irregular cocci	Motile and irregular cocci	Irregular cocci	Motile cocci	Irregular cocci
Seize (µM)		0.6-1.4	0.5-1.5	0.8-2	0.8-2	0.8-2.5	0.8-1	ND	0.7-1.2
Metabolism	Strictly anaerobic	Strictly anaerobic	Strictly anaerobic	Strictly anaerobic	Strictly anaerobic	Strictly anaerobic	Strictly anaerobic	Strictly anaerobic	Strictly anaerobic
Growth condition									
Temperature range (°C)	70-112	70-108	75-104	67-102	80-102	70-103	65-103	70-95	75-105
Optimum temperature (°C)	105	98	95	96	98	100	95	85	95-100
pH range	3.5-8.5	6-9.5	2.5-9.5	4-8.5	5-8	5-9	ND	6-9	5-7.8
Optimum pH	7	7.5-8	7.5	6.8	7	7	ND	7.5	7.2
NaCl range (% w/v)		2.5-5.5	1.7-5.2	0.7-5	1-5	0.5-5	ND	1-2.5	0.25-4
Optimum range (% w/v)		3.5	2.6	3	2.4	2	ND	2	2.4
Doubling time (min)		50	30	33	32	37	36	35	

Résultats des cultures en fioles

Characteristic	NCB 100 <sup>T</sup>	<i>P. yayanosii</i>	<i>P. glycovorans</i>	<i>P. abyssi</i>	<i>P. horikoshii</i>	<i>P. furiosus</i>	strain GB-D	strain HT3	strain Pikanate PK 5017
DNA G+C content (mol%)		49	47	45	44	38	39.47	43	42.5
Carbon sources									
Yeast extract	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Peptone	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tryptone	+	+	ND	+	+	+	+	+	ND
Casein	-	+	-	+	+	+	ND	+	+
20 Amino acids	-	ND	+	+	ND	ND	ND	+	ND
Chitin	-	+	+	-	ND	-	ND		ND
Maltose	-	-	+	+	-	+	-	+	+
Glucose	-	W	+	-	-	-	-	+	ND
Sucrose	-	+	+	+	-	-	ND	+	ND
Starch	+	+	+	+	-	+	-	+	W
Glycogen	+	-	ND	+		ND	ND	+	ND
Cellobiose	-	+	+	-	+	-	ND	+	ND
Acetate	-	+	ND	ND	-	-	ND	-	ND
Pyruvate	-	+	-	+	-	-	ND	+	ND
Glycerol	-	+	ND	ND	-	-	ND	ND	ND
Growth with elemental sulfur	Necessary	Enhanced	Enhanced	Enhanced	Enhanced	Enhanced	Necessary	Enhanced	Enhanced

### **Description of *Pyrococcus kukulkanii* sp. nov.**

*Pyrococcus kukulkanii* (*ku.kul.kanii*. xxxx. *kukulkanii* for Kukulkan, the Pre-Columbian America divinity born in the ocean, he is the divinity of the four elements, of the creation, resurrection and reincarnation in the Mayan mythology).

Cells are motile irregular rods, approximately xxx  $\mu\text{m}$  in diameter, with xxx archaella (flagella). Optimal growth occurs at 105°C, with a growth range of 70-112°C. The pH ranges are 3.5-8.5 (optimum 7.0) and the NaCl ranges are 1.5-xx % (w/v) (optimum, xx% w/v NaCl). The Strain NCB-100<sup>T</sup>, is also able to growth under hydrostatic pressure at 20, 30, 40 or 50 Mpa at 100°C, 105°C and at 20 and 30 Mpa (not test above) at 110°C. Growth occurs under strictly anaerobic conditions by fermentation of complex protineaceous substrates as yeast extract, peptone, tryptone as well as glycogen and starch along with sulfur-reduction. Elemental sulfur is required for growth as electron acceptor and is reduced to hydrogen sulfide. Maltose, glucose, sucrose, galactose, cellobiose, acetate, formate, pyruvate, succinate, casein, casamino-acids, chitin, ethanol, glycerol and 20 amino-acids mixture are not used. Sulfate, thiosulfate, sulfite, nitrates L-cystine at 10 g.L-1 each and ferric iron (poorly crystalline Fe(III) oxides are not used as electron acceptor. Nitrates, urea, gelatin, yeast extract, peptone, tryptone, 20 amino-acids mixture were used as nitrogen sources.

The type strain, NCB-100<sup>T</sup> (=DSM = JCM), was isolated from the flange of an active deep-sea hydrothermal chimney at the depth of 1997 m at the Rebecca's Roost site on the Guaymas Basin (27° 00.634' N 111° 24.405' W); Mexico. The strain is also available under request at the 'Souchothèque de Bretagne' (catalogue LMBE) culture collection (<http://www.ifremer.fr/souchotheque/>). The genomic DNA G+C content of the strain NCB-100<sup>T</sup> is xx mol%.

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge the BIG shipboard cruise party for their work and support during the BIG cruise: officers, crew and technicians of the *R/V L'Atalante*, the DSV *Nautile* team and scientific team, in particular Céline Rommevaux-Jestin for her precious help during the hydrothermal flange sampling and processing. This cruise was funded by IFREMER (France) and has benefited from a work permit in Mexican waters (DAPA/2/281009/3803, October 28th, 2009). This work was supported by Ifremer, the GIS Européle Mer, UEB, CNRS, INSU and has benefited from state aid managed by the Agence Nationale de la Recherche under the program "Investments for the Future" with the reference ANR-10-LabX-19-01.

## References

- Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese and R. S. Wolfe** (1979). Methanogens : Reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* **43**: 260-296.
- Barbier, G., A. Godfroy, J.-R. Meunier, J. Quérellou, M.-A. Cambon, F. Lesongeur, P. A. D. Grimont and G. Raguénès** (1999). *Pyrococcus glycovorans*, sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from the East Pacific Rise. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1829-1837.
- Baross, J. A.** (1995). Isolation, growth and maintenance of hyperthermophiles. F. T. Robb and A. R. Place, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. **Archaea: a Laboratory Manual, Thermophiles**: 15-23.
- Birrien, J.-L., X. Zeng, M. Jebbar, M.-A. Cambon-Bonavita, J. Quérellou, P. Oger, N. Bienvenu, X. Xiao and D. Prieur** (2011). *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**(12): 2827-2881.
- Casamayor, E. O., H. Schafer, L. Baneras, C. Pedros-Alio and G. Muyzer** (2000). Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(2): 499-508.
- Cord-Ruwisch, R.** (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **4**(1): 33-36.
- Erauso, G., A. L. Reysenbach, A. Godfroy, J. R. Meunier, B. Crump, F. Partensky, J. A. Baross, V. Marteinson, G. Barbier, N. R. Pace and D. Prieur** (1993). *Pyrococcus abyssi* sp. nov. , a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* **160**: 338-349.
- Fiala, G. and K. O. Stetter** (1986). *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch. Microbiol.* **145**: 56-61.
- Godfroy, A., F. Lesongeur, G. Raguénès, J. Quérellou, E. Antoine, J.-R. Meunier, J. Guezennec and G. Barbier** (1997). *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 622-626.
- Godfroy, A., J.-R. Meunier, J. Guezennec, F. Lesongeur , G. Raguénès, A. Rimbault and G. Barbier** (1996). *Thermococcus fumicolans* sp. nov. a new hyperthermophilic archaeum isolated from deep-sea hydrothermal vent in North Fiji bassin. *International Journal of Systematic and Bacteriology* **46**: 1113-1119.
- Gonzalez, J. M., Y. Masuchi, F. T. Robb, J. W. Ammeramn, D. L. Maeder, M. Yanagibayashi, J. Tamaoka and C. Kato** (1998). *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* **2**: 123-130.
- Gorlas, A., K. Alain, N. Bienvenu, S. Isaac and C. Geslin** (2013). *Thermococcus prieurii* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent at the East Pacific Rise. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

- Huber, R., J. Stöhr, S. Honenhaus, R. Rachel, S. Burggraf, H. W. Jannasch and K. O. Stetter** (1995). *Thermococcus chitonophagus* sp. nov., a novel, chitin-degrading, hyperthermophilic archaeum from a deep-sea hydrothermal environment. *Arch. Microbiol.* **164**: 255-264.
- Jannasch, H. W., C. O. Wirsen, S. J. Molyneaux and T. A. Langworthy** (1992). Comparative physiological studies on hyperthermophilic archaea isolated from deep-sea hot vents with emphasis on *Pyrococcus* strain GB-D. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3472-3481.
- Jolivet, E., E. Corre, S. L'Haridon, P. Forterre and D. Prieur** (2004). *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation. *Extremophiles* **8**: 219-227.
- Jolley, K. A., C. M. Bliss, J. S. Bennett, H. B. Bratcher, C. Brehony, F. M. Colles, H. Wimalarathna, O. B. Harrison, S. K. Sheppard and A. J. Cody** (2012). Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology* **158**(Pt 4): 1005-1015.
- Kanoksilapatham, W., P. Pasomsup, M. C. Portillo, P. Keawram and J. M. Gonzalez** (2012). Identification and Characterization of a Freshwater *Pyrococcus* sp. Strain PK 5017 and Identification of Pfu-Like IS Elements in *Thermococcus sibiricus* MM 739. *International Journal of Biology* **4**(4): p11.
- Kecha, M., S. Banallaoua, J.-P. Touzel, R. Bonaly and F. Duchiron** (2007). Biochemical and phylogenetic characterization of a novel terrestrial hyperthermophilic archaeon pertaining to the genus *Pyrococcus* from an Algerian hydrothermal hot spring. *Extremophiles* **11**: 65-73.
- Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**(2): 111-120.
- Kolganova, T. V., B. B. Kuznetsov and T. P. Tourova** (2002). Designing and Testing Oligonucleotide Primers for Amplification and Sequencing of Archaeal 16S rRNA Genes. *Microbiology* **71**(2): 243-246.
- Kumar, S., M. Nei, J. Dudley and K. Tamura** (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* **9**(4): 299-306.
- Pasomsup, P., J. M. González, M. C. Portillo, V. Pongsapukdee and W. Kanoksilapatham** (2011). Differentiation of a Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus* sp. strain Pikanate 5017, by Arbitrarily Primed PCR. *SILPAKORN UNIVERSITY SCIENCE AND TECHNOLOGY JOURNAL* **5**(1).
- Reysenbach, A. L., H. Ehringer and K. Hershberger** (2000). Microbial diversity at 83 degrees C in Calcite Springs, Yellowstone National Park: another environment where the *Aquificales* and "Korarchaeota" coexist. *Extremophiles* **4**(1): 61-67.
- Rossello Mora, R. and R. Amann** (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25**(1): 39-67.
- Slobodkin, A., B. Campbell, S. C. Cary, E. A. Bonch-Osmolovkaya and C. Jeanthon** (2001). Evidence for the presence of thermophilic Fe(III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13°N (East Pacific Rise). *FEMS Microbiology Ecology* **36**: 235-243.

- Takai, K., A. Sugai, T. Itoh and K. Horikoshi** (2000). *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50 Part 2**: 489-500.
- Teske, A., V. Edgcomb, A. Rivers, J. Thompson, A. de Vera Gomez, S. Molyneaux and C. Wirsen** (2009). A molecular and physiological survey of a diverse collection of hydrothermal vent *Thermococcus* and *Pyrococcus* isolates. *Extremophiles* **13**(6): 905-915.
- Tindall, B. J., R. Rosselló-Móra, H.-J. Busse, W. Ludwig and P. Kämpfer** (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(1): 249-266.
- Zillig, W., I. Holtz, D. Janekovic, W. Schäfer and W. D. Reiter** (1983). The archaeobacterium *Thermococcus celer* represents a novel genus within the thermophilic branch of the archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**: 88-94.





## VIII. Etude du fractionnement isotopique du soufre par des microorganismes thermophiles : Cas des sulfo-réducteurs et sulfato-réducteurs

---

1. Introduction de l'étude

2. Méthodes utilisées

3. Article 6 - Reverse mass-dependant sulfur isotopes fractionation during sulfur-reduction and sulfate-reduction by hyperthermophilic *Archaea* isolated from deep-sea hydrothermal system

4. Synthèse de l'étude



## 1. Introduction de l'étude

Les composés soufrés, compte tenu de leurs différents degrés d'oxydation et de leur abondance dans les milieux naturels sont des composés fréquemment utilisés dans les métabolismes microbiens. Ainsi, les isotopes du soufre ont été largement utilisés comme des bio-traceurs, notamment pour les processus microbiens de subsurface (ex sédiments marins, (Jorgensen 1979; Canfield 2001) ou la détection de biosignatures dans des roches anciennes (Shen et al. 2001; Ueno et al. 2008; Roerdink et al. 2012).

Pour les micro-organismes sulfato-réducteurs, il est bien établi que le fractionnement isotopique du soufre pendant la réduction du sulfate, génère des fractionnements importants (différence entre sulfate  $\text{SO}_4^{2-}$  et sulfures  $\text{H}_2\text{S}$  noté  $\epsilon^{10}$ ) jusqu'à 66‰ (Sim et al. 2011). La variabilité de ce fractionnement est dépendante des paramètres tels que la température, la source de donneurs d'électrons, de carbone, de la concentration en sulfate et de la souche microbienne (Detmers et al. 2001; Habicht et al. 2005; Johnston et al. 2005; Canfield et al. 2006; Hoek et al. 2006). Il a aussi été prouvé que généralement, pour une souche microbienne donnée, le fractionnement du soufre est corrélé au taux de réduction des sulfates par cellules (csSRR, cell-specific sulfate rate). Ainsi, selon la « relation conventionnelle » entre le csSRR et le facteur de fractionnement (Johnston et al. 2007), il est fréquent d'observer une diminution du fractionnement associé à une augmentation du csSRR qui est généralement contrôlé par la température (Mitchell et al. 2009; Sim et al. 2011) ou par les conditions de culture (Detmers et al. 2001).

Concernant les micro-organismes sulfo-réducteurs et les mécanismes impliqués dans le fractionnement, peu d'informations sont disponibles à ce jour. Les données disponibles indiquent des facteurs d'enrichissement compris entre -1,3‰ et -5,2‰ pour des souches appartenant au genre *Dethiosulfovibrio* (Surkov et al. 2012).

Notre étude s'est basée sur la réalisation de cultures de souches pures thermophiles sulfo-réductrices et sulfato-réductrices en fioles et à différentes températures d'incubation : optimales, supra-optimales et infra-optimales, afin de : 1) de déterminer les signatures isotopiques en S issues de l' $\text{H}_2\text{S}$  produit par chaque souche, 2) d'étudier l'impact de la température sur l'amplitude de fractionnement isotopique et enfin 3) d'avoir une meilleure connaissance des signatures isotopiques de souches thermophiles en particulier celles des souches réalisant la réduction du soufre élémentaire.

---

<sup>10</sup>  $\epsilon$  est le facteur enrichissement isotopique; une valeur positive du  $\epsilon$  correspond à une déplétion en isotope lourd dans le produit par rapport au réactif.

## 2. Méthodes utilisées

Les cultures de Thermococcales : *Thermococcus gammatolerans*, *T. radiotolerans* et *T. guaymasensis* ont été réalisées avec du milieu SME contenant  $6.7\text{g.l}^{-1}$  de soufre élémentaire et selon leurs optima respectifs de pH et de salinité. Les cultures d'*Archaeoglobus profundus* ont été réalisées avec une base artificielle d'eau de mer contenant 20 mM de sulfate.

Chaque souche a été cultivée à différentes températures :

- optimales : 85°C pour les *Thermococcales* et 80 °C pour *Archaeoglobus profundus*.
- supra-optimales : 90°C et 85°C respectivement pour les Thermococcales et pour *Archaeoglobus profundus*.
- infra-optimales : 60 et 70°C pour les *Thermococcales* et 70 et 75°C pour *Archaeoglobus profundus*.

Chaque expérience a été réalisée en triplicat, en conditions biotiques et abiotiques. Les fioles inoculées ont été immédiatement échantillonnées après l'inoculation et en fin de phase exponentielle de croissance pour les Thermococcales ou après 8h (uniquement en condition optimale de croissance), 24h, 48h et 72h de culture pour *Archaeoglobus profundus*. Parallèlement aux cultures des procaryotes, les témoins abiotiques (milieu non inoculé) ont été réalisés et conditionnés à l'identique des cultures. Les échantillons ont été conditionnés en vue de déterminer la densité cellulaire par comptages, la concentration en sulfure d'hydrogène dissous et l'analyse des isotopes multiple du soufre.

Les signatures isotopiques du Soufre issues de l' $\text{H}_2\text{S}$  produit par des souches pures thermophiles sulfo- et sulfato-réductrices, ainsi que l'impact de la température sur ce fractionnement sont présentées et discutés sous la forme d'un article en préparation.

### **3. Article 6 - Reverse mass-dependant sulfur isotopes fractionation during sulfur-reduction and sulfate-reduction by hyperthermophilic *Archaea* isolated from deep-sea hydrothermal system**

#### **Authors & Affiliations:**

Nolwenn Callac<sup>abcd</sup>, Olivier Rouxel<sup>de</sup>, Shuhei Ono<sup>f</sup>, Françoise Lesongeur<sup>abc</sup>, Harry Oduro<sup>f</sup> and Anne Godfroy<sup>abc</sup>

<sup>a</sup>Université de Brest, UEB, IUEM, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197 place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané, France.

<sup>b</sup>Ifremer, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, 29280 Plouzané, France.

<sup>c</sup>CNRS, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes UMR 6197, 29280 Plouzané, France.

<sup>d</sup>Université de Brest, Domaines Océaniques IUEM, UMR6538, Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané, France.

<sup>e</sup>Ifremer, Laboratoire de Géochimie et de Métallogénie, 29280 Plouzané, France.

<sup>f</sup>Department of Earth, Atmospheric, and Planetary Sciences, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA.

#### **Correspondance:**

Dr. Olivier Rouxel

Laboratoire de Géochimie et de Métallogénie

IFREMER – Centre de Brest

BP70

29280 Plouzané

France

**Running Title:** Sulfur isotopic fractionation during sulfur and sulfate-reduction

## 1. INTRODUCTION

Microbiological experiments and field studies have shown significant S isotope fractionation occurring during various microbial metabolisms such as dissimilatory sulfate-reduction, sulfur compounds disproportionation, sulfur-reduction and also during anoxygenic photosynthetic sulfur oxidation (Canfield and Raiswell 1999; Canfield 2001; Ono 2008) . Thus, sulfur isotopes are commonly used as biosignatures in various natural systems such as modern sediments (Jorgensen 1979; Rudnicki et al. 2001), basalts (Furnes et al. 2001; Rouxel et al. 2008; Lever et al. 2013) or ancient rocks (Shen et al. 2001; Habicht et al. 2002; Ueno et al. 2008; Roerdink et al. 2012).

It is well established that sulfate-reducing microorganisms fractionate sulfur isotopes during dissimilatory sulfate reduction, generating a large range of isotope fractionation factors ( $\epsilon$  : S isotope fractionation between produced  $\text{H}_2\text{S}$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  or  $\text{S}^\circ$ ) comprised between -3 ‰ and -66 ‰ consistent with an enrichment in light S isotopes in produced  $\text{H}_2\text{S}$  due to kinetic isotope effects. The variability of  $\epsilon$  values is dependent on various parameters such as temperature, source of electron donor, source of carbon, sulfate concentration and microbial strain (Detmers et al. 2001; Habicht et al. 2005; Johnston et al. 2005; Canfield et al. 2006; Hoek et al. 2006). It is also generally accepted that  $\epsilon$  values are correlated with the cell-specific sulfate reduction rate (csSRR) (Johnston et al. 2007). However, deviations from this rule has been observed in some cases (e.g. *Desulfovibrio desulfuricans*; (Kaplan and Rittenberg 1964) and PRTOL 1 strain, (Bolliger et al. 2001; Kleikemper et al. 2004), suggesting that other parameters such as temperature (Mitchell et al. 2009; Sim et al. 2011) or culture conditions (Detmers et al. 2001) could be important. Only limited studies of sulfur isotope fractionation during sulfate reduction have been made in (hyper)thermophilic conditions, such as some *Archeoglobus fulgidus* (Farquhar et al. 2003; Mitchell et al. 2009) and *Thermodesulfatator indicus* (Hoek et al. 2006).

To date, limited information is available about the mechanisms involved in sulfur fractionation by sulfur-reducing prokaryotes. The enrichment factors ( $\epsilon$ ) have been determined for some microbial groups and are ranging between -1.3 ‰ and -5.2 ‰ for strains belonging to the genus *Dethiosulfovibrio* (Surkov et al. 2012); and then between -0.2 and -0.7 for member of the *Thermococcus* and *Lebetimonas* genera (Tada et al. 2008). Although an enrichment in light S isotopes during reduction of  $\text{S}^\circ$  to  $\text{H}_2\text{S}$  (i.e.  $\epsilon < 0\text{‰}$ ) is consistent with a kinetic S isotope effect, one study (unpublished abstract) reported positive  $\epsilon$  values between 0.6 and 1.7‰ for prokaryotes belonging the *Deferribacter* and *Desulforobacterium* genera (Tada et al. 2008). Additional studies are therefore required to test if similar inverse S isotope fractionation could be identified in other thermophilic S reducing organisms.

35 It has been considered that life could have emerged and evolved on Early Earth in reduced and hot environments similar to those of in modern hydrothermal system. Thus, to apply sulfur isotope biosignature of ancient microbial metabolisms in early rock record, it is important to study the signatures of modern thermophilic microorganisms from seafloor hydrothermal systems. In this environment, both elemental sulfur reduction and sulfate reduction appears to be the mains  
40 microbial metabolisms occurring at high temperature ( $T^{\circ}\text{C} >80^{\circ}\text{C}$ ). In particular, members of *Thermococcales* and especially *Thermococcus* strain seem to be widespread in hydrothermal sites along mid-ocean ridges (Antoine et al. 1995; Godfroy et al. 1997; Takai et al. 2001; Postec et al. 2005; Huber et al. 2006; Teske et al. 2009; Nunoura et al. 2010; Takai and Nakamura 2011). Hence, *Thermococcales* appears to be one of key groups of marine *Archaea* in hydrothermal systems and are  
45 key players in both organic matter decomposition (Huber et al. 2006; Inagaki et al. 2006; Roussel et al. 2008) and elemental sulfur reduction. Thermophilic sulfate-reducers are represented by members belonging only to two genera *Archaeoglobus* with the strains *Archaeoglobus profundus* (Burggraf et al. 1990), *A. veneficus* (Huber et al. 1997) et *A. infectus* (Mori et al. 2008) and *Palaeococcus* with *Palaeococcus pacificus* (Zeng et al. 2012). In numerous hydrothermal sites, phylotypes related to the  
50 genus *Archaeoglobus* are often detected (Reysenbach et al. 2000; Teske et al. 2002; Nercessian et al. 2003).

Belonging to the archaeal domain, the *Thermococcales* are, based on 16S rRNA sequences, located near the deepest branching of Euryarchaeota tree (Woese et al. 1990; Forterre et al. 2002). Likewise, it was proposed that sulfur-reduction is one of the most primitive metabolisms occurring in the early  
55 Earth (Woese et al. 1990; Canfield and Raiswell 1999; Forterre et al. 2002; Kasting and Siefert 2002; Reysenbach and Shock 2002; Gribaldo and Brochier-Armanet 2006; Philippot et al. 2007; Martin et al. 2008; Fani and Fondi 2009).

In contrast, *Archaeoglobus*, according their 16S rRNA sequences, are not placed in deeply branching of the archaeal tree but rather located close to the *Methanoarchaea* with which they share some  
60 biochemical pathways (Canfield and Raiswell 1999). Phylogenetic studies of dissimilatory sulfite reductase supports that, the *Archaeoglobus* species gain their ability to reduce sulfate from an ancient lateral gene transfer (Wagner et al. 1998; Klein et al. 2001). However, owing the occurrence of hyperthermophilic sulfate-reducer (*Archaeoglobus*, *Thermodesulfovibrio* and *Thermodesulfobacterium* species)(Canfield and Raiswell 1999), and sulfur isotopic data (Shen et al.  
65 2001; Ueno et al. 2008; Roerdink et al. 2012), sulfate-reduction may have also been one of the oldest metabolisms in Early Earth.

In order to get insights into the relationships between sulfur isotopic biosignatures of hydrothermal and hyperthermophilic sulfur- and sulfate-reducer prokaryotes, we conducted experiment cultures at



70 various temperatures: optimal, supra-optimal and infra-optimal. We selected three sulfur-reducing  
microorganisms strains (*Thermococcales*: *Thermococcus gammatolerans*, *T. radiotolerans* and *T.*  
*guaymasensis*) and one sulfate-reducer strain (*Archaeoglobus profundus*). The aims of the study are:  
1) determine S isotopic fractionation factors of each strain, 2) study the effect of growth conditions  
75 (temperature) on the magnitude of isotopic fractionation and 3) have a better understanding of  
isotopic biosignatures of thermophilic strains in particular those performing elemental sulfur  
reduction in natural environments.

## 2. METHODS

### 80 2.1. Strains collection, physiology and growth media

#### 2.1.1. Experiments with the *Thermococcus* strains

Pure cultures of thermophilic sulfur-reducers *Archaea*: *Thermococcus gammatolerans* strain EJ3<sup>T</sup>  
(DSM 15229<sup>T</sup>), *T. radiotolerans* strain EJ2<sup>T</sup> (DSM 15228<sup>T</sup>) and *T. guaymasensis* strain TYS (DSM 11113<sup>T</sup>)  
85 was obtained from the Souchothèque de Bretagne (LMEE, Ifremer Brest, France). These species were  
all isolated from hydrothermal samples recovered in Southern Trough vent field in the Guaymas  
Basin, from an active chimney fragment for *Thermococcus gammatolerans* (Jolivet et al. 2003) and *T.*  
*radiotolerans* (Jolivet et al. 2004), or from deep-sea marine sediments for: *T. guaymasensis*  
(Canganella et al. 1997; Canganella et al. 1998). They are strictly anaerobes, hyperthermophiles  
90 (optimal growth temperature above 80°C), neutrophiles and heterotrophs (Prieur 2003; Sokolova et  
al. 2004; Bertoldo and Antranikian 2006; Sokolova et al. 2009; Takai and Nakamura 2011). They have  
a fermentative metabolism by assimilation and fermentation of complex organic compounds as yeast  
extract, peptides, casein, starch or other sugars and for that, sulfur is often required (Bertoldo and  
Antranikian 2006; Teske et al. 2009). For many strains, elemental sulfur or sulfur-containing amino-  
95 acid is necessary or stimulate significantly growth and in these cases fermentation metabolism is  
associated to sulfur respiration and coupled to hydrogen sulfide production. Owing their description,  
it was defined that (1) elemental sulfur is required and necessary and reduced into H<sub>2</sub>S during the  
growth of *T. gammatolerans* and *T. radiotolerans* or (2) elemental sulfur allows a higher growth  
yields for *T. guaymasensis* growth when it is added in medium where it is also reduced to H<sub>2</sub>S.

100 The culture media used for *Thermococcus* strains were a modified SME medium (Stetter et al. 1983;  
Raven et al. 1992) supplemented only with yeast extract and with some modifications according the  
optimal growth salinity and pH of each species.

The modified SME contains per liter of desionized water : 10 ml of magnesium solution (for 1 liter of  
desionized water: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O,180g; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 140g), 1 ml of each A, B, C and D solutions

105 (composition for each solution, for 1 liter of desionized water, A solution:  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 9g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.5g;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 g;  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.15g, B solution:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5.6 g; NaBr, 25 g; KCl, 16 g; KI, 10 g;  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4 g, C solution:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 50g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 7.5 g,  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3.3g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.15 g,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 0.005g, and D solution:  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 10g), 1 g of yeast extract, 3.46 g of PIPES buffer and 1 mg of rezasurin (all from Sigma Aldrich, except yeast extract from Difco). Concerning the optimal pH and salt concentration (NaCl), they are pH 7 and  $20\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  of NaCl for *T. gammatolerans* and *T. radiotolerans*; and pH 7 and  $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  of NaCl for *T. guaymasensis*. Prior to sterilization, all media were boiled and cooled under  $\text{N}_2$  atmosphere. During cooling, in order to achieve anaerobiosis,  $0.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  of L-Cystein HCl (Sigma) was added and replaced usual reducing agent  $\text{Na}_2\text{S}$ , in order to avoid bias in sulfur isotopic determination. Once prepared, 115 these media were autoclaved and then cooled to room temperature. Then, they were transferred into an anaerobic chamber (La Calhène, France) containing  $\text{N}_2/\text{H}_2$  (90:10) gas atmosphere. Concentrated anaerobic filter sterilized solution of poly-vitamins (Balch et al. 1979) was added to the media to final concentrations of 0.04 % (w/v). Then 15 mL of medium were distributed into 50 mL penicillin vials which contain 0.1g of sterilized elemental sulfur (sterilized by tyndallization at  $100^\circ\text{C}$  120 for 30 min on two successive days). The  $\text{S}^\circ$  was added in excess in each batch to avoid limiting growth condition. Then penicillin vials were closed with a butyl rubber and an aluminum cap. In addition, in order to verify the necessity in sulfur requirement for growth, some growth tests in optimal growth condition, were performed using the same medium but without the addition of elemental sulfur.

125

### 2.1.2. Experiments with *Archaeoglobus profundus*

Pure cultures of *Archaeoglobus profundus* strain AV18 (DSM 5631<sup>T</sup>) was obtained from the DSMZ. *Archaeoglobus profundus* is a hyperthermophilic (optimal growth temperature at  $82^\circ\text{C}$ ) and anaerobic *Archaea* isolated from a deep sea hydrothermal system located on the Guaymas Basin 130 (Burggraf et al. 1990). It is a mixotrophic sulfate-reducer requiring  $\text{H}_2$  and various carbon sources as acetate, lactate, pyruvate, peptone, meat extract and yeast extract.

The culture medium used for *Archaeoglobus profundus* consists of: NaCl, 18g/L;  $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3g/L; KCl, 0.5g/L;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.25g/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.5g/L; PIPES, 3.46g/L and 1 mg/L of rezasurin (all from Sigma Aldrich). Medium was titrated to pH 6 and prior to sterilization; the medium was boiled and cooled 135 under  $\text{N}_2$  atmosphere. During cooling, in order to achieve anaerobiosis,  $0.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  of L-Cystein HCl (Sigma) was added and replaced usual reducing agent  $\text{Na}_2\text{S}$ , in order to avoid bias in sulfur isotopic determination. Once prepared, these media were autoclaved and then cooled to room temperature. Then, they were transferred into an anaerobic chamber (La Calhène, France) containing  $\text{N}_2/\text{H}_2$  (90:10)

gas atmosphere. Sterile and anoxic solution stocks of sulfate and yeast extract were respectively  
140 added at 20 mM and 0.1% (w/v) final concentration.

Concentrated anaerobic filter sterilized solution of poly-vitamins (Balch et al. 1979), concentrated  
sterilized solution of nonchelated trace elements (Balch et al. 1979), concentrated sterilized selenite-  
tungstate solution (Widdel and Bak 1992) and sterile phosphate solutions, both  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  
were all added to the medium to final concentrations of 0.04 % (w/v). Also, were added to a final  
145 concentration of (w/v).

Following, 15 mL of medium were distributed into 50 mL penicillin vials which were closed with a  
butyl rubber and an aluminum cap. Then, the vials were pressurized with a gaseous phase of  $\text{H}_2/\text{CO}_2$   
(80:20, 200 kPa).

### 150 **2.1.3. Batch experiments**

In order to ensure reproducible growth conditions, each strain were cultivated and successfully  
transferred into fresh medium four times. Also, to ensure the appropriate sampling frequency,  
growth rate for each strain was determined according the temperature of incubation. All  
experiments were inoculated with 5% of culture in middle to late exponential growth phase and  
155 were done in the dark.

All experiments with *Thermococcus* strains were conducted at four different temperatures conditions:  
optimal growth 85°C, infra-optimal at 60°C and 70°C and in supra-optimal temperature at 90°C. Each  
set of batch experiment were realized in triplicate mode, in biotic and abiotic conditions. Inoculated  
batches were immediately harvested just after inoculation and during the late exponential growth  
160 phase: after 8 hours of growth in optimal condition at 85°C and after 12 hours or 16 hours for non  
optimal temperatures growth conditions respectively for 70°C, 90°C and for 60°C.

All experiments with *Archaeoglobus profundus* were conducted at four different temperatures  
conditions: optimal growth 80°C, infra-optimal at 70°C and 75°C and in supra-optimal temperature at  
85°C. Each set of batch experiment were realized in triplicate mode, in biotic and abiotic conditions.  
165 Inoculated batches were immediately harvested just after inoculation and after 8, 24, 48 and 72  
hours of incubation in optimal growth condition; and after 24, 48 and 72 hours of culture in non  
optimal growth condition.

The abiotic controls were realized in the same condition and were harvested in the same time as the  
inoculated cultures. After harvested, each batch was sub-sampled to determine cell density,  
170 dissolved hydrogen sulfide concentration and sulfur isotope analysis. Cell density was determined by  
direct cell counting by using a Thoma chamber (depth 0.02 mm) with an Olympus BX60 phase  
contrast microscope (X400). Dissolved hydrogen sulfide concentration was evaluated photometrically  
using the Cord-Ruwisch method which consists to dark-brown precipitate formation depending on

H<sub>2</sub>S concentration which react with copper sulfate reagent (Cord-Ruwisch 1985). For sulfur isotope analysis, 10 mL of culture were filtered through 0.45µm (Acrodisc®, Pall Corporation) membrane, precipitated as ZnS in 25 mL evacuated septum vials containing 0.1g of zinc acetate (Sigma-Aldrich™) and stored at 4°C until analysis.

#### 2.1.4. Calculation of growth rate, growth yield and sulfate-reduction rate

The specific growth rates ( $k$ ) express in day<sup>-1</sup> of *Archaeoglobus profundus* culture in exponentially growth phase in batch mode were determined as:

$$k = (\ln(C_x) - \ln(C_i)) / (t_x - t_i) \quad (1)$$

where  $t_i$  is the start of exponential growth,  $t_x$  is the time of sampling in day;  $C_x$  and  $C_i$  are the cell density in number of cells/ml determined respectively at the time  $t_x$  and  $t_i$ .

The growth yield ( $Y$ ) determined between two sampling time was calculated as the ratio of the increase in of cells number and the dissolved sulfide produced in µmoles (corresponding of the sulfate consumed during the interval) were calculated as:

$$Y = (C_x - C_i) / ([H_2S]_x - [H_2S]_i) \quad (2)$$

The average of cell-specific sulfate reduction rate (csSRR) were determined from the specific growth rate and growth yield (Sim et al. 2011):

$$csSRR = k/Y = (((\ln(C_x) - \ln(C_i)) / (t_x - t_i)) * (([H_2S]_x - [H_2S]_i) / (C_x - C_i))) \quad (3)$$

## 2.2. Sulfur isotopes analysis

### 2.2.1. ZnS conversation into Ag<sub>2</sub>S

All samples precipitated as ZnS are converted to Ag<sub>2</sub>S at room temperature. For this purpose, a series of three vials hermetically closed are continuously purged with nitrogen to remove trace oxygen and avoid sulfide oxidation. The first vial contains an aqueous solution with ZnS precipitates, the second contains 15 ml of silver nitrate solution at 0.04 M and the last contains 15 ml of a solution of zinc acetate at 0.03M. The first vial containing the ZnS sample is acidified with 5 ml of 6 mol/L hydrochloric acid to release H<sub>2</sub>S under gaseous form. The gaseous H<sub>2</sub>S is continuously transferred into the second vial containing the silver nitrate solution and precipitated as Ag<sub>2</sub>S.

The last flask containing zinc acetate solution allows to verify the complete recovery of H<sub>2</sub>S trapped into silver nitrate solution. In all cases, we found that H<sub>2</sub>S was totally trapped into silver nitrate solution. The silver sulfide precipitate is then collected in a Falcon tube, washed 5 times with Milli-Q water and then dried at 60°C.

### 2.2.2. Extraction of sulfur compounds used as substrate

For each sulfur compounds extraction: elemental sulfur, sulfate and yeast extract, 0.1 to 1g were approximately reduced into H<sub>2</sub>S gas with different acid solutions and then convert into Ag<sub>2</sub>S, following the published methods described by (Oduro et al. 2011) and (Canfield et al. 1986).

Briefly, elemental sulfur was reduced with hot chromium acid distillation (Canfield et al. 1986). Sulfate was precipitated as BaSO<sub>4</sub> (from BaCl<sub>2</sub> solution) and then it was reduced into H<sub>2</sub>S gas by boiling with 25 mL solution mixture (with is composed of 320 mL HI, 524 mL HCl, and 156 mL H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)(Oduro et al. 2011). Yeast extract which contain organically bounded sulfur was reduced using the Raney nickel hydrodesulfurization reagent (Oduro et al. 2011). In all extraction, the H<sub>2</sub>S gas generated was quantitatively trapped into silver nitrate solution by precipitation into Ag<sub>2</sub>S form.

### 2.2.3. Multiple sulfur isotopes measurement and isotopic notation

For isotope measurements, Ag<sub>2</sub>S samples were placed into where they react with an excess of fluorine gas at 300°C during approximately 10 hours. Then the SF<sub>6</sub> produced was purified by gas chromatography and introduced to an isotope ratio mass-spectrometer (Thermo-electron MAT 253) using a dual-inlet mode for measurements of masses 127, 128, 129, and 131 (corresponding respectively to <sup>32</sup>SF<sub>5</sub><sup>+</sup>, <sup>33</sup>SF<sub>5</sub><sup>+</sup>, <sup>34</sup>SF<sub>5</sub><sup>+</sup> and <sup>36</sup>SF<sub>5</sub><sup>+</sup>)(Ono et al. 2006). The analytical reproducibility of isotope ratio measurement by fluorination method, are ±0.1‰, ±0.2‰ and ±0.3‰ (1σ) for δ<sup>33</sup>S, δ<sup>34</sup>S and δ<sup>36</sup>S, and ±0.005‰ and ±0.05‰ (2σ) for Δ<sup>33</sup>S and Δ<sup>36</sup>S, respectively, determined by repeated analysis of international references material (Ono et al. 2007).

The sulfur isotopic compositions of samples are presented using the conventional delta (δ) notation (δ<sup>33</sup>S, δ<sup>34</sup>S, and δ<sup>36</sup>S) as:

$$\delta^{3x}S = \left( \left[ \frac{{}^{3x}S/{}^{32}S_{\text{sample}}}{{}^{3x}S/{}^{32}S_{\text{reference}}} \right] - 1 \right) \times 1000 \quad (4)$$

where x is 33, 34 or 36 of sample and reference material and are express in ‰. Here, the isotopic ratios are reported relative to the laboratory working reference SF<sub>6</sub> as previous described by Sim and colleagues (Sim et al. 2011). In table 1, mean δ<sup>34</sup>S values corresponds to raw values reported against the internal S isotope standard (gas SF<sub>6</sub>) while δ<sup>34</sup>S<sub>VCTD</sub> corresponds to the conventional international notation reported against the VCTD standard (Vienna Canon Diablo Troilite).

Usually, the fractionation factor (α) between two sulfur reservoirs i.e. sulfate-sulfide in the same batch culture experiment was calculated using the Rayleigh fractionation, assuming an isotopic mass balance between sulfate and sulfide as described by Sim and colleagues (Sim et al. 2011):

$$\alpha = -\frac{1}{\ln fr} \ln \left( 1 + \frac{(1-fr) \delta_{\Delta p} + 1000}{fr \delta_r + 1000} \right) \quad (7)$$

Where fr is the remaining sulfate at the sampling time (tx), δ<sub>r</sub> and δ<sub>Δp</sub> the sulfur isotope composition (<sup>33</sup>S or <sup>34</sup>S) of sulfate which remain at the sampling time (tx) and the sulfide produced between the

day of inoculation ( $t_0$ ) and the day of sampling ( $t_x$ ). The  $\delta_{\Delta p}$  is commonly derived using the concentration and the  $\delta^x\text{S}$  of the sulfide in the inoculum and the corresponding measurements in the medium at the sampling time.

245 However, considering the low cell-specific sulfate-reduction rate (table X) and very small extent of sulfate or sulfur reduction (fr), it is more convenient to determine  $\alpha$  as a steady state system. In this case, the fractionation factor  $\alpha$  is better determined using :

$${}^x\alpha = (\delta^x\text{S}_{\text{HS}} + 1000) / (\delta^x\text{S}_{\text{SO}_4 \text{ or } \text{S}^\circ} + 1000) \quad (8)$$

where x is 33 or 34.

250 Then, the isotope enrichment factor ( $\epsilon$ ) is calculated as:

$${}^x\epsilon = 1000 * (1 - {}^x\alpha) \quad (9)$$

where x is 33 or 34, a positive values signify a depletion of heavy isotopes in the  $\text{H}_2\text{S}$  product; and a negative value indicate an enrichment in heavy isotope in the  $\text{H}_2\text{S}$  product.

255 In this preliminary version of manuscript, only  $\delta^{34}\text{S}$  values are discussed – hence reported  $\alpha$  and  $\epsilon$  values are referring to  ${}^{34}\alpha$  and  ${}^{34}\epsilon$  values respectively.

### 3. RESULTS

All results obtained in growth cultures are presented in Table 1. In addition we reported  $\delta^{34}\text{S}$  values  
 260 for S substrate ( $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{S}^\circ$ ), and organic compounds (yeast extract and L-cysteine). For each growth cultures, we also performed sterile controls and measured  $\text{H}_2\text{S}$  concentrations that are also reported in Table 1. Although  $\text{H}_2\text{S}$  background in the sterile controls may represent up to 50% of the total  $\text{H}_2\text{S}$  in growth culture in some cases, only S isotope fractionation in cultures having less than 10% of background are discussed. Although the contribution of this background may affect  $\delta^{34}\text{S}$  values of  
 265 biologically produced  $\text{H}_2\text{S}$ , there are no relationships between  $\delta^{34}\text{S}$  values and % of contribution of background (referred as ‘% control’ in Table 1) suggesting minor effects. In addition, we did not observe growth in cultures of *Thermococcales* with only L-cysteine as S sources, suggesting that heavier  $\delta^{34}\text{S}$  values of L-Cysteine did not affect  $\delta^{34}\text{S}$  values of  $\text{H}_2\text{S}$ .

#### 270 3.1. Sulfur isotope fractionation during sulfur reduction by *Thermococcus*

For all strains of *Thermococcus*, no growth was observed in the absence of elemental sulfur and even in the presence of yeast extract.

In medium containing elemental sulfur, cell growth and  $\text{H}_2\text{S}$  production was observed for all strains, for temperature ranging from 60 to 90°C. The sulfur isotopic compositions of dissolved hydrogen  
 275 sulfide were done for all experiments Table 1).

The concentration of hydrogen sulfide and cell density were determined during the late exponential growth phase: after 8 hours of incubation in optimal condition (85°C) and after 12 hours (70 and 90°C) or 16 hours (60°C) for non optimal temperatures growth conditions (Table 1).

280 The  $\delta^{34}\text{S}_{\text{VCDT}}$  in optimal growth condition is 20.38‰, 22.18‰ and 18.08‰ respectively for *Thermococcus gammatolerans*, *T. radiotolerans* and *T. guaymasensis*; and varying slightly according the temperature. Using duplicated  $\delta^{34}\text{S}_{\text{VCDT}}$  values for  $\text{S}^{\circ}$  determined at 19.01 and 18.83‰, we determined the enrichment factor  $\epsilon$  in all cultures with an overall precision of about 0.2‰ (Table 1).  
 285 The enrichment factor  $^{34}\epsilon$  varied from -1.4‰ at 85°C to -1.9‰ to -1.6‰ in non optimal growth condition in experiments done with *Thermococcus gammatolerans* (Table 1). *Thermococcus radiotolerans* exhibit also a fractionation factor  $^{34}\epsilon$  of -3.2‰ in optimal growth temperature but values to -2.3‰; -2.8‰ and -3.1‰ for incubation done respectively at 90°C, 70°C and 60°C (Table 1).  
 With *Thermococcus radiotolerans* the  $^{34}\epsilon$  fractionation factor varied from 0.8 at 85°C to -1.9 at 70°C and 60°C (Table 1).

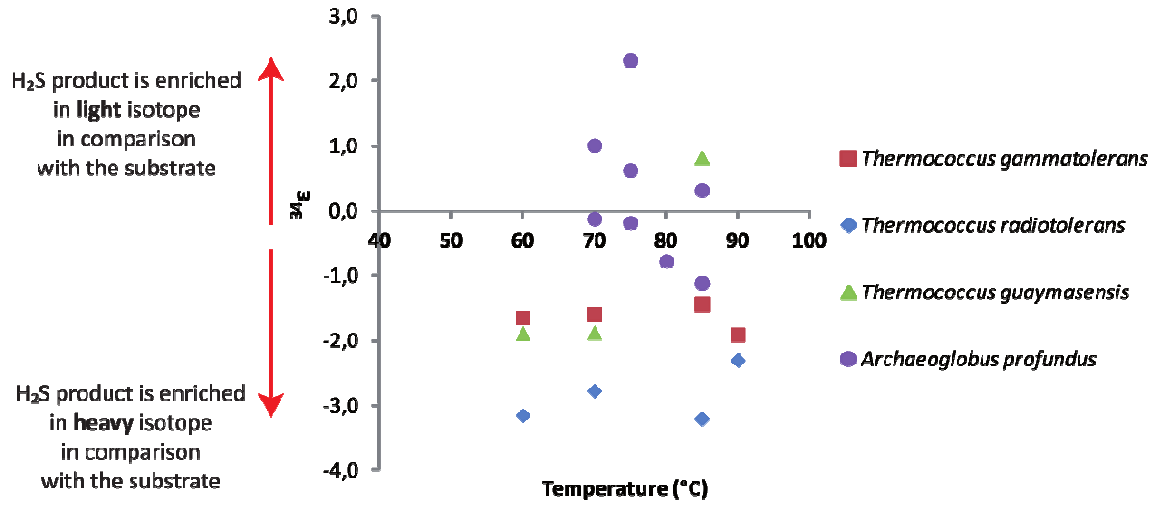
290 That indicates that  $\text{H}_2\text{S}$  produced by all *Thermococcus* strains were enriched in heavy sulfur isotope except for *Thermococcus guaymasensis* which produced isotopically light  $\text{H}_2\text{S}$  at 85°C. The fact that positive  $\epsilon$  value was observed for *T. guaymasensis* only at 85°C but not at lower temperature (60 and 70°C) raised questions about the significance of this result.

### 3.2. Sulfur isotope fractionation during sulfate reduction by *Archaeoglobus profundus*

295 As for the sulfur-reducers experiments, the sulfur isotopic measurement were done for dissolved hydrogen sulfide produced by *Archaeoglobus profundus* at all temperature after 732 hours of incubation. For shorter time, the quantities of detected hydrogen sulfide were too low in many cases to measure  $\delta^{34}\text{S}$  values (Table 1).

300 The cell-specific sulfate reduction rate (csSRR) was very low (to 0.003 to 0.009 fmol/cell/day) despite good cellular growth rate (i.e. at  $t_0$  the initial cell number was around  $2 \times 10^6$  cells/ml vs. up to  $4.6 \times 10^7$  after 8 hours).

305 The  $\delta^{34}\text{S}_{\text{VCTD}}$  values for  $\text{H}_2\text{S}$  are ranging from -5.93‰ to -2.51‰. Compared to  $\delta^{34}\text{S}_{\text{VCTD}}$  of -3.62‰ for sulfate in growth medium, the enrichment factor  $^{34}\epsilon$  vary from 2.3‰ to -1.1‰ (Table 1). In general,  $^{34}\epsilon$  values tend to decrease with the incubation duration. These results highlight in all cases a very low S isotope fractionation factor compared to previous studies, and even more important, an enrichment in heavy isotope in  $\text{H}_2\text{S}$  after 72 hours of culture (Figure1 and Table 1) The magnitude of the enrichment factor ( $^{34}\epsilon$ ) is also not correlated with the cell-specific sulfate reduction rate.



310

Figure 1: Diagram showing the isotopic enrichment according the strain and the growth temperature



312 **Table 1:** Growth condition and isotopic data from batch cultures: *Thermococcales* and *Archaeoglobus profundus*

Sample	Temperature °C	Hours	Cell density (cell/ml)	csSRR (fmol/cell /day)	[H <sub>2</sub> S] mM	Control [H <sub>2</sub> S] mM	δ <sup>34</sup> S mean	δ <sup>34</sup> S VCTD	1SD	<sup>34</sup> α	<sup>34</sup> ε (+/- 0.2) ‰	% control
Sulfate							-4,65	-3,62	0,02			
Soufre S1							17,96	19,01	0,02			
Soufre S2							17,77	18,83	0,02			
YE							2,05	3,09	0,02			
L-Cystein							32,56	33,63	0,02			
<b><i>T. gammatolerans</i></b>	85	8	3,41E+08		3,09	0,20	19,32	20,38	0,02	1,00	-1,4	6,55
	90	12	1,53E+08		7,44	0,28	19,80	20,86	0,02	1,00	-1,9	3,71
	70	12	1,29E+08		3,45	0,26	19,48	20,54	0,02	1,00	-1,6	7,62
	60	16	6,69E+07		0,79	0,20	19,53	20,59	0,02	1,00	-1,6	25,95
<b><i>T. radiotolerans</i></b>	85	8	3,42E+08		5,23	0,19	21,12	22,18	0,01	1,00	-3,2	3,54
	90	12	8,63E+07		2,28	0,34	20,20	21,26	0,02	1,00	-2,3	15,05
	70	12	1,47E+08		3,12	0,21	20,68	21,74	0,01	1,00	-2,8	6,71
	60	16	1,25E+07		1,08	0,15	21,07	22,13	0,02	1,00	-3,1	13,97
<b><i>T. guaymasensis</i></b>	85	8	2,62E+08		3,48	0,25	17,02	18,08	0,03	1,00	0,8	7,08
	70	12	2,00E+08		5,34	0,26	19,77	20,83	0,02	1,00	-1,9	4,90
	60	16	5,75E+07		1,07	0,21	19,78	20,84	0,03	1,00	-1,9	19,78
<b><i>Archaeoglobus profundus</i></b>	80	8	2,23E+07		0,09	0,05	nd		nd			
	80	24	3,44E+07	0,0003	0,64	0,05	nd		nd			
	80	48	4,64E+07	0,0030	2,03	0,01	nd		nd			
	80	72	3,16E+07	0,0040	3,77	nd	-3,88	-2,85	0,02	1,00	-0,8	
	70	24	2,48E+07		0,25	0,04	-5,66	-4,63	0,03	1,00	1,0	16,02
	70	48	2,89E+07	0,0050	1,71	0,03	nd		nd			1,77
	70	72	3,66E+07	0,0030	2,94	0,05	-4,53	-3,50	0,02	1,00	-0,1	1,57
	75	24	4,48E+07		1,17	0,04	-6,96	-5,93	0,42	1,00	2,3	3,45

Etude du fractionnement isotopique du soufre par des microorganismes thermophiles

Sample	Temperature °C	Hours	Cell density (cell/ml)	csSRR (fmol/cell /day)	[H <sub>2</sub> S] mM	Control [H <sub>2</sub> S] mM	δ <sup>34</sup> S mean	δ <sup>34</sup> S VCTD	1SD	<sup>34</sup> α	<sup>34</sup> ε (+/- 0.2) ‰	% control
<i>Archaeoglobus profundus</i>	75	48	2,48E+07		2,40	0,01	-5,28	-4,24	0,02	1,00	0,6	0,42
	75	72	4,05E+07	0,0040	3,81	0,05	-4,47	-3,44	0,01	1,00	-0,2	1,21
	85	24	3,28E+07		0,83	0,05	nd		nd			6,03
	85	48	3,39E+07	0,0090	3,89	0,03	-4,97	-3,94	0,02	1,00	0,3	0,78
	85	72	1,73E+07		3,75	0,03	-3,55	-2,51	0,01	1,00	-1,1	0,92

313 **4. DISCUSSION**

314

315 **4.1. Effect of the temperature on sulfur isotope fractionation**

316

317 **4.1.1. During sulfur-reduction by *Thermococcus* strains**

318 In this study, pure *Thermococcus* species produced an expand range of the  $^{34}\epsilon$  between 0.8‰ to -  
 319 3.2‰ (Table 1). Those results are the first to report enrichment in heavy S isotopes for biologically  
 320 produced H<sub>2</sub>S during elemental sulfur reduction. Only one previous study (unpublished abstract)  
 321 have reported similar features for *Thermococcus* species with  $^{34}\epsilon$  varying between -0.2‰ to -0.7‰  
 322 (Tada et al. 2008) (Table 2).

323 In previous experiments done with *Thermococcus* strains (Tada et al. 2008), both regular and inverse  
 324 isotope effect were observed. However, the net isotope fractionation effect was low ( $\epsilon = 0 \pm 2\%$ )  
 325 and it was supposed that an unidirectional metabolic process (i.e. kinetic effect) have been  
 326 superposed by equilibrium isotope exchange between elemental sulfur and sulfide in the culture  
 327 medium (Tada et al. 2008). Equilibrium S isotope fractionation between H<sub>2</sub>S and S<sub>0</sub> have been already  
 328 experimentally determined (Ohmoto and Goldhaber 1997) and is a function of temperature (T, in  
 329 Kelvin) such as  $\epsilon = \delta^{34}\text{S}_{\text{H}_2\text{S}} - \delta^{34}\text{S}_{\text{S}_0} = -0.16 \times 10^6 / (T^2)$ . This yields equilibrium  $\epsilon$  values of about -1.3‰  
 330 for temperature between 60 and 90°C. However, in our experiments,  $\epsilon$  values as low as -3.2‰  
 331 cannot be simply explained by equilibrium S isotope exchange between S<sup>0</sup> and H<sub>2</sub>S.

332 In addition, the isotope effect is not affected by the growth temperature (Table 1) but rather by  
 333 specific strains. Potential mechanisms explaining this inverse S isotope fractionation are presented in  
 334 section 4.2.

335

336 **Table 2:** Compilation of experimental results on stable sulphur isotope fractionation during elemental sulphur  
 337 reduction and sulfate-reduction by different micro-organism.

		$^{34}\epsilon$ ‰	references
<b>Sulfur reducer</b>			
<i>Thermococcus</i>	thermophile	-0,2 to -0,7	(Tada et al. 2008)
<i>Dethiosulfovibrio marinus</i>	mesophile	1,3 to 5,2	(Surkov et al. 2012)
<i>Dethiosulfovibrio russensis</i>	mesophile	1,7 to 5,2	(Surkov et al. 2012)
<i>Thermococcus gammatolerans</i>	thermophile	-1,4 to -1,9	This study
<i>Thermococcus radiotolerans</i>	thermophile	-2,3 to -3,2	This study
<i>Thermococcus guaymasensis</i>	thermophile	0,8 to -1,9	This study
<b>Sulfate-reducer</b>			
<i>Archaeoglobus profundus</i>	thermophile	-1,1 to 2,3	This study (Detmers et al. 2001;
<i>Archaeoglobus fulgidus strain Z</i>	thermophile	14 to 25	Habicht et al. 2005)
<i>Thermodesulfatator indicus</i>	thermophile	4 to 32	(Hoek et al. 2006)
DMSS-1	mesophile	4 to 66	(Sim et al. 2011)

#### 338 4.1.2. During sulfate-reduction by *Archaeoglobus profundus*

339 In this study, we used H<sub>2</sub> as electron donor and yeast extract as carbon source. To date, no study was  
340 done with this carbon substrate and only one with H<sub>2</sub> as electron donor in thermophilic condition  
341 using *Thermodesulfatator indicus* as microbial strain (Hoek et al. 2006).

342 Here, *Archaeoglobus profundus* produced small enrichment factor (<sup>34</sup>ε) between -0.8‰ to 2.3‰ at  
343 all temperatures. The lowest (i.e. negative) <sup>34</sup>ε values were systematically found after 72 hours of  
344 incubation when *Archaeoglobus profundus* is in late exponential to decline growth phase and the  
345 highest (i.e. positive) <sup>34</sup>ε values were observed during the early stage of the growth. In comparison  
346 with other experimental data reported in Sim et al., 2011 and Detmers et al., (Detmers et al. 2001;  
347 Sim et al. 2011) *Archaeoglobus profundus* exhibit a very small isotopic fractionation (ε < 2.3‰). Even  
348 more surprising, our data reveal an inverse isotope fractionation (ε < 0‰) during microbial sulfate  
349 reduction which has been never reported in previous studies.

350 The maximum S isotope fractionation factor of about 2‰ obtained for *Archaeoglobus profundus* is  
351 consistent with previous results of *Archaeoglobus fulgidus* strain Z (Mitchell et al. 2009) incubated at  
352 temperature between 83 and 87°C or with *Thermodesulfatator indicus* incubated under high H<sub>2</sub>  
353 conditions (ε ranging from 1.5‰ to 5.5‰) (Hoek et al. 2006).

354

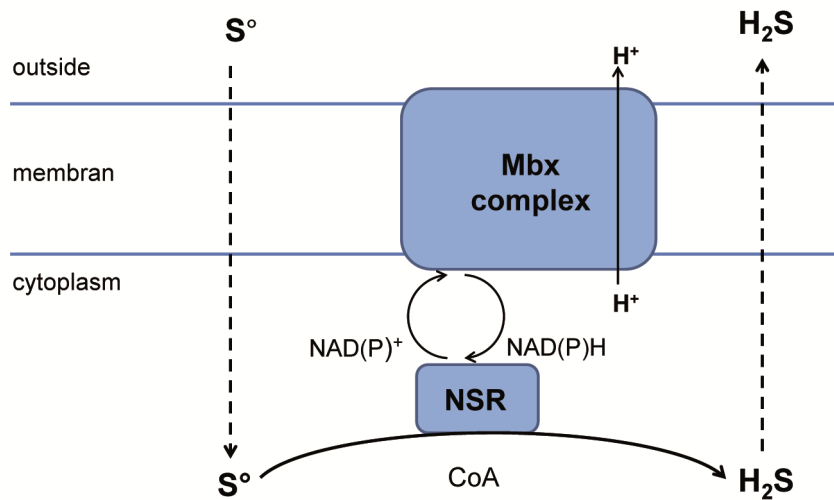
355 In comparison with the other thermophilic sulfate-reducers: *Thermodesulfatator indicus* (Hoek et al.  
356 2006) and *Archaeoglobus fulgidus* (Mitchell et al. 2009) and mesophilic strains (for review (Detmers  
357 et al. 2001; Sim et al. 2011)); *Archaeoglobus profundus* have a low cell-specific sulfate reduction rate  
358 (2 to 3 orders of magnitude lower). Also, in contrast to the previous studies of other strains (for  
359 review table in (Sim et al. 2011)), the csSRR of *Archaeoglobus profundus* is not correlated with  
360 temperature. However, low sulfate rate were previously found in deep-sea sediment at elevated  
361 temperature (up to 62°C) and were associated with extremely high S isotope fractionation factors  
362 (Rudnicki et al. 2001) which is clearly not the case in our study. In order to interpret our results, that  
363 is (1) small ε values under low rate of sulfate reduction and; (2) inverse S isotope fractionation (ε < 0);  
364 we propose in section 4.2 a preliminary model. This model involves a mixing between two or more  
365 reservoirs of H<sub>2</sub>S, e.g. one extracellular and one intracellular, that could undergo different cycling  
366 such as intracellular re-oxidation of reduced compounds followed by their re-cycling.

367

#### 368 4.2. Metabolic pathways

369 The metabolic model proposed here for the *Thermococcales* is based on known mechanisms implied  
370 in sulfur-reduction by *Thermococcales* that are based on genome analysis and enzyme  
371 characterization (Schut et al. 2007; Zivanovic et al. 2009)). It appears that sulfur is reduced  
372 intracellularly during the NAD(P)-elemental sulfur oxidoreductase activity (NADPH NSR) (Figure 2)

373 (Schut et al. 2007; Zivanovic et al. 2009). Also, it seems that the NADPH NSR activity is coupled to the  
 374 membrane-bound oxidoreductase complex (MBX) which reduces the NAD(P) used later by the  
 375 elemental sulfur oxidoreductase (Schut et al. 2007; Zivanovic et al. 2009) (Figure 2).

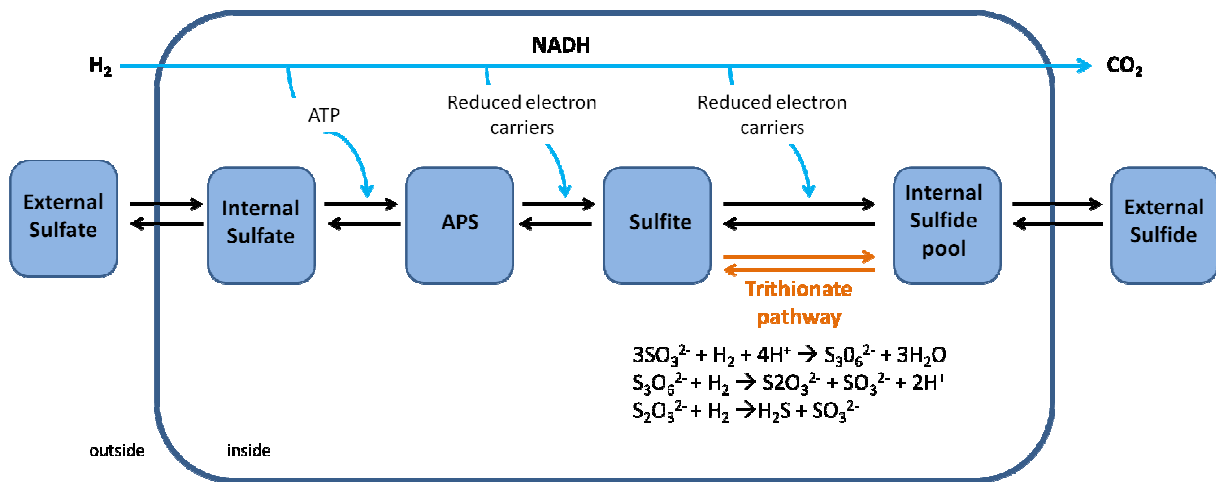


376  
 377 **Figure 2:** *Thermococcales* metabolic pathway. Elemental sulfur is transformed to sulfide by enzyme-catalyzed  
 378 step within the sulfur-reducing organism. MBX corresponds to the membrane-bound oxidoreductase complex,  
 379 NSR to the NAD(P)-elemental sulfur oxidoreductase. Modified from (Schut et al. 2007; Zivanovic et al. 2009).  
 380

381 Hence, in contrast to other Sulfur-reducing microorganisms where  $S^{\circ}$  reduction is accomplished by a  
 382 membrane-bound respiratory system (Hedderich et al., 1999 #17), reduction of  $S^{\circ}$  by *Thermococcales*  
 383 is accomplished by intracellular enzymes. This difference may explain the different and opposite S  
 384 isotope fractionation factor observed for *Thermococcales*. Considering that no intracellular  
 385 accumulation of  $S^{\circ}$  is observed,  $S^{\circ}$  reduction to  $H_2S$  should be quantitative (i.e. complete reduction)  
 386 thus precluding the expression of kinetic S isotope fractionation during reduction. The fact that  
 387 isotopically heavy  $H_2S$  is produced may result from two potential processes: (1) a small isotope effect  
 388 during  $S^{\circ}$  incorporation through the membrane, with heavier  $S^{\circ}$  being preferentially transported  
 389 through the membrane. In this case, the involvement of membrane-bound transporter is required  
 390 since simple diffusion through the membrane would favor light S isotopes. ; (2) recycling of the  $S^{\circ}$   
 391 pool in the cell through partial oxidation of  $H_2S$ . In this case, light S isotopes would be preferentially  
 392 oxidized to  $S^{\circ}$ , leaving remaining  $H_2S$  with higher  $\delta^{34}S$  values compared to initial  $S^{\circ}$  pool.

393  
 394 The metabolic model proposed to explain the small sulfur isotope effect during sulfate reduction is  
 395 based on the competition between multiple processes which affect the flow of sulfur through the cell  
 396 during sulfate reduction. The different metabolic pathways involved in S cycling are: 1) re-oxidation

397 of intermediate sulfur compounds (eg APS,  $\text{SO}_3^{2-}$ ) up to sulfate; 2) trithionate pathway, involving a  
 398 multi-step reduction of sulfite into sulfide; 3) intracellular  $\text{H}_2\text{S}$  oxidation to sulfite; and 4) diffusion of  
 399 intracellular  $\text{H}_2\text{S}$  through membrane and. The processes 1, 2, 3 and the reservoir of intracellular  $\text{H}_2\text{S}$   
 400 have been previously exposed to explain some large fractionation values ( $\delta^{34}\text{S}$  until 75‰) (Brunner  
 401 and Bernasconi 2005; Canfield et al. 2006). Following previous approaches (Farquhar et al. 2003;  
 402 Johnston et al. 2007), rigorous modeling of reactions rates of all reactions described about would be  
 403 required to reconcile low rate of sulfate reduction and inverse S isotope fractionation. Nevertheless,  
 404 we can explain our results by considering (1) quantitative reduction of sulfate to sulfide in the cell  
 405 due to fast turn-over (re-oxidation) of sulfur allowing limited release of  $\text{H}_2\text{S}$  in the medium (i.e. low  
 406 rate of SSR) and limited S isotope fractionation between  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{H}_2\text{S}$ . As for the sulfur-reduction  
 407 pathways, inverse S isotope fractionation may result from S isotope (kinetic) effects during  $\text{H}_2\text{S}$   
 408 oxidation in the cell. Since kinetic S isotope fractionation during  $\text{H}_2\text{S}$  oxidation to sulfite is likely very  
 409 small, we interpret such reverse S isotope fractionation to the oxidation of  $\text{H}_2\text{S}$  to  $\text{S}^0$ . It is however  
 410 important to note that this pathway has not been reported yet for sulfate reducers (Figure 3) but  
 411 may be restricted to hyper-thermophilic organisms.  
 412



413  
 414 **Figure 3:** *Archaeoglobus profundus* metabolic pathway showing the multiple processes which affect the flow of  
 415 sulfur through the cell during the sulfate reduction: 1) an intracellular process of re-oxidation of reduced  
 416 compounds (eg APS,  $\text{SO}_3^{2-}$ ); 2) the used of the Trithionate pathway, a multi-step reduction of sulfite into sulfide  
 417 (three sulfites are used to generate one sulfide), rather than the direct reduction of sulfite to sulfide; 3) the  
 418 occurrence of an intracellular  $\text{H}_2\text{S}$  reservoir with a different isotopic signature than the excreted  $\text{H}_2\text{S}$  and 4) by  
 419 the intracellular sulfide oxidation. Modified from (Brunner and Bernasconi 2005).  
 420  
 421

## 422 5. CONCLUSIONS

423 In light of our experiments it appears that each strain of thermophilic sulfate and sulfur reducers  
 424 exhibits rather unique S isotope biosignatures.

425 Concerning *Thermococcales* strains, S isotope fractionation factor, albeit very small, are generally  
 426 negative regardless of the growth temperature. In contrast to previous studies, observed S isotope  
 427 fractionation factor during sulfate reduction by *Archaeoglobus profundus* is not correlated with  
 428 csSRR. Depending on growth state and temperature, H<sub>2</sub>S produced by *Archaeoglobus profundus* may  
 429 be either slightly positive or negative compared to sulfate source. For both type of sulfur metabolism  
 430 (i.e. sulfate and sulfur reduction) we proposed a tentative model that could explain the rather unique  
 431 geochemical signatures of such organisms. Additional studies are now required to explore  
 432 intracellular mechanisms and associated S isotope fractionation. It would be also important to  
 433 increase the range of growth conditions (temperature, time, pressure, concentration of S sources)  
 434 and hyper-thermophile strains to test if inverse S isotope fractionation is rather unique or ubiquitous  
 435 process. Ultimately, the combination of  $\delta^{34}\text{S}$  and d33S signatures in natural environments where  
 436 thermophilic organisms are active (e.g. seafloor hydrothermal systems, deep sea sediments, basaltic  
 437 volcanic rocks) may help to define new biosignatures in both modern and ancient extreme  
 438 environments.

439

#### 440 **ACKNOWLEDGEMENTS**

441 The authors thank the MIT and the souchothèque de Bretagne, which provide the *Thermococcus*  
 442 stains. The authors acknowledge William J. Olszewski for his assistance for isotope analysis and Yoan  
 443 Germain for clean laboratory assistance.

444 Members of the LMEE, the PSO or the GM laboratory are thanked for their helpful comments, their  
 445 suggestions and their advices. This work was supported by Ifremer, the GIS Europôle Mer, UEB, CNRS,  
 446 INSU and has benefited from state aid managed by the Agence Nationale de la Recherche under the  
 447 program "Investments for the Future" with the reference ANR-10-LabX-19-01.

448

#### 449 **REFERENCES**

- 450 **Antoine, E., J. Guezennec, J. R. Meunier, F. Lesongeur and G. Barbier** (1995). Isolation and  
 451 characterization of extremely thermophilic archaeobacteria related to the genus  
 452 *Thermococcus* from deep-sea hydrothermal Guaymas basin. *Current Microbiology* **31**: 186-  
 453 192.
- 454 **Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese and R. S. Wolfe** (1979). Methanogens :  
 455 Reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* **43**: 260-296.
- 456 **Bertoldo, C. and G. Antranikian** (2006). The Order Thermococcales. *The Prokaryotes*: 69-81.
- 457 **Bolliger, C., M. H. Schroth, S. M. Bernasconi, J. Kleikemper and J. Zeyer** (2001). Sulfur isotope  
 458 fractionation during microbial sulfate reduction by toluene-degrading bacteria. *Geochimica*  
 459 *et Cosmochimica Acta* **65**(19): 3289-3298.
- 460 **Brunner, B. and S. M. Bernasconi** (2005). A revised isotope fractionation model for dissimilatory  
 461 sulfate reduction in sulfate reducing bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **69**(20):  
 462 4759-4771.

- 463 **Burggraf, S., H. W. Jannasch, B. Nicolaus and K. O. Stetter** (1990). *Archaeoglobus profundus* sp. nov.,  
 464 represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Systematic and Applied*  
 465 *Microbiology* **13**: 24-28.
- 466 **Canfield, D. E.** (2001). Biogeochemistry of Sulfur Isotopes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*  
 467 **43**(1): 607-636.
- 468 **Canfield, D. E., C. A. Olesen and R. P. Cox** (2006). Temperature and its control of isotope  
 469 fractionation by a sulfate-reducing bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**(3): 548-  
 470 561.
- 471 **Canfield, D. E. and R. Raiswell** (1999). The evolution of the sulfur cycle. *Am J Sci* **299**(7-9): 697-723.
- 472 **Canfield, D. E., R. Raiswell, J. T. Westrich, C. M. Reaves and R. A. Berner** (1986). The use of  
 473 chromium reduction in the analysis of reduced inorganic sulfur in sediments and shales.  
 474 *Chemical Geology* **54**(1): 149-155.
- 475 **Canganella, F., W. J. Jones, A. Gambacorta and G. Antranikian** (1997). Biochemical and phylogenetic  
 476 characterization of two novel deep-sea *Thermococcus* isolates with potentially biotechnological  
 477 applications. *Arch. Microbiol.* **167**: 233-238.
- 478 **Canganella, F., W. J. Jones, A. Gambacorta and G. Antranikian** (1998). *Thermococcus guaymasensis*  
 479 sp. nov. and *Thermococcus aggregans* sp. nov., two novel thermophilic archaea isolated from  
 480 the Guaymas Basin hydrothermal vent site. *International Journal of Systematic Bacteriology*  
 481 **48**: 1181-1185.
- 482 **Cord-Ruwisch, R.** (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides  
 483 in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **4**(1): 33-36.
- 484 **Detmers, J., V. Brüchert, K. S. Habicht and J. Kuever** (2001). Diversity of sulfur isotope fractionations  
 485 by sulfate-reducing procaryotes. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(2): 888-894.
- 486 **Fani, R. and M. Fondi** (2009). Origin and evolution of metabolic pathways. *Physics of Life Reviews*  
 487 **6**(1): 23-52.
- 488 **Farquhar, J., D. T. Johnston, B. A. Wing, K. S. Habicht, D. E. Canfield, S. Airieau and M. H. Thiemens**  
 489 (2003). Multiple sulphur isotopic interpretations of biosynthetic pathways: implications for  
 490 biological signatures in the sulphur isotope record. *Geobiology* **1**(1): 27-36.
- 491 **Forterre, P., C. Brochier and H. Philippe** (2002). Evolution of the Archaea. *Theoretical Population*  
 492 *Biology* **61**(4): 409-422.
- 493 **Furnes, H., H. Staudigel, I. H. Thorseth, T. Torsvik, K. Muehlenbachs and O. Tomyr** (2001).  
 494 Bioalteration of basaltic glass in the oceanic crust. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*  
 495 **2**(8).
- 496 **Godfroy, A., F. Lesongeur, G. Raguénès, J. Quérellou, E. Antoine, J.-R. Meunier, J. Guezennec and G.**  
 497 **Barbier** (1997). *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon  
 498 isolated from deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology*  
 499 **47**: 622-626.
- 500 **Gribaldo, S. and C. Brochier-Armanet** (2006). The origin and evolution of Archaea: a state of the art.  
 501 *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **361**(1470): 1007-1022.
- 502 **Habicht, K. S., M. Gade, B. Thamdrup, P. Berg and D. E. Canfield** (2002). Calibration of sulfate levels  
 503 in the Archean ocean. *Science* **298**(5602): 2372-2374.
- 504 **Habicht, K. S., L. Salling, B. Thamdrup and D. E. Canfield** (2005). Effect of low sulfate concentrations  
 505 on lactate oxidation and isotope fractionation during sulfate reduction by *Archaeoglobus*  
 506 *fulgidus* strain Z. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(7): 3770-3777.
- 507 **Hoek, J., A.-L. Reysenbach, K. S. Habicht and D. E. Canfield** (2006). Effect of hydrogen limitation and  
 508 temperature on the fractionation of sulfur isotopes by a deep-sea hydrothermal vent sulfate-  
 509 reducing bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**(23): 5831-5841.
- 510 **Huber, H., H. Jannasch, R. Reinhard, T. Fuchs and K. O. Stetter** (1997). *Archaeoglobus veneficus*, sp.  
 511 nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, isolated  
 512 from abyssal black smokers. *System. Appl. Microbiol.* **20**: 374-380.



- 513 **Huber, J. A., D. A. Butterfield and J. A. Baross** (2006). Diversity and distribution of subseafloor  
514 Thermococcales populations in diffuse hydrothermal vents at an active deep-sea volcano in  
515 the northeast Pacific Ocean. *J. Geophys. Res.* **111**(G4): G04016.
- 516 **Inagaki, F., T. Nunoura, S. Nakagawa, A. Teske, M. Lever, A. Lauer, M. Suzuki, K. Takai, M. Delwiche,**  
517 **F. S. Colwell, K. H. Nealson, K. Horikoshi, S. D'Hondt and B. B. Jørgensen** (2006).  
518 Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep  
519 marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proceedings of the National Academy of*  
520 *Sciences of the United States of America* **103**(8): 2815-2820.
- 521 **Johnston, D. T., J. Farquhar and D. E. Canfield** (2007). Sulfur isotope insights into microbial sulfate  
522 reduction: *When microbes meet models*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **71**(16): 3929-  
523 3947.
- 524 **Johnston, D. T., J. Farquhar, B. A. Wing, A. J. Kaufman, D. E. Canfield and K. S. Habicht** (2005).  
525 Multiple sulfur isotope fractionations in biological systems: A case study with sulfate  
526 reducers and sulfur disproportionators. *American Journal of Science* **305**(6-8): 645-660.
- 527 **Jolivet, E., E. Corre, S. L'Haridon, P. Forterre and D. Prieur** (2004). *Thermococcus marinus* sp. nov.  
528 and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea  
529 hydrothermal vents that resist ionizing radiation. *Extremophiles* **8**: 219-227.
- 530 **Jolivet, E., S. L'Haridon, E. Corre, P. Forterre and D. Prieur** (2003). *Thermococcus gammatolerans* sp.  
531 nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing  
532 radiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(3): 847-851.
- 533 **Jorgensen, B. B.** (1979). A theoretical model of the stable sulfur isotope distribution in marine  
534 sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **43**(3): 363-374.
- 535 **Kaplan, I. and S. Rittenberg** (1964). Microbiological fractionation of sulphur isotopes. *Journal of*  
536 *General Microbiology* **34**(2): 195-212.
- 537 **Kasting, J. F. and J. L. Siefert** (2002). Life and the Evolution of Earth's Atmosphere. *Science* **296**(5570):  
538 1066-1068.
- 539 **Kleikemper, J., M. H. Schroth, S. M. Bernasconi, B. Brunner and J. Zeyer** (2004). Sulfur isotope  
540 fractionation during growth of sulfate-reducing bacteria on various carbon sources.  
541 *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68**(23): 4891-4904.
- 542 **Klein, M., M. Friedrich, A. J. Roger, P. Hugenholtz, S. Fishbain, H. Abicht, L. L. Blackall, D. A. Stahl**  
543 **and M. Wagner** (2001). Multiple Lateral Transfers of Dissimilatory Sulfite Reductase Genes  
544 between Major Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes. *J. Bacteriol.* **183**(20): 6028-6035.
- 545 **Lever, M. A., O. Rouxel, J. C. Alt, N. Shimizu, S. Ono, R. M. Coggon, W. C. Shanks, L. Lapham, M.**  
546 **Elvert, X. Prieto-Mollar, K.-U. Hinrichs, F. Inagaki and A. Teske** (2013). Evidence for  
547 Microbial Carbon and Sulfur Cycling in Deeply Buried Ridge Flank Basalt. *Science* **339**(6125):  
548 1305-1308.
- 549 **Martin, W., J. Baross, D. Kelley and M. J. Russell** (2008). Hydrothermal vents and the origin of life.  
550 *Nat Rev Micro* **6**(11): 805-814.
- 551 **Mitchell, K., A. Heyer, D. E. Canfield, J. Hoek and K. S. Habicht** (2009). Temperature effect on the  
552 sulfur isotope fractionation during sulfate reduction by two strains of the hyperthermophilic  
553 *Archaeoglobus fulgidus*. *Environmental Microbiology* **11**(12): 2998-3006.
- 554 **Mori, K., A. Maruyama, T. Urabe, K.-i. Suzuki and S. Hanada** (2008). *Archaeoglobus infectus* sp. nov.,  
555 a novel thermophilic, chemolithoheterotrophic archaeon isolated from a deep-sea rock  
556 collected at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, western Pacific Ocean. *International Journal of*  
557 *Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(4): 810-816.
- 558 **Nercessian, O., A.-L. Reysenbach, D. Prieur and C. Jeanthon** (2003). Archaeal diversity associated  
559 with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13°N).  
560 *Environmental Microbiology* **5**(6): 492-502.
- 561 **Nunoura, T., H. Oida, M. Nakaseama, A. Kosaka, S. B. Ohkubo, T. Kikuchi, H. Kazama, S. Hosoi-**  
562 **Tanabe, K.-i. Nakamura, M. Kinoshita, H. Hirayama, F. Inagaki, U. Tsunogai, J.-i. Ishibashi**  
563 **and K. Takai** (2010). Archaeal Diversity and Distribution along Thermal and Geochemical

- 564 Gradients in Hydrothermal Sediments at the Yonaguni Knoll IV Hydrothermal Field in the  
565 Southern Okinawa Trough. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(4): 1198-1211.
- 566 **Oduro, H., A. Kamyshny, W. Guo and J. Farquhar** (2011). Multiple sulfur isotope analysis of volatile  
567 organic sulfur compounds and their sulfonium precursors in coastal marine environments.  
568 *Marine Chemistry* **124**(1): 78-89.
- 569 **Ohmoto, H. and M. Goldhaber** (1997). Sulfur and carbon isotopes. *Geochemistry of hydrothermal*  
570 *ore deposits* **3**: 517-612.
- 571 **Ono, S.** (2008). Multiple-sulphur isotope biosignatures. *Strategies of Life Detection*, Springer: 203-  
572 220.
- 573 **Ono, S., W. C. Shanks III, O. J. Rouxel and D. Rumble** (2007). S-33 constraints on the seawater sulfate  
574 contribution in modern seafloor hydrothermal vent sulfides. *Geochimica et Cosmochimica*  
575 *Acta* **71**(5): 1170-1182.
- 576 **Ono, S., B. Wing, D. Rumble and J. Farquhar** (2006). High precision analysis of all four stable isotopes  
577 of sulfur (<sup>32</sup>S, <sup>33</sup>S, <sup>34</sup>S and <sup>36</sup>S) at nanomole levels using a laser fluorination isotope-ratio-  
578 monitoring gas chromatography–mass spectrometry. *Chemical Geology* **225**(1–2): 30-39.
- 579 **Philippot, P., M. Van Zuilen, K. Lepot, C. Thomazo, J. Farquhar and M. J. Van Kranendonk** (2007).  
580 Early Archaean microorganisms preferred elemental sulfur, not sulfate. *Science* **317**(5844):  
581 1534-1537.
- 582 **Postec, A., L. Urios, F. Lesongeur, B. Ollivier, J. Quérellou and A. Godfroy** (2005). Continuous  
583 enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of  
584 thermophiles inhabiting the deep-sea hydrothermal ecosystems. *Current Microbiology* **50**:  
585 138-144.
- 586 **Prieur, D.** (2003). Hydrothermal Vents: Prokaryotes in Deep-Sea Hydrothermal Vents. *Encyclopedia*  
587 *of Environmental Microbiology*, John Wiley & Sons, Inc.
- 588 **Raven, N., N. Ladwa, D. Cossar and R. Sharp** (1992). Continuous culture of the hyperthermophilic  
589 archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**(2): 263-267.
- 590 **Reysenbach, A.-L. and E. Shock** (2002). Merging Genomes with Geochemistry in Hydrothermal  
591 Ecosystems. *Science* **296**(5570): 1077-1082.
- 592 **Reysenbach, A. L., K. Longnecker and J. Kirshtein** (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from  
593 an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and*  
594 *Environmental Microbiology* **66**(9): 3798-3806.
- 595 **Roerdink, D. L., P. R. Mason, J. Farquhar and T. Reimer** (2012). Multiple sulfur isotopes in  
596 Paleoproterozoic barites identify an important role for microbial sulfate reduction in the early  
597 marine environment. *Earth and Planetary Science Letters* **331**: 177-186.
- 598 **Roussel, E. G., M.-A. C. Bonavita, J. Querellou, B. A. Cragg, G. Webster, D. Prieur and R. J. Parkes**  
599 (2008). Extending the Sub-Sea-Floor Biosphere. *Science* **320**(5879): 1046-.
- 600 **Rouxel, O., S. Ono, J. Alt, D. Rumble and J. Ludden** (2008). Sulfur isotope evidence for microbial  
601 sulfate reduction in altered oceanic basalts at ODP Site 801. *Earth and Planetary Science*  
602 *Letters* **268**(1): 110-123.
- 603 **Rudnicki, M. D., H. Elderfield and B. Spiro** (2001). Fractionation of sulfur isotopes during bacterial  
604 sulfate reduction in deep ocean sediments at elevated temperatures. *Geochimica et*  
605 *Cosmochimica Acta* **65**(5): 777-789.
- 606 **Schut, G. J., S. L. Bridger and M. W. W. Adams** (2007). Insights into the Metabolism of Elemental  
607 Sulfur by the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: Characterization of a  
608 Coenzyme A- Dependent NAD(P)H Sulfur Oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* **189**(12):  
609 4431-4441.
- 610 **Shen, Y., R. Buick and D. E. Canfield** (2001). Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the  
611 early Archaean era. *Nature* **410**(6824): 77-81.
- 612 **Sim, M. S., T. Bosak and S. Ono** (2011). Large Sulfur Isotope Fractionation Does Not Require  
613 Disproportionation. *Science* **333**(6038): 74-77.

- 614 **Sim, M. S., S. Ono, K. Donovan, S. P. Templer and T. Bosak** (2011). Effect of electron donors on the  
615 fractionation of sulfur isotopes by a marine *Desulfovibrio* sp. *Geochimica et Cosmochimica*  
616 *Acta* **75**(15): 4244-4259.
- 617 **Sokolova, T. G., A.-M. Henstra, J. Sipma, S. N. Parshina, A. J. M. Stams and A. V. Lebedinsky** (2009).  
618 Diversity and ecophysiological features of thermophilic carboxydrotrophic anaerobes. *FEMS*  
619 *Microbiology Ecology* **68**(2): 131-141.
- 620 **Sokolova, T. G., C. Jeanthon, N. A. Kostrikina, N. A. Chernyh, A. V. Lebedinsky, E. Stackebrandt and**  
621 **E. A. Bonch-Osmolovskaya** (2004). The first evidence of anaerobic CO oxidation coupled with  
622 H<sub>2</sub> production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a  
623 deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* **8**(4): 317-323.
- 624 **Stetter, K. O., H. König and E. Stackebrandt** (1983). *Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine  
625 disc-shaped sulfur-reducing archaeobacteria growing optimally at 105°C. *System. Appl.*  
626 *Microbiol.* **4**: 535-551.
- 627 **Surkov, A. V., M. E. Böttcher and J. Kuever** (2012). Sulphur isotope fractionation during the  
628 reduction of elemental sulphur and thiosulphate by *Dethiosulfovibrio* spp. *Isotopes in*  
629 *Environmental and Health Studies* **48**(1): 65-75.
- 630 **Tada, A., Y. Ueno, K. Taka and N. Yoshida** (2008). Quadruple Sulphur Isotope Fractionation of  
631 Microbial Sulphur Reduction in Pure Culture. *Proceedings Japanese Geoscience Union Meet,*  
632 25–30.5.2008, Chiba City, Abstract C203-P006.
- 633 **Takai, K., T. Komatsu, F. Inagaki and K. Horikoshi** (2001). Distribution of Archaea in a Black Smoker  
634 Chimney Structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(8): 3618-3629.
- 635 **Takai, K. and K. Nakamura** (2011). Archaeal diversity and community development in deep-sea  
636 hydrothermal vents. *Current Opinion in Microbiology* **14**(3): 282-291.
- 637 **Teske, A., V. Edgcomb, A. Rivers, J. Thompson, A. de Vera Gomez, S. Molyneaux and C. Wirsen**  
638 (2009). A molecular and physiological survey of a diverse collection of hydrothermal vent  
639 *Thermococcus* and *Pyrococcus* isolates. *Extremophiles* **13**(6): 905-915.
- 640 **Teske, A., K.-U. Hinrichs, V. Edgcomb, A. de Vera Gomez, D. Kysela, S. P. Sylva, M. L. Sogin and H. W.**  
641 **Jannasch** (2002). Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin:  
642 Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Applied and Environmental*  
643 *Microbiology* **68**(4): 1994-2007.
- 644 **Ueno, Y., S. Ono, D. Rumble and S. Maruyama** (2008). Quadruple sulfur isotope analysis of ca. 3.5 Ga  
645 Dresser Formation: New evidence for microbial sulfate reduction in the early Archean.  
646 *Geochimica et Cosmochimica Acta* **72**(23): 5675-5691.
- 647 **Wagner, M., A. J. Roger, J. L. Flax, G. A. Brusseau and D. A. Stahl** (1998). Phylogeny of Dissimilatory  
648 Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *Journal of Bacteriology*  
649 **180**(11): 2975-2982.
- 650 **Widdel, F. and F. Bak** (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. *The Prokaryotes.*  
651 H. G. T. A. Balows, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer New York, Springer. **IV**: 3352-3378.
- 652 **Woese, C. R., O. Kandler and M. L. Wheelis** (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal  
653 for the domains Archae, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4576-4579.
- 654 **Woese, C. R., O. Kandler and M. L. Wheelis** (1990). Towards a natural system of organisms: proposal  
655 for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of*  
656 *Sciences* **87**(12): 4576-4579.
- 657 **Zeng, X., X. Zhang, L. Jiang, K. Alain, M. Jebbar and Z. Shao** (2012). *Palaeococcus pacificus* sp. nov., a  
658 novel archaeon from a deep-sea hydrothermal sediment. *International Journal of Systematic*  
659 *and Evolutionary Microbiology.*
- 660 **Zivanovic, Y., J. Armengaud, A. Lagorce, C. Leplat, P. Guérin, M. Dutertre, V. Anthouard, P. Forterre,**  
661 **P. Wincker and F. Confalonieri** (2009). Genome analysis and genome-wide proteomics of  
662 *Thermococcus gammatolerans*, the most radioresistant organism known amongst the  
663 Archaea. *Genome Biol* **10**(6): R70.
- 664  
665

## 4. Synthèse de l'étude

### 4.1. Rappel des principaux résultats

**Les témoins abiotiques et T0 :** Les fioles témoins et les T0 (juste après l'inoculation), ne contenaient que de faible quantité d'H<sub>2</sub>S. La conversion des précipités de ZnS sous forme d'Ag<sub>2</sub>S, généra une trop petite quantité d'Ag<sub>2</sub>S ne permettant pas de réaliser des analyses fiables (même avec la technique des micro-volumes cf. II Matériel et Méthodes).

**Soufre et sulfate à la fin des incubations :** le soufre élémentaire a été ajouté en excès dans chaque flacon de pénicilline (0,1 g) de ce fait, nous avons considéré que sa composition isotopique ne change pas au cours des expériences. Concernant le sulfate, dans toutes les conditions de cultures testées ici, le taux de réduction des sulfates par cellules (csSRR) est très faible. En raison de ce faible taux, nous avons supposé que la composition isotopique du soufre du sulfate ne change pas au cours des cultures.

**Les souches sulfo-réductrices :** les souches de *Thermococcus* utilisées lors de cette étude présentent des signatures isotopiques en soufre différentes. Les <sup>34</sup>ε sont compris entre -1.4 et -1.9‰ pour *Thermococcus gammatolerans* ; -2.3 et -3.1‰ pour *T. radiotolerans* et -1.9 +/- 0.2 ‰ pour *T. guaymasensis*. Notre étude a donc permis de mettre en évidence un résultat majeur puisque les fractionnements isotopiques sont inverses de ceux reportés dans les études précédentes. Au cours de leurs métabolismes, ces *Thermococcus* enrichissent l'H<sub>2</sub>S qu'elles produisent en isotopes lourds du soufre. Le <sup>34</sup>ε est aussi dépendant de la température. Ainsi, pour *Thermococcus gammatolerans*, le facteur de fractionnement est plus important à des températures supra et infra-optimales ; alors que pour *Thermococcus radiotolerans*, il est plus important à 85°C ainsi qu'à 60°C (température la plus basse utilisée). Il est important de souligner qu'à ce jour, aucune étude n'a mis en évidence un fractionnement inverse des isotopes du soufre lors de réduction microbienne de soufre, hormis un abstract de Tada et al., 2008. L'interprétation de ces résultats a permis de proposer un model de métabolisme du soufre et fractionnement isotopique unique chez les thermophiles.

***Archaeoglobus profundus* (souche sulfato-réductrice) :** dans nos conditions de culture, *Archaeoglobus profundus* a un <sup>34</sup>ε compris entre -1,1‰ et 2.3 ‰. Ce facteur de fractionnement n'est dépendant ni du csSRR ni de la température. . Ces résultats sont également uniques à différents niveaux (1) les facteurs de fractionnements isotopiques sont proches de zéro alors que les taux de réduction (csSRR) sont extrêmement faible. Ceci contraste radicalement avec les études d'autres souches étudiées (Sim et al) qui montrent une augmentation du facteur de fractionnement (plus de 60‰ pour des valeurs de csSRR minimales). ; (2) dans certains cas, notamment à haute température,

des facteurs de fractionnements inverses ont été observées. Ces fractionnements sont opposés à ceux attendus lors des fractionnements isotopiques à l'équilibre (abiotiques) et cinétiques (biotiques). Même si les mécanismes de fractionnements ne sont encore pas totalement compris, ces résultats ont des implications majeures pour l'utilisation des isotopes du S comme traceurs biologiques des systèmes hydrothermaux et anciens.

## 4.2. Perspectives

Une des hypothèses évoquées est que, pour toutes les souches testées, le fractionnement des isotopes du soufre par les thermophiles est inverse par rapport aux souches mésophiles étudiées (Canfield 2001; Canfield et al. 2006). Des expériences complémentaires pourraient être réalisées afin de déterminer avec plus de précision les valeurs isotopiques du soufre à des intervalles de températures réguliers (par exemple tous les 5°C) et qui couvriraient entièrement la gamme de température où les souches croissent (*Thermococcales* et *Archaeoglobus profundus*). Ceci confirmerait ce point et pourrait mettre en évidence des tendances de fractionnement en fonction des souches de *Thermococcales* et pour *Archaeoglobus profundus* avec les données disponibles pour deux souches d'*Archaeoglobus fulgidus* (souche VC-16 et souche Z) (Mitchell et al. 2009).

Enfin, il serait intéressant d'élargir cette étude en choisissant d'autres *Thermococcales* :

- d'autres *Thermococcus* d'origine hydrothermale pour accéder à d'autres signatures isotopiques et les comparer à celles déjà obtenues.
- des *Pyrococcus* pour avoir un aperçu des signatures isotopiques de souches capables de croître à des températures supérieures à 100°C.

Les données en isotopes multiples du Soufre ( $^{32}\text{S}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ) ont également été obtenues dans cette étude et seront discutées plus en détail dans l'article en préparation. Les résultats préliminaires montrent en revanche une absence de fractionnement « anormale » ou indépendant de la masse par les thermophiles.

Enfin, les analyses en cours de la composition isotopique du  $\text{H}_2\text{S}$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  des eaux interstitielles dans les sédiments de Guaymas vont permettre de tester dans un cas concret, si la réduction microbienne de sulfate est réalisée par les thermophiles (fractionnements nuls ou inverses) ou d'autres organismes. Le bassin de Guaymas se prête particulièrement bien à cette exercice comparatif puisque la réduction de sulfate se produit à la fois en contexte de zone froide (cold seeps) et zone chaude (hydrothermale). Ces résultats pourront être directement comparés aux données de diversité microbienne obtenues dans ces sédiments.

## **IX. Synthèse et perspectives**

---

1. Introduction des études

2. Méthodes utilisées

3. Etude A : Microbial colonization of basaltic glasses deployed on hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin

4. Etude B : Microbial colonization of basaltic glasses in hydrothermal organic-rich sediments at Guaymas Basin

5. Résultats complémentaires

6. Synthèse des études



Les objectifs de ce travail étaient de développer des nouvelles approches afin d'identifier et d'établir des liens entre la structure, l'activité et les signatures isotopiques des communautés microbiennes et les caractéristiques physico-chimiques des systèmes hydrothermaux. Le site d'étude qui a été retenu était celui du Bassin de Guaymas puisque ce site offre la possibilité d'étudier les interactions géo-biologiques en domaine hydrothermal à la fois en contexte sédimentaire dans des cheminés hydrothermaux.

Les relations procaryotes-biotopes ont été explorés à la fois par l'étude du fonctionnement des cycles biogéochimiques du soufre et du fer et par l'étude des interactions procaryotes-minéraux-fluides.

Pour mettre en évidence ces interactions, une approche pluridisciplinaire mettant en œuvre des techniques de microbiologie de géochimie et d'isotopie, a été réalisées lors des études de colonisation de substrats basaltiques et des cultures d'enrichissements en bioréacteur. Ces études ont permis de mettre en évidence l'importance des cycles du soufre et du fer en contexte hydrothermal, l'impact du biotope sur l'activité et la diversité microbienne mais également le rôle des microorganismes dans la modification des conditions environnementales.

## 1. Synthèse

### 1.1. Interactions procaryotes-biotopes

#### 1.1.1. Influence des conditions in situ sur la colonisation microbienne

Les modules de colonisation ont permis de mettre en évidence des patrons de colonisation en fonction des conditions environnementales.

Ainsi, pour les modules déployés dans les sédiments (modules AISICS), la colonisation des *Archaea* ne semble dépendre ni de la durée de déploiement, ni de la chimie des fluides, ni de la profondeur dans les sédiments, ni de la nature des substrats (verres basaltiques naturels ou synthétiques). A l'inverse, la colonisation bactérienne semble influencée par la durée du déploiement, la chimie des fluides et la profondeur (donc la température) dans le module déployé pendant 8 jours.

Le module de géomicrobiologie, quant à lui, montre que la diversité microbienne est corrélée à la présence de micro-habitats, y compris des micro-niches anaérobies, qui sont créés lors du mélange entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer à la fois à l'échelle d'un colonisateur et à celle d'un fragment de verre basaltique. La présence à basse température dans les colonisateurs de micro-



organismes hydrothermaux anaérobies et thermophiles, suggère que la circulation de fluide hydrothermal a un rôle dans la dispersion de ces procaryotes.

A l'échelle d'un colonisateur, les conditions *in situ* guident la colonisation des basaltes par les micro-organismes de manières différentes en fonction du type de déploiement réalisé:

- la température essentiellement pour les modules AISICS
- la chimie du fluide et donc la disponibilité en source de donneurs et d'accepteurs d'électrons pour tous les modules
- la variété des micro-habitats oxiques à anoxiques pour le module de géomicrobiologie

A une échelle plus locale, celle d'un verre basaltique, la colonisation microbienne semble être influencé par :

- la présence d'amas de matière organique pouvant générer des micro-habitats
- la présence de vésicules (constitutives des basaltes synthétiques ou naturels) dans lesquelles des conditions particulières peuvent être générées à la fois par la circulation du fluide et par l'activité des micro-organismes. Ces micro-habitats constitueraient ainsi des niches privilégiées pour la colonisation et probablement pour l'altération des verres basaltiques (formation *de novo* de pyrite et de barytine)

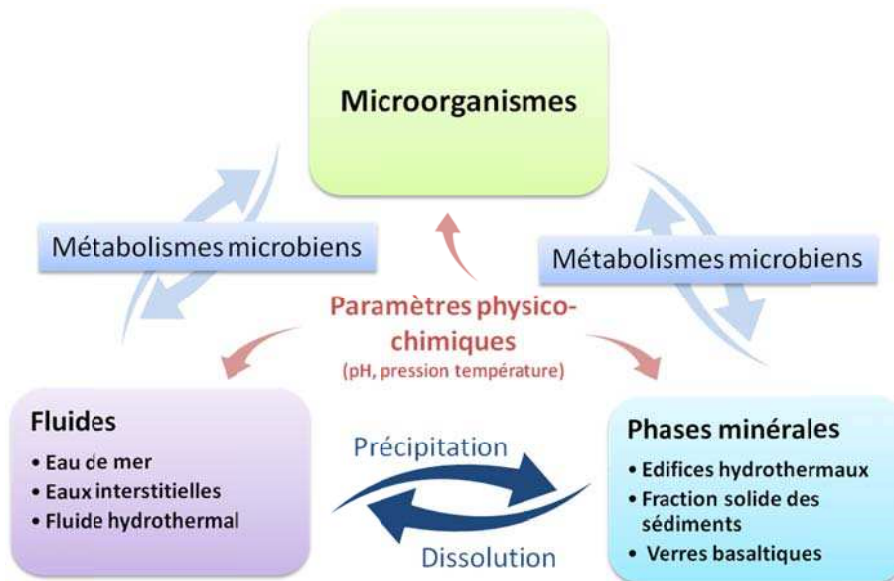
## **1.1.2. Fonctionnement des cycles biogéochimiques du soufre et du fer**

### **1.1.2.1. Influence des conditions environnementales**

Les résultats des cultures d'enrichissements en bioréacteurs (en particulier celle qui a utilisé le fluide hydrothermal comme milieu de culture, chapitre V), montrent que la disponibilité des substrats, donneurs et accepteurs d'électron, source de carbone, pour l'activité des micro-organismes est dépendante des interactions entre les phases minérales, le fluide et les paramètres environnementaux (température, pH, balayage gazeux).

Les interactions « abiotiques », dépendantes des conditions physicochimiques (température, pH), vont majoritairement contrôler les processus de dissolution et de précipitation des phases minérales et faire varier les concentrations en certains éléments, et donc leur disponibilité pour les micro-organismes (Figure IX-1). L'activité des micro-organismes et les produits issus de leurs métabolismes, en particulier ceux impliqués dans les métabolismes du soufre et de fer, peuvent à leur tour affecter les processus de précipitation des phases minérales, en particulier les sulfures lors

de la réduction des sulfates. La dissolution de phases minérales par les microorganismes a surtout été mise en évidence en bioréacteurs lors de la réduction microbienne d'oxyhydroxides de Fer. La dissolution des minéraux par des mécanismes d'oxydation microbienne ou de « bioleaching (ex sulfures de fer, verres volcaniques) n'a pas été mise en évidence dans cette étude compte tenu des conditions de cultures anaérobiques et de la durée courte des expériences (Figure IX-1). Certains paramètres du milieu, en particulier le pH, ont également montré un fort contrôle sur la disponibilité des substrats et par en retour l'activité des micro-organismes.



**Figure IX-1 :** Schéma illustrant l'influence des interactions fluides-phases minérales sur les métabolismes microbiens et réciproquement, le rôle des micro-organismes sur les processus de dissolution et de précipitation de phases minérales ; le tout étant contrôlé par des paramètres physico-chimiques.

L'étude comparative des phases minérales secondaires formées sur les verres basaltiques déployés en conditions biologiques et abiotiques indiquent que 1) les conditions *in situ* influencent la disponibilité des substrats pour les micro-organismes (par exemple la formation de pyrite nécessite du fer ferreux, le rendant moins bio-disponible pour les micro-organismes), et donc guident la colonisation et la croissance microbienne ; et que 2) l'activité microbienne modifie localement la géochimie du milieu, notamment la disponibilité des sources d'accepteurs et de donneurs d'électrons et la précipitation/dissolution des phases minérales.

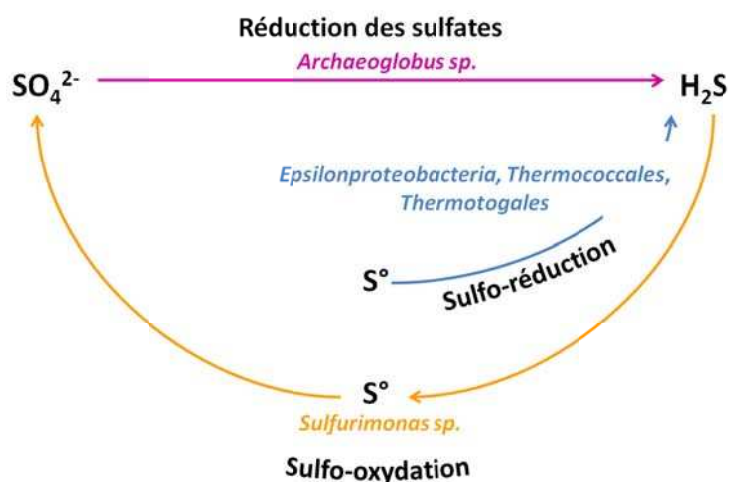
Ainsi, ces interactions instaurent des dynamiques géochimiques et microbiennes à différentes échelles. Dynamiques qui dépendent des interactions phases minérales-fluides à grandes échelles, auxquelles s'ajoutent à une plus petite échelle l'activité métabolique des procaryotes.

### 1.1.2.2. Acteurs microbiens et rôles dans l'écosystème

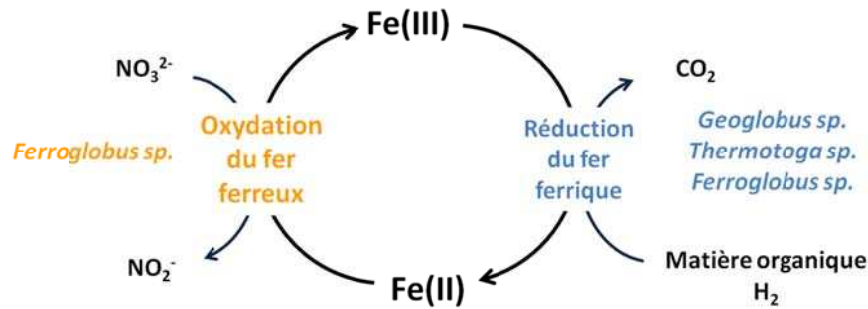
Les acteurs microbiens impliqués dans une ou plusieurs réaction(s) au sein du cycle du Soufre ou du Cycle du fer ou au niveau des deux cycles ont été identifiés, à la fois lors des études de la diversité microbienne associées aux modules de colonisation et lors des cultures d'enrichissement en bioréacteurs et grâce à l'isolement de souches pures.

**A haute température (>80°C) :** La culture d'enrichissement en continu en bioréacteur a permis de mettre en avant la versatilité métabolique des micro-organismes appartenant aux genres *Thermotoga* : réduction du soufre et du fer ferrique et *Ferroglobus* : oxydation du fer ferreux ou réduction du fer ferrique. L'obtention en culture de *Ferroglobus* est une première en contexte hydrothermal profond, et suggère que dans cet écosystème, la ferro-oxydation serait possible à haute température et en anaérobiose. Ceci est appuyé par le fait que dans les cultures en bioréacteurs ciblant l'enrichissement de micro-organismes ferri-réducteurs, inoculé avec le même échantillon de cheminée (Chapitre VI), nous n'avons pas observé de croissance de *Ferroglobus*.

De même, pour la première fois lors d'une culture d'enrichissement à haute température 85°C et en anaérobiose (cf. Chapitre V), les microorganismes impliqués dans les cycles complets du soufre (Figure IX-2) et du fer (Figure IX-3) ont pu être cultivés.



**Figure IX-2 :** Représentation schématique du cycle du soufre en anaérobiose, à haute température et de ces acteurs microbiens détectés lors de nos études.

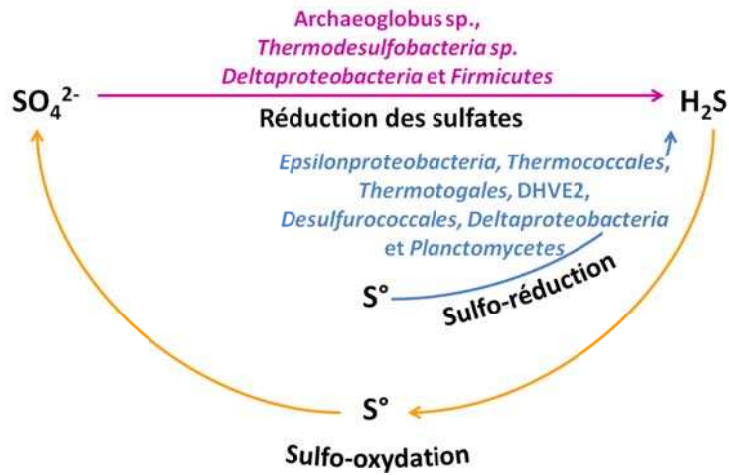


**Figure IX-3 :** Représentation schématique du cycle du fer en anaérobie, à haute température et des micro-organismes détectés lors de nos études.

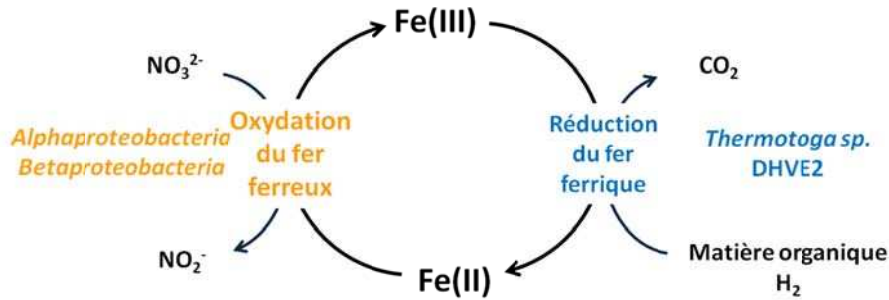
Les cultures d'enrichissement réalisées sur un milieu ciblant les micro-organismes ferri-réducteurs confirment le rôle des micro-organismes appartenant au genre *Geoglobus* et *Thermotoga* dans la réduction dissimilative du fer ferrique.

Les isollements de micro-organismes sur des milieux ciblant la sulfo-réduction, ont aussi permis de cultiver des *Thermococcales* dont un *Pyrococcus* capable de croître jusqu'à une température de 112°C, confirmant le fonctionnement biologique de ces cycles, tout au moins une partie de celui du soufre, à très haute température.

**A des températures intermédiaires ( $\leq 40^\circ\text{C}$ ) :** dans les modules de colonisation AISICS1 et 2, aucun micro-organismes opérant la sulfo-oxydation n'a pu être mis en évidence de façon formelle dans nos banques de clones. Cependant, de nombreux micro-organismes étant affilié à des phylum pour lesquels il n'existe aucun représentant cultivé, il n'est pas possible de conclure à l'absence de sulfo-oxydation. Néanmoins la présence à la surface des sédiments de micro-organismes sulfo-oxydant (*Beggiatoa*) laisse penser que le cycle du soufre fonctionne de façon complète (Figure IX-4). Quand au cycle du fer il semble fonctionner de façon complète en anaérobiose (Figure IX-5).



**Figure IX-4 :** Représentation schématique du cycle du soufre en anaérobiose, à des températures proches de 40-50°C, et des acteurs microbiens impliqués, détectés lors de nos études.

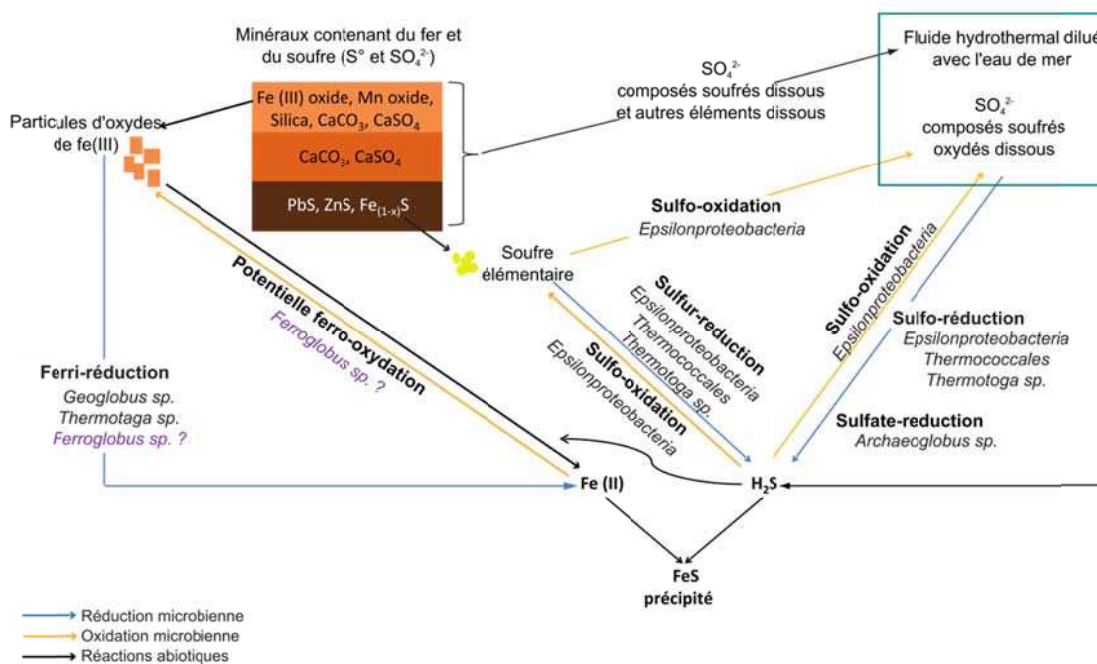


**Figure IX-5 :** Représentation schématique du cycle du fer en anaérobiose, à des températures proche de 40°C, et des micro-organismes détectés lors de nos études.

### 1.1.2.3. Fonctionnement des cycles du soufre et du fer

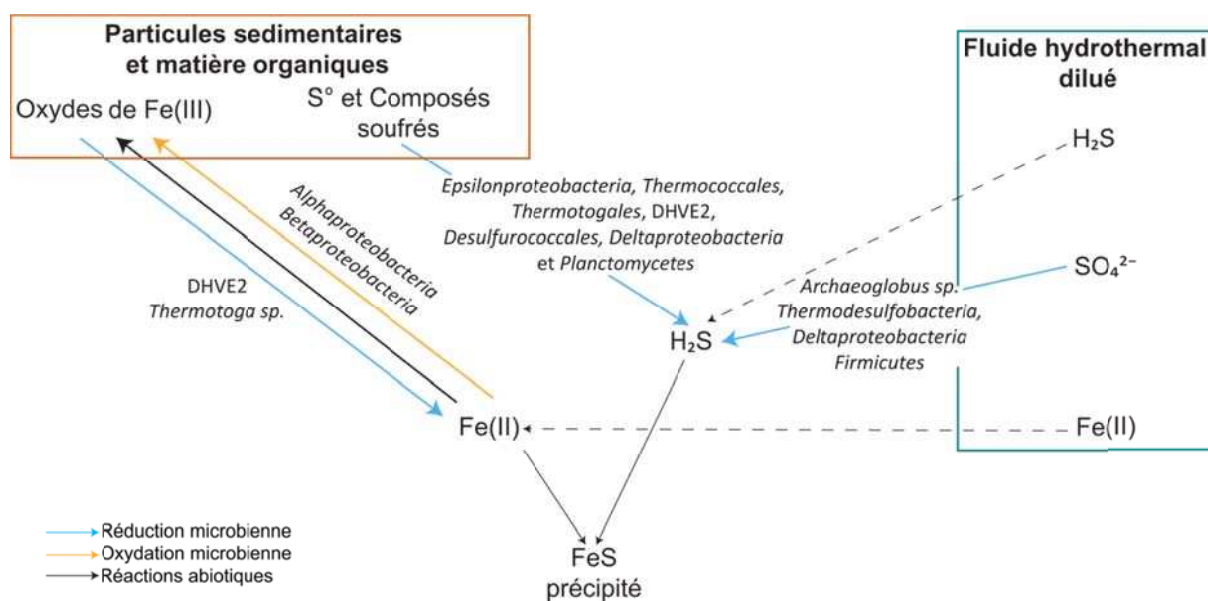
Ainsi, les interactions entre les micro-organismes, les phases minérales et le milieu (fluide hydrothermal), conditionnent le déroulement des cycles biogéochimiques dans les écosystèmes hydrothermaux.

La figure IX-6 propose un schéma de fonctionnement des cycles du soufre et du fer via les interactions entre procaryotes-phases minérales-fluide, à haute température (85°C), établi d'après les résultats obtenus lors des cultures d'enrichissements.



**Figure IX-6 :** Représentation schématique du fonctionnement des cycles du soufre et du fer via les interactions entre procaryotes-phases minérales-fluide, à haute température (85°C).

La figure IX-7, propose, un fonctionnement possible des cycles du soufre et du fer à de plus basse température (≤40°C), dans les sédiments hydrothermaux. Ce schéma est basé sur les résultats obtenus lors de l'étude des modules de colonisation AISICS.



**Figure IX-7:** Représentation schématique du fonctionnement des cycles du soufre et du fer via les interactions entre procaryotes-phases minérales-fluide, à des températures proches de 40°C.

### 1.1.3. Formation de minéraux : biotique versus abiotique ?

En contexte hydrothermal, des minéraux sont généralement formés lors du mélange entre le fluide hydrothermal chaud, anoxique et réduit et l'eau de mer froide et oxygénée. Ce mélange entraîne la précipitation de sulfate de calcium, de baryum puis de sulfures polymétalliques de fer, de zinc, de cuivre etc.

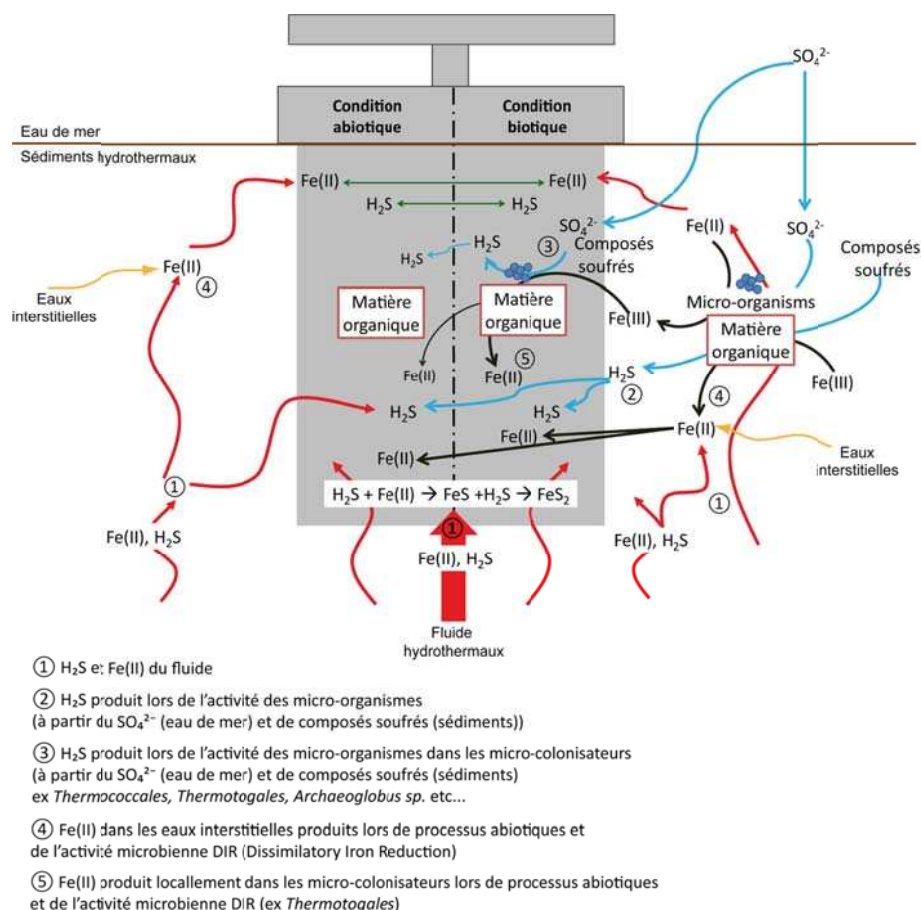
La formation de précipité de FeS a été mise en évidence lors des cultures d'enrichissement en bioréacteurs (cf. Chapitre V et VI) (Figure IX-6). Cette précipitation est due à l'interaction entre

- l'hydrogène sulfuré produit par les micro-organismes sulfo- et sulfato-réducteurs et/ou présent dans le fluide hydrothermal utilisé comme milieu de culture (chapitre V)

et

- le fer ferreux, provient soit de l'activité des micro-organismes ferri-réducteurs (mis en évidence dans ces deux études), de l'inoculum (dissolution de phase minérale) ou du fluide hydrothermal utilisé comme milieu de culture (chapitre V).

La formation de pyrite (cf. études A et B du Chapitre IV) et de barytine (cf. études A du Chapitre IV) a été observée sur les verres basaltiques des modules de colonisation exposés à la fois aux conditions biotiques et abiotiques. Cependant une différence majeure a été observée: la taille des cristaux de pyrite et de barytine. Les micro-cristaux sont observés à la fois à la surface des verres exposés aux conditions biotiques et abiotiques ; alors que les nano-cristaux l'ont été uniquement à la surface des verres incubés en condition biotique. Les nano-cristaux de barytine ont été observés en association étroite avec la matière organique. De même, les nano-cristaux de pyrite n'ont été observés que sur les basaltes exposés à des conditions biotiques. La formation de la pyrite résulte d'une réaction entre les sulfures ou les polysulfures et le fer ferreux Fe (II). Les sulfures ont plusieurs origines : ils peuvent être issus de métabolismes microbiens (sulfo- et la sulfato-réduction dans le colonisateur et dans les sédiments environnants) ou du fluide hydrothermal. Le fer ferreux a également plusieurs sources : il peut provenir de la réduction microbienne désassimilatrice du fer, du fluide hydrothermal et de la réaction entre le sulfure dissous et des oxy-hydroxydes ferriques. Ainsi, il semble qu'en conditions biotiques, les micro-organismes aient localement, *via* l'accumulation d'hydrogène sulfuré et de fer ferreux ou ferrique (réagissant avec l'H<sub>2</sub>S pour former du Fe(II) ou du FeS), favorisés la formation de nano-cristaux de pyrite. Un schéma bilan (Figure IX-8), exposant différents modèles de formation des cristaux de pyrite et mettant en évidence les interactions entre procaryotes-biotopes, est proposé à partir des résultats obtenus lors des études A et B du Chapitre IV.



**Figure IX-8:** Représentation schématique des différentes voies de formation de la pyrite dans les mini-colonisateurs biotiques et abiotiques.

Ainsi, il semblerait que la formation de micro-cristaux résulte uniquement de procédé chimique, alors que la formation des nano-cristaux serait favorisée directement ou indirectement par les micro-organismes.

### 1.2. Signatures isotopiques : des biotraceurs d'activités microbiennes ?

Les échantillons environnementaux (fluides hydrothermaux et fluide de la zone de mélange fluide hydrothermal-eau de mer), les cultures d'enrichissements ciblant la ferri-réduction, les cultures en fioles (sulfo-, sulfato et ferri-réduction) ainsi que les témoins abiotiques ont permis de mettre en évidence, différentes signatures isotopique du fer ferreux et en soufre de l'H<sub>2</sub>S.

Les études géochimiques réalisée dans le gradient de mélange fluide-eau de mer (chapitre III), nous avons observé que la signature isotopique en fer total reste constante. En revanche, plus le fluide hydrothermal est dilué avec l'eau de mer, plus le  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  devient positif. Ces signatures isotopiques en fer ferreux, ainsi que les profils de concentrations en métaux et H<sub>2</sub>S sont attribuées à



la précipitation des sulfures de Fer à partir du  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{H}_2\text{S}$  dissous dans la fluide hydrothermal lors du refroidissement du fluide hydrothermal et de son mélange avec l'eau de mer.

Ces études ont aussi permis de mettre en évidence des signatures isotopiques de  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$  différentes entre les systèmes biologiques (ex : bioréacteur inoculé avec un broyat de cheminée hydrothermale active, culture de *Thermotoga maritima*) et dans des contrôles abiotiques (réalisés dans les mêmes conditions que les cultures). En revanche, les résultats montrent que les fractionnements abiotiques sont généralement plus importants que les fractionnements biologiques. Ceci témoigne du contrôle majeur des échanges isotopiques à l'équilibre entre espèces de Fe(II) et Fe(III). Ces résultats illustrent clairement que des valeurs négatives de  $\delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)aq}}$ , ne peuvent et ne doivent pas toujours être considérées comme une bio-signature de réduction dissimilatrice du fer comme cela a été envisagé dans d'autres études, notamment pour l'étude des environnements Archéens. Ainsi, l'utilisation des isotopes du fer en tant que bio-traceur d'activité de ferri-réduction dans des échantillons modernes ou de Terre ancienne, doit être utilisée avec précaution. En revanche, les résultats obtenus montrent bien l'intérêt de coupler les analyses isotopiques du Fer avec des observations microbiologiques et minéralogiques du milieu afin de mieux comprendre le cycle biogéochimique du Fer.

Les résultats préliminaires d'isotopie du soufre montrent une absence de fractionnement « anormale » ou indépendant de la masse par les thermophiles utilisés lors de nos études. Cependant, les résultats obtenus à partir des trois *Thermococcales* étudiés soulignent un fait important puisque les fractionnements isotopiques sont inverses de ceux reportés dans les études précédentes. En effet, toutes ces *Thermococcales* présentent des signatures isotopiques en soufre et des facteurs d'enrichissement ( $\epsilon$ ) négatifs (-1.4 et -1.9‰ pour *Thermococcus gammatolerans* ; -2.3 et -3.1‰ pour *T. radiotolerans* et -1.9 +/- 0.2 ‰ pour *T. guaymasensis*) ; c'est-à-dire qu'au cours de leurs métabolismes, ces *Thermococcus* enrichissent l' $\text{H}_2\text{S}$  qu'elles produisent en isotopes lourds du soufre. Ce  $^{34}\epsilon$  est dépendant de l'espèce microbienne mais aussi de la température de croissance. Il est important de souligner qu'à ce jour, hormis un abstract de Tada et al., 2008, aucune étude n'a reporté un fractionnement inverse des isotopes du soufre lors de réduction microbienne de soufre.

Dans nos conditions de culture, *Archaeoglobus profundus*, une espèce sulfato-réductrice, a un  $^{34}\epsilon$  compris entre -1,1‰ et 2.3 ‰. Ce facteur de fractionnement n'est dépendant ni du csSRR ni de la température ce qui est nouveau chez les sulfato-réducteurs. Aussi, pour la première fois, les facteurs de fractionnements isotopiques sont proches de zéro alors que les taux de réduction (csSRR) sont très faibles, contrastant avec d'autres études (autres souches (Sim et al. 2011)) qui montrent une augmentation du facteur de fractionnement pour de faibles valeurs de csSRR. Aussi, dans certaines conditions, notamment à haute température, des facteurs de fractionnements inverses ont

été observés et sont opposés à ceux attendus lors des fractionnements isotopiques à l'équilibre (abiotiques) et cinétiques (biotiques).

Même si les mécanismes de fractionnements ne sont encore pas totalement compris, ces résultats ont des implications majeures pour l'utilisation des isotopes du S comme traceurs biologiques des systèmes hydrothermaux et anciens.

## 2. Perspectives

Les cultures d'enrichissements en bioréacteurs et l'étude des modules de colonisation *in situ*, ont mis en évidence l'importance des conditions environnementales sur la croissance des micro-organismes et, vice-versa, le rôle des micro-organismes dans les modifications de ces conditions et donc indirectement sur leurs activités. Ainsi, une des perspectives (travaux en cours) est de déterminer les interactions procaryote-biotope, en fonction des gradients physico-chimique et thermiques, à une échelle plus grande et hétérogène : celle de la zone hydrothermale du Bassin de Guaymas. Ceci *via* l'étude comparative de la diversité microbienne, de la géochimie des fluides et des fractions solides et de l'isotopie de plusieurs carottes sédimentaires collectées sur trois sites hydrothermaux différents : MatMound, MegaMat et Marker 27. Cette étude devrait permettre d'identifier et de déterminer les paramètres qui influencent *in situ* l'activité des micro-organismes.

L'attribution d'une signature isotopique à un métabolisme donné dans un échantillon naturel nécessite une meilleure connaissance des signatures isotopiques spécifiques d'une espèce, ou d'un ensemble de micro-organismes réalisant la même fonction. Pour cela afin de poursuivre les travaux initiés lors de cette thèse (chapitre VII et chapitre VIII) en déterminant les signatures isotopiques, en conditions optimales ou non de croissance, de nombreux isolats thermophiles et (hyper)thermophiles ferri-réducteur, sulfato-réducteur, sulfo-réducteur et même réalisant la dismutation du soufre. Ceci permettra de comparer leur signatures à celles des sédiments et minéraux hydrothermaux soufrés et/ou contenant du fer (ex pyrite pyrrhotite) modernes et anciens et ainsi, potentiellement détecter voire identifier des activités microbiennes passées et enregistrées dans ces roches ou sédiments.

La compréhension des mécanismes d'altération de phases minérales et de production de nano-cristaux pourrait être améliorée grâce à la réalisation de cultures d'enrichissement ou avec des souches pures, en présence de différentes matrices minérales et de différentes conditions physico-chimiques.

### 3. Conclusion

Pour conclure, ces travaux ont permis d'améliorer notre connaissance des écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds en élargissant notre vision : 1) de la diversité et de l'activité des micro-organismes, 2) du fonctionnement des cycles biogéochimiques du soufre, du fer mais également du carbone de l'azote et 3) des interactions procaryotes-minéraux-fluide et leurs traçages isotopiques. Avec notamment :

- la culture de micro-organismes hyperthermophile potentiellement impliqué dans l'oxydation anaérobie du fer ferreux affilié au genre *Ferroglobus*
- la présence simultanée en anaérobiose et à haute température, lors d'une culture d'enrichissement en bioréacteur, de micro-organismes sulfo-réducteurs, sulfato-réducteurs ; ainsi que des procaryotes ferri-réducteurs et ferro-oxydants
- l'isolement de nouvelles espèces sulfo-réductrices dont un nouveau *Pyrococcus* capable de croître jusqu'à 112°C
- la mise en évidence du rôle direct ou indirect des micro-organismes dans la formation des nano-cristaux de pyrite et de barytine par comparaison aux micro-cristaux formés en aux conditions abiotiques.

Ces études que ce soit *in vitro* au laboratoire ou *in situ* grâce au déploiement de colonisateurs, ont aussi permis d'améliorer la compréhension du fonctionnement de l'écosystème hydrothermal en montrant l'importance des interactions croisées entre les différents compartiments que sont les communautés microbiennes, le fluide hydrothermal et l'eau de mer et les structures minérales.

## X. Bibliographie

---



## A

**Alain, K., V. T. Marteinson, M. L. Miroshnichenko, E. A. Bonch-Osmolovskaya, D. Prieur and J. L. Birrien** (2002). *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1331-1339.

**Alain, K., M. Olagnon, D. Desbuyères, A. Page, G. Barbier, K. Juniper, J. Querellou and M. A. Cambon-Bonavita** (2002). Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 463-476.

**Alain, K., A. Postec, E. Grinsard, F. Lesongeur, D. Prieur and A. Godfroy** (2010). *Thermodesulfator atlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 33-38.

**Alain, K. and J. Querellou** (2009). Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* 13: 583-594.

**Alain, K., J. Querellou, F. Lesongeur, P. Pignet, P. Crassous, G. Raguene, V. Cuff and M. A. Cambon-Bonavita** (2002). *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1317-1323.

**Alain, K., S. Rolland, P. Crassous, F. Lesongeur, M. Zbinden, C. LeGall, A. Godfroy, A. Page, S. K. Juniper, M.-A. Cambon-Bonavita, F. Duchiron and J. Querellou** (2003). *Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel thermophilic, pinkish-streamer forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium*. *Extremophiles* 7: 361-370.

**Alain, K., M. Zbinden, N. Le Bris, F. Lesongeur, F. Gaill and M.-A. Cambon-Bonavita** (2004). Early steps of microbial colonization process at deep-sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology* 6: 227-241.

**Alazard, D., S. Dukan, A. Urios, F. Verhe, N. Bouabida, F. Morel, P. Thomas, J.-L. Garcia and B.**

**Ollivier** (2003). *Desulfovibrio hydrothermalis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 173-178.

**Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.

**Anbar, A. D., J. E. Roe, J. Barling and K. H. Nealson** (2000). Non biological Fractionation of Iron Isotopes. *Science* 288: 126-128.

**Anbar, A. D. and O. Rouxel** (2007). Metal stable isotopes in paleoceanography. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 35: 717-746.

**Archer, C. and D. Vance** (2006). Coupled Fe and S isotope evidence for Archean microbial Fe (III) and sulfate reduction. *Geology* 34: 153-156.

**Arndt, C., F. Gaill and H. Felbeck** (2001). Anaerobic sulfur metabolism in thiotrophic symbioses. *Journal of Experimental Biology* 204: 741-750.

**Audiffren, C., J.-L. Cayol, C. Joulian, L. Casalot, P. Thomas, J.-L. Garcia and B. Ollivier** (2003). *Desulfonauticus submarinus* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1585-1590.

## B

**Bach, W. and K. J. Edwards** (2003). Iron and sulfide oxidation within the basaltic ocean crust: implications for chemolithoautotrophic microbial biomass production. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67: 3871-3887.

**Bach, W., S. E. Humphris and A. T. Fisher** (2004). Fluid flow and fluid-rock interaction within ocean crust: Reconciling geochemical, geological, and geophysical observations. *The Subseafloor Biosphere at Mid-Ocean Ridges*. Washington, DC, AGU. 144: 99-117.

**Baker, E. T., J. W. Lavelle and G. J. Massoth** (1985). Hydrothermal particle plumes over the southern Juan de Fuca Ridge. doi:10.1038/316342a0

**Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese and R. S. Wolfe** (1979). Methanogens : Reevaluation of a unique biological group. *Microbiology Review* 43: 260-296.

- Balci, N., T. D. Bullen, K. Witte-Lien, W. C. Shanks, M. Motelica and K. W. Mandernack** (2006). Iron isotope fractionation during microbially stimulated Fe(II) oxidation and Fe(III) precipitation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70: 622-639.
- Baross, J. A.** (1995). Isolation, growth and maintenance of hyperthermophiles In *Archaea: a Laboratory Manual, Thermophiles*. Ed. F. T. Robb and A. R. Place, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp 15-23.
- Bazylinski, D. A., J. W. Farrington and H. W. Jannasch** (1988). Hydrocarbons in surface sediments from Guaymas basin hydrothermal vent site. *Organic Geochemistry* 12: 547-558.
- Beard, B. L., C. M. Johnson, L. Cox, H. Sun, K. H. Nealson and C. Aguilar** (1999). Iron isotope biosignatures. *Science* 285: 1889-1892.
- Beard, B. L., C. M. Johnson, J. L. Skulan, K. H. Nealson, L. Cox and H. Sun** (2003). Application of Fe isotopes to tracing the geochemical and biological cycling of Fe. *Chemical Geology* 195 : 87-117.
- Beard, B. L., C. M. Johnson, K. L. Von Damm and R. L. Poulson** (2003). Iron isotope constraints on Fe cycling and mass balance in oxygenated Earth oceans. *Geology* 31(7): 629-632.
- Bennett, S. A., O. Rouxel, K. Schmidt, D. Garbe-Schönberg, P. J. Statham and C. R. German** (2009). Iron isotope fractionation in a buoyant hydrothermal plume, 5°S Mid-Atlantic Ridge. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73: 5619-5634.
- Biddle, J. F., Z. Cardman, H. Mendlovitz, D. B. Albert, K. G. Lloyd, A. Boetius and A. Teske** (2012). Anaerobic oxidation of methane at different temperature regimes in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *ISME Journal* 6: 1018-1031.
- Bischoff, J. L. and F. W. Dickson** (1975). Seawater-basalt interaction at 200°C and 500 bars: Implications for origin of sea-floor heavy-metal deposits and regulation of seawater chemistry. *Earth and Planetary Science Letters* 25(3): 385-397.
- Bolliger, C., M. H. Schroth, S. M. Bernasconi, J. Kleikemper and J. Zeyer** (2001). Sulfur isotope fractionation during microbial sulfate reduction by toluene-degrading bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(19): 3289-3298.
- Bond, D. R. and D. R. Lovley** (2002). Reduction of Fe (III) oxide by methanogens in the presence and absence of extracellular quinones. *Environmental Microbiology* 4: 115-124.
- Borowski, C., O. Giere, J. Krieger, R. Amann and N. Dubilier** (2002). New aspects of the symbiosis in the provannid snail *Ifremeria nautilei* from the North Fiji Back Arc Basin. *Cahiers de Biologie Marine* 43: 321-324.
- Bowers, T. S., K. L. Von Damm and J. M. Edmond** (1985). Chemical evolution of mid-ocean ridge hot springs. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49(11): 2239-2252.
- Bowles, M. W., L. M. Nigro, A. P. Teske and S. Joye** (2012). Denitrification and environmental factors influencing nitrate removal in Guaymas Basin hydrothermally-altered sediments. *Frontiers in Microbiology* 3: 377
- Brazelton, W. J., M. O. Schrenk, D. S. Kelley and J. A. Baross** (2006). Methane- and Sulfur-Metabolizing Microbial Communities Dominate the Lost City Hydrothermal Field Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6257-6270.
- Breier, J., B. Toner, S. Fakra, M. Marcus, S. White, A. Thurnherr and C. German** (2012). Sulfur, sulfides, oxides and organic matter aggregated in submarine hydrothermal plumes at 9° 50'N East Pacific Rise. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 88: 216-236
- Bruns, A., H. Cypionka and J. Overmann** (2002). Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3978-3987.
- Bruns, A., U. Nübel, H. Cypionka and J. Overmann** (2003). Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1980-1989.
- Bullen, T. D., A. F. White, C. W. Childs, D. V. Vivit and M. S. Schulz** (2001). Demonstration of significant abiotic iron isotope fractionation in nature. *Geology* 29: 699-702.
- Burggraf, S., H. W. Jannasch, B. Nicolaus and K. O. Stetter** (1990). *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 13: 24-28.
- Butler, I. B., C. Archer, D. Vance, A. Oldroyd and D. Rickard** (2005). Fe isotope fractionation on FeS

formation in ambient aqueous solution. *Earth and Planetary Science Letters* 236(1–2): 430–442.

**Byrne, N.** (2008). Etude de la diversité métabolique des micro-organismes des sources hydrothermales. Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale. Mention Microbiologie, Brest. 206 p.

**Byrne, N., F. Lesongeur, N. Bienvenu, C. Geslin, K. Alain, D. Prieur and A. Godfroy** (2009). Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor. *Extremophiles* 13: 595–608.

**Byrne, N., M. Strous, V. Crépeau, B. Kartal, B. Jean-Louis, M. C. Schmid, F. Lesongeur, S. Schouten, A. Jaeschke, M. S. M. Jetten, D. Prieur and A. Godfroy** (2009). Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *ISME Journal* 3: 117–123

## C

**Callac, N., O. Rouxel, E. Ponzevera and A. Godfroy** (2010). On-line Sulfur Isotope Determination by Hydride Generation coupled to MC-ICP-MS. EGU General Assembly Conference Abstracts.

**Calvert, S. E.** (1966). Origin of Diatom-Rich, Varved Sediments from the Gulf of California. *The Journal of Geology* 74: 546–565.

**Campbell, B. J., A. S. Engel, M. L. Porter and K. Takai** (2006). The versatile  $\epsilon$ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology* 4(6): 458–468.

**Campbell, B. J., J. L. Stein and S. C. Cary** (2003). Evidence of Chemolithoautotrophy in the Bacterial Community Associated with *Alvinella pompejana*, a Hydrothermal Vent Polychaete. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5070–5078.

**Canfield, D. E., C. A. Olesen and R. P. Cox** (2006). Temperature and its control of isotope fractionation by a sulfate-reducing bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70: 548–561.

**Canganella, F., W. J. Jones, A. Gambacorta and G. Antranikian** (1998). *Thermococcus guaymasensis* sp. nov. and *Thermococcus aggregans* sp. nov., two novel thermophilic archaea isolated from the Guaymas Basin hydrothermal vent site. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1181–1185.

**Cardinale, M., L. Brusetti, P. Quatrini, S. Borin, A. M. Puglia, A. Rizzi, E. Zanardini, C. Sorlini, C. Corselli and D. Daffonchio** (2004). Comparison of Different Primer Sets for Use in Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Complex Bacterial Communities Applied and Environmental Microbiology 70: 6147–6156.

**Casamayor, E. O., H. Schafer, L. Baneras, C. Pedros-Alio and G. Muyzer** (2000). Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 499–508.

**Charlson, R. J., J. E. Lovelock, M. O. Andreae and S. G. Warren** (1987). Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature* 326: 655–661.

**Charlou, J. L., J. P. Donval, Y. Fouquet, P. Jean-Baptiste and N. Holm** (2002). Geochemistry of high  $H_2$  and  $CH_4$  vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36°14'N, MAR). *Chemical Geology* 191(4): 345–359

**Chen, J., B. Gu, R. A. Royer and W. D. Burgos** (2003). The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric iron. *Science of The Total Environment* 307: 167–178.

**Childress, J. J. and C. R. Fisher** (1995). The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry, and autotrophic symbioses. *Oceanography and marine biology: an annual review* 30: 337–441.

**Cline, J. D.** (1969). Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* 14: 454–458.

**Coleman, M. L., D. B. Hedrick, D. R. Lovley, D. C. White and K. Pye** (1993). Reduction of Fe(III) in sediments by sulphate-reducing bacteria. *Nature* 361: 436–438.

**Connon, S. A. and S. J. Giovannoni** (2002). High-Throughput Methods for Culturing Microorganisms in Very-Low-Nutrient Media Yield Diverse New Marine Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3878–3885.

**Cord-Ruwisch, R.** (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 4(1): 33–36.



- Corliss, J. B. and R. D. Ballard** (1977). Oases of life in the cold abyss. *National Geographic* 152: 440-453.
- Corre, E., A.-L. Reysenbach and D. Prieur** (2001).  $\epsilon$ -Proteobacterial diversity from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *FEMS Microbiology Letters* 205(2): 329-335.
- Cowen, J. P., G. J. Massoth and E. T. Baker** (1986). Bacterial scavenging of Mn and Fe in a mid- to far-field hydrothermal particle plume. *Nature* 322: 169-171.
- Craddock, P. R., O. J. Rouxel, L. A. Ball and W. Bach** (2008). Sulfur isotope measurement of sulfate and sulfide by high-resolution MC-ICP-MS. *Chemical Geology* 253(3): 102-113.
- Crépeau, V.** (2010). Diversité et fonctions dans les tapis microbiens du site hydrothermal de Lucky Strike. Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, mention Microbiologie, Brest 264 p.
- Crépeau, V., M.-A. Cambon Bonavita, F. Lesongeur, H. Randrianalivelo, P.-M. Sarradin, J. Sarrazin and A. Godfroy** (2011). Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field. *FEMS Microbiology Ecology* 76: 524-540.
- Croal, L. R., C. M. Johnson, B. L. Beard and D. K. Newman** (2004). Iron isotope fractionation by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68: 1227-1242.
- Crosby, H. A., C. M. Johnson, E. E. Roden and B. L. Beard** (2005). Coupled Fe(II)-Fe(III) Electron and Atom Exchange as a Mechanism for Fe Isotope Fractionation during Dissimilatory Iron Oxide Reduction. *Environmental Science & Technology* 39: 6698-6704.
- Crosby, H. A., E. E. Roden, C. M. Johnson and B. L. Beard** (2007). The mechanisms of iron isotope fractionation produced during dissimilatory Fe(III) reduction by *Shewanella putrefaciens* and *Geobacter sulfurreducens*. *Geobiology* 5: 169-189.
- Curray, J. R. and D. G. Moore** (1982). Guaymas Basin: Sites 477, 478 and 481. Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project, Vol. 64 U.S. Govt Printing Office, Washington, DC 64: 211-415
- D**
- Dauphas, N. and O. Rouxel** (2006). Mass spectrometry and natural variations of iron isotopes. *Mass Spectrometry Reviews* 25(4): 515-550.
- Davidova, I. A., K. E. Duncan, B. M. Perez-Ibarra and J. M. Suflita** (2012). Involvement of thermophilic archaea in the biocorrosion of oil pipelines. *Environmental Microbiology* 14: 1762-1771
- De Cian, M. C., A. Andersen, J. Y. Toullec, I. Biegala, J. C. Caprais, B. Shillito and F. Lallier** (2003). Isolated bacteriocyte cell suspensions from the hydrothermal-vent tubeworm *Riftia pachyptila*, a potent tool for cellular physiology in a chemoautotrophic symbiosis. *Marine Biology* 142: 141-151.
- De la Lanza-Espino, G. and L. A. Soto** (1999). Sedimentary geochemistry of hydrothermal vents in Guaymas Basin, Gulf of California, Mexico. *Applied Geochemistry* 14: 499-510.
- Dean, W., C. Pride and R. Thunell** (2004). Geochemical cycles in sediments deposited on the slopes of the Guaymas and Carmen Basins of the Gulf of California over the last 180 years. *Quaternary Science Reviews* 23: 1817-1833.
- Decker, C.** (2011). Diversité, écologie et adaptation des bivalves Vesicomidae associés aux environnements réducteurs profonds des marges continentales. Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale mention Océanographie Biologique Brest, 624p.
- Deming, J. W. and J. A. Baross** (1993). Deep-sea smokers : Windows to a subsurface biosphere. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57: 3219-3230.
- Detmers, J., V. Brüchert, K. S. Habicht and J. Kuever** (2001). Diversity of sulfur isotope fractionations by sulfate-reducing prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 888-894.
- Dhillon, A., M. Lever, K. G. Lloyd, D. B. Albert, M. L. Sogin and A. Teske** (2005). Methanogen Diversity Evidenced by Molecular Characterization of Methyl Coenzyme M Reductase A (*mcrA*) Genes in Hydrothermal Sediments of the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4592-4601.
- Dhillon, A., A. Teske, J. Dillon, D. A. Stahl and M. L. Sogin** (2003). Molecular Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in the Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2765-2772.

**Dick, G. J., B. G. Clement, S. M. Webb, F. J. Fodrie, J. R. Bargar and B. M. Tebo** (2009). Enzymatic microbial Mn (II) oxidation and Mn biooxide production in the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73: 6517-6530.

**Dick, G. J., Y. E. Lee and B. M. Tebo** (2006). Manganese(II)-Oxidizing Bacillus Spores in Guaymas Basin Hydrothermal Sediments and Plumes. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3184-3190.

**Dick, G. J. and B. M. Tebo** (2010). Microbial diversity and biogeochemistry of the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Environmental Microbiology* 12: 1334-1347.

**Didyk, B. M. and B. R. T. Simoneit** (1990). Petroleum characteristics of the oil in a Guaymas Basin hydrothermal chimney. *Applied Geochemistry* 5: 29-40.

**Druschel, G. K., D. Emerson, R. Sutka, P. Suhecki and G. W. Luther III** (2008). Low-oxygen and chemical kinetic constraints on the geochemical niche of neutrophilic iron(II) oxidizing microorganisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72: 3358-3370.

**Duperron, S., C. Bergin, F. Zielinski, A. Blazejak, A. Pernthaler, Z. P. McKiness, E. DeChaine, C. M. Cavanaugh and N. Dubilier** (2006). A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiulus azoricus* and *Bathymodiulus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* 8: 1441-1447.

**Durand, P., A.-L. Reysenbach, D. Prieur and N. Pace** (1993). Isolation and characterization of *Thiobacillus hydrothermalis* sp. nov., a mesophilic obligately chemolithotrophic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Fiji Basin. *Archives of Microbiology* 159: 1502-1506

## E

**Edmond, J. M., K. Von Damm and R. McDuff** (1982). Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal. doi:10.1038/297187a0

**Edwards, K. J., W. Bach and T. M. McCollom** (2005). Geomicrobiology in oceanography: microbe-mineral interactions at and below the seafloor. *Trends in Microbiology* 13: 449-456.

**Edwards, K. J., W. Bach, T. M. McCollom and D. R. Rogers** (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., T. M. McCollom, H. Konishi and P. R. Buseck** (2003). Seafloor bioalteration of sulfide minerals: results from in situ incubation studies. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67: 2843-2856.

**Edwards, K. J., D. R. Rogers, C. O. Wirsen and T. M. McCollom** (2003). Isolation and Characterization of Novel Psychrophilic, Neutrophilic, Fe-Oxidizing, Chemolithoautotrophic  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria from the Deep Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2906-2913.

**Ehrlich, H. L.** (1999). Microbes as Geologic Agents: Their Role in Mineral Formation. *Geomicrobiology Journal* 16: 135-153.

**Elsgaard, L., M. F. Isaksen, B. B. Jorgensen, A.-M. Alayse and H. W. Jannasch** (1994). Microbial sulfate reduction in deep-sea sediments at the Guaymas Basin hydrothermal vent area: Influence of temperature and substrates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58(16): 3335-3343.

**Emerson, D. and C. L. Moyer** (2002). Neutrophilic Fe-Oxidizing Bacteria Are Abundant at the Loihi Seamount Hydrothermal Vents and Play a Major Role in Fe Oxide Deposition. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3085-3093.

**Emerson, D., J. A. Rentz, T. G. Lilburn, R. E. Davis, H. Aldrich, C. Chan and C. L. Moyer** (2007). A Novel Lineage of *Proteobacteria* Involved in Formation of Marine Fe-Oxidizing Microbial Mat Communities. *PLoS ONE* 2(8) : 667

**Erauso, G.** (1994). Les Thermococcales du Bassin Nord-Fidjien, description d'une nouvelle espèce: *Pyrococcus abyssi* et caractérisation de son plasmide. Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, mention Océanographie Biologique, Brest 455p

## F

**Farquhar, J., D. T. Johnston, B. A. Wing, K. S. Habicht, D. E. Canfield, S. Airieau and M. H. Thiemens** (2003). Multiple sulphur isotopic interpretations of biosynthetic pathways: implications for biological signatures in the sulphur isotope record. *Geobiology* 1: 27-36.

**Faust, B. C. and J. Hoigné** (1990). Photolysis of Fe (III)-hydroxy complexes as sources of OH radicals in clouds, fog and rain. *Atmospheric Environment*. Part A. General Topics 24(1): 79-89.

**Feely, R., T. Geiselman, E. Baker, G. Massoth and S. Hammond** (1990). Distribution and composition of hydrothermal plume particles from the ASHES vent field at Axial Volcano, Juan de Fuca Ridge. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* (1978–2012) 95(B8): 12855-12873.

**Feng, W. and D. Nansheng** (2000). Photochemistry of hydrolytic iron (III) species and photoinduced degradation of organic compounds. A minireview. *Chemosphere* 41: 1137-1147.

**Fiala, G., K. O. Stetter, H. W. Jannasch, T. A. Langworthy and J. Madon** (1986). *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98°C. *Systematic and Applied Microbiology* 8: 106-113.

**Flores, G. E., J. H. Campbell, J. D. Kirshtein, J. Meneghin, M. Podar, J. I. Steinberg, J. S. Seewald, M. K. Tivey, M. A. Voytek, Z. K. Yang and A.-L. Reysenbach** (2011). Microbial community structure of hydrothermal deposits from geochemically different vent fields along the Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* 13: 2158-2171.

**Flores, G. E., I. Wagner, Y. Liu and A.-L. Reysenbach** (2012). Distribution, abundance, and diversity patterns of the thermoacidophilic "Deep-sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota 2" (DHVE2). *Frontiers in Microbiology* 3: 47

**Forget, N. L., S. A. Murdock and S. K. Juniper** (2010). Bacterial diversity in Fe-rich hydrothermal sediments at two South Tonga Arc submarine volcanoes. *Geobiology* 8(5): 417-432.

**Fouquet, Y., J.-L. Charlou, J.-P. Donval, J. Radford-Knoery, P. Pelle, H. Ondreas, N. Lourenco, M. Segonzac and M. Tivey** (1994). A detailed study of the Lucky-Strike hydrothermal site and discovery of a new hydrothermal site: «Menez-Gwen». Preliminary results of DIVA 1 cruise (5-29 May, 1994). *Inter-Ridge News* 3: 14-17.

**Fukushima, M. and K. Tatsumi** (1999). Light acceleration of iron(III) reduction by humic acid in the aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 155: 249-258.

## G

**Gerasimchuk, A. L., A. A. Shatalov, A. L. Novikov, O. P. Butorova, N. V. Pimenov, A. Y. Lein, A. S. Yanenko and O. V. Karnachuk** (2010). The search for sulfate-reducing bacteria in mat samples from the lost city hydrothermal field by molecular cloning. *Microbiology* 79 : 96-105.

**German, C. and K. Von Damm** (2006). Hydrothermal processes. The oceans & marine geochemistry (Treatise on geochemistry series, Vol. 6), Elsevier: 181-222.

**German, C. R., A. Bowen, M. L. Coleman, D. L. Honig, J. A. Huber, M. V. Jakuba, J. C. Kinsey, M. D. Kurz, S. Leroy, J. M. McDermott, B. M. de Lépinay, K. Nakamura, J. S. Seewald, J. L. Smith, S. P. Sylva, C. L. Van Dover, L. L. Whitcomb and D. R. Yoerger** (2010). Diverse styles of submarine venting on the ultraslow spreading Mid-Cayman Rise. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 14020-14025.

**Glazer, B. T. and O. J. Rouxel** (2009). Redox speciation and distribution within diverse iron-dominated microbial habitats at Loihi Seamount. *Geomicrobiology Journal* 26: 606-622.

**Godfroy, A., F. Lesongeur, G. Raguénès, J. Quérellou, E. Antoine, J.-R. Meunier, J. Guezennec and G. Barbier** (1997). *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 622-626.

**Godfroy, A., J.-R. Meunier, J. Guezennec, F. Lesongeur, G. Raguénès, A. Rimbault and G. Barbier** (1996). *Thermococcus fumicolans* sp. nov. a new hyperthermophilic archaeum isolated from deep-sea hydrothermal vent in North Fiji basin. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 46: 1113-1119.

**Godfroy, A., A. Postec and N. Raven** (2006). Growth of hyperthermophilic microorganisms for physiological and nutritional studies. In *Methods in Microbiology, Extremophiles*. Eds. F. A. Rainey and A. Oren. Academic Press, Oxford, England.

**Godfroy, A., N. D. H. Raven, and R. J. Sharp** (2000). Physiology and continuous culture of the hyperthermophilic deep-sea vent archaeon *Pyrococcus abyssi* ST549. *FEMS Microbiology Letters* 186: 127-132.

**Gold, T.** (1992). The Deep, Hot Biosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 6045-6049.

**Gotz, D., A. Banta, T. J. Beveridge, A. I. Rushdi, B. Simoneit and A. L. Reysenbach** (2002). *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1349-1359.

**Guilbaud, R., I. B. Butler and R. M. Ellam** (2011). Abiotic pyrite formation produces a large Fe isotope fractionation. *Science* 332: 1548-1551.

**Guilbaud, R., I. B. Butler and R. M. Ellam** (2012). Response to Comment on "Abiotic Pyrite Formation Produces a Large Fe Isotope Fractionation". *Science* 335: 538.

**Guri, M., L. Durand, V. Cuff-Gauchard, M. Zbinden, P. Crassous, B. Shillito and M.-A. Cambon-Bonavita** (2011). Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *The ISME journal* 6: 597-609.

## H

**Habicht, K. S., L. Salling, B. Thamdrup and D. E. Canfield** (2005). Effect of low sulfate concentrations on lactate oxidation and isotope fractionation during sulfate reduction by *Archaeoglobus fulgidus* strain Z. *Applied and Environmental Microbiology* 71(7): 3770-3777.

**Hafenbradl, D., M. Keller, R. Dirmeier, R. Rachel, P. Rosznagel, S. Burggraf, H. Huber and K. O. Stetter** (1996). *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe<sup>2+</sup> at neutral pH under anoxic conditions. *Archives of Microbiology* 166: 308-314.

**Hagen, K. D. and D. C. Nelson** (1996). Organic carbon utilization by obligately and facultatively autotrophic *Beggiatoa* strains in homogeneous and gradient cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 947-953.

**Hales, B., C. Edwards, D. Ritchie, G. Hall, R. Pickup and J. Saunders** (1996). Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 668-675.

**Harhangi, H. R., M. Le Roy, T. van Alen, B.-I. Hu, J. Groen, B. Kartal, S. G. Tringe, Z.-X. Quan, M. S. Jetten and H. J. O. den Camp** (2012). Hydrazine synthase, a unique phylomarker with which to study the presence and biodiversity of Anammox bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 752-758.

**Harmsen, H. J. M., D. Prieur and C. Jeanthon** (1997). Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2876-2883.

**Higashi, Y., M. Sunamura, K. Kitamura, K.-i. Nakamura, Y. Kurusu, J.-i. Ishibashi, T. Urabe and A. Maruyama** (2004). Microbial diversity in hydrothermal surface to subsurface environments of Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, using a catheter-type in situ growth chamber. *FEMS Microbiology Ecology* 47: 327-336.

**Hoek, J., A.-L. Reysenbach, K. S. Habicht and D. E. Canfield** (2006). Effect of hydrogen limitation and temperature on the fractionation of sulfur isotopes by a deep-sea hydrothermal vent sulfate-reducing bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70: 5831-5841.

**Holden, J. F. and M. W. W. Adams** (2003). Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. *Current Opinion in Chemical Biology* 7: 160-165.

**Holler, T., F. Widdel, K. Knittel, R. Amann, M. Y. Kellermann, K.-U. Hinrichs, A. Teske, A. Boetius and G. Wegener** (2011). Thermophilic anaerobic oxidation of methane by marine microbial consortia. *ISME Journal* 5 : 1946-1956.

**Houghton, J. L. and W. E. Seyfried Jr** (2010). An experimental and theoretical approach to determining linkages between geochemical variability and microbial biodiversity in seafloor hydrothermal chimneys. *Geobiology* 8: 457-470.

**Houghton, J., W. Seyfried, A. Banta and A. Reysenbach** (2007). Continuous enrichment culturing of thermophiles under sulfate and nitrate-reducing conditions and at deep-sea hydrostatic pressures. *Extremophiles* 11: 371-382.

**Huber, J. A., D. A. Butterfield and J. A. Baross** (2003). Bacterial diversity in a subseafloor habitat following a deep-sea volcanic eruption. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 393-409.

**Huber, H., S. Burggraf, T. Mayer, I. Wyschkony, R. Rachel and K. O. Stetter** (2000). *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2093-2100.

**Huber, H., H. Jannash, R. Reinhard, T. Fuchs and K. O. Stetter** (1997). *Archaeoglobus veneficus*, sp. nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, isolated from abyssal black smokers. *Systematic and Applied Microbiology* 20: 374-380.

**Huber, R., M. Kurr, K. O. Jannasch and K. O. Stetter** (1989). A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110°C. *Nature* 342: 833-834.

**Hulston, J. and H. Thode** (1965). Variations in the S33, S34, and S36 contents of meteorites and their relation to chemical and nuclear effects. *Journal of Geophysical Research* 70: 3475-3484.

---

## I

**Icopini, G. A., A. D. Anbar, S. S. Ruebush, M. Tien and S. L. Brantley** (2004). Iron isotope fractionation during microbial reduction of iron: The importance of adsorption. *Geology* 32: 205-208.

**Ikeda, S., N. Ytow, H. Ezura, K. Minamisawa and T. Fujimura** (2006). Soil microbial community analysis in the environmental risk assessment of transgenic plants. *Plant Biotechnology* 23(1): 137-151.

**Inagaki, F., K. Takai, H. Kobayashi, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2003). *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing  $\epsilon$ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1801-1805.

**Inagaki, F., K. Takai, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2004). *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the  $\epsilon$ Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1477-1482.

**Izumi, H., T. Nunoura, M. Miyazaki, S. Mino, T. Toki, K. Takai, Y. Sako, T. Sawabe and S. Nakagawa** (2012). *Thermotomaculum hydrothermale* gen. nov., sp. nov., a novel

heterotrophic thermophile within the phylum Acidobacteria from a deep-sea hydrothermal vent chimney in the Southern Okinawa Trough. *Extremophiles* 16: 245-253.

---

## J

**Jan, C.** (2012). Approche métagénomique de la chimiosynthèse en système hydrothermal océanique profond: cas des symbioses bactériennes associées à la crevette *Rimicaris exoculata* Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, Mention Microbiologie. Brest, 383p.

**Jannasch, H. W.** (1985). The chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents. *Proceeding of the Royal Society of London B*. 225: 277-297.

**Jannasch, H. W. and M. J. Mottl** (1985). Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science* 229: 717-725.

**Jannasch, H. W., D. C. Nelson and C. O. Wirsen** (1989). Massive natural occurrence of unusually large bacteria (*Beggiatoa*) at hydrothermal vent site. *Nature* 342: 834-836.

**Jannasch, H. W., C. O. Wirsen, D. Nelson and L. Robertson** (1985). *Thiomicrospira crunogena* sp. nov. a colorless sulfur-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35: 422-424.

**Jannasch, H. W., C. O. Wirsen, S. J. Molyneaux and T. A. Langworthy** (1988). Extremely thermophilic fermentative archaeobacteria of the genus *Desulfurococcus* from deep-sea hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1203-1209.

**Jeanthon, C., S. L'Haridon, V. Cueff, A. Banta, A. L. Reysenbach and D. Prieur** (2002). *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 765-772.

**Johnson, C. M., B. L. Beard and E. E. Roden** (2008). The Iron Isotope Fingerprints of Redox and Biogeochemical Cycling in Modern and Ancient Earth. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 36: 457-493.

**Johnston, D. T., J. Farquhar and D. E. Canfield** (2007). Sulfur isotope insights into microbial sulfate reduction: When microbes meet models. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71: 3929-3947.

**Johnston, D. T., J. Farquhar, B. A. Wing, A. J. Kaufman, D. E. Canfield and K. S. Habicht** (2005). Multiple sulfur isotope fractionations in biological systems: A case study with sulfate reducers and sulfur disproportionators. *American Journal of Science* 305: 645-660.

**Johnson, C. M., E. E. Roden, S. A. Welch and B. L. Beard** (2005). Experimental constraints on Fe isotope fractionation during magnetite and Fe carbonate formation coupled to dissimilatory hydrous ferric oxide reduction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69: 963-993.

**Jolivet, E., E. Corre, S. L'Haridon, P. Forterre and D. Prieur** (2004). *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation. *Extremophiles* 8: 219-227.

**Jolivet, E., S. L'Haridon, E. Corre, P. Forterre and D. Prieur** (2003). *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 847-851.

**Jørgensen, B.** (1977). Bacterial sulfate reduction within reduced microniches of oxidized marine sediments. *Marine Biology* 41(1): 7-17.

**Jørgensen, B. B. and N. P. Revsbech** (1983). Colorless Sulfur Bacteria, *Beggiatoa* spp. and *Thiovulum* spp., in O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S Microgradients. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 1261-1270.

**Jørgensen, B. B., L. X. Zawacki and H. W. Jannasch** (1990). Thermophilic bacterial sulfate reduction in deep-sea sediments at the Guaymas Basin hydrothermal vent site (Gulf of California). *Deep-Sea Research* 37: 695-710.

## K

**Kallmeyer, J. and A. Boetius** (2004). Effects of Temperature and Pressure on Sulfate Reduction and Anaerobic Oxidation of Methane in Hydrothermal Sediments of Guaymas Basin. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1231-1233.

**Kaplan, I. and S. Rittenberg** (1964). Microbiological fractionation of sulphur isotopes. *Journal of General Microbiology* 34: 195-212.

**Kappler, A., C. Johnson, H. Crosby, B. Beard and D. Newman** (2010). Evidence for equilibrium iron isotope fractionation by nitrate-reducing iron (II)-oxidizing bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74: 2826-2842.

**Kappler, A. and K. L. Straub** (2005). Geomicrobiological cycling of iron. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 59: 85-108.

**Karl, D. M.** (1995). Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial communities. In *The microbiology of deep-sea hydrothermal vents*. Eds D. M. Karl, CRC Press: 35-124.

**Kashefi, K., D. E. Holmes, J. A. Baross and D. R. Lovley** (2003). Thermophily in the Geobacteraceae: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Member of the Geobacteraceae from the "Bag City" Hydrothermal Vent. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2985-2993.

**Kashefi, K., D. E. Holmes, A. L. Reysenbach and D. R. Lovley** (2002). Use of Fe(III) as an electron acceptor to recover previously uncultured hyperthermophiles: Isolation and characterization of *Geothermobacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1735-1742.

**Kashefi, K., J. M. Tor, D. E. Holmes, C. V. Gaw Van Praagh, A. L. Reysenbach and D. R. Lovley** (2002). *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52(3): 719-728.

**Kato, S., C. Kobayashi, T. Kakegawa and A. Yamagishi** (2009). Microbial communities in iron-silica-rich microbial mats at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Environmental Microbiology* 11: 2094-2111.

**Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Meintjes and A. Drummond** (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.

- Kelley, D. S., J. A. Baross and J. R. Delaney** (2002). Volcanoes, fluids, and life at mid-ocean ridge spreading centers. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 30: 385-491.
- Kerr, R. C.** (1997). Heat transfer and hydrothermal fluid flow at flanges on large seafloor sulphide structures. *Earth and Planetary Science Letters* 152: 93-99.
- Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kleikemper, J., M. H. Schroth, S. M. Bernasconi, B. Brunner and J. Zeyer** (2004). Sulfur isotope fractionation during growth of sulfate-reducing bacteria on various carbon sources. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68: 4891-4904.
- Klinkhammer, G.** (1980). Observations of the distribution of manganese over the East Pacific Rise. *Chemical Geology* 29(1): 211-226.
- Kniemeyer, O., T. Fischer, H. Wilkes, F. O. Glockner and F. Widdel** (2003). Anaerobic Degradation of Ethylbenzene by a New Type of Marine Sulfate-Reducing Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 760-768.
- Kniemeyer, O., F. Musat, S. M. Sievert, K. Knittel, H. Wilkes, M. Blumenberg, W. Michaelis, A. Classen, C. Bolm, S. B. Joye and F. Widdel** (2007). Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* 449: 898-901.
- Kolganova, T. V., B. B. Kuznetsov and T. P. Tourova** (2002). Designing and Testing Oligonucleotide Primers for Amplification and Sequencing of Archaeal 16S rRNA Genes. *Microbiology* 71: 243-246.
- Konhauser, K. O., A. Kappler and E. E. Roden** (2011). Iron in microbial metabolism. *Elements* 7: 89-93.
- Kouris, A., S. Kim Juniper, G. Frébourg and F. Gaill** (2007). Protozoan–bacterial symbiosis in a deep-sea hydrothermal vent folliculinid ciliate (*Folliculinopsis* sp.) from the Juan de Fuca Ridge. *Marine Ecology* 28: 63-71.
- Kumar, S., M. Nei, J. Dudley and K. Tamura** (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.
- Kurr, M., R. Huber, H. König, H. W. Jannasch, H. Fricke, A. Trincone, J. K. Kristjansson and K. O. Stetter** (1991). *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Archives of Microbiology* 156: 239-247.
- 
- ## L
- 
- Lane, D., J.** (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*.1:115-176
- Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin and N. R. O. Pace** (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 82: 6955-6959.
- Lawver, L. A., J. G. Sclater, T. L. Henyey and J. Rogers** (1973). Heat flow measurements in the southern portion of the Gulf of California. *Earth and Planetary Science Letters* 19(2): 198-208.
- Le Bris, N., B. Govenar, C. Le Gall and C. Fisher** (2006). Variability of physico-chemical conditions in 9°50' N EPR diffuse flow vent habitats. *Marine Chemistry* 98(2): 167-182.
- Le Bris, N., P.-M. Sarradin and J.-C. Caprais** (2003). Contrasted sulphide chemistries in the environment of 13°N EPR vent fauna. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 50(6): 737-747.
- Le Roy, M.** (2008). Recherche de microorganismes ferreducteurs en milieu hydrothermal profond. Rapport de stage de Master I Sciences Technologie Santé, Mention Sciences du Vivant, Université de Bretagne Occidentale, Brest, 22p
- Le Roy, M.** (2009). Suivi temporel de la diversité microbienne dans une cheminée hydrothermale active. Rapport de stage de Master II Sciences Technologie Santé, Mention Sciences du Vivant, Spécialité Microbiologie Fondamentale et Appliquée, Université de Bretagne Occidentale, Brest 30p.
- L'Haridon, S., V. Cilia, P. Messner, G. Ragueneas, A. Gambacorta, U. B. Sleytr, D. Prieur and C. Jeanthon** (1998). *Desulfurobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 701-711.

- L'Haridon, S., A.-L. Reysenbach, B. J. Tindall, P. Schonheit, A. Banta, U. Johnsen, P. Schumann, A. Gambacorta, E. Stackebrandt and C. Jeanthon** (2006). *Desulfurobacterium atlanticum* sp. nov., *Desulfurobacterium pacificum* sp. nov. and *Thermovibrio guaymasensis* sp. nov., three thermophilic members of the Desulfurobacteriaceae fam. nov., a deep branching lineage within the Bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2843-2852.
- Lonsdale, P.** (1977). Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep Sea Research* 24(9): 857-863.
- Lonsdale, P. and K. Becker** (1985). Hydrothermal plumes, hot springs, and conductive heat flow in the Southern Trough of Guaymas Basin. *Earth and Planetary Science Letters* 73: 211-225.
- Lonsdale, P. F., J. L. Bischoff, V. M. Burns, M. Kastner and R. E. Sweeney** (1980). A high-temperature hydrothermal deposit on the seabed at a Gulf of California spreading center. *Earth and Planetary Science Letters* 49: 8-20.
- Lonsdale, P. and L. A. Lawver** (1980). Immature plate boundary zones studied with a submersible in the Gulf of California. *Geological Society of America Bulletin* 91: 555-569.
- Lopez-Garcia, P., A. Vereshchaka and D. Moreira** (2007). Eukaryotic diversity associated with carbonates and fluid-seawater interface in Lost City hydrothermal field. *Environmental Microbiology* 9: 546-554.
- Lovley, D. R. and E. J. P. Phillips** (1986). Availability of Ferric Iron for Microbial Reduction in Bottom Sediments of the Freshwater Tidal Potomac River. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 751-757.
- Luther III, G. W., A. J. Findlay, D. J. MacDonald, S. M. Owings, T. E. Hanson, R. A. Beinart and P. R. Girguis** (2011). Thermodynamics and Kinetics of sulfide oxidation by oxygen: a look at inorganically controlled reactions and biologically mediated processes in the environment. *Frontiers in Microbiology* 2: 62
- Luther III, G. W., B. T. Glazer, L. Hohmann, J. I. Popp, M. Taillefert, T. F. Rozan, P. J. Brendel, S. M. Theberge and D. B. Nuzzio** (2001). Sulfur speciation monitored in situ with solid state gold amalgam voltammetric microelectrodes: polysulfides as a special case in sediments, microbial mats and hydrothermal vent waters *Journal of Environmental Monitoring* 3(1): 61-66.
- Luton, P. E., J. M. Wayne, R. J. Sharp and P. W. Riley** (2002). The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148: 3521-3530.
- 
- ## M
- 
- Machel, H. G.** (2001). Bacterial and thermochemical sulfate reduction in diagenetic settings - old and new insights. *Sedimentary Geology* 140: 143-175.
- Machel, H. G., H. R. Krouse and R. Sassen** (1995). Products and distinguishing criteria of bacterial and thermochemical sulfate reduction. *Applied Geochemistry* 10: 373-389.
- Madigan, M. and J. Martinko** (2007). *Brock Biologie des micro-organismes*, Pearson Education, France.
- Maestrojuan, G. M., D. R. Boone, L. Xun, R. A. Mah and L. Zhang** (1990). Transfer of *Methanogenium bourgense*, *Methanogenium marisnigri*, *Methanogenium olentangyi*, and *Methanogenium thermophilicum* to the Genus *Methanoculleus* gen. nov., Emendation of *Methanoculleus marisnigri* and *Methanogenium*, and Description of New Strains of *Methanoculleus bourgense* and *Methanoculleus marisnigri*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40: 117-122.
- Magenheim, A. J. and J. M. Gieskes** (1992). Hydrothermal discharge and alteration in near-surface sediments from the Guaymas Basin, Gulf of California. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56(6): 2329-2338.
- Makita, H., S. Nakagawa, M. Miyazaki, K.-i. Nakamura, F. Inagaki and K. Takai** (2012). *Thiofractor thiocaminus* gen. nov., sp. nov., a novel hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing epsilonproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney in the Nikko Seamount field of the northern Mariana Arc. *Archives of Microbiology* 194: 785-794.
- Mann, J. L., R. D. Vocke and W. R. Kelly** (2009). Revised  $\delta^{34}\text{S}$  reference values for IAEA sulfur isotope reference materials S-2 and S-3. *Rapid*



Communications in Mass Spectrometry 23: 1116-1124.

**Martens, C. S.** (1990). Generation of short chain acid anions in hydrothermally altered sediments of the Guaymas Basin, Gulf of California. *Applied Geochemistry* 5: 71-76.

**Mason, O. U., U. Stingl, L. J. Wilhelm, M. M. Moeseneder, C. A. Di Meo-Savoie, M. R. Fisk and S. J. Giovannoni** (2007). The phylogeny of endolithic microbes associated with marine basalts. *Environmental Microbiology* 9: 2539-2550.

**Mayer, L. and K. R. Vincent** (1999). Active tectonics of the Loreto area, Baja California Sur, Mexico. *Geomorphology* 27: 243-255.

**McCliment, E., A., K. Voglesonger, M., P. O'Day, A., E. Dunn, E., J. Holloway, R. and S. C. Cary** (2006). Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage. *Environmental Microbiology* 8: 114-125.

**McHatton, S. C., J. P. Barry, H. W. Jannasch and D. C. Nelson** (1996). High Nitrate Concentrations in Vacuolate, Autotrophic Marine *Beggiatoa* spp. *Applied in Environmental Microbiology* 62: 954-958.

**McKay, L. J., B. J. MacGregor, J. F. Biddle, D. B. Albert, H. P. Mendlovitz, D. R. Hoer, J. S. Lipp, K. G. Lloyd and A. P. Teske** (2012). Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white *Beggiatoa* mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 67(0): 21-31.

**Metz, S. and J. H. Trefry** (2000). Chemical and mineralogical influences on concentrations of trace metals in hydrothermal fluids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64(13): 2267-2279.

**Millero, F. J., S. Hubinger, M. Fernandez and S. Garnett** (1987). Oxidation of H<sub>2</sub>S in seawater as a function of temperature, pH, and ionic strength. *Environmental Science & Technology* 21: 439-443.

**Miroshnichenko, M. L., N. A. Kostrikina, S. L'Haridon, C. Jeanthon, H. Hippe, E. Stackebrandt and E. A. Bonch-Osmolovskaya** (2002). *Nautilia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing epsilon-proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1299-1304.

**Miroshnichenko, M. L., A. I. Slobodkin, N. A. Kostrikina, S. L'Haridon, O. Nercessian, S. Spring, E. Stackebrandt, E. A. Bonch-Osmolovskaya and C. Jeanthon** (2003). *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1637-1641.

**Mitchell, K., A. Heyer, D. E. Canfield, J. Hoek and K. S. Habicht** (2009). Temperature effect on the sulfur isotope fractionation during sulfate reduction by two strains of the hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus*. *Environmental Microbiology* 11: 2998-3006.

**Mottl, M. J. and T. F. McConachy** (1990). Chemical processes in buoyant hydrothermal plumes on the East Pacific Rise near 21 N. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54(7): 1911-1927.

**Mori, K., A. Maruyama, T. Urabe, K.-i. Suzuki and S. Hanada** (2008). *Archaeoglobus infectus* sp. nov., a novel thermophilic, chemolithoheterotrophic archaeon isolated from a deep-sea rock collected at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, western Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 810-816.

**Moussard, H., S. L'Haridon, B. J. Tindall, A. Banta, P. Schumann, E. Stackebrandt, A.-L. Reysenbach and C. Jeanthon** (2004). *Thermodesulfator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 227-233.

**Moyer, C., F. Dobbs and D. Karl** (1995). Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1555-1562.

**Mullineaux, L. S., C. H. Peterson, F. Micheli and S. W. Mills** (2003). Successional mechanism varies along a gradient in hydrothermal fluid flux at deep-sea vents. *Ecological Monographs* 73(4): 523-542.

**Muyzer, G. and K. Smalla** (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.

**Muyzer, G., E. C. De Waal and A. G. Uitterlinden** (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis

analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.

## N

**Nakagawa, S., F. Inagaki, K. Takai, K. Horikoshi and Y. Sako** (2005). *Thioreductor micantisoli* gen. nov., sp. nov., a novel mesophilic, sulfur-reducing chemolithoautotroph within the  $\epsilon$ -Proteobacteria isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 599-605.

**Nakagawa, S., K. Takai, F. Inagaki, H. Chiba, J.-i. Ishibashi, S. Kataoka, H. Hirayama, T. Nunoura, K. Horikoshi and Y. Sako** (2005). Variability in microbial community and venting chemistry in a sediment-hosted backarc hydrothermal system: Impacts of seafloor phase-separation. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 141-155.

**Nakagawa, S., K. Takai, F. Inagaki, H. Hirayama, T. Nunoura, K. Horikoshi and Y. Sako** (2005). Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-Proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. *Environmental Microbiology* 7: 1619-1632.

**Nakagawa, T., K. Takai, Y. Suzuki, H. Hirayama, U. Konno, U. Tsunogai and K. Horikoshi** (2006). Geomicrobiological exploration and characterization of a novel deep-sea hydrothermal system at the TOTO caldera in the Mariana Volcanic Arc. *Environmental Microbiology* 8: 37-49.

**Nelson, D. C. and H. W. Jannasch** (1983). Chemoautotrophic growth of a marine *Beggiatoa* in sulfide-gradient cultures. *Archives of Microbiology* 136: 262-269.

**Nelson, D. C., N. P. Revsbech and B. B. Jørgensen** (1986). Microoxic-Anoxic Niche of *Beggiatoa* spp.: Microelectrode Survey of Marine and Freshwater Strains. *Applied Environmental Microbiology* 52: 161-168.

**Nelson, D. C., C. O. Wirsen and H. W. Jannasch** (1989). Characterization of large, autotrophic *Beggiatoa* sp. abundant at hydrothermal vent of Guaymas basin. *Applied Environmental Microbiology* 55: 2909-2917.

**Nunoura, T., H. Oida, M. Miyazaki and Y. Suzuki** (2008). *Thermosulfidibacter takaii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing chemolithoautotroph isolated from a

deep-sea hydrothermal field in the Southern Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 659-665.

**Nunoura, T., H. Oida, M. Nakaseama, A. Kosaka, S. B. Ohkubo, T. Kikuchi, H. Kazama, S. Hosoi-Tanabe, K.-i. Nakamura, M. Kinoshita, H. Hirayama, F. Inagaki, U. Tsunogai, J.-i. Ishibashi and K. Takai** (2010). Archaeal Diversity and Distribution along Thermal and Geochemical Gradients in Hydrothermal Sediments at the Yonaguni Knoll IV Hydrothermal Field in the Southern Okinawa Trough. *Applied and Environmental Microbiology* 76(4): 1198-1211.

## O

**Ondreas, H., Y. Fouquet, A. Normand, O. Rouxel and A. Godfroy** (2011). Combination of AUV high resolution mapping and submersible visual observations on the Guaymas Hydrothermal Fields (Southern Trough Ridge). American Geophysical Union, Fall Meeting 2011(abstract #OS13A-1503).

**Ono, S., B. Wing, D. Johnston, J. Farquhar and D. Rumble** (2006). Mass-dependent fractionation of quadruple stable sulfur isotope system as a new tracer of sulfur biogeochemical cycles. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70: 2238-2252.

**Ono, S., B. Wing, D. Rumble and J. Farquhar** (2006). High precision analysis of all four stable isotopes of sulfur ( $^{32}\text{S}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$  and  $^{36}\text{S}$ ) at nanomole levels using a laser fluorination isotope-ratio-monitoring gas chromatography-mass spectrometry. *Chemical Geology* 225: 30-39.

**Orcutt, B. N., W. Bach, K. Becker, A. T. Fisher, M. Hentscher, B. M. Toner, C. G. Wheat and K. J. Edwards** (2011). Colonization of subsurface microbial observatories deployed in young ocean crust. *ISME Journal* 5: 692-703.

**Orcutt, B. N., J. B. Sylvan, N. J. Knab and K. J. Edwards** (2011). Microbial Ecology of the Dark Ocean above, at, and below the Seafloor. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75: 361-422.

**Orcutt, B., C. G. Wheat and K. J. Edwards** (2010). Subseafloor Ocean Crust Microbial Observatories: Development of FLOCS (Flow-through Osmo Colonization System) and Evaluation of Borehole Construction Materials. *Geomicrobiology Journal* 27: 143-157.

**Otero, X. L., M. A. Huerta-Diaz and F. Macias** (2003). Influence of a turbidite deposit on the extent of pyritization of iron, manganese and trace metals in sediments from the Guaymas Basin, Gulf of California (Mexico). *Applied Geochemistry* 18: 1149-1163.

## P

**Page, A., M. K. Tivey, D. S. Stakes and A.-L. Reysenbach** (2008). Temporal and spatial archaeal colonization of hydrothermal vent deposits. *Environmental Microbiology* 10: 874-884.

**Page, A., S. K. Juniper, M. Olgan, K. Alain, G. Desrosiers, J. Querellou and M. A. Cambon-Bonavita** (2004). Microbial diversity associated with a *Paralvinella sulfincola* tube and the adjacent substratum on an active deep-sea vent chimney. *Geobiology* 2: 225-238.

**Percak-Dennett, E., B. Beard, H. Xu, H. Konishi, C. Johnson and E. Roden** (2011). Iron isotope fractionation during microbial dissimilatory iron oxide reduction in simulated Archean seawater. *Geobiology* 9: 205-220.

**Pérez-Rodríguez, I., A. Grosche, L. Massenburg, V. Starovoytov, R. A. Lutz and C. Vetriani** (2011). *Phorcysia thermohydrogeniphila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium from a deep-sea hydrothermal vent on the East Pacific Rise. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 2388-2394

**Peter, J. M. and S. D. Scott** (1988). Mineralogy, composition, and fluid inclusion microthermometry of sea-floor hydrothermal deposits in the southern trough of Guaymas Basin, Gulf of California. *The Canadian Mineralogist* 26: 567-587.

**Phelps, C. D., L. J. Kerkhof and L. Y. Young** (1998). Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. *FEMS Microbiology Ecology* 27: 269-279.

**Pley, U., J. Schipka, A. Gambacorta, J. H.W., H. Fricke, R. Rachel and K. O. Stetter** (1991). *Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110°C. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 245-253.

**Postec, A.** (2005). Diversité des populations microbiennes thermophiles d'une cheminée hydrothermale océanique : cultures

d'enrichissement en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles, Doctorat de l'Université de Provence (Aix-Marseille I) Mention Microbiologie, Biologie Végétale et Biotechnologies. 251p .

**Postec, A., C. Le Breton, M. L. Fardeau, F. Lesongeur, P. Pignet, J. Quérellou, B. Ollivier and A. Godfroy** (2005). *Marinitoga hydrogenitolerans* sp. nov., a novel member of the order Thermotogales isolated from a black smoker chimney on the Mid-Atlantic Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1217-1221.

**Postec, A., F. Lesongeur, P. Pignet, B. Ollivier, J. Quérellou and A. Godfroy** (2007). Continuous enrichment cultures: insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent chimneys. *Extremophiles* 11: 747-757.

**Postec, A., P. Pignet, V. Cueff-Gauchard, A. Schmitt, J. Querellou and A. Godfroy** (2005). Optimisation of growth conditions for continuous culture of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus hydrothermalis* and development of sulphur-free defined and minimal media. *Research in Microbiology* 156: 82-87.

**Postec, A., L. Urios, F. Lesongeur, B. Ollivier, J. Quérellou and A. Godfroy** (2005). Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting the deep-sea hydrothermal ecosystems. *Current Microbiology* 50: 138-144.

**Poulton, S. W., M. D. Krom and R. Raiswell** (2004). A revised scheme for the reactivity of iron (oxyhydr) oxide minerals towards dissolved sulfide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68: 3703-3715.

**Poulton, S. W., M. D. Krom, J. V. Rijn and R. Raiswell** (2002). The use of hydrous iron (III) oxides for the removal of hydrogen sulphide in aqueous systems. *Water Research* 36: 825-834.

**Preisler, A., D. de Beer, A. Lichtschlag, G. Lavik, A. Boetius and B. B. Jorgensen** (2007). Biological and chemical sulfide oxidation in a Beggiatoa inhabited marine sediment. *ISME Journal* 1: 341-353.

## R

**Rabus, R., T. A. Hansen and F. Widdel** (2006). Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. *The prokaryotes* 2: 659-768.

**Rassa, A. C., S. M. McAllister, S. A. Safran and C. L. Moyer** (2009). Zeta-Proteobacteria Dominate the

- Colonization and Formation of Microbial Mats in Low-Temperature Hydrothermal Vents at Loihi Seamount, Hawaii. *Geomicrobiology Journal* 26: 623-638.
- Raven, N., N. Ladwa, D. Cossar and R. Sharp** (1992). Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 263-267.
- Ravot, G., B. Ollivier, M. Magot, B. Patel, J. Crolet, M. Fardeau and J. Garcia** (1995). Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order Thermotogales. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2053-2055.
- Reysenbach, A.-L. and S. L. Cady** (2001). Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. *Trends in Microbiology* 9: 79-86.
- Reysenbach, A.-L., D. Gotz, A. Banta, C. Jeanthon and Y. Fouquet** (2002). Expanding the distribution of the Aquificales to the deep-sea vents on Mid-Atlantic Ridge and Central Indian Ridge. *Cahiers de Biologie Marine* 43: 425-428.
- Reysenbach, A.-L., Y. Liu, A. B. Banta, T. J. Beveridge, J. D. Kirshtein, S. Schouten, M. K. Tivey, K. L. Von Damm and M. A. Voytek** (2006). A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature* 442: 444-447.
- Reysenbach, A. L., K. Longnecker and J. Kirshtein** (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3798-3806.
- Rickard, D.** (1995). Kinetics of FeS precipitation: Part 1. Competing reaction mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59: 4367-4379.
- Roe, J. E., A. D. Anbar and J. Barling** (2003). Nonbiological fractionation of Fe isotopes: evidence of an equilibrium isotope effect. *Chemical Geology* 195: 69-85.
- Roerdink, D. L., P. R. Mason, J. Farquhar and T. Reimer** (2012). Multiple sulfur isotopes in Paleoproterozoic barites identify an important role for microbial sulfate reduction in the early marine environment. *Earth and Planetary Science Letters* 331: 177-186.
- Roesch, L. F. W., G. L. Lorca, G. Casella, A. Giongo, A. Naranjo, A. M. Pionzio, N. Li, V. Mai, C. H. Wasserfall, D. Schatz, M. A. Atkinson, J. Neu and E. W. Triplett** (2009). Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. *ISME Journal* 3: 536-548.
- Roussel, E. G., C. Konn, J.-L. Charlou, J.-P. Donval, Y. Fouquet, J. Querellou, D. Prieur and M.-A. Cambon Bonavita** (2011). Comparison of microbial communities associated with three Atlantic ultramafic hydrothermal systems. *FEMS Microbiology Ecology* 77: 647-665.
- Rouxel, O. J. and M. Auro** (2010). Iron Isotope Variations in Coastal Seawater Determined by Multicollector ICP-MS. *Geostandards and Geoanalytical Research* 34: 135-144.
- Rouxel, O. J., A. Bekker and K. J. Edwards** (2005). Iron Isotope Constraints on the Archean and Paleoproterozoic Ocean Redox State. *Science* 307: 1088-1091.
- Rouxel, O., N. Dobbek, J. Ludden and Y. Fouquet** (2003). Iron isotope fractionation during oceanic crust alteration. *Chemical Geology* 202: 155-182.
- Rouxel, O., Y. Fouquet and J. N. Ludden** (2004). Subsurface processes at the Lucky Strike hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge: evidence from sulfur, selenium, and iron isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68: 2295-2311.
- Rouxel, O., S. Ono, J. Alt, D. Rumble and J. Ludden** (2008). Sulfur isotope evidence for microbial sulfate reduction in altered oceanic basalts at ODP Site 801. *Earth and Planetary Science Letters* 268: 110-123.
- Rouxel, O., W. C. Shanks Iii, W. Bach and K. J. Edwards** (2008). Integrated Fe- and S-isotope study of seafloor hydrothermal vents at East Pacific Rise 9-10°N. *Chemical Geology* 252: 214-227.
- Ruby, E. G. and H. W. Jannasch** (1982). Physiological characteristics of *Thiomicrospira* sp. strain L12 isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Journal of Bacteriol.* 149: 161-165.
- Ruby, E. G., C. O. Wirsen and H. W. Jannasch** (1981). Chemolithotrophic Sulfur-Oxidizing Bacteria from the Galapagos Rift Hydrothermal Vents *Applied and Environmental Microbiology* 42: 317-324.
- Rueter, P., R. Rabus, H. Wilkest, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch and F. Widdel** (1994). Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature* 372: 455-458.

## S

- Saitou, N. and M. Nei** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sander, S. G. and A. Koschinsky** (2011). Metal flux from hydrothermal vents increased by organic complexation. *Nature Geoscience* 4(3): 145-150.
- Sangwan, P., S. Kovac, K. E. Davis, M. Sait and P. H. Janssen** (2005). Detection and cultivation of soil Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8402-8410.
- Santelli, C. M., V. P. Edgcomb, W. Bach and K. J. Edwards** (2009). The diversity and abundance of bacteria inhabiting seafloor lavas positively correlate with rock alteration. *Environmental Microbiology* 11: 86-98.
- Sarradin, P.-M., J.-C. Caprais, P. Briand, F. Gaill, B. Shillito and D. Desbruyeres** (1998). Chemical and thermal description of the environment of the Genesis hydrothermal vent community (13 N, EPR). *Cahiers de biologie marine* 39(2): 159-167.
- Sarrazin, J., P.-M. Sarradin and the MoMARETO cruise participants** (2006). MoMARETO: a cruise dedicated to the spatio-temporal dynamics and the adaptations of hydrothermal vent fauna on the Mid-Atlantic Ridge. *InterRidge News* 15: 24-33.
- Schloss, P. D. and J. Handelsman** (2004). Status of the Microbial Census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 686-691.
- Schrenk, M. O., D. S. Kelley, S. A. Bolton and J. A. Baross** (2004). Low archaeal diversity linked to subseafloor geochemical processes at the Lost City Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *Environmental Microbiology* 6: 1086-1095.
- Schrenk, M. O., D. S. Kelley, J. R. Delaney and J. A. Baross** (2003). Incidence and Diversity of Microorganisms within the Walls of an Active Deep-Sea Sulfide Chimney. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3580-3592.
- Severmann, S., C. Johnson, B. Beard, C. German, H. Edmonds, H. Chiba and D. Green** (2004). The effect of plume processes on the Fe isotope composition of hydrothermally derived Fe in the deep ocean as inferred from the Rainbow vent site, Mid-Atlantic Ridge, 36° 14' N. *Earth and Planetary Science Letters* 225(1): 63-76.
- Sharma, M., M. Polizzotto and A. Anbar** (2001). Iron isotopes in hot springs along the Juan de Fuca Ridge. *Earth and Planetary Science Letters* 194: 39-51.
- Shen, Y., R. Buick and D. E. Canfield** (2001). Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era. *Nature* 410: 77-81.
- Sim, M. S., T. Bosak and S. Ono** (2011). Large Sulfur Isotope Fractionation Does Not Require Disproportionation. *Science* 333: 74-77.
- Sim, M. S., S. Ono, K. Donovan, S. P. Templer and T. Bosak** (2011). Effect of electron donors on the fractionation of sulfur isotopes by a marine *Desulfovibrio* sp. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75: 4244-4259.
- Simoneit, B. R.** (1985). Hydrothermal petroleum: genesis, migration, and deposition in Guaymas Basin, Gulf of California. *Canadian Journal of Earth Sciences* 22: 1919-1929.
- Simoneit, B. R. T., P. F. Lonsdale, J. M. Edmond and W. C. Shanks III** (1990). Deep-water hydrocarbon seeps in Guaymas Basin, Gulf of California. *Applied Geochemistry* 5: 41-49.
- Singer, E., J. F. Heidelberg, A. Dhillon and K. J. Edwards** (2013). Metagenomic insights into the dominant Fe(II) oxidizing *Zetaproteobacteria* from an iron mat at Loi'hi, Hawai'i. *Frontiers in Microbiology* 4 : 52
- Slobodkina, G. B., T. V. Kolganova, N. A. Chernyh, J. Querellou, E. A. Bonch-Osmolovskaya and A. I. Slobodkin** (2009). *Deferribacter autotrophicus* sp. nov., an iron(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 1508-1512.
- Slobodkina, G. B., T. V. Kolganova, J. Querellou, E. A. Bonch-Osmolovskaya and A. I. Slobodkin** (2009). *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2880-2883.
- Slobodkina, G. B., A.-L. I. Reysenbach, A. Panteleeva, N. Kostrikina, I. Wagner, E. Bonch-Osmolovskaya and A. I. Slobodkin** (2011). *Deferrisoma camini* gen. nov., sp. nov. a novel moderately thermophilic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent that forms a distinct phylogenetic branch in Deltaproteobacteria. *International Journal of*

Systematic and Evolutionary Microbiology 62:2463-2468

**Slobodkin, A. I., A.-L. Reysenbach, G. B. Slobodkina, R. V. Baslerov, N. A. Kostrikina, I. D. Wagner and E. Bonch-Osmolovskaya** (2011). *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov. a novel extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62: 2565-2571

**Slobodkin, A. I., A.-L. Reysenbach, G. B. Slobodkina, T. V. Kolganova, N. A. Kostrikina and E. A. Bonch-Osmolovskaya** (2012). *Dissulfuribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov. a novel thermophilic autotrophic sulfur-disproportionating deeply-branching delta-proteobacterium from a deep-sea hydrothermal vent of the Eastern Lau Spreading Center. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. doi:10.1099/ij.s.0.046938-0

**Slobodkin, A., B. Campbell, S. C. Cary, E. A. Bonch-Osmolovskaya and C. Jeanthon** (2001). Evidence for the presence of thermophilic Fe(III)-reducing microorganisms in deep-sea hydrothermal vents at 13°N (East Pacific Rise). FEMS Microbiology Ecology 36: 235-243.

**Slobodkin, A. I., C. Jeanthon, S. L'Haridon, T. Nazima, M. Miroshnichenko and E. Bonch-Osmolovskaya** (1999). Dissimilatory reduction of Fe(III) by thermophilic bacteria and archaea in deep surface petroleum reservoirs of Western Siberia. Current Microbiology 39: 99-102.

**Sorokin, D. Y., T. P. Tourova and G. Muyzer** (2005). *Citricella thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a novel lithoheterotrophic sulfur-oxidizing bacterium from the Black Sea. Systematic and Applied Microbiology 28: 679-687.

**Statham, P., C. German and D. Connelly** (2005). Iron (II) distribution and oxidation kinetics in hydrothermal plumes at the Kairei and Edmond vent sites, Indian Ocean. Earth and Planetary Science Letters 236: 588-596.

**Staton, S., L. Amskold, G. Gordon, A. Anbar and K. Konhauser** (2006). Iron isotope fractionation during photo-oxidation of aqueous ferrous iron. AGU Spring Meeting Abstracts. abstract #V44A-04

**Staudigel, H. and S. R. Hart** (1983). Alteration of basaltic glass: Mechanisms and significance for the

oceanic crust-seawater budget. Geochimica et Cosmochimica Acta 47: 337-350.

**Stevenson, B. S., S. A. Eichorst, J. T. Wertz, T. M. Schmidt and J. A. Breznak** (2004). New Strategies for Cultivation and Detection of Previously Uncultured Microbes. Applied and Environmental Microbiology 70: 4748-4755.

**Stookey, L. L.** (1970). Ferrozine—a new spectrophotometric reagent for iron. Analytical Chemistry 42: 779-781.

**Stott, M. B., J. A. Saito, M. A. Crowe, P. F. Dunfield, S. Hou, E. Nakasone, C. J. Daughney, A. V. Smirnova, B. W. Mountain, K. Takai and M. Alam** (2008). Culture-independent characterization of a novel microbial community at a hydrothermal vent at Brothers volcano, Kermadec arc, New Zealand. Journal of Geophysical Research 113(B8): B08S06.

**Suess, E.** (1980). Particulate organic carbon flux in the oceans—surface productivity and oxygen utilization. doi:10.1038/288260a0

**Sunamura, M., Y. Higashi, C. Miyako, J.-I. Ishibashi and A. Maruyama** (2004). Two Bacteria Phylotypes Are Predominant in the Suiyo Seamount Hydrothermal Plume. Applied and Environmental Microbiology 70: 1190-1198.

**Surkov, A. V., M. E. Böttcher and J. Kuever** (2012). Sulphur isotope fractionation during the reduction of elemental sulphur and thiosulphate by *Dethiosulfobivrio* spp. Isotopes in Environmental and Health Studies 48: 65-75.

**Suzuki, Y., T. Sasaki, M. Suzuki, Y. Nogi, T. Miwa, K. Takai, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2005). Novel Chemoautotrophic Endosymbiosis between a Member of the Epsilonproteobacteria and the Hydrothermal-Vent Gastropod *Alviniconcha aff. hessleri* (Gastropoda: Provannidae) from the Indian Ocean. Applied and Environmental Microbiology 71: 5440-5450.

**Suzuki, M. T., L. T. Taylor and E. F. DeLong** (2000). Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays. Applied and Environmental Microbiology 66: 4605-4614.

**Sylvan, J. B., B. C. Pyenson, O. Rouxel, C. R. German and K. J. Edwards** (2012). Time-series analysis of two hydrothermal plumes at 9°50'N East Pacific Rise reveals distinct, heterogeneous bacterial populations. Geobiology 10: 178-192.

**Sylvan, J. B., B. M. Toner and K. J. Edwards** (2012). Life and Death of Deep-Sea Vents: Bacterial Diversity and Ecosystem Succession on Inactive Hydrothermal Sulfides. *mBio* 3 : 279-11.

## T

**Tada, A., Y. Ueno, K. Taka and N. Yoshida** (2008). Quadruple Sulphur Isotope Fractionation of Microbial Sulphur Reduction in Pure Culture. Proceedings Japanese Geoscience Union Meet, 25–30.5.2008, Chiba City, Abstract C203-P006.

**Taillefert, M., S. Neuhuber and G. Bristow** (2007). The effect of tidal forcing on biogeochemical processes in intertidal salt marsh sediments. *Geochemical transactions* 8(6).

**Takai, K., T. Gamo, U. Tsunogai, N. Nakayama, H. Hirayama, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2004). Geochemical and microbiological evidence for a hydrogen-based, hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem (HyperSLiME) beneath an active hydrothermal field. *Extremophiles* 8: 269-282.

**Takai, K., H. Hirayama, T. Nakagawa, Y. Suzuki, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2004). *Thiomicrospira thermophila* sp. nov., a novel microaerobic, thermotolerant, sulfur-oxidizing chemolithomixotroph isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the TOTO caldera, Mariana Arc, Western Pacific. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2325-2333.

**Takai, K., H. Hirayama, T. Nakagawa, Y. Suzuki, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2005). *Lebetimonas acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, acidophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the Mariana Arc. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 183-189.

**Takai, K. and K. Horikoshi** (1999). Genetic Diversity of Archaea in Deep-Sea Hydrothermal Vent Environments. *Genetics* 152(4): 1285-1297.

**Takai, K., F. Inagaki, S. Nakagawa, H. Hirayama, T. Nunoura, Y. Sako, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2003). Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated  $\epsilon$ -Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *FEMS Microbiology Letters* 218(1): 167-174.

**Takai, K., H. Kobayashi, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2003). *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(3): 839-846.

**Takai, K., T. Komatsu, F. Inagaki and K. Horikoshi** (2001). Distribution of Archaea in a Black Smoker Chimney Structure. *Applied Environmental Microbiology* 67: 3618-3629.

**Takai, K. and K. Nakamura** (2011). Archaeal diversity and community development in deep-sea hydrothermal vents. *Current Opinion in Microbiology* 14: 282-291.

**Takai, K., S. Nakagawa, Y. Sako and K. Horikoshi** (2003). *Balnearium lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, strictly anaerobic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph isolated from a black smoker chimney in the Suiyo Seamount hydrothermal system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1947-1954.

**Takai, K., T. Nunoura, J.-i. Ishibashi, J. Lupton, R. Suzuki, H. Hamasaki, Y. Ueno, S. Kawagucci, T. Gamo, Y. Suzuki, H. Hirayama and K. Horikoshi** (2008). Variability in the microbial communities and hydrothermal fluid chemistry at the newly discovered Mariner hydrothermal field, southern Lau Basin. *Journal of Geophysical Research* 113: doi:10.1029/2007JG000521.

**Takai, K., M. Suzuki, S. Nakagawa, M. Miyazaki, Y. Suzuki, F. Inagaki and K. Horikoshi** (2006). *Sulfurimonas paralvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1725-1733.

**Tangalos, G., B. Beard, C. Johnson, C. N. Alpers, E. Shelobolina, H. Xu, H. Konishi and E. Roden** (2010). Microbial production of isotopically light iron (II) in a modern chemically precipitated sediment and implications for isotopic variations in ancient rocks. *Geobiology* 8: 197-208.

**Taylor, K. G. and K. O. Konhauser** (2011). Iron in Earth Surface Systems: A Major Player in Chemical and Biological Processes. *Elements* 7: 83-88.

**Teske, A.** (2010). Sulfate-Reducing and Methanogenic Hydrocarbon-Oxidizing Microbial Communities in the Marine Environment Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis, Springer Berlin Heidelberg: 2203-2223

**Teske, A., K.-U. Hinrichs, V. Edgcomb, A. de Vera Gomez, D. Kysela, S. P. Sylva, M. L. Sogin and H. W. Jannasch** (2002). Microbial Diversity of Hydrothermal Sediments in the Guaymas Basin: Evidence for Anaerobic Methanotrophic Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1994-2007.

**Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

**Thunell, R. C.** (1998). Seasonal and annual variability in particle fluxes in the Gulf of California: A response to climate forcing. *Deep-Sea Research Part I* 45: 2059-2083.

**Thunell, R., C. Benitez-Nelson, R. Varela, Y. Astor and F. Muller-Karger** (2007). Particulate organic carbon fluxes along upwelling-dominated continental margins: Rates and mechanisms. *Global Biogeochemical Cycles* 21(1). DOI: 10.1029/2006GB002793

**Tivey, M. K. and J. R. Delaney** (1986). Growth of large sulfide structures on the endeavour segment of the Juan de Fuca ridge. *Earth and Planetary Science Letters* 77: 303-317.

**Tivey, M. K., D. S. Stakes, T. L. Cook, M. D. Hannington and S. Petersen** (1999). A model for growth of steep-sided vent structures on the Endeavour Segment of the Juan de Fuca Ridge: Results of a petrologic and geochemical study. *Journal of Geophysical Research* 104: 22859-22883.

**Toner, B. M., S. C. Fakra, S. J. Manganini, C. M. Santelli, M. A. Marcus, J. W. Moffett, O. Rouxel, C. R. German and K. J. Edwards** (2009). Preservation of iron (II) by carbon-rich matrices in a hydrothermal plume. *Nature Geoscience* 2: 197-201.

**Toner, B. M., M. A. Marcus, K. J. Edwards, O. J. Rouxel and C. R. German** (2012). Measuring the form of iron in hydrothermal plume particles. *Oceanography* 25: 209-212, doi:10.5670/oceanog.2012.19.

**Tor, J. M. and D. R. Lovley** (2001). Anaerobic degradation of aromatic compounds coupled to Fe(III) reduction by *Ferroglobus placidus*. *Environmental Microbiology* 3: 281-287.

**Tor, J. M., K. Kashefi and D. R. Lovley** (2001). Acetate oxidation coupled to Fe(III) reduction in hyperthermophilic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1363-1365.

## U

**Ueno, Y., S. Ono, D. Rumble and S. Maruyama** (2008). Quadruple sulfur isotope analysis of ca. 3.5 Ga Dresser Formation: New evidence for microbial sulfate reduction in the early Archean. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72: 5675-5691.

## V

**Van Bodegom, P. M., J. C. M. Scholten and A. J. M. Stams** (2004). Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron. *FEMS Microbiology Ecology* 49: 261-268.

**Vargas, M., K. Kashefi, E. L. BluntHarris and D. R. Lovley** (1998). Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature* 395: 65-67.

**Vartoukian, S. R., R. M. Palmer and W. G. Wade** (2010). Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 309: 1-7.

**Vazquez G, F., J. Zhang, zhong and F. J. Millero** (1989). Effect of metals on the rate of the oxidation of H<sub>2</sub>S in seawater. *Geophysical Research Letters* 16: 1363-1366.

**Von Breyman, M. T., R. Collier and E. Suess** (1990). Magnesium adsorption and ion exchange in marine sediments: A multi-component model. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54(12): 3295-3313.

**Von Breyman, M. T. and E. Suess** (1988). Magnesium in the marine sedimentary environment: Mg-NH<sub>4</sub> ion exchange. *Chemical Geology* 70(4): 359-371.

**Von Damm, K. L.** (1990). Seafloor Hydrothermal Activity: Black Smoker Chemistry and Chimneys.



Annual Review of Earth and Planetary Sciences 18: 173-204.

**Von Damm, K. L.** (1995). Controls on the chemistry and temporal variability of seafloor hydrothermal fluids. *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions*. Washington, DC, AGU. 91: 222-247.

**Von Damm, K.** (2000). Chemistry of hydrothermal vent fluids from 9–10 N, East Pacific Rise: "Time zero," the immediate post-eruptive period. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth (1978–2012)* 105(B5): 11203-11222.

**Von Damm, K. L., J. M. Edmond, B. Grant, C. I. Measures, B. Walden and R. F. Weiss** (1985). Chemistry of submarine hydrothermal solutions at 21 °N, East Pacific Rise. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49: 2197-2220.

**Von Damm, K. L., J. M. Edmond, C. I. Measures and B. Grant** (1985). Chemistry of submarine hydrothermal solutions at Guaymas Basin, Gulf of California. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49: 2221-2237.

## W

**Wagner, M., A. J. Roger, J. L. Flax, G. A. Brusseau and D. A. Stahl** (1998). Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *Journal of Bacteriology* 180: 2975-2982.

**Wang, F., H. Zhou, J. Meng, X. Peng, L. Jiang, P. Sun, C. Zhang, J. D. Van Nostrand, Y. Deng and Z. He** (2009). GeoChip-based analysis of metabolic diversity of microbial communities at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 4840-4845.

**Weber, K. A., L. A. Achenbach and J. D. Coates** (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology* 4: 752-764.

**Webster, G., C. J. Newberry, J. C. Fry and A. J. Weightman** (2003). Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods* 55: 155-164.

**Wei, M., R. Zhang, Y. Wang, H. Ji, J. Zheng, X. Chen and H. Zhou** (2013). Microbial community

structure and diversity in deep-sea hydrothermal vent sediments along the Eastern Lau Spreading Centre. *Acta Oceanologica Sinica* 32: 42-51.

**Welhan, J. A.** (1988). Origins of methane in hydrothermal systems. *Chemical Geology* 71: 183-198.

**Wery, N., F. Lesongeur, P. Pignet, V. Derennes, M.-A. Cambon-Bonavita, A. Godfroy and G. Barbier** (2001). *Marinitoga camini*, gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order Thermotogales, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 495-504.

**Wheat, C. G. and M. J. Mottl** (2000). Composition of pore and spring waters from Baby Bare: global implications of geochemical fluxes from a ridge flank hydrothermal system. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64: 629-642.

**Whelan, J. K., B. R. Simoneit and M. E. Tarafa** (1988). C1- C8 hydrocarbons in sediments from Guaymas Basin, Gulf of California—Comparison to Peru Margin, Japan Trench and California Borderlands. *Organic Geochemistry* 12: 171-194.

**Widdel, F. and F. Bak** (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*. Eds H. G. T. A. Balows, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer Springer New York, 3352-3378.

**Widdel, F. and T. E. Hanson** (1992). The Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Bacteria. In *The Prokaryotes*. Eds H. G. T. A. Balows, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer Springer New York, pages 583-624

**Winn, C. D., D. M. Karl and G. J. Massoth** (1986). Microorganisms in deep-sea hydrothermal plumes. *Nature* 320: 744-746.

**Wirsen, C. O., T. Brinkhoff, J. Kuever, G. Muyzer, S. J. Molyneaux and H. W. Jannasch** (1998). Comparison of a new *Thiomicrospira* species strain from The Mid-Atlantic Ridge with known hydrothermal vent isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4057-4059.

**Wu, L. L., B. L. Beard, E. E. Roden and C. M. Johnson** (2011). Stable Iron Isotope Fractionation Between Aqueous Fe(II) and Hydrous Ferric Oxide. *Environmental Science & Technology* 45: 1847-1852.

**Wu, L. L., B. L. Beard, E. E. Roden, C. B. Kennedy and C. M. Johnson** (2010). Stable Fe isotope fractionations produced by aqueous Fe(II)-hematite surface interactions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74: 4249-4265.

**Wu, L., B. L. Beard, E. E. Roden and C. M. Johnson** (2011). Stable iron isotope fractionation between aqueous Fe (II) and hydrous ferric oxide. *Environmental Science & Technology* 45: 1847-1852.

## Y

**Yamamoto, M. and K. Takai** (2011). Sulfur metabolisms in epsilon- and gamma-Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *Frontiers in Microbiology* 2:192

**Yao, W. and F. J. Millero** (1996). Oxidation of hydrogen sulfide by hydrous Fe(III) oxides in seawater. *Marine Chemistry* 52: 1-16.

**Yu, Y., C. Lee, J. Kim and S. Hwang** (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative

real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 89: 670-679.

## Z

**Zbinden, M. and M. A. Cambon-Bonavita** (2003). Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiology Ecology* 46: 23-30.

**Zeng, X., X. Zhang, L. Jiang, K. Alain, M. Jebbar and Z. Shao** (2012). *Palaeococcus pacificus* sp. nov., a novel archaeon from a deep-sea hydrothermal sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi:10.1099/ijs.0.044487-0

**Zhang, H.** (2000). Light and Iron(III)-induced oxidation of chromium(III) in the presence of organic acids and manganese(II) in simulated atmospheric water. *Atmospheric Environment* 34: 1633-1640.



## XI. **Annexes**

---

1. *Bacteria* isolées des sources hydrothermales océaniques profondes

2. *Archaea* isolées des sources hydrothermales océaniques profondes

3. Résumé de la présentation orale exposant la méthode d'analyse directe des isotopes du soufre de l'hydrogène sulfuré par la technique du « sparging », présenté à l'EGU en 2010



**Annexe 1 : *Bacteria* isolées des sources hydrothermales océaniques profondes**

(modifié d'après les thèses de K. Alain, 2003 ; A. Postec ,2005 ; N. Byrne, 2008 et du Mémoire d'Habilitation à Diriger les Recherches de A.Godfroy, 2006).

<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Aquificae	<i>Persephonella</i>	<i>P. marina</i>	Microaérophile, autotrophe, sulfo-thiosulfato- et hydrogène-oxydante, dénitrifiante	EPR 9°N, Pacifique	70	Gotz et al. 2002
		<i>P. guaymasensis</i>	Microaérophile, autotrophe, sulfo-thiosulfato- et hydrogène-oxydante, dénitrifiante	Bassin de Guaymas, Pacifique	70	Gotz et al. 2002
		<i>P. hydrogeniphila</i>	Microaérophile, autotrophe, hydrogène-oxydante, dénitrifiante	Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, Pacifique	70	Nakagawa et al. 2003
	<i>Phorcysia</i>	<i>P. thermohydrogeniphila</i>	Anaérobie, litho-autotrophe, dénitrifiante et sulfo-réductrice	EPR 13°N, Pacifique	75	Pérez-Rodríguez et al. 2011
	<i>Thermosulfidibacter</i>	<i>T. takaii</i>	Anaérobie, litho-autotrophe sulfo-réductrice et hydrogène-oxydante	Yonaguni Knoll IV, Southern Okinawa Trough, Pacifique	70	Nunoura et al. 2008
	<i>Hydrogenivirga</i>	<i>H. okinawensis</i>	Aérobie facultative (dénitrifiante) litho-autotrophe sulfo- et thiosulfato oxydante	Yonaguni Knoll IV, Southern Okinawa Trough, Pacifique	70-75	Nunoura et al. 2008

<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Desulfurobacterales	<i>Desulfurobacterium</i>	<i>D. thermolithotrophum</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice	Snake Pit, MAR, Atlantique	70	L'Haridon et al. 1998
		<i>D. crinifex</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice et dénitrifiante	CASM, Juan de Fuca, Pacifique	60-65	Alain et al. 2003
		<i>D. atlanticum</i>	Anaérobie, chimiolitho-autotrophe, sulfo- et nitrate-réductrice	23°N MAR, Atlantique	70-75	L'Haridon et al. 2006
		<i>D. pacificum</i>	Anaérobie, chimiolitho-autotrophe, sulfo-, thiosulfate et nitrate-réductrice	EPR 13°N, Pacifique	75	L'Haridon et al. 2006
	<i>Balnearium</i>	<i>B. lithotrophicum</i>	Anaérobie, autotrophe, hydrogène-oxidante, sulfo-réductrice	Suiyo seamount, Izu-Bonin Arc, Pacifique	70-75	Takai et al. 2003
	<i>Thermovibrio</i>	<i>T. amonificans</i>	Anaérobie, autotrophe, nitrate et sulfo-réducteur	EPR 9 °N, Pacifique	75	Vetriani et al. 2004
		<i>T. guaymasensis</i>	Anaérobie, litho-autotrophe nitrate- et sulfo-réductrice	Bassin de Guaymas, Pacifique	75-80	L'Haridon et al. 2006
	Thermotogales	<i>Marinitoga</i>	<i>M. camini</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Ménez-Gwen, MAR, Atlantique	55
<i>M. piezophila</i>			Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Grandbonum, EPR 13°N, Pacifique	65	Alain et al. 2002



<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Thermotogales	<i>Marinitoga</i>	<i>M. okinawensis</i>	Anaérobie, hétérotrophe la réduction du soufre stimule la croissance	Southern Okinawa Trough	55-60	Nunoura et al. 2007
		<i>M. hydrogenitolerans</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Rainbow, MAR, Atlantique	60	Postec et al. 2005
	<i>Thermotoga</i>	<i>Thermotoga sp.</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Snake Pit, MAR, Atlantique	80	Marteinsson et al. 1997
	<i>Thermosipho</i>	<i>T. melanesiensis</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Bassin de Lau, Pacifique	70	Antoine et al. 1997
		<i>T. japonicus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo- et thiosulfato-réductrice	Bassin d'Iheya (Okinawa), Pacifique	72	Takai and Horikoshi 2000
		<i>T. atlanticus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire	Menez Gwen, MAR, Atlantique	65	Urios et al. 2004
		<i>T. affectus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire	MAR, Atlantique	70	Podosokorskaya et al. 2011
Thermodesulfobacteria	<i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>T. hydrogeniphilum</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfato-réductrice	Bassin de Guaymas, Pacifique	75	Jeanthon et al. 2002

<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Thermodesulfobacteria	<i>Thermodesulfatator</i>	<i>T. indicus</i>	Anaérobie autotrophe, sulfato-réductrice	Central Indian Ridge	70	Moussard et al. 2004
		<i>T. atlanticus</i>	Anaérobie, litho-autotrophe, sulfato-réductrice	Rainbow, MAR, Atlantique	65-70	Alain et al. 2010
	<i>Thermosulfurimonas</i>	<i>T. dismutans</i>	Anaérobie, litho-autotrophe (sources de carbone : le CO <sub>2</sub> et les bicarbonates), réalisant la dismutation du S° en thiosulfate et sulfite	Eastern Lau Spreading Center (Bassin de Lau) Pacifique	74	Slobodkin et al. 2011
Nouvelle lignée	<i>Caldithrix</i>	<i>C. abyssi</i>	Anaérobie, mixotrophe, fermentaire, dénitrification couplée à oxydation d'hydrogène ou d'acétate	Logatchev, MAR, Atlantique	60	Miroshnichenko et al. 2003
Acidobacteria	<i>Thermotomaculum</i>	<i>T. hydrothermale</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Okinawa Trough, Pacifique	55	Izumi et al. 2012
Groupe des Thermus-Deinococcus	<i>Thermus</i>	<i>T. thermophilus GY1211</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique	75	Marteinsson et al. 1999
		<i>Thermus sp.</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique et Snake Pit, MAR, Atlantique	70-80	Marteinsson et al. 1995

<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Groupe des Thermus-Deinococcus	<i>Marinithermus</i>	<i>M. hydrothermalis</i>	Aérobic, hétérotrophe	Suiyo Seamount, Pacifique	67	Sako et al. 2003
	<i>Oceanithermus</i>	<i>O. profundus</i>	Microaérophile, lithotrophe facultative oxydant l'hydrogène, organo-hétérotrophe,	EPR 13°N, Pacifique	60	Miroshnichenko et al. 2003
		<i>O. desulfurans</i>	Microaérophile, chimiohétérotrophe, réduit O <sub>2</sub> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et S <sup>0</sup>	Suiyo Seamount, Pacifique	60	Mori et al. 2004
	<i>Vulcanithermus</i>	<i>V. mediatlanticus</i>	Microaérophile, lithohétérotrophe réduisant O <sub>2</sub> et NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Rainbow, MAR, Atlantique	70	Miroshnichenko et al. 2003
	<i>Rhabdothermus</i>	<i>R. articus</i>	Aérobic hétérotrophe capable de croître en anaérobic en réduisant les nitrates et le S <sup>0</sup>	Soria Moria vent field 71 °N Arctic Mid-Ocean Ridge	65	Steinsbu et al. 2011
Deferribacteres	<i>Deferribacter</i>	<i>D. desulfuricans</i>	Anaérobic, hétérotrophe, réduisant le soufre, les nitrates et l'arsenate	Suiyo Seamount, Pacifique	60-65	Takai et al. 2003
		<i>D. abyssi</i>	Anaérobic, litho ou organo-autotrophe, réduisant S <sup>0</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et Fe(III)	Rainbow et Ménez-Gwen, MAR, Atlantique	60	Miroshnichenko et al. 2003
		<i>D. autotrophicus</i>	Anaérobic, litho-autotrophe, réduisant le Fe(III), le Mn(IV), S <sup>0</sup> et NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ashadze, MAR, Atlantique	60	Slobodkina et al. 2009

<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Firmicutes	<i>Caloranaerobacter</i>	<i>C. azorensis</i>	Anaérobie, fermentaire	Lucky Strike, MAR, Atlantique	65	Wery et al. 2001
	<i>Caminicella</i>	<i>C. sporogenes</i>	Anaérobie, fermentaire	Elsa, EPR 13°N, Pacifique	55-60	Alain et al. 2002
	<i>Clostridium</i>	<i>C. caminithermale</i>	Anaérobie, fermentaire, capable de réaliser la réaction de Stickland	Ménez-Gwen, MAR, Atlantique	45	Brisbarre et al. 2003
		<i>C. tepidiprofundii</i>	Anaérobie, fermentaire, forme des spores	EPR 1°N, Pacifique	50	Slobodkina et al. 2008
	<i>Tepidibacter</i>	<i>T. thalassicus</i>	Anaérobie, fermentaire, réduisant le S°	EPR 13°N, Pacifique	50	Slobodkin et al. 2003
		<i>T. formicigenes</i>	Anaérobie fermentaire	Menez Gwen, MAR, Atlantique	45	Urios et al. 2004
	<i>Carboxydobrachium</i>	<i>C. pacificum</i>	Anaérobie, fermentaire. Capable de croissance par lithotrophie sur CO	Okinawa, Pacifique	70	Sokolova et al. 2001
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassins de Guaymas et de Lau, Pacifique et Snake Pit, MAR, Atlantique	60-80	Marteinsson et al. 1996
	<i>Exiguobacterium</i>	<i>E. profundum</i>	Anaérobie facultative produisant de l'acide lactique, halophile modéré, réduit les nitrates en nitrites en anaérobiose	EPR 13°N, Pacifique	45	Crapart et al. 2007

<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Firmicutes	<i>Vulcanibacillus</i>	<i>V. modesticaldus</i>	Anaérobie, fermentaire (carbohydrate, substrats organiques et protéiques), réduit les nitrates en nitrites.	Rainbow, MAR, Atlantique	55	L'Haridon et al. 2006
	<i>Vallitalea</i>	<i>V. guaymasensis</i>	Anaérobie, fermentaire, ne produit pas de spore	Tapis microbien (blanc) recouvrant des sédiments, Bassin de Guaymas, Pacifique	30-35	Lakhal et al. 2013
Bacteroidetes	<i>Rhodothermus</i>	<i>R. profundus</i>	Aérobie, hétérotrophe, ne forme pas de spore	EPR 13°N, Pacifique	70-75	Marteinsson et al. 2010
Spirochaete	<i>Exilispira</i>	<i>E. thermophila</i>	Anaérobie, hétérotrophe (uniquement de l'extrait de levure)	Iheya North field, Okinawa Trough, Japan, Pacifique	50	Imachi et al. 2008
Proteobacteria $\alpha$ -Proteobacteria	Indéterminé	Souche JF-1	Aérobie pratiquant la photosynthèse anoxygénique !	Juan de Fuca, Pacifique	30	Yurkov and Beatty 1998
	<i>Parvibaculum</i>	<i>P. hydrocarboniclasticum</i>	Aérobie, source de carbone et d'énergie: n-alkanes dans un milieu supplémenté en peptone et extrait de levure	EPR 9°N, Pacifique	35	Rosario-Passapera et al. 2012

<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
<b>Proteobacteria</b> <b>α-Proteobacteria</b>	<i>Glycoaulis</i>	<i>G. abyssi</i>	Aérobie, chimio-hétérotrophe, halophile modéré	Plume hydrothermal, proche de l'île de Vancouver, Canada		Abraham et al. 2012
	<i>Oceanibaculum</i>	<i>O. pacificum</i>		Sédiments hydrothermaux du Bassin de Lau, Pacifique	28-37	Dong et al. 2010
	<i>Piezobacter</i>	<i>P. thermophilus</i>	Aérobie facultative, mixotrophe, sulfothiosulfate-, cystein-HCl-, tetrathionate- et sulfite- oxydante avec l'oxygène ou les nitrates comme accepteur	TAG, MAR, Atlantique (isolée sous pression hydrostatique)	50	Takai et al. 2009
	<i>Aurantimonas</i>	<i>Aurantimonas-like species, souche AE01-7</i>	Mn(II)-oxydante	tube d' <i>Alvinella pompejana</i> (surface dorsal), P-vent, EPR 9°N, Pacifique	37	Anderson et al. 2009
<b>β-Proteobacteria</b>	<i>Thiobacillus</i>	<i>T. hydrothermalis</i>	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le tetrathionate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates	Bassin Nord Fidjien, Pacifique	35	Durand et al. 1993
<b>δ-Proteobacteria</b>	<i>Geothermobacter</i>	<i>G. ehrlichii</i>	Anaérobie, réduisant le fer ferrique et les nitrates	« Bag city », Juan de Fuca, Pacifique	55	Kashefi et al. 2003

Bacteria	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
δ-Proteobacteria	<i>Desulfovibrio</i>	<i>D. hydrothermalis</i>	Anaérobie, mixotrophe, sulfato-, sulfito-, thiosulfato-réductrice	Grandbonum, EPR 13°N, Pacifique	35	Alazard et al. 2003
	<i>Desulfonauticus</i>	<i>D. submarinus</i>	Anaérobie utilisant l'H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> ou le formate comme donneur d'électrons ; le sulfate, sulfite, thiosulfate ou soufre élémentaire comme accepteur d'électron et l'acétate comme source de carbone.	<i>Alvinella</i> et <i>Riftia</i> , EPR 13°N, Pacifique	45	Audiffrin et al. 2003
	<i>Desulfothermus</i>	<i>D. naphthae</i> souche TD3	Anaérobie, sulfato-réduction couplée à l'oxydation d'hydrocarbures (n-alcanes)	Bassin de Guaymas, Pacifique		Rueter et al. 1994
	<i>Dissulfuribacter</i>	<i>D. thermophilus</i>	Anaérobie, autotrophe (sources de carbone : le CO <sub>2</sub> et les bicarbonates), réalisant la dismutation du S <sup>0</sup> , du thiosulfate et du sulfite en sulfate et H <sub>2</sub> S	Valu Fa, Eastern Lau Spreading Center (Bassin de Lau) Pacifique	61	Slobodkin et al. 2012
	<i>Deferrisoma</i>	<i>D. camini</i>	Anaérobie, organotrophe, ferri-réductrice (DIR) et sulfo-réductrice	Eastern Lau Spreading Center (Bassin de Lau), Pacifique	50	Slobodkina et al. 2011

<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
δ-Proteobacteria	<i>Hippea</i>	<i>H. jasoniae</i>	Anaérobie, thermoacidophile, hétérotrophe sulfo-réductrice capable de litho-autotrophie	Lucky Strike, MAR, Atlantique	60-65	Flores et al. 2012
		<i>H. alviniae</i>	Anaérobie, thermoacidophile, hétérotrophe sulfo-réductrice capable de litho-autotrophie	'A' vent, EPR 9°N, Pacifique	60	Flores et al. 2012
γ-Proteobacteria	<i>Thiomicrospira</i>	<i>T. crunogena</i>	Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates et soufre élémentaire	EPR 21°N, Pacifique	28-32	Jannasch et al. 1985
		<i>T. thermophila</i>	Microaérophile, chemolitho-mixotrophe sulfo-oxydante	Mariana Arc, Ouest Pacifique	35-40	Takai et al. 2004
		<i>Thiomicrospira strain MA-3</i>	<i>sp.</i> , Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates et soufre élémentaire	TAG, MAR, Atlantique	28-32	Wirsen et al. 1998
		<i>Thiomicrospira strain L-12</i>	<i>sp.</i> , Aérobie, autotrophe, oxydant le thiosulfate, le soufre et le sulfure d'hydrogène en sulfates et soufre élémentaire	Galapagos, Pacifique	25	Ruby and Jannasch 1982
	<i>Vibrio</i>	<i>V. diabolicus</i>	Anaérobie facultatif, hétérotrophe	EPR 13°N, Pacifique	30-45	Raguénès et al. 1997



<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
γ-Proteobacteria	<i>Alteromonas</i>	<i>A. macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin Nord Fidjien, Pacifique	25-35	Raguénès et al. 1996
		<i>A. infernus</i>	Aérobie, hétérotrophe	Bassin de Guaymas, Pacifique	25-35	Raguénès et al. 1997
		<i>A. macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i> biovar <i>medioatlantica</i>	Aérobie, hétérotrophe	Snake Pit, MAR, Atlantique	35-40	Raguénès et al. 2003
	<i>Halomonas</i>	<i>H. neptunia</i>	Aérobie, hétérotrophe	Juan de Fuca, Pacifique	2	Kaye et al. 2004
		<i>H. sulfidaeris</i>	Aérobie, hétérotrophe	Juan de Fuca, Pacifique	20	Kaye et al. 2004
		<i>H. axialensis</i>	Aérobie, hétérotrophe	Juan de Fuca, Pacifique	20	Kaye et al. 2004
		<i>H. hydrothermalis</i>	Aérobie, hétérotrophe	South pacific Ocean, Pacifique	20	Kaye et al. 2004
	<i>Thiopfundum</i>	<i>T. hispidum</i>	Anaérobie facultative, autotrophe utilisant le soufre élémentaire, le thiosulfate, ou le tétrathionate comme donneurs d'électrons et l'oxygène et les nitrates comme accepteur d'électrons	Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, Pacifique	39	Mori et al. 2011

<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
$\gamma$ -Proteobacteria		<i>T. lithotrophica</i>	Aérobie facultative, litho-autotrophe, sulfo-, thiosulfate-, sulfite et tétrathioante-réductrice avec l'oxygène ou les nitrates comme accepteur d'électrons	TAG, MAR, Atlantique (isolée sous pression hydrostatique)	50	Takai et al. 2009
	<i>Salinisphaera</i>	<i>S. hydrothermalis</i>	Aérobie, hétérotrophe, litho-autotrophe facultative utilisant du thiosulfate et du CO <sub>2</sub>	ERP 9°N, Pacifique	30-35	Crespo-Medina et al. 2009
	<i>Amphritea</i>	<i>A. atlantica</i>	Aérobie, hétérotrophe	<i>Bathymodiolus</i> , sp. Logatchev, MAR, Atlantique	31-34	Gärtner et al. 2008
	<i>Halomonas</i>	<i>H. profundus</i>	Aérobie, hétérotrophe	Carapace de <i>Rimicaris exoculata</i> , Rainbow, MAR, Atlantique	32-37	Simon-Colin et al. 2008
$\varepsilon$ -Proteobacteria	<i>Caminiibacter</i>	<i>C. hydrogeniphilus</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice, dénitrifiante	Elsa, EPR 13°N, Pacifique	60	Alain et al. 2002
		<i>C. profundus</i>	Microaérophile, anaérobie autotrophe sulfo-réductrice, dénitrifiante	Rainbow, MAR, Atlantique	55	Miroshnichenko et al. 2004
		<i>C. mediatlanticus</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice, dénitrifiante	Rainbow, MAR, Atlantique	55	Voordeckers et al. 2005

<i>Bacteria</i>	<i>Genre</i>	<i>Espèce</i>	<i>Métabolisme</i>	<i>Origine</i>	<i>T° optimale (°C)</i>	<i>Référence</i>
$\epsilon$ -Proteobacteria	<i>Nautilia</i>	<i>N. lithotrophica</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice	EPR 13°N, Pacifique	53	Miroshnichenko et al. 2002
		<i>N. abyssi</i>	Anaérobie, hétérotrophe et litho-autotrophe sulfo-reductice	Elsa, EPR 13°N, Pacifique	60	Alain et al. 2009
		<i>N. profunficola</i>	Anaérobie, mixotrophe, sulfo-reductrice	<i>Alvinella pompejana</i> , EPR 13°N, Pacifique	40	Smith et al. 2008
		<i>N. nitratireducens</i>	Anaérobie, organotrophe et litho-autotrophe utilisant les nitrates, thiosulfate, S° et sélérate comme accepteur d'électron	L-vent , EPR 9°N, Pacifique	55	Pérez-Rodríguez et al. 2010
		<i>Sulfurospirillum Am-N</i>	<i>Sulfurospirillum</i> sp.	Anaérobie, hétérotrophe	EPR 13°N, Pacifique	41
	<i>Sulfurimonas</i>	<i>S. autotrophica</i>	Aérobie, autotrophe soufre et thiosulfate oxydante	Mid-Okinawa Trough Pacifique	25	Inagaki et al. 2003
		<i>S. paralvinella</i>	Anaérobie facultative chimolitho-autotrophe utilisant l'H <sub>2</sub> , le S° ou le thiosulfate comme source d'énergie et le CO <sub>2</sub> comme source de carbone	Mid-Okinawa Trough	30	Takai et al. 2006

<i>Bacteria</i>	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
ε-Proteobacteria	<i>Hydrogenimonas</i>	<i>H. thermophila</i>	Microaérophile anaérobie autotrophe sulfo-réductrice, dénitrifiante	Central Indian ridge, Océan Indien	55	Takai et al. 2004
	<i>Sulfurovum</i>	<i>S. lithotrophicum</i>	Microaérophile anaérobie autotrophe, soufre et thiosulfate oxydante	Okinawa Trough, Japon, Pacifique	28-30	Inagaki et al. 2004
	<i>Thioreductor</i>	<i>T. micantisoli</i>	Autotrophe anaérobie sulfo-réductrice, dénitrifiante	Okinawa Trough, Japon, Pacifique	32	Nakagawa et al. 2005
	<i>Lebetimonas</i>	<i>L. acidiphila</i>	Autotrophe anaérobie sulfo-réductrice	Mariana Arc, Pacifique	50	Takai et al. 2005
	<i>Thiofractor</i>	<i>T. thiocaminus</i>	Anaérobie, litho-autotrophe utilisant l'hydrogène comme source d'énergie, le S° comme accepteur d'électron et le CO2 comme source de carbone	Nikko Seamount, Mariana Arc, Pacifique	37	Makita et al. 2012

**A**

**Abraham, W.-R., H. Lünsdorf, M. Vancanneyt and J. Smit** (2012). Cauliform bacteria lacking phospholipids from an abyssal hydrothermal vent: Proposal of *Glycocaulis abyssi* gen. nov., sp. nov. belonging to the *Hyphomonadaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

**Alain, K., N. Callac, M. Guégan, F. Lesongeur, P. Crassous, M.-A. Cambon-Bonavita, J. Querellou and D. Prieur** (2009). *Nautilia abyssi* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfur-reducing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(6): 1310-1315.

**Alain, K., V. T. Marteinsson, M. L. Miroshnichenko, E. A. Bonch-Osmolovskaya, D. Prieur and J. L. Birrien** (2002). *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermopiezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(4): 1331-1339.

**Alain, K., P. Pignet, M. Zbinden, M. Quillevere, F. Duchiron, J. P. Donval, F. Lesongeur, G. Raguenes, P. Crassous, J. Querellou and M. A. Cambon-Bonavita** (2002). *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(5): 1621-1628.

**Alain, K., A. Postec, E. Grinsard, F. Lesongeur, D. Prieur and A. Godfroy** (2010). *Thermodesulfatator atlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(1): 33-38.

**Alain, K., J. Querellou, F. Lesongeur, P. Pignet, P. Crassous, G. Raguenes, V. Cueff and M. A. Cambon-Bonavita** (2002). *Caminibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(4): 1317-1323.

**Alain, K., S. Rolland, P. Crassous, F. Lesongeur, M. Zbinden, C. LeGall, A. Godfroy, A. Page, S. K. Juniper, M.-A. Cambon-Bonavita, F. Duchiron and J. Querellou** (2003). *Desulfurobacterium crinifex* sp. nov., a novel thermophilic, pinkish-streamer forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium*. *Extremophiles* **7**: 361-370.

**Alazard, D., S. Dukan, A. Urios, F. Verhe, N. Bouabida, F. Morel, P. Thomas, J.-L. Garcia and B. Ollivier** (2003). *Desulfovibrio hydrothermalis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**(1): 173-178.

**Anderson, C. R., G. Dick, M.-L. Chu, J.-C. Cho, R. Davis, S. Bräuer and B. Tebo** (2009). *Aurantimonas manganoxydans*, sp. nov. and *Aurantimonas litoralis*, sp. nov.: Mn (II) oxidizing representatives of a globally distributed clade of alpha-*Proteobacteria* from the order *Rhizobiales*. *Geomicrobiology Journal* **26**(3): 189-198.

**Antoine, E., V. Cilia, J.-R. Meunier, J. Guezennec, F. Lesongeur and G. Barbier** (1997). *Thermosiphon melanesiensis* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium belonging to the *Thermotogales*, isolated from deep-sea hydrothermal vent in the southern Pacific ocean. *Int. J. System. Bacteriol.* **47**: 1118-1123.

**Audiffren, C., J.-L. Cayol, C. Joulian, L. Casalot, P. Thomas, J.-L. Garcia and B. Ollivier** (2003). *Desulfonauticus submarinus* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**(5): 1585-1590.

**B**

**Brisbarre, N., M.-L. Fardeau, V. Cueff, J.-L. Cayol, G. Barbier, V. Cilia, G. Ravot, P. Thomas, J.-L. Garcia and B. Ollivier** (2003). *Clostridium caminitermale* sp. nov., a slightly halophilic and moderately thermophilic bacterium isolated from an Atlantic deep-sea hydrothermal chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**(4): 1043-1049.

**C**

**Campbell, J. B., C. Jeanthon, J. E. Kostka, G. W. Luther and S. C. Cary** (2001). Growth and phylogenetic properties of novel bacteria belonging to the epsilon subdivision of the *Proteobacteria* enriched from *Alvinella pompejana*

and deep sea hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(10): 4566-4572.

**Crapart, S., M.-L. Fardeau, J.-L. Cayol, P. Thomas, C. Sery, B. Ollivier and Y. Combet-Blanc** (2007). *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**(2): 287-292.

**Crespo-Medina, M., A. Chatziefthimiou, R. Cruz-Matos, I. Pérez-Rodríguez, T. Barkay, R. A. Lutz, V. Starovoytov and C. Vetriani** (2009). *Salinisphaera hydrothermalis* sp. nov., a mesophilic, halotolerant, facultatively autotrophic, thiosulfate-oxidizing *gammaproteobacterium* from deep-sea hydrothermal vents, and emended description of the genus *Salinisphaera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(6): 1497-1503.

## D

**Dong, C., Q. Lai, L. Chen, F. Sun, Z. Shao and Z. Yu** (2010). *Oceanibaculum pacificum* sp. nov., isolated from hydrothermal field sediment of the south-west Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(1): 219-222.

**Durand, P., A.-L. reysenbach, D. Prieur and N. Pace** (1993). Isolation and characterization of *Thiobacillus hydrothermalis* sp. nov., a mesophilic obligately chemolithotrophic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Fiji Basin. *Arch. Microbiol.* **159**: 1502-150639-150644.

## F

**Flores, G. E., R. C. Hunter, Y. Liu, A. Mets, S. Schouten and A.-L. Reysenbach** (2012). *Hippea jasoniae* sp. nov. and *Hippea alviniae* sp. nov., thermoacidophilic members of the class *Deltaproteobacteria* isolated from deep-sea hydrothermal vent deposits. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**(Pt 6): 1252-1258.

## G

**Gärtner, A., J. Wiese and J. F. Imhoff** (2008). *Amphritea atlantica* gen. nov., sp. nov., a *gammaproteobacterium* from the Logatchev hydrothermal vent field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(1): 34-39.

**Gotz, D., A. Banta, T. J. Beveridge, A. I. Rushdi, B. Simoneit and A. L. Reysenbach** (2002). *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(4): 1349-1359.

## I

**Imachi, H., S. Sakai, H. Hirayama, S. Nakagawa, T. Nunoura, K. Takai and K. Horikoshi** (2008). *Exilispira thermophila* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic spirochaete isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(10): 2258-2265.

**Inagaki, F., K. Takai, H. Kobayashi, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2003). *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing  $\epsilon$ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(6): 1801-1805.

**Inagaki, F., K. Takai, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2004). *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the  $\{\epsilon\}$ -Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(5): 1477-1482.

**Izumi, H., T. Nunoura, M. Miyazaki, S. Mino, T. Toki, K. Takai, Y. Sako, T. Sawabe and S. Nakagawa** (2012). *Thermotomaculum hydrothermale* gen. nov., sp. nov., a novel heterotrophic thermophile within the phylum *Acidobacteria* from a deep-sea hydrothermal vent chimney in the Southern Okinawa Trough. *Extremophiles* **16**(2): 245-253.

## J

**Jannasch, H. W., C. O. Wirsen, D. Nelson and L. Robertson** (1985). *Thiomicrospira crunogena* sp. nov. a colorless sulfur-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**: 422-424.

**Jeanthon, C., S. L'Haridon, V. Cueff, A. Banta, A. L. Reysenbach and D. Prieur** (2002). *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus *Thermodesulfobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(3): 765-772.

## K

**Kashefi, K., D. E. Holmes, J. A. Baross and D. R. Lovley** (2003). Thermophily in the Geobacteraceae: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Member of the Geobacteraceae from the "Bag City" Hydrothermal Vent. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(5): 2985-2993.

**Kaye, J. Z., M. C. Marquez, A. Ventosa and J. A. Baross** (2004). *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(2): 499-511.

## L

**L'Haridon, S., V. Cilia, P. Messner, G. Raguene, A. Gambacorta, U. B. Sleytr, D. Prieur and C. Jeanthon** (1998). *Desulfurobacterium thermolithotrophum* gen. nov., sp. nov., a novel autotrophic, sulphur-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 701-711.

**L'Haridon, S., M. L. Miroshnichenko, N. A. Kostrikina, B. J. Tindall, S. Spring, P. Schumann, E. Stackebrandt, E. A. Bonch-Osmolovskaya and C. Jeanthon** (2006). *Vulcanibacillus modesticaldus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, nitrate-reducing bacterium from deep-sea hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(5): 1047-1053.

**L'Haridon, S., A.-L. Reysenbach, B. J. Tindall, P. Schönheit, A. Banta, U. Johnsen, P. Schumann, A. Gambacorta, E. Stackebrandt and C. Jeanthon** (2006). *Desulfurobacterium atlanticum* sp. nov., *Desulfurobacterium pacificum* sp. nov. and *Thermovibrio guaymasensis* sp. nov., three thermophilic members of the *Desulfurobacteriaceae* fam. nov., a deep branching

lineage within the Bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(12): 2843-2852.

**Lakhal, R., N. Pradel, A. Postec, M. Hamdi, B. Ollivier, A. Godfroy and M.-L. Fardeau** (2013). Characterization of *Vallitalea guaymasensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium, isolated from sediments of Guaymas basin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

## M

**Makita, H., S. Nakagawa, M. Miyazaki, K.-i. Nakamura, F. Inagaki and K. Takai** (2012). *Thiofractor thiocaminus* gen. nov., sp. nov., a novel hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing *epsilonproteobacterium* isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney in the Nikko Seamount field of the northern Mariana Arc. *Archives of Microbiology* **194**(9): 785-794.

**Marteinsson, V. T., J.-L. Birrien, J. K. Kristjansson and D. Prieur** (1995). First isolation of thermophilic aerobic non-sporulating heterotrophic bacteria from deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiology Ecology* **18**: 163-174.

**Marteinsson, V. T., J. L. Birrien, C. Jeanthon and D. Prieur** (1996). Numerical taxonomic study of thermophilic *Bacillus* isolated from three geographical separated deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiology Ecology* **21**: 255-266.

**Marteinsson, V. T., J. L. Birrien and D. Prieur** (1997). In situ enrichment and isolation of thermophilic microorganisms from deep-sea vent environments. *Can. J. Microbiol.* **43**(7): 694-697.

**Marteinsson, V. T., J. L. Birrien, G. Raguene, M. S. Da Costa and D. Prieur** (1999). Isolation and characterization of *Thermus thermophilus* Gy1211 from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* **3**(4): 247-251.

**Marteinsson, V. T., S. H. Bjornsdottir, N. Bienvenu, J. K. Kristjansson and J.-L. Birrien** (2010). *Rhodothermus profundus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(12): 2729-2734.

**Miroshnichenko, M. L., N. A. Kostrikina, N. A. Chernyh, N. V. Pimenov, T. P. Tourova, A. N. Antipov, S. Spring, E. Stackebrandt and E. A. Bonch-Osmolovskaya** (2003). *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic,

anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(1): 323-329.

**Miroshnichenko, M. L., N. A. Kostrikina, S. L'Haridon, C. Jeanthon, H. Hippe, E. Stackebrandt and E. A. Bonch-Osmolovskaya** (2002). *Nautilia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing epsilon-proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(4): 1299-1304.

**Miroshnichenko, M. L., S. L'Haridon, C. Jeanthon, A. N. Antipov, N. A. Kostrikina, B. J. Tindall, P. Schumann, S. Spring, E. Stackebrandt and E. A. Bonch-Osmolovskaya** (2003). *Oceanithermus profundus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, microaerophilic, facultatively chemolithoheterotrophic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(3): 747-752.

**Miroshnichenko, M. L., S. L'Haridon, O. Nercessian, A. N. Antipov, N. A. Kostrikina, B. J. Tindall, P. Schumann, S. Spring, E. Stackebrandt, E. A. Bonch-Osmolovskaya and C. Jeanthon** (2003). *Vulcanithermus mediatlanticus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Thermaceae from a deep-sea hot vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(4): 1143-1148.

**Miroshnichenko, M. L., S. L'Haridon, P. Schumann, S. Spring, E. A. Bonch-Osmolovskaya, C. Jeanthon and E. Stackebrandt** (2004). *Caminibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of Nautiliales ord. nov. within the class 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(1): 41-45.

**Miroshnichenko, M. L., A. I. Slobodkin, N. A. Kostrikina, S. L'Haridon, O. Nercessian, S. Spring, E. Stackebrandt, E. A. Bonch-Osmolovskaya and C. Jeanthon** (2003). *Deferribacter abyssi* sp. nov., an anaerobic thermophile from deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(5): 1637-1641.

**Mori, K., T. Kakegawa, Y. Higashi, K.-i. Nakamura, A. Maruyama and S. Hanada** (2004). *Oceanithermus desulfurans* sp. nov., a novel

thermophilic, sulfur-reducing bacterium isolated from a sulfide chimney in Suiyo Seamount. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(5): 1561-1566.

**Mori, K., K.-i. Suzuki, T. Urabe, M. Sugihara, K. Tanaka, M. Hamada and S. Hanada** (2011). *Thiopfundum hispidum* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing *gammaproteobacterium* isolated from the hydrothermal field on Suiyo Seamount, and proposal of *Thioalkalispiraceae* fam. nov. in the order *Chromatiales*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**(10): 2412-2418.

**Moussard, H., S. L'Haridon, B. J. Tindall, A. Banta, P. Schumann, E. Stackebrandt, A.-L. Reysenbach and C. Jeanthon** (2004). *Thermodesulfator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(1): 227-233.

## N

**Nakagawa, S., F. Inagaki, K. Takai, K. Horikoshi and Y. Sako** (2005). *Thioreductor micantisoli* gen. nov., sp. nov., a novel mesophilic, sulfur-reducing chemolithoautotroph within the  $\epsilon$ -Proteobacteria isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(2): 599-605.

**Nakagawa, S., K. Takai, K. Horikoshi and Y. Sako** (2003). *Persephonella hydrogeniphila* sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**(3): 863-869.

**Nunoura, T., M. Miyazaki, Y. Suzuki, K. Takai and K. Horikoshi** (2008). *Hydrogenivirga okinawensis* sp. nov., a thermophilic sulfur-oxidizing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field, Southern Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**(3): 676-681.

**Nunoura, T., H. Oida, M. Miyazaki and Y. Suzuki** (2008). *Thermosulfidibacter takaii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field in the Southern Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(3): 659-665.



**Nunoura, T., H. Oida, M. Miyazaki, Y. Suzuki, K. Takai and K. Horikoshi** (2007). *Marinitoga okinawensis* sp. nov., a novel thermophilic and anaerobic heterotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field, Southern Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**(3): 467-471.

## P

**Pérez-Rodríguez, I., A. Grosche, L. Massenburg, V. Starovoytov, R. A. Lutz and C. Vetriani** (2011). *Phorcysia thermohydrogeniphila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium from a deep-sea hydrothermal vent on the East Pacific Rise. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

**Pérez-Rodríguez, I., J. Ricci, J. W. Voordeckers, V. Starovoytov and C. Vetriani** (2010). *Nautilia nitratreducens* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, chemosynthetic, nitrate-ammonifying bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(5): 1182-1186.

**Podosokorskaya, O. A., I. V. Kublanov, A.-L. Reysenbach, T. V. Kolganova and E. A. Bonch-Osmolovskaya** (2011). *Thermosipho affectus* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, cellulolytic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**(5): 1160-1164.

**Postec, A., C. Le Breton, M. L. Fardeau, F. Lesongeur, P. Pignet, J. Quérellou, B. Ollivier and A. Godfroy** (2005). *Marinitoga hydrogenitolerans* sp. nov., a novel member of the order *Thermotogales* isolated from a black smoker chimney on the Mid-Atlantic Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 1217-1221.

## R

**Raguénès, G., M.-A. Cambon-Bonavita, J.-F. Lohier, C. Boisset and J. Guézennec** (2003). A novel, highly viscous polysaccharide excreted by an *alteromonas* isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Current Microbiology* **46**: 448-452.

**Raguénès, G., R. Christen, J. Guezennec, P. Pignet and G. Barbier** (1997). *Vibrio diabolicus*, sp. nov. a new polysaccharide-secreting organisms isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychate

annelid, *Alvinella pompejana*. *Int. J. System. Bacteriol.* **47**: 989-995.

**Raguénès, G., P. Pignet, G. Gauthier, A. Peres, R. Christen, H. Rougeaux, G. Barbier and J. Guezennec** (1996). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 67-73.

**Raguénès, G. H. C., A. Peres, R. Ruimy, P. Pignet, R. Christen, M. Loaec, H. Rougeaux, G. Barbier and J. G. Guezennec** (1997). *Alteromonas infernus* sp nov, a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of Applied Microbiology* **82**(4): 422-430.

**Rosario-Passapera, R., R. Keddiss, R. Wong, R. A. Lutz, V. Starovoytov and C. Vetriani** (2012). *Parvibaculum hydrocarboniclasticum* sp. nov., a mesophilic, alkane-oxidizing *alphaproteobacterium* isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the East Pacific Rise. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

**Ruby, E. G. and H. W. Jannasch** (1982). Physiological characteristics of *Thiomicrospira* sp. strain L12 isolated from deep-sea hydrothermal vents. *J. Bacteriol.* **149**: 161-165.

**Rueter, P., R. Rabus, H. Wilkest, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch and F. Widdel** (1994). Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature* **372**(6505): 455-458.

## S

**Sako, Y., S. Nakagawa, K. Takai and K. Horikoshi** (2003). *Marinithermus hydrothermalis* gen. nov., sp. nov., a strictly aerobic, thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**(1): 59-65.

**Simon-Colin, C., G. Raguénès, J. Cozien and J. G. Guezennec** (2008). *Halomonas profundus* sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Journal of Applied Microbiology* **104**(5): 1425-1432.

**Slobodkin, A. I., A.-L. Reysenbach, G. B. Slobodkina, R. V. Baslerov, N. A. Kostrikina, I. D. Wagner and E. Bonch-Osmolovskaya** (2011). *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov. a novel extremely thermophilic sulfur-

disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

**Slobodkin, A. I., A.-L. Reysenbach, G. B. Slobodkina, T. V. Kolganova, N. A. Kostrikina and E. A. Bonch-Osmolovskaya** (2012). *Dissulfuribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov. a novel thermophilic autotrophic sulfur-disproportionating deeply-branching delta-proteobacterium from a deep-sea hydrothermal vent of the Eastern Lau Spreading Center. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

**Slobodkin, A. I., T. P. Tourova, N. A. Kostrikina, N. A. Chernyh, E. A. Bonch-Osmolovskaya, C. Jeanthon and B. E. Jones** (2003). *Tepidibacter thalassicus* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, fermentative bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(4): 1131-1134.

**Slobodkina, G. B., T. V. Kolganova, N. A. Chernyh, J. Querellou, E. A. Bonch-Osmolovskaya and A. I. Slobodkin** (2009). *Deferribacter autotrophicus* sp. nov., an iron(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(6): 1508-1512.

**Slobodkina, G. B., T. V. Kolganova, T. P. Tourova, N. A. Kostrikina, C. Jeanthon, E. A. Bonch-Osmolovskaya and A. I. Slobodkin** (2008). *Clostridium tepidiprofundum* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**(4): 852-855.

**Slobodkina, G. B., A.-L. I. Reysenbach, A. Panteleeva, N. Kostrikina, I. Wagner, E. Bonch-Osmolovskaya and A. I. Slobodkin** (2011). *Deferrisoma camini* gen. nov., sp. nov. a novel moderately thermophilic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent that forms a distinct phylogenetic branch in Deltaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

**Smith, J. L., B. J. Campbell, T. E. Hanson, C. L. Zhang and S. C. Cary** (2008). *Nautilia profundicola* sp. nov., a thermophilic, sulfur-reducing epsilonproteobacterium from deep-sea hydrothermal vents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(7): 1598-1602.

**Sokolova, T. G., J. M. González, A. Kostrikina, N. A. Chernyh, T. P. Tourova, C. Kato, E. A. Bonch-Osmolovskaya and F. T. Robb** (2001). *Carboxydobrachium pacificum* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, CO-utilizing marine bacterium from Okinawa Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 141-149.

**Steinsbu, B. O., B. J. Tindall, V. L. Torsvik, I. H. Thorseth, F. L. Daae and R. B. Pedersen** (2011). *Rhabdothermus arcticus* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Thermaceae* isolated from a hydrothermal vent chimney in the Soria Moria vent field on the Arctic Mid-Ocean Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**(9): 2197-2204.

## T

**Takai, K., H. Hirayama, T. Nakagawa, Y. Suzuki, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2004). *Thiomicrospira thermophila* sp. nov., a novel microaerobic, thermotolerant, sulfur-oxidizing chemolithomixotroph isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the TOTO caldera, Mariana Arc, Western Pacific. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(6): 2325-2333.

**Takai, K., H. Hirayama, T. Nakagawa, Y. Suzuki, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2005). *Lebetimonas acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, acidophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the 'Epsilonproteobacteria', isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the Mariana Arc. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(1): 183-189.

**Takai, K. and K. Horikoshi** (2000). *Thermosiphon japonicus* sp. nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Extremophiles* **4**(1): 9-17.

**Takai, K., H. Kobayashi, K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2003). *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(3): 839-846.

**Takai, K., M. Miyazaki, H. Hirayama, S. Nakagawa, J. Querellou and A. Godfroy** (2009). Isolation and physiological characterization of two novel, piezophilic, thermophilic chemolithoautotrophs from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Environmental Microbiology* **11**(8): 1983-1997.

**Takai, K., S. Nakagawa, Y. Sako and K. Horikoshi** (2003). *Balnearium lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, strictly anaerobic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph isolated from a black smoker chimney in the Suiyo Seamount hydrothermal system. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**(6): 1947-1954.

**Takai, K., K. H. Neilson and K. Horikoshi** (2004). *Hydrogenimonas thermophila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the  $\epsilon$ -Proteobacteria, isolated from a black smoker in a Central Indian Ridge hydrothermal field. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(1): 25-32.

**Takai, K., M. Suzuki, S. Nakagawa, M. Miyazaki, Y. Suzuki, F. Inagaki and K. Horikoshi** (2006). *Sulfurimonas parvalvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(8): 1725-1733.

## U

**Urios, L., V. Cuffe-Gauchard, P. Pignet, A. Postec, M. L. Fardeau, B. Ollivier and G. Barbier** (2004). *Thermosiphon atlanticus* sp. nov., a novel member of *Thermotogales* isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1953-1957.

**Urios, L., V. Cuffe, P. Pignet and G. Barbier** (2004). *Tepidibacter formicigenes* sp. nov., a novel spore-forming bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 439-443.

## V

**Vetriani, C., M. D. Speck, S. V. Ellor, R. A. Lutz and V. Starovoytov** (2004). *Thermovibrio ammonificans* sp. nov., a thermophilic, chemolithotrophic, nitrate-ammonifying bacterium from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(1): 175-181.

**Voordeckers, J. W., V. Starovoytov and C. Vetriani** (2005). *Caminibacter mediatlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(2): 773-779.

## W

**Wery, N., F. Lesongeur, P. Pignet, V. Derennes, M.-A. Cambon-Bonavita, A. Godfroy and G. Barbier** (2001). *Marinitoga camini*, gen. nov., sp. nov., a rod-shaped bacterium belonging to the order *Thermotogales*, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 495-504.

**Wery, N., J.-M. Moricet, V. Cuffe, J. J., P. Pignet, F. Lesongeur, M.-A. Cambon-Bonavita and G. Barbier** (2001). *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 1789-1796.

**Wirsen, C. O., T. Brinkhoff, J. Kuever, G. Muyzer, S. J. Molyneaux and H. W. Jannasch** (1998). Comparison of a new *Thiomicrospira* species strain from The Mid-Atlantic Ridge with known hydrothermal vent isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 4057-4059.

## Y

**Yurkov, V. and J. T. Beatty** (1998). Isolation of Aerobic Anoxygenic Photosynthetic Bacteria from Black Smoker Plume Waters of the Juan de Fuca Ridge in the Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(1): 337-341.

**Annexe 2 : *Archaea* isolées des sources hydrothermales océaniques profondes**

(modifié d'après les thèses de K. Alain, 2003 ; A. Postec ,2005 ; N. Byrne, 2008 et du Mémoire d'Habilitation à Diriger les Recherches de A.Godfroy, 2006).

Archaea	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
«Nanoarchaeota »	<i>Nanoarchaeum</i>	<i>N. equitans</i>	Enrichie en conditions d'anaérobiose et d'autotrophie	EPR Pacifique	9°N, 90	Huber et al. 2002
Crenarchaeota	<i>Desulfurococcales</i>	<i>Desulfurococcus</i> <i>S et SY</i>	Anaérobie, hétérotrophe, sulfo-réductrice	EPR Pacifique	11°N, 85 et 90	Jannasch et al. 1988
	<i>Ignicoccus</i>	<i>I. pacificus</i>	Anaérobie, autotrophe, sulfo-réductrice	EPR Pacifique	9°N, 90	Huber et al. 2000
	<i>Staphylothermus</i>	<i>S. marinus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, sulfo-réductrice	EPR Pacifique	11°N, 85-92°C	Fiala et al. 1986
	<i>Pyrodictium</i>	<i>P. abyssi</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réductrice	Bassin de Guaymas, Pacifique	97	Pley et al. 1991
		<i>Souche 121</i>	Réalise l'oxydation du formate couplée à la réduction du fer ferrique (formation magnétite)	Mothra (Finn), Juan de Fuca, Pacifique	Gamme T° : 85-121°C	Kashefi and Lovley 2003
	<i>Pyrolobus</i>	<i>P. fumarii</i>	Anaérobie facultatif, autotrophe oxydant l'hydrogène et réduisant les nitrates, le thiosulfate et les faibles concentrations d'oxygène	TAG, Atlantique	MAR, 106	Blöchl et al. 1997
	<i>Aeropyrum</i>	<i>A. camini</i>	Hétérotrophe aérobie	Suyio Seamount, Izu Bonin Arc, Pacifique	85	Nakagawa et al. 2004
Euryarchaeota Methanococcales	<i>Methanocaldococcus</i>	<i>M. jannaschii</i>	Anaérobie, méthanogène	EPR Pacifique	21°N, 85	Jones et al. 1983
		<i>M. Jannaschii str FS406-22</i>	Anaérobie, méthanogène fixatrice d'azote	Pacifique Axial volcano Juan de Fuca, Pacifique	90	Mehta and Baross 2006
		<i>M. infernus</i>	Anaérobie, méthanogène	Logatchev, Atlantique	MAR, 85	Jeanthon et al. 1998

Archaea	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Euryarchaeota Methanococcales	<i>Methanocaldococcus</i>	<i>M. vulcanius</i>	Anaérobie, méthanogène	EPR Pacifique	13°N, 80	Jeanthon et al. 1999
		<i>M. indicus</i>	Anaérobie, méthanogène	Site Central ridge, indien	Kairei, indian Océan 85	L'Haridon et al. 2003
	<i>Methanothermococcus</i>	<i>M. okinawensis</i>	Anaérobie, méthanogène	Iheya Okinawa Trough, Pacifique	Ridge, Japon, 60-65	Takai et al. 2002
	<i>Methanotorris</i>	<i>M. formicicus</i>	Anaérobie, méthanogène	Central Ridge	indian 75	Takai et al. 2004
Methanopyrales	<i>Methanopyrus</i>	<i>M. kandleri</i>	Anaérobie, méthanogène, sulfo-réductrice réduisant le CO <sub>2</sub> ou le CH <sub>4</sub>	Bassin Guaymas, Pacifique	de 98	Huber et al. 1989; Burggraf et al. 1991; Kurr et al. 1991
Thermococcales	<i>Thermococcus</i>	<i>T. guaymensis</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin Guaymas, Pacifique	de 88	Canganella and Jones 1994; Canganella et al. 1997; 1998
		<i>T. aggregans</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin Guaymas, Pacifique	de 88	Canganella and Jones 1994; Canganella et al. 1997 . 1998

Archaea	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Thermococcales	<i>Thermococcus</i>	<i>T. barossi</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Juan de Fuca, Pacifique	82	Duffaud et al. 1998
		<i>T. fumicolans</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin Nord Fidjien Pacifique	85	Godfroy et al. 1996
		<i>T. hydrothermalis</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	EPR 21°N, Pacifique	85	Godfroy et al. 1997
		<i>T. peptonophilus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Fosse des Mariannes Pacifique	85-90	Gonzalez et al. 1995
		<i>T. siculi</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Okinawa Trough, Japon, Pacifique	85	Grote et al. 1999
		<i>T. chitonophagus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	85	Huber et al. 1995
		<i>T. barophilus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Snake Pit, MAR, Atlantique	85	Marteinsson et al. 1999
		<i>T. atlanticus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	TAG, MAR, Atlantique	85	Cambon-Bonavita et al. 2003
		<i>T. gammatolerans</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	Jolivet et al. 2003
		<i>T. marinus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Snake Pit, MAR, Atlantique	88	Jolivet et al. 2004
<i>T. radiotolerans</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin de Guyamas Pacifique	88	Jolivet et al. 2004		

Archaea	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Thermococcales	<i>Thermococcus</i>	<i>T. coalescens</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, Pacifique	87	Kuwabara et al. 2005
		<i>T. celericrescens</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, Pacifique	80	Kuwabara et al. 2007
		<i>T. thioeducens</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Rainbow, MAR, Atlantique	83-85	Pikuta et al. 2007
		<i>T. prieurii</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Sarah Spring, EPR, Pacifique	80	Gorlas et al. 2013
		<i>Thermococcus sp ES1</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Juan de Fuca, Pacifique	82	Pledger and Baross 1989
		<i>Thermococcus sp DT-1331</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Minami-ensei Knoll, Mid-Okinawa Trough, Pacifique		Kwak et al. 1995
		<i>Thermococcus sp</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	EPR 11, 13 et 21°N, Atlantique		Raguénès et al. 1995
		<i>Thermococcus sp</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin de Guyamas Pacifique		Antoine et al. 1995
		<i>Thermococcus sp</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin de Guyamas Pacifique		Lepage et al. 2004
		<i>Thermococcus sp.</i>	CO oxydation avec H <sub>2</sub>			
<i>Thermococcus sp</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Juan de Fuca Ridge, Pacifique			Holden et al. 2001	



## Annexes

Archaea	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
	<i>Pyrococcus</i>	<i>P. abyssi</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin Nord-Fidjien, Pacifique	96	Erauso et al. 1993
Thermococcales	<i>Pyrococcus</i>	<i>P. glycovorans</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Site Totem, EPR 13°N, Pacifique	95	Barbier et al. 1999
		<i>P. horikoshii</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Okinawa Trough, Japon, Pacifique	98	Gonzalez et al. 1998
		<i>P. yayanosii</i>	Anaérobie, piezophile, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Ashadze, MAR, Atlantique	98	Birrien et al. 2011
		<i>Pyrococcus sp GB-D</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Bassin de Guaymas Pacifique	95	Jannasch et al. 1992
		<i>Pyrococcus sp ES4</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	Juan de Fuca, Pacifique	90-99	Pledger and Baross 1991
		<i>Pyrococcus sp</i>	Anaérobie, hétérotrophe, fermentaire, sulfo-réducteur	13°N EPR, Pacifique		Lepage et al. 2004
	<i>Palaeococcus</i>	<i>P. ferrophilus</i>	Anaérobie, hétérotrophe, réduisant le soufre (fer nécessaire comme cofacteur pour sa croissance)	Ogasawara, Pacifique	83	Takai et al. 2000
		<i>P. pacificus</i>	Anaérobie, piezophile, organo-hétérotrophe, sulfate- et sulfo-réductrice facultative	Sédiments hydrothermaux, EPR, Pacifique	80	Zeng et al. 2012
Archaeoglobales	<i>Archaeoglobus</i>	<i>A. profundus</i>	Anaérobie, mixotrophe, sulfato-réducteur	Bassin de Guaymas, Pacifique	82	Burggraf et al. 1990

## Annexes

Archaea	Genre	Espèce	Métabolisme	Origine	T° optimale (°C)	Référence
Archaeoglobales	<i>Archaeoglobus</i>	<i>A. infectus</i>	Anaérobie, mixotrophe, réduisant le thiosulfate et les sulfites	Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, Pacifique	70	Mori et al. 2008
	<i>Geoglobus</i>	<i>G. ahangari</i>	Anaérobie, mixotrophe, croissance en lithoautotrophie ou en organohétérotrophie avec le fer ferrique comme accepteur d'électrons	Bassin de Guaymas, Pacifique	88	Kashefi et al. 2002
		<i>G. acetivorans</i>	Anaérobie, mixotrophe, croissance en lithoautotrophie ou en organohétérotrophie avec le fer ferrique comme accepteur d'électrons	Ashadze, MAR, Atlantique	81	Slobodkina et al. 2009
DHVE 2	<i>Aciduliprofundum</i>	<i>A. boonei</i>	Anaérobie, heterotrophs, thermoacidophile, sulfo- et ferri-réductrice	Mariner vent field Bassin de Lau, Pacifique	70	Reysenbach et al. 2006

**A**

**Antoine, E., J. Guezennec, J. R. Meunier, F. Lesongeur and G. Barbier** (1995). Isolation and characterization of extremely thermophilic archaeobacteria related to the genus *Thermococcus* from deep-sea hydrothermal Guaymas basin. *Current Microbiology* **31**: 186-192.

**B**

**Barbier, G., A. Godfroy, J.-R. Meunier, J. Quérellou, M.-A. Cambon, F. Lesongeur, P. A. D. Grimont and G. Raguénès** (1999). *Pyrococcus glycovorans*, sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from the East Pacific Rise. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1829-1837.

**Birrien, J.-L., X. Zeng, M. Jebbar, M.-A. Cambon-Bonavita, J. Quérellou, P. Oger, N. Bienvenu, X. Xiao and D. Prieur** (2011). *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**(12): 2827-2881.

**Blöchl, E., R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H. W. Jannasch and K. O. Stetter** (1997). *Pyrolobus fumarii*, ge. nov., sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* **1**: 14-21.

**Burggraf, S., H. W. Jannasch, B. Nicolaus and K. O. Stetter** (1990). *Archaeoglobus profundus* sp. nov., represents a new species within the sulfate-reducing archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **13**: 24-28.

**Burggraf, S., K. O. Stetter, P. Rouvire and C. R. Woese** (1991). *Methanopyrus kandleri*: An archeal methanogen unrelated to all other known methanogens. *System. Appl. Microbiol.* **14**: 346-351.

**C**

**Cambon-Bonavita, M.-A., F. Lesongeur, P. Pignet, N. Wery, C. Lambert, A. Godfroy, J. Querellou and G. Barbier** (2003).

*Thermococcus atlanticus* sp.nov., a hyperthermophilic Archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Mid-Atlantic Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **7**: 101-109.

**Canganella, F. and W. J. Jones** (1994). Microbial Characterization of Thermophilic Archaea Isolated from the Guaymas Basin Hydrothermal Vent. *Current Microbiology* **28**: 299-306.

**Canganella, F., W. J. Jones, A. Gambacorta and G. Antranikian** (1997). Biochemical and phylogenetic characterization of two novel deep-sea *Thermococcus* isolates with potentially biotechnological applications. *Arch. Microbiol.* **167**: 233-238.

**Canganella, F., W. J. Jones, A. Gambacorta and G. Antranikian** (1998). *Thermococcus guaymasensis* sp. nov. and *Thermococcus aggregans* sp. nov., two novel thermophilic archaea isolated from the Guaymas Basin hydrothermal vent site. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1181-1185.

**D**

**Duffaud, G. D., O. B. dHennezel, A. S. Peek, A. L. Reysenbach and R. M. Kelly** (1998, ). "Isolation and characterization of *Thermococcus barossii*, sp. nov., a hyperthermophilic Archaeon isolated from a hydrothermal vent flange formation." *Systematic and Applied Microbiology* Retrieved 1, 21.

**E**

**Erauso, G., A. L. Reysenbach, A. Godfroy, J. R. Meunier, B. Crump, F. Partensky, J. A. Baross, V. Marteinsson, G. Barbier, N. R. Pace and D. Prieur** (1993). *Pyrococcus abyssi* sp. nov. , a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* **160**: 338-349.

**F**

**Fiala, G., K. O. Stetter, H. W. Jannasch, T. A. Langworthy and J. Madon** (1986). *Staphylothermus marinus* sp. nov. represents a

novel genus of extremely thermophilic submarine heterotrophic archaeobacteria growing up to 98°C. *System. Appl. Microbiol.* **8**: 106-113.

## G

**Godfroy, A., F. Lesongeur, G. Raguénès, J. Quérellou, E. Antoine, J.-R. Meunier, J. Guezennec and G. Barbier** (1997). *Thermococcus hydrothermalis* sp. nov., a new hyperthermophilic Archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 622-626.

**Godfroy, A., J.-R. Meunier, J. Guezennec, F. Lesongeur, G. Raguénès, A. Rimbault and G. Barbier** (1996). *Thermococcus fumicolans* sp. nov. a new hyperthermophilic archaeum isolated from deep-sea hydrothermal vent in North Fiji basin. *International Journal of Systematic and Bacteriology* **46**: 1113-1119.

**Gonzalez, J. M., C. Kato and K. Horikoshi** (1995). *Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaeobacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Arch. Microbiol.* **164**: 159-164.

**Gonzalez, J. M., Y. Masuchi, F. T. Robb, J. W. Ammeramn, D. L. Maeder, M. Yanagibayashi, J. Tamaoka and C. Kato** (1998). *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* **2**: 123-130.

**Gorlas, A., K. Alain, N. Bienvenu, S. Isaac and C. Geslin** (2013). *Thermococcus prieurii* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent at the East Pacific Rise. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

**Grote, R., L. N. Li, J. Tamaoka, C. Kato, K. Horikoshi and G. Antranikian** (1999). *Thermococcus siculi* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent at the Mid-Okinawa Trough. *Extremophiles* **3**(1): 55-62.

## H

**Holden, J. F., K. Takai, M. Summit, S. Bolton, J. Zyskowski and J. A. Baross** (2001). Diversity among three novel groups of hyperthermophilic deep-sea *Thermococcus* species from three sites in the northeastern Pacific Ocean. *FEMS Microbiology Ecology* **36**: 51-60.

**Huber, H., S. Burggraf, T. Mayer, I. Wyschkony, R. Rachel and K. O. Stetter** (2000). *Ignicoccus* gen. nov., a novel genus of hyperthermophilic, chemolithoautotrophic Archaea, represented by two new species, *Ignicoccus islandicus* sp. nov. and *Ignicoccus pacificus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 2093-2100.

**Huber, H., M. J. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V. C. Wimmer and K. O. Stetter** (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.

**Huber, H., H. Jannash, R. Reinhard, T. Fuchs and K. O. Stetter** (1997). *Archaeoglobus veneficus*, sp. nov., a novel facultative chemolithoautotrophic hyperthermophilic sulfite reducer, isolated from abyssal black smokers. *Sytem. Appl. Microbiol.* **20**: 374-380.

**Huber, R., M. Kurr, K. O. Jannasch and K. O. Stetter** (1989). A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110°C. **342**: 833-834.

**Huber, R., J. Stöhr, S. Honenhaus, R. Rachel, S. Burggraf, H. W. Jannasch and K. O. Stetter** (1995). *Thermococcus chitonophagus* sp. nov., a novel, chitin-degrading, hyperthermophilic archaeum from a deep-sea hydrothermal environment. *Arch. Microbiol.* **164**: 255-264.

## J

**Jannasch, H. W., C. O. Wirsen, S. J. Molyneaux and T. A. Langworthy** (1988). Extremely thermophilic fermentative archaeobacteria of the genus *Desulfurococcus* from deep-sea hydrothermal vents. *Appl; Environ. Microbiol.* **54**: 1203-1209.

**Jannasch, H. W., C. O. Wirsen, S. J. Molyneux and T. A. Langworthy** (1992). Comparative physiological studies on hyperthermophilic archaea isolated from deep-sea hot vents with emphasis on *Pyrococcus* strain GB-D. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3472-3481.

**Jeanthon, C., L. H. S, A. L. Reysenbach, E. Corre, M. Vernet, P. Messner, U. B. Sleytr and D. Prieur** (1999). *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213 as *Methanococcus fervens* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 583-589.

**Jeanthon, C., L. H. S, A. L. Reysenbach, M. Vernet, P. Messner, U. B. Sleytr and D. Prieur** (1998). *Methanococcus infernus* sp. nov., a novel hyperthermophilic lithotrophic methanogen isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 913-919.

**Jolivet, E., E. Corre, S. L'Haridon, P. Forterre and D. Prieur** (2004). *Thermococcus marinus* sp. nov. and *Thermococcus radiotolerans* sp. nov., two hyperthermophilic archaea from deep-sea hydrothermal vents that resist ionizing radiation. *Extremophiles* **8**: 219-227.

**Jolivet, E., S. L'Haridon, E. Corre, P. Forterre and D. Prieur** (2003). *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(3): 847-851.

**Jones, W. J., J. A. Leigh, F. Mayer, C. R. Woese and R. S. Wolfe** (1983). *Methanococcus jannaschii* sp. nov. an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* **136**: 254-261.

## K

**Kashefi, K. and D. R. Lovley** (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science* **301**(5635): 934.

**Kashefi, K., J. M. Tor, D. E. Holmes, C. V. Gaw Van Praagh, A. L. Reysenbach and D. R. Lovley** (2002). *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe(III) serving as the sole electron acceptor. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**(3): 719-728.

**Kurr, M., R. Huber, H. König, H. W. Jannasch, H. Fricke, A. Trincone, J. K. Kristjansson and K. O. Stetter** (1991). *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Archives of Microbiology* **156**: 239-247.

**Kuwabara, T., M. Minaba, Y. Iwayama, I. Inouye, M. Nakashima, K. Marumo, A. Maruyama, A. Sugai, T. Itoh, J.-i. Ishibashi, T. Urabe and M. Kamekura** (2005). *Thermococcus coalescens* sp. nov., a cell-fusing hyperthermophilic archaeon from Suiyo Seamount. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(6): 2507-2514.

**Kuwabara, T., M. Minaba, N. Ogi and M. Kamekura** (2007). *Thermococcus celericrescens* sp. nov., a fast-growing and cell-fusing hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**(3): 437-443.

**Kwak, Y. S., T. Kobayashi, T. Akiba, K. Horikoshi and Y. B. Kim** (1995). A hyperthermophilic sulfur-reducing Archaeobacterium, *Thermococcus* sp. DT1331, isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 1666-1669.

## L

**L'Haridon, S., A.-L. Reysenbach, A. Banta, P. Messner, P. Schumann, E. Stackebrandt and C. Jeanthon** (2003). *Methanocaldococcus indicus* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from the Central Indian Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**(6): 1931-1935.

**Lepage, E., E. Marguet, C. Geslin, O. Matte-Tailliez, W. Zillig, P. Forterre and P. Tailliez** (2004). Molecular Diversity of New Thermococcales Isolates from a Single Area of

Hydrothermal Deep-Sea Vents as Revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting and 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(3): 1277-1286.

## M

**Marteinsson, V. T., J. L. Birrien, A. L. Reysenbach, M. Vernet, D. Marie, A. Gambacorta, P. Messner, U. B. Sleytr and D. Prieur** (1999). *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49 Part 2**: 351-359.

**Mehta, M. P. and J. A. Baross** (2006). Nitrogen Fixation at 92{degrees}C by a Hydrothermal Vent Archaeon. *Science* **314**(5806): 1783-1786.

**Mori, K., A. Maruyama, T. Urabe, K.-i. Suzuki and S. Hanada** (2008). *Archaeoglobus infectus* sp. nov., a novel thermophilic, chemolithoheterotrophic archaeon isolated from a deep-sea rock collected at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, western Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(4): 810-816.

## N

**Nakagawa, S., K. Takai, K. Horikoshi and Y. Sako** (2004). *Aeropyrum camini* sp. nov., a strictly aerobic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(2): 329-335.

## P

**Philippot, P., M. Van Zuilen, K. Lepot, C. Thomazo, J. Farquhar and M. J. Van Kranendonk** (2007). Early Archaeal microorganisms preferred elemental sulfur, not sulfate. *Science* **317**(5844): 1534-1537.

**Pikuta, E. V., D. Marsic, T. Itoh, A. K. Bej, J. Tang, W. B. Whitman, J. D. Ng, O. K. Garriott and R. B. Hoover** (2007). *Thermococcus thioeducens* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing

archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**(7): 1612-1618.

**Pledger, R. J. and J. A. Baross** (1989). Characterization of an extremely thermophilic archaeobacterium isolated from a black smoker polychaete (*Paralvinella* sp.) at the Juan de Fuca Ridge. *Syst. Appl. Microbiol.* **12**: 249-256.

**Pledger, R. J. and J. A. Baross** (1991). Preliminary description and nutritional characterization of a chemoorganotrophic archaeobacterium growing at temperature up to 110°C isolated from a submarine hydrothermal vent environment. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 203-211.

**Pley, U., J. Schipka, A. Gambacorta, J. H.W., H. Fricke, R. Rachel and K. O. Stetter** (1991). *Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110°C. *System. Appl. Microbiol.* **14**: 245-253.

## R

**Raguénès, G., J. R. Meunier, E. Antoine, A. Godfroy, J. C. Caprais, F. Lesongeur, J. Guezennec and G. Barbier** (1995). Biodiversité d'Archaea hyperthermophiles de sites hydrothermaux du Pacifique oriental. *C.R. Acad. Sci. Paris* **318**: 395-402.

**Reysenbach, A.-L., Y. Liu, A. B. Banta, T. J. Beveridge, J. D. Kirshtein, S. Schouten, M. K. Tivey, K. L. Von Damm and M. A. Voytek** (2006). A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature* **442**(7101): 444-447.

## S

**Slobodkina, G. B., T. V. Kolganova, J. Querellou, E. A. Bonch-Osmolovskaya and A. I. Slobodkin** (2009). *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(11): 2880-2883.

**Sokolova, T. G., C. Jeanthon, N. A. Kostrikina, N. A. Chernyh, A. V. Lebedinski, E. Stackebrandt and E. A. Bonch-Osmolovskaya**

(2004). The first evidence of anaerobic CO oxidation coupled with H<sub>2</sub> production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* **8**: 317-323.

## **T**

---

**Takai, K., A. Inoue and K. Horikoshi** (2002). *Methanothermococcus okinawensis* sp. nov., a thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a Western Pacific deep-sea hydrothermal vent system. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**(4): 1089-1095.

**Takai, K., K. H. Nealson and K. Horikoshi** (2004). *Methanotorris formicicus* sp. nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(4): 1095-1100.

**Takai, K., A. Sugai, T. Itoh and K. Horikoshi** (2000). *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50 Part 2**: 489-500.

## **Z**

---

**Zeng, X., X. Zhang, L. Jiang, K. Alain, M. Jebbar and Z. Shao** (2012). *Palaeococcus pacificus* sp. nov., a novel archaeon from a deep-sea hydrothermal sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

**Annexe 3 : Résumé de la présentation orale exposant la méthode d'analyse directe des isotopes du soufre de l'hydrogène sulfuré par la technique du « sparging », présenté à l'EGU en 2010**

Geophysical Research Abstracts  
Vol. 12, EGU2010-8717, 2010  
EGU General Assembly 2010  
© Author(s) 2010



**On-line Sulfur Isotope Determination by Hydride Generation coupled to MC-ICP-MS**

Nolwenn Callac (1), Olivier Rouxel (2,3), Emmanuel Ponzevera (4), and Anne Godfroy (1)

(1) Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197, IFREMER, 29280 Plouzané, France, (2) Woods Hole Oceanographic Institution, Marine Chemistry & Geochemistry, Woods Hole, MA02543, USA, (3) IUEM, Université de Bretagne Occidentale, 29280 Plouzané, FRANCE, (4) IFREMER, Département Géosciences Marines, 29280 Plouzané, FRANCE

In seafloor hydrothermal systems, Sulfur is an important element present in various forms such as sulfate, elemental sulfur or sulfide in hydrothermal fluids and pore waters. Sulfur, as either electron donor or acceptor, is one element that enables support for microbial life in the deep biosphere. Traditionally, measurements of  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  ratios ( $\delta^{34}\text{S}$ ) are performed using gas-source mass spectrometry (GS-MS) in which sulfur is introduced as gaseous  $\text{SO}_2$  or  $\text{SF}_6$  species. We recently developed an alternate technique for the accurate and precise determination of  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  ratios in sulfur-bearing minerals using solution and laser ablation multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS) (Craddock *et al.*, 2008; *Chemical Geology* 253 p102–113). We examined and determined rigorous corrections for analytical difficulties such as instrumental mass bias, unresolved isobaric interferences, blanks, and laser ablation- and matrix-induced isotopic fractionation. In particular, the use of high resolution sector-field mass spectrometry has been shown to remove major isobaric interferences from  $\text{O}_2^+$  while standard-sample bracketing allowed the correcting instrumental mass bias of unknown samples.

Here, we evaluate a new method for the direct determination of S isotope in environmental samples using on-line generation of hydrogen sulfide coupled to MC-ICPMS. It is expected that the introduction of volatile S-species in the plasma torch will lower the minimum amounts of S required per analysis by more than 1 order of magnitude while permitting matrix-free isotope analysis. An important aim of this study was to determine optimal procedures to overcome analytical difficulties such as instrumental mass bias, unresolved isobaric interferences, blanks, and isotope fractionation induced during hydrogen sulfide generation. We initially applied this method to investigate the diversity of sulfur isotope fractionations during microbial sulfur-reducing or sulfate-reducing at high temperature. For that purpose, we used pure hyperthermophilic strains isolated from deep-sea hydrothermal vents, including several sulfur- and sulfate-reducing archaea strains and sulfate-reducing strains. These results will be discussed according to the source of sulfide, the temperature of incubation, and type of microbial strains.





## XII. **Appendices**

---

1. Communications orales

2. Poster 1 - Stable isotopic tracing of Sulfur and Iron biogeochemical cycles in seafloor hydrothermal systems

3. Poster 2 - Continuous enrichment culture in bioreactor: Access to iron-reduction by thermophilic microorganisms inhabiting deep-sea hydrothermal system of Guaymas Basin

4. Poster 3 - Continuous enrichment culture using diluted hydrothermal fluid as medium: insights into sulfur and iron biogeochemical cycles, microbial actors, and mineral interactions in active deep-sea vent chimney of Guaymas Basin

5. Article 7 – DNA extractions from deep subseafloor sediments: Novel cryogenic-mill-based procedure and comparison to existing protocols

6. Article 8 – *Nautilia abyssi* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfur-reducing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent



## Appendice 1: Communications orales

- **Online sulfur isotope determination by hydride generation coupled to MC-ICP-MS.**

**Callac N**, O Rouxel, M Ponzevera et A Godfroy. Communication orale présentée en 2010 à l'EGU (European Geosciences Union), Vienne, Autriche.

- **Rôle des micro-organismes dans le cycle du fer en contexte hydrothermal dans le Bassin de Guaymas : Approches isotopiques et culturelles en bioréacteurs Gas-lift.**

**Callac N**, O Rouxel, F Lesongeur, S Laigle, C Liorzou, E Ponzeverza et A Godfroy. Communication orale présentée en 2011 au 5<sup>ème</sup> congrès de l'AFEM (Association Francophone d'Ecologie microbienne), Hammamet, Tunisie.

- **Méthode directe d'analyse des isotopes du soufre par génération d'hydrides.**

**Callac N**, O Rouxel, M Ponzevera, F Lesongeur et A Godfroy. Communication orale présentée en 2011 aux 5<sup>èmes</sup> journées des jeunes chercheurs, SFIS (Société Française des Isotopes Stable), Brest, France.

- **Rôle des micro-organismes dans le cycle du Fer et du Soufre en contexte hydrothermal dans le bassin de Guaymas : Approches culturelles et isotopiques.**

**Callac N**, O Rouxel, F Lesongeur, C Liorzou, E Ponzeverra, S Laigle, K Estève, P Pignet, C Rommevaux-Jestin et A Godfroy. Communication orale présentée en 2012 à la réunion d'après campagne BIG, Brest, France.

- **Quand les microorganismes rencontrent les minéraux ! Synthèse des premiers résultats.**

**Callac N**, C Rommevaux-Jestin, O Rouxel, F Lesongeur, A Ferrant, P Noel, P.M Sarradin et A Godfroy. Communication orale présentée en 2012 à la réunion d'après campagne BIG, Brest, France.

- **Continuous enrichment cultures using diluted hydrothermal fluid as medium: new insights into active microbial diversity inhabiting active deep-sea vent chimney of Guaymas Basin.**

**Callac N**, O Rouxel, F Lesongeur, C Decker, C Liorzou, C Bassoullet, K Estève, P Pignet, S Cheron, J Etoubleau, Y Fouquet, C Rommevaux-Jestin et A Godfroy. Communication orale présentée en 2012 au 9<sup>ème</sup> congrès international Extremophiles, Séville, Espagne.

- **Interactions et acteurs microbiens impliqués dans les cycles biogéochimiques du Fer et du Soufre en contexte hydrothermal dans le Bassin de Guaymas.**

**Callac N**, O Rouxel, F Lesongeur, C Decker, C Liorzou, C Bassoullet, K Estève, P Pignet, S Cheron, J Etoubleau, Y Fouquet, C Rommevaux-Jestin et A Godfroy. Communication orale présentée en 2012 au GDR Ecchis, Paris, France.

**Appendice 2: Poster 1 - Stable isotopic tracing of Sulfur and Iron biogeochemical cycles in seafloor hydrothermal systems**

**Callac N, O Rouxel, F Lesongeur, and A Godfroy**


Journée di GIS Europôle Mer, L'Aber Wrach, FRANCE, 2009

## Stable isotopic tracing of Sulfur and Iron biogeochemical cycles in seafloor hydrothermal systems

N. Callac<sup>1,2</sup>, O. Rouxel<sup>2</sup>, F. Lesongeur<sup>1</sup> and A. Godfroy<sup>1</sup>.


<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, IFREMER 29280 Plouzané, France.  
<sup>2</sup>Domaines Océaniques, UMR6538, Institut Universitaire Européen de la mer 29280 Plouzané, France  
 nolwenn.callac@ifremer.fr

### Background



**Prokaryote Hydrothermal habitats:**  
 Free living or attached to particles in discharged vent fluid and plume  
 Free living in mats, rocks, chimney, sediment or animal surfaces  
 Chimney structure and subseafloor  
 Symbiotic associations with fauna

In hydrothermal habitats among important chemical species, Iron and Sulfur species can be used as both electron donors (eg. S<sup>0</sup>, H<sub>2</sub>S or Fe (II)) and acceptors (eg. SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> or Fe (III)) for microbial metabolism.



**Sulfur cycle and microbial key metabolic reactions**  
From Briza Biology of Microorganisms

Being involved in biogeochemical cycles, microorganisms impact on both biosphere and geosphere. Some prokaryotes may have a role in geological processes such as rock or mineral dissolution, magnetite and pyrite formation, weathering, sedimentary diagenesis or transformation of primary to secondary mineral.  
 Hydrothermal biotopes host thermophilic and hyperthermophilic microorganisms belonging to both *Archaeal* and *Bacterial* domains.

Stable isotopic systematics of S, Fe, Ni, Se, Cu and Zn cycles provide potential tools to better understand interactions between Geosphere, Hydrosphere and Biosphere in seafloor hydrothermal systems. Not only these elements can be used as electron donor (S, Fe) or acceptor (S, Fe, Se) by prokaryotes but also they can be found in metalloproteins involved in key metabolic reactions (eg. Ni in F<sub>430</sub> cofactor in methanogenesis or S and Fe in (di)sulfite reductase in sulfate-reduction).

### Method

<sup>34</sup>S/<sup>32</sup>S, <sup>56</sup>Fe/<sup>54</sup>Fe, <sup>60</sup>Ni/<sup>58</sup>Ni, <sup>82</sup>Se/<sup>76</sup>Se, <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu or <sup>66</sup>Zn/<sup>64</sup>Zn ratios are commonly used to study respectively S, Fe, Ni, Se, Cu and Zn fractionation. Isotopic fractionation occurs during: **Equilibrium Isotope Fractionation: heavier isotope partition preferentially into the stronger bonding environment** and during **Kinetic Isotope Fractionation: lighter isotope partition preferentially into the forming product (kinetically favored)**.

AX

→

Processus

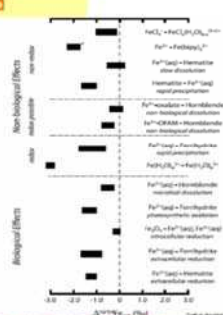
→

AX

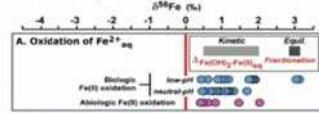
←

BY

Isotopic data are given as a relative deviation  
 $\delta^{56}\text{Fe} = \left[ \frac{(^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe})_{\text{sample}}}{(^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe})_{\text{NBS-187}}} - 1 \right] \times 1000$



In one given microbial metabolic pathway, isotopic fractionation occurs during one or more steps and is influenced by environmental factors such as temperature, carbon or energy sources and concentration, electron acceptor and microbial species.



From Arber (2004) EPSL 217:223-236  
 From Johnson and Beard (2006) GSA 18 (1):1-10


Each isotope ratio is measured by Neptune MC-ICP-MS (Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer) at Pôle de Spectrométrie Océan (Brest).

To date, microbial isotopic fractionation studies essentially focused on S and Fe cycle in pure or enrichment cultures (in soil, shallow sediments, sea/freshwater) and mainly in mesophilic condition (T°C > 30)  
 → But NEVER studied in hydrothermal ecosystem at high temperature

**Sampling Area:**


- Active chimneys
- Hydrothermal fluids
- Hydrothermally-affected organic-rich sediments

→ All collected during the BIG oceanographic cruise in Guaymas Basin (Gulf of California, Mexico)



**Aims of this study and strategy**

**Microbial diversity and activity**  
(16 sRNA and function genes)

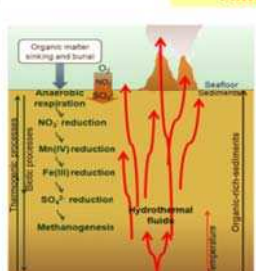


**Sediment, fluid and chimney samples characterization:**  
 Sulfur and iron isotopes, pH, temperature, porosity, pore water chemistry (H<sub>2</sub>S, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, trace metals...), mineralogy, chemistry, stratigraphy.

**Isotopic fractionation at high temperature**


**Microorganisms in Artificial medium cultures:**  
 - Pures,  
 - Enrichments,  
 - Consortia

**Compare *in situ* and *ex situ* isotopic fractionation (both biotic and abiotic)**  
 Distinguish isotopic signatures resulting from microbial metabolism from those resulting from abiotic processes



**Multidisciplinary (Microbiology and Geochemistry) approach will enable**

- à Determination of isotopic fractionation factors for major metabolic pathway involved in hydrothermal environment and tracking biogeochemical cycles.
- à Establishment of links between structure and activity of microbial community and environmental factors (temperature, pH, mineralogy, and chemical composition).
- à Better knowledge of the Biosphere-Geosphere-Hydrosphere interactions in modern hydrothermal context, and possibly Early Earth and other planets.



Contact: Europôle Mer – Institut Universitaire Européen de la Mer / European Institute of Marine Studies – Pl Nicolas Copernic – Technopôle Brest-Iroise – 29280 Plouzané – France  
 Tel. +33 2 98 49 88 20 – Fax. + 33 2 98 49 96 09 – Email. contact@europolemer.eu – Website. http://www.europolemer.eu

**Appendice 3: Poster 2 - Continuous enrichment culture in bioreactor: Access to iron-reduction by thermophilic microorganisms inhabiting deep-sea hydrothermal system of Guaymas Basin**

**Callac N, S Laigle, O Rouxel, F Lesongeur, C Liorzou, E Ponzeverza and A Godfroy**

Sediment Microbiology Meeting (C-DEBI); Chapell Hill, USA, 2011

## CONTINUOUS ENRICHMENT CULTURE IN BIOREACTOR : ACCESS TO IRON-REDUCTION BY THERMOPHILIC MICROORGANISMS INHABITING DEEP-SEA HYDROTHERMAL SYSTEM OF GUAYMAS BASIN

N. Callac<sup>1,2,3</sup>, S. Laigle<sup>2,3</sup>, O. Rouxel<sup>1,3,4</sup>, F. Lesongeur<sup>2</sup>, C. Liorzou<sup>3</sup>, E. Ponzeverza<sup>4</sup> and A. Godfroy<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Université Européenne de Bretagne, Brest, France.  
<sup>2</sup>Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, IFREMER 29280 Plouzané, France.  
<sup>3</sup>Domaines Océaniques, UMR6538, Institut Universitaire Européen de la mer 29280 Plouzané, France.  
<sup>4</sup>Géosciences Marine, UMR 6538, IFREMER 29280 Plouzané, France.  
no@wenn.callac@ifremer.fr



### Introduction

It is now established that deep sea anoxic sediments and marine hydrothermal vents host dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms. In this anoxic marine ecosystem iron-reduction by thermophilic microorganisms is an important process of the iron cycle associated to organic matter oxidation.

To understand the interactions between thermophilic microorganisms and organic-rich substrate in hydrothermal conditions, culture in bioreactor provides an appropriate approach to control important parameters such as pH, temperature, nature and supply of electron donors in an open system allowing the elimination of volatile metabolic end products by gas sparging (Godfroy et al., 2000; Postec et al., 2005; Byrne et al., 2009).

In this study, high temperature enrichment cultures in bioreactor with ferric iron as terminal electron acceptor were performed, using a hydrothermal chimney sample and for the first time sediment core sample percolated by hydrothermal fluid.

### Experimental setup

2 x 2 liters gas-lift bioreactor connected to temperature and pH control system

1 system dedicated to sediment and the other to chimney enrichment culture

### Medium

Artificial sea water supplemented with acetate, formate benzoate (10 mM each), yeast extract (0.1 g.L<sup>-1</sup>) and insoluble Fe III oxide reduced with HCl-Cysteine

### Culture parameters

In anaerobic condition, in the dark at 80°C, at pH 7 under N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (70/20/10) gas sweeping

### Background

Samples used for enrichment culture were collected in an active hydrothermal area of the Southern Trough in Guaymas Basin (Gulf of California, Mexico), during the oceanographic cruise BIG (*Biodiversité et Interactions à Guaymas*, chief scientist A. Godfroy) in June 2010 with R/V *Atalante* and DSV *Nautilus*



### Samples

Fragment of an active hydrothermal chimney (flange) from Rebecca Roots site

Hydrothermally-affected organic-rich sediment section (17.5-21.5 cmbsf) sampled in white mat at Marker 27 site

### Material and methods



### Cell density

Monitoring by cell count using modified Thoma chamber under light microscope and by Q-PCR

### Molecular analysis of microbial diversity

Using DGGE (on both 16S rRNA and 16S rRNA genes)

### Iron concentration (ferrous and total iron)

Using Ferrozine method and ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry)

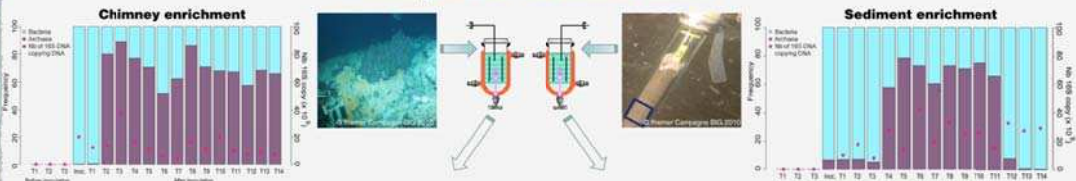
### Multi-element concentrations

Major and trace elements by ICP-AES

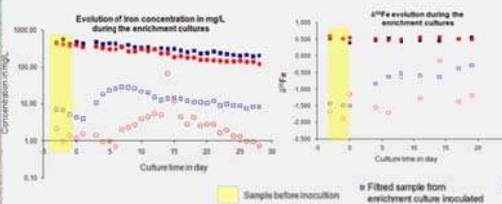
### Iron fractionation

Measured with MC-ICP-MS (MultiCollector inductively coupled plasma mass spectrometry)

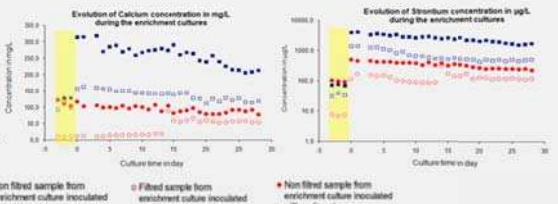
### Preliminary results of the enrichment cultures



### Evolution of Fe(II), total Fe concentration and iron fractionation during the enrichment cultures



### Evolution of Calcium and Strontium during the enrichment cultures as proxy of sample behavior



- Microbial diversity is under investigation using fingerprint molecular method.
- Preliminary results show contrasted ferric iron consumption and ferrous iron production in both bioreactors: very low Fe(II) production in the sediment culture suggest that this culture is poorly enriched in iron-reducers while Fe(II) production is high in the chimney culture.
- During both experiments, Fe(III) isotopic composition remain unchanged while Fe(II) isotopic composition is highly variable. Before inoculation, highly negative  $\delta^{56}\text{Fe}$  values for Fe(II) was observed due to abiotic fractionation (i.e. Fe(II) adsorption onto particulate Fe(III)). After inoculation, an increase of  $\delta^{56}\text{Fe}$  values for Fe(II) isotopic composition was observed in both bioreactors. In sediment culture, we observed an initial  $\delta^{56}\text{Fe}$  value at  $-1.15\%$  to  $-1.20\%$  at 20 days. For the chimney enrichment, we observed a  $\delta^{56}\text{Fe}$  value at  $-1.51\%$  at the beginning to  $-0.28\%$  at 20 days.
- Temporal evolution in calcium and strontium concentrations indicates the dissolution of Ca-containing compounds (such as anhydrite) suggesting sulphate dissolution during the chimney culture. Concerning the sediment culture, the concentration of calcium remains the same throughout the experiment and sign the absence or a low Calcium containing compounds presence and so no sulphate release was observed. In the sediment culture, strontium, as well as potassium and aluminium concentrations increased after inoculation and might be explained by clay dissolution.
- Our findings suggest that thermophilic iron-reducers were only enriched in the chimney culture. Fe isotope fractionation identified in this culture, with  $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Fe(II)-III}} \sim -1\%$  may differ (i.e. being lower) from other iron-reducers signature investigated so far (e.g. Johnson et al., 2004). This study shows the first isotopic signature of thermophilic iron-reducers enrichment in bioreactor. However, this study also demonstrates abiotic Fe isotope fractionation of up to  $-2.5\%$  which confirms that Fe isotope biosignatures in modern or ancient marine sediments should be used with caution (Rouxel et al., 2004; 2008).

### References

Godfroy, A., A. Postec, et al. (2006). 4 Growth of Hyperthermophilic Microorganisms for Physiological and Nutritional Studies Methods in Microbiology, D. o. B. S. L. U. B. R. Editors: Fred A Rainey, LA USA;Aharon Oren Institute of Life Sciences The Hebrew University of Jerusalem Jerusalem Israel, Academic Press: 93-108.  
Postec, A., L. Utro, et al (2005). Continuous Enrichment Culture and Molecular Monitoring to Investigate the Microbial Diversity of Thermophilic Inhabiting Deep-Sea Hydrothermal Ecosystems. Current Microbiology, Springer New York, 50: 128-144.  
Byrne, N., F. Lesongeur, et al. (2009). Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor. Extremophiles, Springer Japan, 13: 591-604.  
Rouxel, O., A. Bekker, et al., (2005). Iron isotope constraints on the Archean and Paleo-Proterozoic Ocean Redox State. Science, 307, 1088-1091.  
Rouxel, O., E. Sholkovitz, et al. (2008). Iron isotope fractionation in subterranean estuaries. Geochimica et Cosmochimica Acta 72(14): 3413-3430.

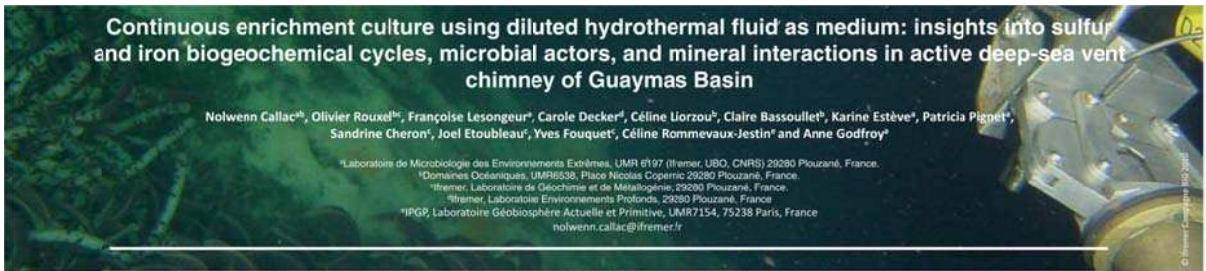




**Appendice 4: Poster 3 - Continuous enrichment culture using diluted hydrothermal fluid as medium: insights into sulfur and iron biogeochemical cycles, microbial actors, and mineral interactions in active deep-sea vent chimney of Guaymas Basin**

**Callac N**, O Rouxel, F Lesongeur, C Decker, C Liorzou, C Bassoullet, K Estève, P Pignet, S Cheron, J Etoubleau, Y Fouquet, C Rommevaux-Jestin and A Godfroy

Symposium GEOCEAN, en hommage à Jean Francheteau; Brest, FRANCE, 2012



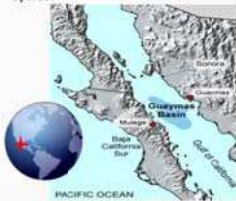
# Continuous enrichment culture using diluted hydrothermal fluid as medium: insights into sulfur and iron biogeochemical cycles, microbial actors, and mineral interactions in active deep-sea vent chimney of Guaymas Basin

Nolwenn Callac<sup>1b</sup>, Olivier Rouxel<sup>2c</sup>, Françoise Lesongeur<sup>3</sup>, Carole Decker<sup>4</sup>, Céline Liorzou<sup>5</sup>, Claire Bassoullet<sup>6</sup>, Karine Estève<sup>7</sup>, Patricia Pignat<sup>8</sup>, Sandrine Cheron<sup>9</sup>, Joel Etoubleau<sup>9</sup>, Yves Fouquet<sup>9</sup>, Céline Rommevaux-Jestin<sup>9</sup> and Anne Godfroy<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197 (Ifremer, UBO, CNRS) 29280 Plouzané, France.  
<sup>2</sup>Domaines Océaniques, UMR6538, Place Nicolas Copernic 29280 Plouzané, France.  
<sup>3</sup>Ifremer, Laboratoire de Géochimie et de Métallologie, 29200 Plouzané, France.  
<sup>4</sup>Extrêmes, Laboratoire Environnements Profonds, 29280 Plouzané, France.  
<sup>5</sup>IPGP, Laboratoire Géobiosphère Actuelle et Primitive, UMR7154, 75238 Paris, France  
 nolwenn.callac@ifremer.fr

## Introduction

Active hydrothermal vent chimneys host highly diverse microbial communities exhibiting various metabolisms including those involved in sulfur or iron biogeochemical cycles.



Guaymas Basin (Gulf of California, Mexico): hydrothermal systems (Southern Trough) and cold seep systems (Sonora Margin) are in the same area without biogeographical frontiers.

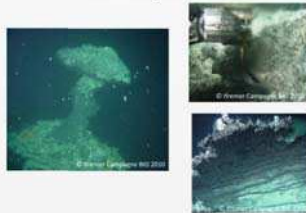
**Southern Trough** = thick layer of organic-rich sediments are affected by circulation of hydrothermal fluids forming sulfide-rich and carbonate-rich active chimneys and flanges at the seafloor. Diagenetic interactions between the hydrothermal fluids and sediments result in high temperature organic matter pyrolysis and metal-sulfide precipitation in subsurface environments. Products of organic matter pyrolysis include light hydrocarbons, short-chain organic acids organic matter particulate, ammonia which provide unique conditions for microbial life.

In order to investigate interactions between microbial communities and both hydrothermal fluids and mineral chimney matrix, cultural approach using a gas-lift bioreactor was implemented.

## Sample collection, culture protocol and results

An active hydrothermal flange sample was collected during the French oceanographic cruise BIG (RV *Atalante* June 2010) on "Rebecca's Roost" site (at 1997 m depth) in the Southern Trough of the Guaymas Basin using the DSV *Nautilus*. On board, the flange was crushed anaerobically and was used for the enrichment culture.

**Medium:** Diluted Hydrothermal fluid collected in the mixing zone at 100°C



**Experimental setup**  
Baby Gas-Lift bioreactor (850mL) connected to temperature and pH control system

**Daily sampling from the suspended culture**

**Cell density**

by direct cell count (Thoma chamber) under light microscope and by Q-PCR

**Molecular analysis of microbial diversity**  
using cloning-sequencing method on 16S rRNA after transcription into complementary DNA

**Organic acid concentrations (acetate, formate, propionate, lactate) & sulfate**  
using ion exchange chromatography

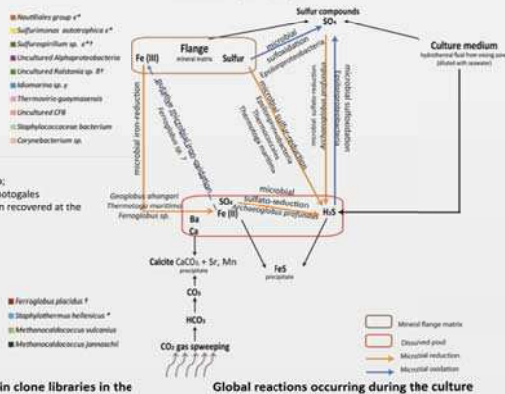
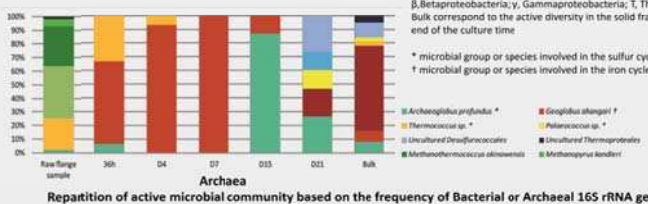
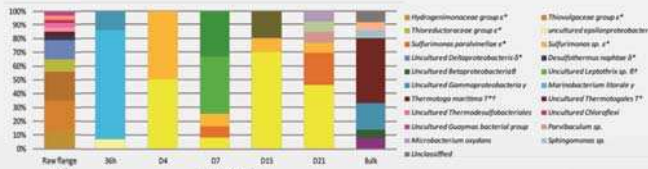
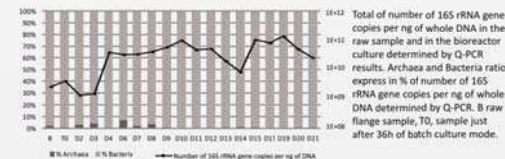
**H<sub>2</sub>S concentration**  
using Cline method

**Multi-element concentrations**  
major and trace elements by ICP-AES & HR-ICP-MS

**Culture parameters**  
21 days in anaerobic condition, at 85°C, at pH 6.8 under N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (75/20/5) gas sweeping

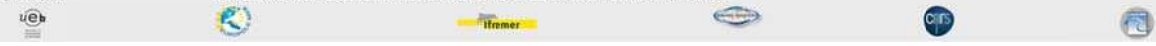
**Inoculum:** Active Hydrothermal flange on Rebecca's Roost site

Batch mode	36 h	Day 5	Day 6	Day 7	Day 10	Day 12	Day 15	Day 17	Day 21
Acetate μM	288	43	18	7	4	1	0	2	2
Sulfate mM	36	27	19	22	24	20	24	25	25
Fe (dissolved) μM	0.6	nd	1.6	0.8	nd	0.2	0.3	0.2	0.2
Ca mM	33	25	41	25	22	23	23	22	22
Mn μM	31	31	203	44	28	29	28	32	32



## Conclusions

The differences in term of microbial diversity between the raw flange sample (i.e. *in-situ*), suspended culture and the flange sample at the end of the culture reveal that continuous enrichment methods allow to access new communities and metabolisms that were not detected in the original sample. All together, those results also highlight that sulfur and iron biogeochemical cycles are important in hydrothermal system and highly dependent on the availability of dissolved sulfur and iron species and minerals that could fuel microbial communities.



**Appendice 5: Article 7 – DNA extractions from deep seafloor sediments: Novel cryogenic-mill-based procedure and comparison to existing protocols**

Karine Alain, **Nolwenn Callac**, Maria-Cristina Ciobanu, Yann Reynaud,  
Frédérique Duthoit, Mohamed Jebbar

Journal of Microbiology Methods (2011), **85**, 255-362



## DNA extractions from deep seafloor sediments: Novel cryogenic-mill-based procedure and comparison to existing protocols

Karine Alain <sup>\*</sup>, Nolwenn Callac, Maria-Cristina Ciobanu, Yann Reynaud, Frédérique Duthoit, Mohamed Jebbar

CNRS, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) – UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), Place Nicolas Copernic, F-29280 Plouzané, France  
 Université de Bretagne Occidentale (UBO, UEB), IUEM – UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), Place Nicolas Copernic, F-29280 Plouzané, France  
 Ifremer, UMR6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), Technopôle Pointe du diable, F-29280 Plouzané, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 July 2011

Received in revised form 30 September 2011

Accepted 30 September 2011

Available online 7 October 2011

#### Keywords:

Sediment

DNA extraction

Deep subsurface biosphere

### ABSTRACT

Extracting DNA from deep subsurface sediments is challenging given the complexity of sediments types, low bio-masses, resting structures (spores, cysts) frequently encountered in deep sediments, and the potential presence of enzymatic inhibitors. Promising results for cell lysis efficiency were recently obtained by use of a cryogenic mill (Lipp et al., 2008). These findings encouraged us to devise a DNA extraction protocol using this tool. Thirteen procedures involving a combination of grinding in liquid nitrogen (for various durations and beating rates) with different chemical solutions (phenol, chloroform, SDS, sarkosyl, proteinase, GTC), or with use of DNA recovery kits (MagExtractor®) were compared. Effective DNA extraction was evaluated in terms of cell lysis efficiency, DNA extraction efficiency, DNA yield and determination of prokaryotic diversity. Results were compared to those obtained by standard protocols: the FastDNA@SPIN kit for soil and the Zhou protocol. For most sediment types grinding in a cryogenic mill at a low beating rate in combination with direct phenol-chloroform extraction resulted in much higher DNA yields than those obtained using classical procedures. In general (except for clay-rich sediments), this procedure provided high-quality crude extracts for direct downstream nested-PCR, from cell numbers as low as  $1.1 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup>. This procedure is simple, rapid, low-cost, and could be used with minor modifications for large-scale DNA extractions for a variety of experimental goals.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The deep subsurface environment is one of the least explored biotopes on Earth. Microbiological investigations give evidence for a remarkably abundant and diverse microbial population to depths of 1626 m below the sea floor (mbsf) and in sediments dating 111 million years (My) old (Fry et al., 2008; Roussel et al., 2008). These prokaryotes are to some extent alive and metabolically active (Schippers et al., 2005; Lipp et al., 2008). To date there are many questions regarding the seafloor microbial communities, their composition, their abundance and their interactions with the basaltic lithosphere and oceanic hydrosphere. To acquire a representative description of the microbial diversity, molecular methods need to be used (Fry et al., 2008) and reliable qualitative and quantitative DNA extracts are necessary.

Obtaining representative DNA extracts from entire subsurface communities is critical, but challenging due to the low concentrations of nucleic acids that can be extracted, the adsorption of cells to sediment/rock particles, and the frequent co-extraction of enzymatic inhibitors (heavy metals, colloids, fulvic and humic acids, etc.). Therefore, DNA

extraction procedures alone cannot be used to estimate microbial diversity, but require combination and optimization with other methods (Madsen, 1996; Martin-Laurent et al., 2001; Luna et al., 2006). Previous efforts to extract DNA from sediments were based on the evaluation of two main procedures: first, cells separated from the sediment matrix and lysed (cell extraction) and second, cells lysed within the sediment (direct cell lysis) (Steffan et al., 1988; Leff et al., 1995; Luna et al., 2006). Direct cell lysis protocols provide higher DNA yields, ribotype richness and diversity, as compared to cell extraction procedures (Leff et al., 1995; Courtois et al., 2001; Luna et al., 2006). Several variations of direct cell lysis protocols are described in the literature (Zhou et al., 1996; Miller et al., 1999; Webster et al., 2003; Luna et al., 2006). They are based on mechanical disruption (freeze-thawing, bead-mill homogenization and/or sonication), chemical lysis (detergents, NaCl and/or chaotropic agents) and enzymatic lysis (lysozyme, proteinase K, achromopeptidase and/or proteinase E). Regarding deep marine sediment samples, the most commonly used protocols are the Zhou method (Zhou et al., 1996) and the bead-beating. The former technique combines freeze-thawing in a high-salt extraction buffer followed by chemical lysis at 65 °C, in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS), hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) and proteinase K. The bead-beating method is based on a commercially available kit 'FastDNA@SPIN for Soil' (Qbiogene) that has been modified according to Webster et al. (2003). At the present time, detailed DNA extraction

<sup>\*</sup> Corresponding author at: Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, CNRS UMR6197, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France. Tel.: +33 2 98 49 88 53; fax: +33 2 98 49 87 05.

E-mail address: [Karine.Alain@univ-brest.fr](mailto:Karine.Alain@univ-brest.fr) (K. Alain).

procedures using a cryogenic mill are not yet described in the literature even though there are some preliminary reports suggesting that grinding in liquid nitrogen may increase DNA yields extracted from deep sediment samples (Lipp et al., 2008).

The first objective of this study was to establish a protocol that allows for efficient extraction of DNA from subsurface sediments and rocks using a cryogenic laboratory mill. The cryogenic laboratory mill is an apparatus that allows for chilling samples in liquid nitrogen and pulverizing them with a magnetically driven impactor. Given the variety of sediment types (various compositions and grain sizes) and the multitude of factors impacting DNA extraction, we aimed to develop a comprehensive method that could be applied to a wide variety of sediments. Our procedure took into account clay, silt and sandy sediment types from the Mediterranean Sea, then these methods were analyzed on 'standard' sediment (silt) from Tasman Sea and finally the results were compared and validated with samples from various depths and locations.

The second aim of this work was to compare the relative effectiveness for the Freezer/Mill-based protocol to the established protocols (the Zhou and the bead-beating methods). To do this, we took into account several criteria including DNA yield, purity, and determination of prokaryotic diversity. Finally, our approach established a fundamental protocol for DNA extraction that should be suitable for many marine subsurface sediments and experimental goals.

## 2. Material and methods

### 2.1. Samples

Subseafloor marine sediments and rocks were collected from various locations (Table 1). They were dissimilar in their physical characteristics, their chemical properties, and their age (Table 1):

- (1) Mediterranean Sea: sediments were collected from the Var sedimentary Ridge and the Gulf of Lions, during the RHOSOS and ESSCAR9 cruises (R/V *Le Suroit*) in September–October 2008 by a Kullenberg (Calypso) corer. Sediments had high

organic matter content and different grain sizes. In the laboratory, the core liners were aseptically opened and subsamples were collected from the inner part of the cores using end-cut sterile 2 ml syringes. 100–150 cm<sup>3</sup> samples were directly frozen at –80 °C for molecular analyses (DNA extractions); 1 cm<sup>3</sup> samples for cells counts were placed in 15 ml vials containing 9 ml of 4% formalin/30 g l<sup>-1</sup> NaCl solution and stored at 4 °C.

- (2) Tasman Sea: sediment samples were collected by Geosciences Australia from the Australian maritime jurisdiction during the AUSFAIR survey (R/V *Marion Dufresne*), in February 2006 by a Calypso piston corer. Cores were immediately sliced aseptically onboard and subsampled using 5 ml syringes (luer end removed) from the inner part of the core. Subsamples were stored at –80 °C for molecular analysis and at 4 °C for prokaryotic enumeration.
- (3) Northern-Atlantic Ocean: an ultra-deep hemipelagic mudstone was collected from the New-Foundland margin, at ODP site 1276, in September 2003 during the ODP Leg 210 mission (R/V *Joides Resolution*), as described elsewhere (Roussel et al., 2008, SOM). Contamination tests following the ODP standard procedure for microbiological samples (particulate tracers) indicated that this sample was suitable for microbiological investigations (Roussel et al., 2008, SOM). It is noteworthy that the sediment fraction stored at –20 °C was used for other molecular studies (Roussel et al., 2008); therefore, we worked with duplicate fractions stored at 4 °C. Our present results, in addition to the cultivation of indigenous subsurface microorganisms from these crude samples (data not shown) confirmed that the microbial communities from this sample were well-preserved.

### 2.2. Microbial strains and addition to sterilized sediment

*Thermococcus siculi* strain RG-20<sup>T</sup> (Grote et al., 1999), *Marinitoga piezophila* strain KA3<sup>T</sup> (Alain et al., 2002) and *Caldiclava thermospodii* strain OLG2<sup>T</sup> (new genus of Firmicutes, Le Romancer et al., unpublished) were used as seed organisms for the positive controls. These representatives of *Archaea*, Gram-negative *Bacteria* and sporulating Gram-positive *Bacteria*, respectively, were grown to late exponential

**Table 1**  
Location and properties of the subsurface sediments used in cell disruption tests and DNA extraction methods.

Location	Sediment				
	Mediterranean Sea	Mediterranean Sea	Mediterranean Sea	Tasman Sea	Northern Atlantic Ocean
Sampling location	Var sedimentary Ridge (43°23'016 N, 07°44'187E)	Gulf of Lions (42°41'596 N, 03°50'493E)	Var sedimentary Ridge (43°23'016 N, 07°44'187E)	(27°46'65S, 160°10'54E)	New-Foundland margin (45°24'3198 N, 44°47'1496 W)
Depth (mbsf)	3.03	5.40	6.84	21	1626
Water depth (m)	2160	291	2160	2546	4560
Sediment texture <sup>a</sup>	Silt	Clay	Fine sand	Silt	Mudstone
<i>In situ</i> temperature (°C)	10–12	10–12	12–13	2.5–4	60–100 <sup>b</sup>
Salinity (‰)	37.9	37.9	40.1	27.3	ND
TOC (%)	0.30	0.39	0.05	ND	0.87
TC (%)	4.45	4.95	3.87	ND	ND
Period (geologic time), age (years)	Holocene, age < 10 ky	Late Pleistocene, 18.7–18.8 ky	Holocene, age < 10 ky	Early Pleistocene, between 0.78 and 2.59 My	Cretaceous, 111 My
Used	To compare various cryogenic mill lysis programs (different durations, various beating rates)	To compare various cryogenic mill lysis programs (different durations, various beating rates)	To compare various cryogenic mill lysis programs (different durations, various beating rates)	– To validate the freezer/mill programs giving the best cell disruption efficiencies – To compare different DNA extraction procedures	To validate the most efficient DNA extraction procedures

Abbreviations: ND, not determined; TOC, total organic carbon; TC, total carbon.

<sup>a</sup> Textures are defined as follow:

- Fine sand: dominance of particles with size < 125 μm.
- Silt: dominance of particles with size < 62.5 μm.
- Clay: dominance of particles with size < 3.9 μm.

<sup>b</sup> Estimation of the *in situ* temperature (Roussel et al., 2008).

phase before being mixed, in the proportions 1:1:1, with sterilized sediment (silt) from which amplifiable DNA could not be obtained. The cell suspensions were added to DNA-free sediment to a final concentration of  $\sim 1.0 \times 10^6$  cells per cubic centimetre sediment.

### 2.3. Physical disruption with a cryogenic mill and cell counts

Mechanical lysis of  $\sim 1$  g thawed sediments was performed in a cryogenic laboratory mill (6770 Freezer/Mill, Spex SamplePrep, NJ, USA). Nine Freezer/Mill programs consisting of different durations and different beating rates were tested on clay, silt and sandy sediments from the Mediterranean Sea. These programs were as follows: a pre-cooling time for 2 min, pulverization time (at a given beating rate) for 1 min and post-pulverization cooling time for 3 min. Tested programs were composed of one or two cycles at one beating rate of either 6, 8, 10, 12, 14 or 15 units (1 unit corresponds to 2 impacts per second).

The efficiency of cell disruption was monitored by microscopic cell counts (Olympus BX60 microscope, WIB filter) using the SYBR Green I staining procedure. When counting could not be performed immediately after cryogenic mill disruption, 10  $\mu$ l of samples were fixed with 2% (v/v) formaldehyde in 10 ml NaCl 3% (w/v) solution. Fixed samples were then filtered through polycarbonate membrane filters (pore size: 0.22  $\mu$ m), washed and air-dried. Filters were then placed on microscope slides, stained with 50  $\mu$ l SYBR Green I 10x (Molecular Probes-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and mounted with 100  $\mu$ l of an anti-fading solution (0.1% (w/v) N-Ndimethyl-1,4-phenylene diamine sulphate, 0.42% (w/v) NaCl, 0.44% (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.495% (v/v) glycerol) modified from Patel et al. (2007). Cell counts were obtained using a BX60 fluorescence microscope (Olympus) on 0.2  $\mu$ m filters (Isopore™ GTTP membrane filters, Millipore).

For each sediment type, four Freezer/Mill programs were selected for further DNA extraction treatments. These treatments included; (i) two most effective Freezer/Mill programs in terms of cell disruption efficiency; and (ii) two mild programs to control the DNA shearing, given that the subsequent extraction procedures include additional lysis steps.

### 2.4. DNA extraction

A total of fifteen DNA extraction procedures were evaluated and compared on a silt sample from the Tasman Sea. Each sediment sample was divided into  $\sim 1$  g (wet weight) subsamples (and also the positive control). DNA was extracted from duplicate subsamples for each of the fifteen different methods. Nucleic acids extracted from each

duplicate sample (from 1 g sediment fraction) were suspended in 10  $\mu$ l to 200  $\mu$ l TE-1X buffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7.5).

In thirteen procedures, a freezer/mill apparatus was used to crush samples and disrupt cells (mechanical lysis in a liquid nitrogen chamber). These procedures are derived from four main methods (see Table 2):

- Fz-P Method: Freezer/Mill lysis followed by phenol/chloroform DNA extraction. This method was evaluated at beating rates 8, 14 and 15. After crushing in a cryogenic mill, extracts were suspended in 1 ml TE-Na-1X lysis buffer (100 mM Tris, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0) and extracted with equal volumes of buffered phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCI: 25/24/1; pH 8.0). Following recovery of the aqueous phase, a second extraction with PCI was performed. In the second round, the extraction was performed with equal volumes of chloroform. Solutions were subjected to centrifugation at 13,000 g for 15 min. (4 °C), aqueous phases were recovered and then supplemented with 200  $\mu$ g linear acrylamide (Ambion/Applied Biosystems) to favour precipitation of nucleic acid (linear acrylamide does not interfere with A<sub>260/280</sub> readings). DNA was precipitated overnight at  $-20$  °C with 0.7 volumes of ice-cold isopropanol. The precipitate was pelleted by centrifugation at maximum speed for 10 min, air-dried and dissolved in TE-1X buffer to a final volume of 50  $\mu$ l.
- Fz-chem1-P Method: Freezer/Mill lysis followed by chemo-enzymatic treatment (detergents + proteolytic enzyme) and then by phenol/chloroform extraction. This method was evaluated at beating rates 5, 8, 14 and 15. Sample homogenization in cryogenic mill, suspension in TE-1X buffer, centrifugation and supernatant collection were as described in method Fz-P. These were followed by successive additions of 100  $\mu$ l Sarkosyl (10% w/v), 100  $\mu$ l SDS (10% w/v) and 20  $\mu$ l proteinase K (20 mg ml<sup>-1</sup>; Eurobio). After gentle inversion by hand, these preparations were incubated for 1 h at 55 °C, and centrifuged for 20 min. at 8 000 g (4 °C) to pellet cell debris. Final steps were similar to those described in method Fz-P. Briefly they included two extractions with PCI, extraction with chloroform and nucleic acid precipitation.
- Fz-chem2-P Method: Freezer/Mill lysis followed by chemical treatment (detergent + chaotropic agent) and then by phenol/chloroform extraction. This method was performed at beating rates 14 and 15. The procedure was similar to method Fz-chem1-P with the exception that the chemo-enzymatic treatment was replaced by a treatment with detergent and chaotropic agent. Briefly, the first steps were as in method Fz-chem1-P: homogenization in cryogenic mill, suspension in TE-1X buffer and centrifugation, and then, supernatants

**Table 2**

Summary of the DNA extraction procedures performed on Tasman Sea samples.

Method	Cell lysis treatment and nucleic acid extraction procedure				
	Mechanical for freezer/mill	Beating rate <sup>a</sup>	Chemical/osmotic	Enzymatic	Binding matrix
Fz-P-8	Freezer/mill	8	PCI		
Fz-P-14	Freezer/mill	14	PCI		
Fz-P-15	Freezer/mill	15	PCI		
Fz-chem1-P-5	Freezer/mill	5	SDS, Sarkosyl/PCI	Proteinase K	
Fz-chem1-P-8	Freezer/mill	8	SDS, sarkosyl/PCI	Proteinase K	
Fz-chem1-P-14	Freezer/mill	14	SDS, sarkosyl/PCI	Proteinase K	
Fz-chem1-P-15	Freezer/mill	15	SDS, Sarkosyl / PCI	Proteinase K	
Fz-chem2-P-14	Freezer/mill	14	Sarkosyl, GCT/PCI		
Fz-chem2-P-15	Freezer/mill	15	Sarkosyl, GCT/PCI		
Fz-Mag-5	Freezer/mill	5			Magnetic silica beads (MagExtractor®)
Fz-Mag-8	Freezer/mill	8			Magnetic silica beads (MagExtractor®)
Fz-Mag-14	Freezer/mill	14			Magnetic silica beads (MagExtractor®)
Fz-Mag-15	Freezer/mill	15			Magnetic silica beads (MagExtractor®)
F	Bead beating (FastDNA® SPIN kit for Soil)				
Z	Freeze-thawing (Zhou protocol)		Saline buffer, SDS, CTAB/CI	Proteinase K	Silica beads

Abbreviations: PCI or CI (phenol)/chloroform/Isoamyl alcohol; SDS, sodium dodecyl sulphate; GCT, guanidine thiocyanate; CTAB, hexadecyltrimethylammonium bromide.

<sup>a</sup> 1 unit of beating rate corresponds to 2 impacts per second.

were treated with 150  $\mu$ l sarkosyl (10%) and 1 ml GTC (guanidine thiocyanate 4 M). Samples were incubated at 20 °C for 30 s and centrifuged at 8 000 g for 20 min (4 °C). Nucleic acids were extracted with PCI as described previously.

- Fz-Mag Method: Freezer/Mill lysis followed by nucleic acid absorption to magnetic silica beads. Sediments were crushed in a Freezer/Mill apparatus at beating rates 8, 14 and 15. Preparations were then suspended in 0.5 ml TE-Na-1X lysis buffer and centrifuged for 20 min at 8000 rpm (4 °C) to pellet debris. Supernatants were then extracted using the commercial kit 'MagExtractor-PCR & Gel Clean Up' (CosmoBio Co., Tokyo, Japan) following the manufacturer's instructions. Briefly, DNA was directly recovered by absorption to magnetized silica beads in the presence of chaotropic agents, washed and eluted.

Two of the most commonly used protocols for DNA extraction from sediments were also tested:

- F Method: Commercial kit FastDNA®SPIN kit for Soil (Qbiogene, MP Biomedicals, Illkirch, France) with modifications as essentially described in Webster et al. (2003). Briefly, this method is based on a mechanical homogenization of samples with ceramic and silica beads, in a Bead Beater cell disruptor (FastPrep® Instrument, MP Biomedicals, Illkirch, France), and in the presence of chaotropic DNA stabilizing agents (proprietary mixture of detergents and salts). Following cell lysis, DNA was bound to a silica matrix, washed and then eluted. 200  $\mu$ g linear acrylamide were further added to the sediment/lysis buffer mix prior to cell lysis. With this kit, DNA can be extracted from sediment samples weighing less than 0.5 g. As a consequence, total DNA was extracted from four consecutive 0.5 g subsamples in order to standardize and compare results to those obtained from the other protocols (duplicate extractions on 1 g subsamples).
- Z method: Zhou method (Zhou et al., 1996). Briefly, sediments were freeze-thawed in a high-salt extraction buffer containing CTAB and 1.5 M NaCl. Samples were then treated with proteinase K and SDS, and extracted with chloroform-isoamyl alcohol.

These different protocols were used on the sediments collected from the Tasman Sea, and were then applied on all other samples in order to compare the efficacy of these methods to different sediments and depths.

### 2.5. DNA concentration and quality

DNA quantity was routinely determined using an ultra-sensitive fluorescent nucleic acid stain: the Quant-it™PicoGreen® dsDNA kit (Invitrogen). Concentrations of DNA were normalized to sediment dry weight after desiccation (70 °C, 30 h). DNA purity was evaluated by determining the ratios of  $A_{260}/A_{280}$  and  $A_{260}/A_{230}$  (nm) by a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

In order to determine the DNA fragment size, crude extracts (5  $\mu$ l) were subjected to electrophoresis in 1X TAE buffer (pH 8, 40 mM Tris base, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA) in a 0.75% (w/v) agarose gel at 85 V, stained with 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide and visualized under ultraviolet trans-illumination. Lambda DNA *HindIII*-digest (Sigma) was used as marker for size determination.

### 2.6. Ribotype diversity shown by PCR-DGGE

DNA extracts from the Tasman Sea, North Atlantic Ocean (protocols Fz-8, Fz-chem1-P-8, Fz-chem2-P-8, Fz-Mag-8 and F), and from positive controls were all subjected to 16S rRNA gene PCR-Denaturing Gel gradient Electrophoresis (DGGE) analysis to characterize the bacterial and archaeal diversity. Using PCR-DGGE, it is possible to rapidly obtain banding patterns of the dominant microbial populations, and to sequence these bands. PCR-DGGE analysis was performed on pooled

fractions of DNA extracts obtained from duplicate extractions. Nested PCR was performed in all cases to optimize the DGGE results. Bacterial 16S rRNA gene amplification was conducted with primers Bac8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and Bac1493R (5'-GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3') for the first round, and with 341 F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') and 907R (5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3') for the second round. PCR cycles for the first round (Bac8F/Bac1493R) were: a denaturation step of 1 min at 94 °C, 30 cycles consisting of 1 min at 94 °C, 1.5 min at 50 °C and 2 min at 72 °C; and a final step of 6 min at 72 °C. PCR cycles for the second round (341 F-GC/907R) were: a denaturation step of 3 min at 94 °C, 20 cycles consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C and 1.5 min at 72 °C; and a final step of 7 min at 72 °C. Archaeal 16S rRNA gene amplification was conducted with primers Arc21F (5'-TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA-3') and Arc958R (5'-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3') for the first round, and with Arc344F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC CCG CCG GCC GGG GYG CAG CAG CGA-3') and Arc915R (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3') for the second round. PCR cycles for the first round (Arc21F/Arc958R) were as follows: a denaturation step of 5 min at 94 °C, 30 cycles consisting of 1 min at 94 °C, 1.5 min at 54 °C and 2 min at 72 °C; and a final step of 6 min at 72 °C. PCR cycles for the second round (Arc344F-GC/Arc915R) were: a first step of 3 min at 94 °C, 20 cycles consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at 57 °C and 1.5 min at 72 °C; and a final step of 7 min at 72 °C. DGGE was performed with the Bio-Rad DCode Universal Mutation Detection System on a 1 mm thick (16  $\times$  16 cm) 6% (w/v) polyacrylamide gel (acrylamide/bisacrylamide, 37.5/1, BioRad), with denaturant at a 20% to 80% gradient prepared as described elsewhere (Roussel et al., 2009). Electrophoresis was run for 10 min at 80 V and then for 330 min at 200 V, in 1X TAE buffer at 60 °C. The gel was stained with SYBR®Gold nucleic acid gel stain (Molecular Probes, Invitrogen) for 45 min and visualised using an UV transilluminator. The strongest DGGE bands were excised, reamplified by PCR and sequenced by Sanger method (Cogenics Beckman-Coulter, Stansted, U.K.). Sequences were compared to sequences from the databases using NCBI BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). They were then aligned using CLUSTALX and classified into taxonomic units by phylogenetic reconstruction, using neighbour-joining (with Jukes and Cantor correction) in PHYLIP 3.69.

## 3. Results

### 3.1. Impact of different cryogenic mill programs on cell lysis efficiency

Lysis efficiency was deduced from averaged microscopic cell counts performed before and after cryogenic mill treatment. Nine different cryogenic mill programs, at different durations (1 or 2 cycles) and beating rates, were evaluated on three sediment types: clay, silt and fine sand (all from the Mediterranean Sea) (Table 3). As expected, higher percentages of lysed cells were obtained from sandy sediments as compared to muddy sediments. Lysis efficiency improved with increased beating rates, regardless of the sediment texture. With sandy sediments, lysis efficiency ranged from 64%, at beating rate 6, to 96%, at beating rate 15 (maximal power). With clay, these values ranged from 43%, at beating rate 8, to 62%, at beating rate 15. The repetition of a full cycle of cryogenic mill after the first cycle did not increase lysis efficiencies.

### 3.2. Quantity and purity of nucleic acids extracted by different procedures

Nanodrop and Quant-it yielded different results. The former one overestimated the DNA yields. Consequently, only the Quant-it measurements were taken into account.

Large variations in DNA yields were obtained with the different extraction procedures and with the different measurement methods

**Table 3**

Percentages of lysed cells after physical disruption with a cryogenic mill. Results are shown as a function of the sediment nature and of the Freezer/Mill program.

Beating rate units <sup>b</sup> × cycle number	% lysis efficiency <sup>a</sup>								
	5 × 1	6 × 1	8 × 1	10 × 1	12 × 1	14 × 1	15 × 1	14 × 2	15 × 2
Fine sand <sup>c</sup>	NT	64 ± 8	86 ± 5	87 ± 2	91 ± 2	95 ± 1	96 ± 2	NT	NT
Silt <sup>d</sup>	48 ± 4	55 ± 7	81 ± 2	81 ± 1	82 ± 3	85 ± 1	87 ± 1	NT	NT
Clay <sup>e</sup>	NT	NT	43 ± 5	51 ± 5	51 ± 8	52 ± 9	62 ± 3	56 ± 9	65 ± 5

Abbreviation: NT, not tested.

<sup>a</sup> for each condition, percentages were calculated from mean counts (with n = 3) performed before and after treatment with the cryogenic mill; cells were enumerated by direct microscopic counts of samples stained with SYBR Green I.<sup>b</sup> 1 unit of beating rate corresponds to 2 impacts per second.<sup>c</sup> Dominance of particles with size < 125 μm.<sup>d</sup> Dominance of particles with size < 62.5 μm.<sup>e</sup> Dominance of particles with size < 3.9 μm.

(Table 4). The DNA yields obtained with the Tasman Sea sample, ranged from 13 to 1073 ng/g dry weight of sediment. In our tested protocols, the lowest DNA yields were obtained using the Zhou protocol, while the highest yields were obtained using a Freezer/Mill cycle at beating rate 8 followed by phenol/chloroform extraction (method Fz-P-8). Excepted with the Mediterranean Sea sample from 3.03 mbsf, the diverse Freezer-Mill-based approaches gave higher DNA yields than the classical bead-beating (FastDNA@SPIN kit) and freeze-thawing (Zhou protocol) methods. Among the Freezer-Mill-based procedures, those based on direct use of PCI (method Fz-P) or use of SDS/sarkosyl/proteinase K and PCI (method Fz-chem1-P), resulted in the highest DNA yields. For a given procedure, the beating rate 8 consistently generated the highest yields. Concentration of DNA decreased with increasing beating rates suggesting that DNA was sheared and damaged at higher beating rates (i.e. beating rates 14 or 15).

$A_{260}/A_{230}$  and  $A_{260}/A_{280}$  absorbance ratios for the DNA extracted by Fz-P, Fz-chem1-P and Fz-chem2-P were generally above 1.8, indicating that the DNA extracts resulting from these protocols were relatively pure and contained low amounts of humic acids, proteins or other contaminants. On the other hand, the absorbance ratios for DNA extracted by Fz-Mag, F and Z methods were not within the range of 1.8–1.9. However, this discrepancy is explained by the presence of substances absorbing at 230 or 280 nm in commercial kits or solutions used in these procedures. Further, DNA fragment size from crude extracts could not be estimated from ethidium bromide stained gels (data not shown), nor from highly concentrated DNA extracts. Similar detection problems are reported in the literature showing comparable DNA yields (Miller et al., 1999; Aguilera et al., 2006). Except for the extraction of DNA using the Z method, amplification of bacterial and archaeal sequences encoding for 16S rRNA genes was successfully obtained by nested-PCR for all other protocols. The signal was relatively weak or absent after the first PCR, but robust for almost all samples after nested PCR amplification. Intensely stained bands at the expected size were observed at the end of the second round of PCR for all samples, with the exception of the clay-rich sediments that resulted in weakly stained bands (data not shown). Accordingly, further purifications steps were not necessary.

### 3.3. Taxonomic diversity as shown by PCR-DGGE

To compare the microbial diversity recovered via the different methods, molecular fingerprinting was performed using PCR-DGGE-sequencing on community DNA extracted from sediments with methods Fz-P-8, Fz-chem1-P-8, Fz-Mag-8 and F. In our study, we targeted variable regions (~550–610 bp in size) of bacterial and archaeal 16S rRNA genes. Interestingly, whatever the sediment and whatever the targeted domain (*Bacteria* or *Archaea*), we consistently observed the following: (i) method Fz-P-8 gave the highest number of bands on the DGGE pattern, (ii) DGGE patterns showing the highest diversity (as determined by the largest number of bands), were classed as

follows: Fz-P-8 > Fz-Mag-8 > Fz-chem1-P-8; (iii) the diversity shown by PCR-DGGE-sequencing was high but not similar in crude extracts obtained by Fz-P-8, Fz-Mag-8, and F methods; and (iv) positive controls gave the expected results (detection of the 3 seed microorganisms: *Thermococcus sicuti*, *Marinitoga piezophila*, *Caldiclava thermospodii*) with methods Fz-P-8, Fz-chem1-P-8, Fz-Mag-8 and F (Fig. 1 and data not shown).

The subsurface sediments from the Tasman Sea, the Northern Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea displayed complex PCR-DGGE banding patterns, with 5 to 21 bands (Fig. 1 and data not shown). A large fraction of the taxonomic groups, detected by sequencing of the DGGE bands, belonged to uncultured lineages frequently retrieved from marine subsurface sediments, such as the Miscellaneous Crenarcheotic Group (MCG), the Deep-Sea Archaeal Group (DSAG) (synonymous with the MBG-B: Marine Benthic Group B) or the South African Gold Mine Group (SAGMEG) (Fig. 1). When regarding the phyla and the candidate divisions that were detected by PCR-DGGE-sequencing, all were detected from DNA extracts Fz-P-8 and F, but some were absent from extracts Fz-chem1-P-8 and Fz-Mag-8. At the phylotype-level, the microbial diversity shown by methods Fz-P-8 and F was slightly different, suggesting that it could be interesting to combine both methods to obtain larger diversity estimates.

### 3.4. Comparison of DNA extraction procedures based on DNA yield, purity and taxonomic diversity as shown by PCR-DGGE

Among the different procedures tested, the Freezer-Mill-based approaches gave the highest yields. The methods resulting in high DNA quality, in terms of  $A_{260}/A_{230}$  and  $A_{260}/A_{280}$  ratios, were the Freezer-Mill-based methods Fz-P, Fz-chem1-P and Fz-chem2-P, respectively. For tested sediments, most methods (except for the Z method) provided good quality DNA for downstream PCR analysis. Finally, DNA extraction procedures showing the largest diversity by PCR-DGGE-sequencing were methods Fz-P-8 and F.

Based on these results we can conclude that use of the Fz-P-8 method results in high-quality and -quantity DNA, and at the same time offers great recovery of prokaryotic diversity.

In order to validate this method and evaluate its cell lysis efficiency on sediments from various depths (3.03 to 1626 mbsf), different physical-chemical properties (Table 1) and diverse cell densities (from  $1.6 \times 10^6$  to  $2.1 \times 10^8$  cells/cm<sup>3</sup>), crude DNA was extracted from five natural sediments using the Fz-P-8 approach (Table 5). Cell lysis efficiency was evaluated by cell counting (before and after mechanical disruption in the cryogenic mill), and by microscopic observations of the various phases and interphase collected after the first PCI extraction. Indeed, phenol efficiently denatures proteins and PCI extraction acts to lyse the remaining intact cells. Whatever the nature of the sediment and its microbial abundance (with the exception of sediments containing large amounts of clay), we observed very few cells after the PCI extraction. This suggests that most cells were lysed using this method. Crude DNA extracts of high-quality for downstream PCR analyses were



**Table 4**  
Comparison of DNA yields and purities for crude DNA from deep seafloor sediments subjected to different treatments.

Sample	Method	DNA yield (ng/g dry weight of sediment) <sup>a</sup>	Ratio $A_{260}/A_{230}$ <sup>b</sup>	Ratio $A_{260}/A_{280}$ <sup>b</sup>	
Tasman Sea 21 mbsf	Freezer/Mill + PCI	Fz-P-8	1 073 ± 248	2.10 ± 0	2.15 ± 0.08
		Fz-P-14	504 ± 28	1.99 ± 0.08	1.93 ± 0.25
		Fz-P-15	376 ± 35	1.88 ± 0.11	1.78 ± 0.03
	Freezer/Mill + SDS, sarkosyl, proteinase K / PCI	Fz-chem1-P-5	588 ± 32	2.39 ± 0.24	1.99 ± 0.03
		Fz-chem1-P-8	672 ± 161	1.98 ± 0.25	1.90 ± 0.35
		Fz-chem1-P-14	424 ± 22	1.91 ± 0.04	1.92 ± 0.06
	Freezer/Mill + GCT, sarkosyl / PCI	Fz-chem1-P-15	497 ± 199	1.46 ± 0.15	1.70 ± 0.18
		Fz-chem2-P-14	252 ± 13	2.0 ± 2.23	2.04 ± 0.21
	Freezer/Mill + Magnetic silica beads	Fz-chem2-P-15	126 ± 14	OR	1.75 ± 0.01
		Fz-Mag-5	BDL	OR	OR
		Fz-Mag-8	74 ± 9	OR	OR
		Fz-Mag-14	60 ± 39	OR	OR
	Bead Beating (FastDNA <sup>®</sup> SPIN for soil kit)	Fz-Mag-15	16 ± 4	OR	2.08 ± 0.35
F		49 ± 3	OR	1.94	
Freeze-thawing (Zhou protocol)	Z	13 ± 3	1.26 ± 0.57	1.25 ± 0.08	
Northern Atlantic Ocean 1626 mbsf	Freezer/Mill + PCI	Fz-P-8	695 ± 123	1.72 ± 0.32	1.73 ± 0.24
		Fz-P-14	91 ± 10	1.84 ± 0	1.78 ± 0.06
	Freezer/Mill + SDS, sarkosyl, proteinase K / PCI	Fz-chem1-P-5	318 ± 186	2.13 ± 0.08	1.82 ± 0
		Fz-chem1-P-8	696 ± 124	1.75 ± 0.32	1.73 ± 0.24
		Fz-chem1-P-14	679 ± 120	1.54 ± 0.14	1.83 ± 0.01
	Freezer/Mill + Magnetic silica beads	Fz-Mag-5	5	OR	OR
		Fz-Mag-8	58 ± 5	OR	OR
		Fz-Mag-14	35 ± 1	OR	1.91 ± 0.01
	Bead Beating (FastDNA <sup>®</sup> SPIN for soil kit)	F	72 ± 1	OR	1.94
Mediterranean Sea 3.03 mbsf (silt)	Freezer/Mill + PCI	Fz-P-8	548	0.57	1.58
	Bead Beating (FastDNA <sup>®</sup> SPIN for soil kit)	F	2 941	OR	1.58
Mediterranean Sea 5.40 mbsf (clay)	Freezer/Mill + PCI	Fz-P-8	2 192	1.93	1.77
	Bead Beating (FastDNA <sup>®</sup> SPIN for soil kit)	F	1 626	OR	2.09
Mediterranean Sea 6.84 mbsf (sand)	Freezer/Mill + PCI	Fz-P-8	3 520	1.33	1.80
	Bead Beating (FastDNA <sup>®</sup> SPIN for soil kit)	F	1 736	OR	1.90
Positive control	Freezer/Mill + PCI	Fz-P-8	11 ± 2	1.98 ± 0.20	1.93 ± 0.35
		Fz-P-14	8 ± 1	1.98 ± 0.08	1.92 ± 0.05
		Fz-P-15	2 ± 1	1.89 ± 0.40	1.73 ± 0.11
	Freezer/Mill + SDS, sarkosyl, proteinase K / PCI	Fz-chem1-P-5	8 ± 1	2.21 ± 0.15	1.99 ± 0.06
		Fz-chem1-P-8	11 ± 2	1.93 ± 0.31	2.01 ± 0.23
		Fz-chem1-P-14	8 ± 1	1.94 ± 0.06	1.98 ± 0.01
	Freezer/Mill + GCT, sarkosyl / PCI	Fz-chem1-P-15	7 ± 1	1.92 ± 0.17	1.92 ± 0.37
		Fz-chem2-P-14	5 ± 1	2.03 ± 0.28	1.99 ± 0.06
	Freezer/Mill + Magnetic silica beads	Fz-chem2-P-15	3 ± 1	1.77 ± 0.26	1.85 ± 0.02
		Fz-Mag-5	2 ± 1	1.26 ± 0.01	OR
		Fz-Mag-8	3 ± 0	1.56 ± 0.12	OR
		Fz-Mag-14	1 ± 0	OR	OR
	Fz-Mag-15	1 ± 0	OR	OR	

Legend:

DNA yield &gt; 1 000 ng/g dry weight of sediment

DNA yield &gt; 500 ng/g dry weight of sediment

DNA yield &gt; 200 ng/g dry weight of sediment

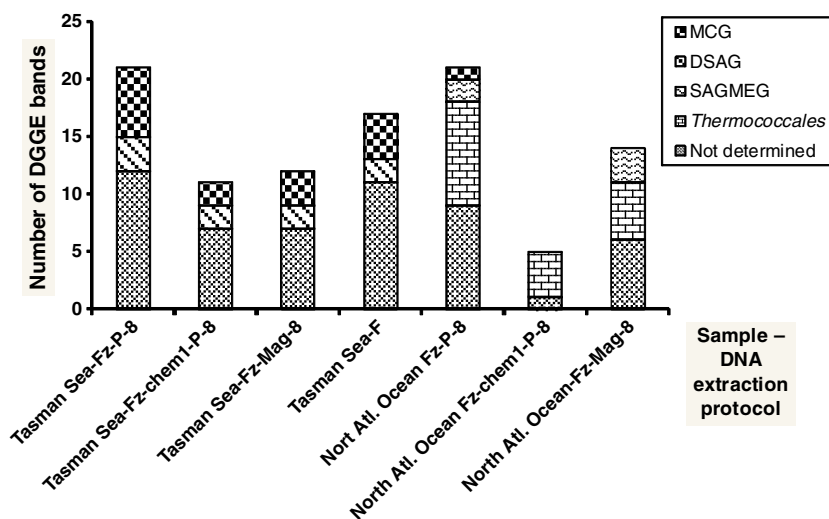
DNA yield &gt; 50 ng/g dry weight of sediment

DNA yield &lt; 50 ng/g dry weight of sediment

Ratio &gt; 1.80

1.80 &gt; ratio &gt; 1.50

Ratio &lt; 1.50



**Fig. 1.** Schematic diagram of the DGGE results obtained with the Tasman Sea sample and the North Atlantic Ocean sample, using the different DNA extraction procedures. The strongest DGGE bands were excised and sequenced. Bar texture shows their taxonomic affiliation. Legend: DSAG, Deep-Sea Archaeal Group; MCG, Miscellaneous Crenarcheotic Group; SAGMEG, South African Gold Mine Group; Not determined, weak DGGE bands which have not been sequenced.

obtained from all five sediments tested, including the one with the lowest cellular abundance. The DNA yield obtained with the positive control was close to the theoretical value, calculated on the basis of cell abundance (Table 5). Crude DNA yields obtained from natural sediments were at one exception in the expected values and rather high (Table 5). The value from the North Atlantic Ocean sample was greatly higher than the expected DNA yield, but this can be explained by the presence of eukaryotic DNA in this sample (data not shown). Interestingly, DNA extraction efficiency was comparable for samples containing low- and high-cell numbers (when microbial abundances were between  $1.1 \times 10^6$  and  $2.1 \times 10^8$  cells/cm<sup>3</sup>).

#### 4. Discussion

Obtaining DNA from deep subsurface sediments is a difficult task because cell abundance generally decreases with depth, in the presence of complex organic matter, and enzymatic inhibitors are omnipresent. In addition, harsh environmental conditions that characterize the subsurface habitat, notably the high pressures, the high temperatures at depth and low energy fluxes, favour the settlement of microorganisms that are resistant to classical lysis. Examples of these include microorganisms with membrane compositions reducing energy loss and hard to degrade cell-wall compositions (tetra-ether based membranes such as in *Archaea*; glycolipids; etc) (Valentine, 2007), as well as biofilms or resting cells (i.e., spores and cysts).

The aim of this work was to devise the basic protocol for a cryogenic-mill-based DNA extraction procedure suitable to recovering high yields of DNA and identifying diversity from deep marine sediments. Among the tested protocols, the Fz-P-8 method offered the highest DNA yields and recovery of diversity. This method derived from traditional procedures is based on a cryogenic mill disruption at beating rate 8 followed by two extractions with PCI and one with chloroform. More drastic cryogenic-mill-based methods or conditions, based on higher beating rates or on additional lysis treatments (chemical, osmotic or enzymatic treatments), led to a loss of diversity and/or to shearing DNA. While DNA extraction from clay-rich samples was less effective, cell lysis

efficiencies and DNA extracting efficiencies were generally higher and better with method Fz-P-8 than with other methods tested here or reported in the literature (Wang and Edwards, 2009). This procedure gave much higher DNA yields than the Zhou protocol and FastDNA@S-PIN kit for soils, the two methods most commonly used. Moreover, for all the investigated sediments Fz-P-8 provided crude DNA extracts that were directly used for nested PCR amplification without requiring additional purification. Nevertheless, we observed that the amplification efficiency decreased after two months (data not shown), suggesting that our protocol could be improved. Future studies to investigate the effect of DNA stabilization reagents on the storage of DNA, the effect of nucleic acid carriers or other polyvalent polymers on the adsorption and degradation of DNA [e.g. skim milk powder, Denhardt's solution; and contaminants discussed herein (Volossiuk et al., 1995; Wang and Edwards, 2009)], are necessitated.

In summary, the DNA extraction method Fz-P-8 described herein is simple, rapid and cost-effective. It provides high efficiency for cell lysis and DNA yield for most sediment types (except for clay-rich samples) and for a myriad of experimental goals. In addition, this method can be used directly without a further purification step for most PCR-mediated assays of subsurface communities, including diversity studies and pyrosequencing. In combination with nested-PCR (known to provide much higher levels of sensitivity), DNA extracted with this method was successfully used to describe the composition of ultra-deep subsurface sediments from cell numbers as low as  $1.1 \times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup>. This method may be advantageous to other methods described to-date, as it can be adapted to various sediment types and to different experimentations. More importantly, it can be easily implemented in microbiology laboratories. Nevertheless, taking into consideration the remarkable complexity of sediment types and the different parameters that may interfere with DNA extractions, this protocol should be considered as a basic configuration that can be amended for a wider scope of analyses. Certain sediment types or purposes will likely require specific modifications or further purification of their target DNA. While one method for DNA extraction from all sediment types is unlikely, herein we provide the footing for a ubiquitous protocol that can be easily amended for all experimental goals.

#### Notes to Table:

<sup>a</sup>Values are means,  $\pm$  standard errors, with  $n=2$ .

<sup>b</sup>Nucleic acids absorb light that has a wavelength of 260 nm. Organic contaminants like phenol and other aromatic compounds, humic acids, TRIzol and reagents commonly used in DNA extraction kits absorb at 230 nm wavelength. The maximal absorption of proteins is at 280 nm. A260/A230 ratios  $\geq 1.9$ , and A260/280 ratios in the range of  $\geq 1.8$  to  $\leq 2.0$ , are generally recommended for any molecular analysis. OR: out-of-range value; very low or very high absorbance value due to the presence of contaminants. BDL: below the detection limit.

**Table 5**  
Direct counts and DNA yields using the DNA extraction procedure Fz-P-8.

Sample	Microbial abundance (cells per cm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	% lysis efficiency after Freezer/Mill treatment (beating rate 8)	Expected DNA yield (ng/g [wet wt] of sediment) <sup>b</sup>	Crude DNA yield (ng/g [wet wt] of sediment)
Mediterranean Sea 3.03 mbsf (silt)	2.1 × 10 <sup>8</sup>	81	336–(1450)–2790	454
Mediterranean Sea 5.40 mbsf (clay)	1.5 × 10 <sup>8</sup>	43	240–(1040)–2000	1871
Mediterranean Sea 6.84 mbsf (fine sand)	1.5 × 10 <sup>8</sup>	86	240–(1040)–2000	2816
Tasman Sea 21 mbsf	7.5 × 10 <sup>7</sup>	82	120–(518)–998	954
North. Atlantic Ocean 1626 mbsf <sup>c</sup>	1.6 × 10 <sup>6</sup>	88	2.56–(11)–21.3	640
Positive control	1.1 × 10 <sup>6</sup>	94	1.76–(7.59)–14.6	11

<sup>a</sup> Microscopic counts of SYBR®Green I-stained cells.

<sup>b</sup> Range of expected DNA yields calculated by multiplying the number of prokaryotic cells by low, middle (under brackets) and high values previously reported in the literature for cellular DNA content of environmental bacteria [mean cellular DNA content of soil bacteria (1.6 × 10<sup>-15</sup> g cell<sup>-1</sup>) as reported by Bakken and Olsen (1989), cellular DNA content of *Escherichia coli* strain B (6.9 × 10<sup>-15</sup> g cell<sup>-1</sup> for a genome of 4.67 Mb) as calculated by Massie and Zimm (1965), and estimated cellular content of a 9 Mb genome such as those encountered among Actinobacteria and *Bacillus/Clostridium* (1.33 × 10<sup>-14</sup> g cell<sup>-1</sup>)]. NB: these calculations are based on the hypothesis that the community is exclusively composed of prokaryotes.

<sup>c</sup> Encysted forms of eukaryotes were detected in this sample (data not shown).

## Acknowledgements

The authors are sincerely indebted to Patrice Woerther, Bernard Dennielou and Serge Berné, the chief scientists of the oceanographic cruises ESSCAR-9 and RHOSOS. The Tasman Sea sample was collected by Geoscience Australia in the Australian maritime jurisdiction during the AUSFAIR survey and results presented here are with permission from Geoscience Australia. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and by the Université de Bretagne Occidentale, notably through the project UBO Projet exploratoire 2011 PALEOMIC. M.-C.C. was supported by a grant from the Ministère de la Recherche and a Transfer of Knowledge grant from the CAREX network.

## References

- Aguilera, A., Gómez, F., Lospitao, E., Amils, R., 2006. A molecular approach to the characterization of the eukaryotic communities of an extreme acidic environment: methods for DNA extraction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 593–605.
- Alain, K., Marteinsson, V.T., Miroshnichenko, M., Bonch-Osmolovskaya, E., Prieur, D., Birrien, J.L., 2002. *Marinitoga piezophila*, sp. nov., a rod-shaped thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1331–1339.
- Bakken, L.R., Olsen, R.A., 1989. DNA content of soil bacteria of different cell size. *Soil Biol. Biochem.* 21, 789–793.
- Birrien, J.L., Bienvenu, N., Postec, A., Dupont, S., Prieur, D., Le Romancer, M., in preparation. *Caldiclava thermospodii* gen. nov., sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a hot soil environment of Saint-Paul island, Southern Indian Ocean.
- Courtois, S., Frostegård, A., Göransson, P., Depret, G., Jeannin, P., Simonet, P., 2001. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ. Microbiol.* 3, 431–439.
- Fry, J.C., Parkes, R.J., Cragg, B.A., Weightman, A.J., Webster, G., 2008. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 181–196.
- Grote, R., Li, L., Tamaoka, J., Kato, C., Horikoshi, K., Antranikian, G., 1999. *Thermococcus siculi* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent at the Mid-Okinawa Trough. *Extremophiles* 3, 55–62.
- Leff, L.G., Dana, J.R., McArthur, J.V., Shimkets, L.J., 1995. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1141–1143.
- Lipp, J.S., Morono, Y., Inagaki, F., Hinrichs, K.U., 2008. Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature* 454, 991–994.
- Luna, G.M., Dell'Anno, A., Danovaro, R., 2006. DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environ. Microbiol.* 8, 308–320.
- Madsen, E.L., 1996. A critical analysis of methods for determining the composition and biogeochemical activities of soil microbial communities in situ. *Soil Biochem.* 9, 287–370.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., Catroux, G., 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2354–2359.
- Massie, H.R., Zimm, B.H., 1965. Molecular weight of the DNA in the chromosomes of *E. coli* and *B. subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1636–1641.
- Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L., Ghiorse, W.C., 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4715–4724.
- Patel, A., Noble, R.T., Steele, J.A., Schwalbach, M.S., Hewson, I., Fuhrman, J.A., 2007. Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I. *Nat. Protoc.* 2, 269–276.
- Roussel, E.G., Cambon-Bonavita, M.-A., Querrelou, J., Cragg, B.A., Webster, G., Prieur, D., Parkes, R.J., 2008. Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science* 320, 1046.
- Roussel, E.G., Sauvadet, A.-L., Allard, J., Chaduteau, C., Richard, P., Cambon-Bonavita, M.-A., Chaumillon, E., 2009. Archaeal methane cycling communities associated with gassy subsurface sediments of Marennes–Oléron Bay (France). *Geomicrobiol. J.* 26, 31–43.
- Schippers, A., Neretin, L.N., Kallmeyer, J., Ferdelman, T.G., Cragg, B.A., Parkes, R.J., Jørgensen, B.B., 2005. Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature* 433, 861–864.
- Steffan, R.J., Goksøyr, J., Bej, A.K., Atlas, R.M., 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2908–2915.
- Valentine, D.L., 2007. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 316–323.
- Volossiuk, T., Robb, E.J., Nazar, R.N., 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3972–3976.
- Wang, H., Edwards, K.J., 2009. Bacterial and archaeal DNA extracted from inoculated experiments: Implication for the optimization of DNA extraction from deep-sea basalts. *Geomicrobiol. J.* 26, 463–469.
- Webster, G., Newberry, C.J., Fry, J.C., Weightman, A.J., 2003. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *J. Microbiol. Methods* 55, 155–164.
- Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316–322.



**Appendice 6: Article 8 – *Nautilia abyssi* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfur-reducing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent**

Karine Alain, **Nolwenn Callac**, Marianne Guégan, Françoise Lesongeur, Philippe Crassous, Marie-Anne Cambon-Bonavita, Joel Querellou, Daniel Prieur

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2009), **59**,  
1310–1315

## *Nautilia abyssi* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfur-reducing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent

Karine Alain,<sup>1</sup> Nolwenn Callac,<sup>1</sup> Marianne Guégan,<sup>1</sup>  
Françoise Lesongeur,<sup>1</sup> Philippe Crassous,<sup>2</sup>  
Marie-Anne Cambon-Bonavita,<sup>1</sup> Joël Querellou<sup>1</sup> and Daniel Prieur<sup>1</sup>

### Correspondence

Karine Alain

Karine.Alain@univ-brest.fr

<sup>1</sup>UMR6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, IUEM, Technopôle Brest-Iroise, F-29280 Plouzané, France

<sup>2</sup>Laboratoire Environnement Profond, Ifremer EEP/LEP, BP 70, F-29280 Plouzané, France

A novel strictly anaerobic, thermophilic, sulfur-reducing bacterium, designated PH1209<sup>T</sup>, was isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent (13° N) sample and studied using a polyphasic taxonomic approach. Cells were Gram-negative, motile rods (approx. 1.60×0.40 μm) with a single polar flagellum. Strain PH1209<sup>T</sup> grew at temperatures between 33 and 65 °C (optimum 60 °C), from pH 5.0 to 8.0 (optimum 6.0–6.5), and between 2 and 4% (w/v) NaCl (optimum 3%). Cells grew chemolithoautotrophically with H<sub>2</sub> as an energy source, S<sup>0</sup> as an electron acceptor and CO<sub>2</sub> as a carbon source. Strain PH1209<sup>T</sup> was also able to use peptone and yeast extract as carbon sources. The G + C content of the genomic DNA was 35 mol%. Phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequencing showed that strain PH1209<sup>T</sup> fell within the order *Nautiliales*, in the class *Epsilonproteobacteria*. Comparative 16S rRNA gene sequence analysis indicated that strain PH1209<sup>T</sup> belonged to the genus *Nautilia* and shared 97.2 and 98.7% 16S rRNA gene sequence identity, respectively, with the type strains of *Nautilia lithotrophica* and *Nautilia profundicola*. It is proposed, from the polyphasic evidence, that the strain represents a novel species, *Nautilia abyssi* sp. nov.; the type strain is PH1209<sup>T</sup> (=DSM 21157<sup>T</sup>=JCM 15390<sup>T</sup>).

Epsilonproteobacteria are widely distributed in marine and terrestrial ecosystems (Campbell *et al.*, 2006). They are particularly common and abundant in 30–70 °C areas of deep-sea hydrothermal vents, as indicated by their prevalence in clone libraries (Polz & Cavanaugh, 1995; Longnecker & Reysenbach, 2001; López-García *et al.*, 2002; Alain *et al.*, 2004), the results of fluorescence *in situ* hybridization (Moussard *et al.*, 2006) and the isolation of several representatives (Alain *et al.*, 2002; Miroshnichenko *et al.*, 2002; Inagaki *et al.*, 2003; Takai *et al.*, 2003, 2005, 2006; Voordeckers *et al.*, 2005). Within this singular ecosystem, members of the class *Epsilonproteobacteria* are retrieved in various habitats, thriving (i) as free-living organisms on chimney structures, within vent plumes and in sediments, (ii) as epi- or endosymbionts of hydrothermal invertebrates or (iii) embedded in mats on the

surfaces of chimney rocks or animals. Cultured isolates from deep-sea vents are all mesophilic to thermophilic chemolithoautotrophs coupling the oxidation of hydrogen or sulfur compounds to the reduction of nitrate, sulfur compounds or oxygen (Takai *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2006). Because of their abundance and metabolic abilities, epsilonproteobacteria are likely to be key players in carbon, sulfur and nitrogen biogeochemical cycling at deep-sea vents.

Two orders are currently described within the class *Epsilonproteobacteria* Garrity *et al.* 2006 (Garrity *et al.*, 2005a, 2006), namely the *Nautiliales* (Miroshnichenko *et al.*, 2004) and the *Campylobacteriales* Garrity *et al.* 2006 (Garrity *et al.*, 2005b, 2006). The order *Nautiliales* includes the genera *Nautilia* (Miroshnichenko *et al.*, 2002), *Caminibacter* (Alain *et al.*, 2002) and *Lebetimonas* (Takai *et al.*, 2005) which are composed exclusively of thermophilic strains isolated from deep-sea hydrothermal vents and which have been found in association with invertebrates or with chimney edifices. At present, the genus *Nautilia* is composed of two species, *Nautilia lithotrophica* (Miroshnichenko *et al.*, 2002) and *Nautilia profundicola*

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of *Nautilia abyssi* PH1209<sup>T</sup> is AM937002.

Scanning electron micrographs of cells of strain PH1209<sup>T</sup> (Fig. S1) and a graph showing the maximum growth rate of strain PH1209<sup>T</sup> at various temperatures, pH and NaCl concentrations (Fig. S2) are available with the online version of this paper.

(Smith *et al.*, 2008). Both strains are strictly anaerobic, sulfur-reducing mixotrophs that are able to grow on hydrogen and carbon dioxide, or, alternatively, on formate. In this study, a novel marine bacterium belonging to the genus *Nautilia* is described.

In April–May 2002, during the PHARE oceanographic cruise, fragments of active hydrothermal chimney rocks covered with colonies of the tubeworm polychaete *Alvinella* spp. were collected from a depth of 2620 m at the Elsa vent field on the East Pacific Rise 13° N (12° 48' N 103° 56' W). Sample collection, subsampling and storage procedures were as described elsewhere (Alain *et al.*, 2004). One subsample collected from the Ph01 chimney was used to inoculate a series of media, including KA22 medium (Alain *et al.*, 2002), which were incubated at 60 °C under a gas phase of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20; 200 kPa). After 24 h incubation, dense populations of short, rod-shaped, motile cells were observed and purified by repeated dilution-to-extinction series. One isolate, strain PH1209<sup>T</sup>, is described in this study. The purity of this isolate was confirmed routinely by microscopic examination and by repeated partial sequencing of the 16S rRNA gene using several primers. Stock cultures were stored at –80 °C in KA22 medium supplemented with 5% (v/v) DMSO.

Morphological characteristics of the cells were determined by light microscopy (CX40; Olympus) and scanning electron microscopy (Quanta 200; FEI). Cells of strain PH1209<sup>T</sup> were Gram-negative, straight rods of 1.0–2.2 µm in length (mean 1.6 ± 0.3 µm; *n*=11) and 0.3–0.5 µm in width (mean 0.4 ± 0.1 µm; *n*=11) in the mid-exponential phase of growth (see Supplementary Fig. S1 in IJSEM Online). They generally occurred singly and were highly motile by a polar flagellum (Supplementary Fig. S1a). Division was by constriction (Supplementary Fig. S1b). Formation of spores was never observed.

Physiological characterization of the novel isolate was carried out in a basal medium, 'NPKsalts', which contained (per litre): 0.33 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.33 g KCl, 0.33 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.33 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 25 g NaCl, 1.0 g NaNO<sub>3</sub>, 1.95 g MES buffer (Sigma) and 1 mg resazurin (Sigma). The pH was adjusted to 6.0. Once prepared, this medium was autoclaved and then cooled to room temperature under a stream of O<sub>2</sub>-free N<sub>2</sub> gas. Concentrated anaerobic filter-sterilized solutions of vitamins and trace elements were added to the medium after autoclaving. Just before inoculation, Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and elemental sulfur were provided from sterile stocks to final concentrations of 0.04% (w/v), 20 mM and 1.2% (w/v), respectively. Unless stated otherwise, experiments were carried out anaerobically under a gas phase of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20; 200 kPa) and incubations were performed in the dark and under agitation. Growth was routinely monitored by direct cell counting using a modified Thoma chamber (depth 10 µm) or by counting after fixation with 1% (v/v) glutaraldehyde and storage at –20 °C. Growth rates were calculated using linear regression analysis of four to nine points along the

logarithmic portions of the resulting growth curves. The determination of the temperature range for growth was tested over the range 30–80 °C (i.e. 30, 33, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 and 80 °C). No growth was observed at 30 °C or at 70 °C and above. The novel isolate grew from 33 to 65 °C, with an optimum growth rate at 60 °C (see Supplementary Fig. S2a in IJSEM Online). The pH range for growth was tested at 60 °C in basal medium buffered and adjusted to the required initial pH as described elsewhere (Alain *et al.*, 2002). Growth was observed from pH 5.0 to 8.0, the optimum being around pH 6.0–6.5 (Supplementary Fig. S2b). No growth was observed at pH 4.0 or 8.5. Salt tolerance was tested at 60 °C in NPKsalts medium prepared with various concentrations of NaCl (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 10%, w/v). Growth was observed at salt concentrations ranging from 2 to 4% (w/v) NaCl, with optimum salinity being around 3% (Supplementary Fig. S2c). No growth was observed in 1 or 5% (w/v) NaCl. Under optimal growth conditions, the generation time of strain PH1209<sup>T</sup> was around 120 min.

Strain PH1209<sup>T</sup> was a strictly anaerobic, chemolithoautotrophic bacterium that used sulfur, hydrogen and carbon dioxide as primary electron acceptor, electron donor and carbon source, respectively. Its ability to use alternative electron acceptors was tested by adding colloidal sulfur (5 g l<sup>-1</sup>; Sigma Aldrich), L-cystine (12 g l<sup>-1</sup>), sulfite (1 mM), thiosulfate (20 mM), sulfate (20 mM), nitrate (10 mM), nitrite (1 mM) and oxygen (1%, v/v) to nitrate- and sulfur-depleted media, under an atmosphere of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20; 200 kPa). Quantitative determination of hydrogen sulfide was carried out as described elsewhere (Cord-Ruwisch, 1985). The novel isolate grew with elemental sulfur and colloidal sulfur, with concomitant production of H<sub>2</sub>S, but did not grow when L-cystine, sulfite, thiosulfate, sulfate, nitrate, nitrite or oxygen were used as electron acceptors. To examine possible carbon sources other than CO<sub>2</sub>, a variety of organic carbon sources was tested in the presence of sulfur, under a 100% H<sub>2</sub> (200 kPa) atmosphere. Formate (10 mM), acetate (10 mM), butyrate (10 mM), propionate (10 mM), methanol (0.5%, v/v), pyruvate (10 mM), lactate (0.5%, v/v), fumarate (10 mM), glucose (10 mM), peptone (2 g l<sup>-1</sup>) and yeast extract (2 g l<sup>-1</sup>) were tested as potential substrates. Heterotrophic growth (with concomitant H<sub>2</sub>S production) was observed exclusively with yeast extract and peptone and was probably the result of decarboxylation of amino acids. Growth rates with yeast extract and peptone were of the same order of magnitude as that measured with carbon dioxide as the carbon source. To test the ability of the strain to use electron donors other than molecular hydrogen, the strain was cultivated under a gas phase of N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20; 200 kPa) in the presence of formate (20 mM), acetate (20 mM), methanol (0.5%, v/v) and yeast extract (2 g l<sup>-1</sup>), with sulfur as a terminal electron acceptor. No growth was observed with the alternative energy sources, indicating that strain PH1209<sup>T</sup> was a strict hydrogen-oxidizer. Nitrogen sources for

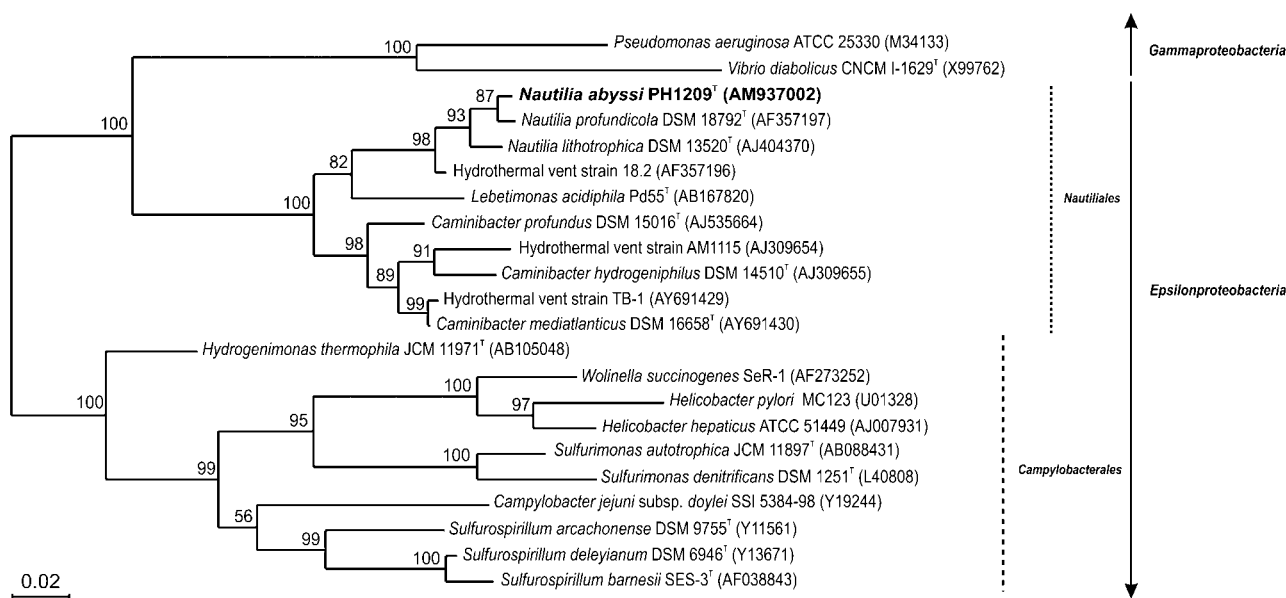
growth were also examined in nitrogen-depleted medium. The novel isolate was found to grow on both organic and inorganic nitrogen sources. Significant growth was observed when  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mM), glutamate (10 mM), yeast extract ( $0.2 \text{ g l}^{-1}$ ), tryptone ( $0.2 \text{ g l}^{-1}$ ), gelatin (0.05 %, v/v) and urea (0.05 %, v/v) were provided as sole nitrogen sources.

Antibiotic resistance was tested in the presence of a variety of antibiotics that differed in their chemical nature, targets and mechanisms of operation. Resistance to vancomycin, streptomycin, chloramphenicol, kanamycin, rifampicin, penicillin, ampicillin and tetracycline was investigated at concentrations of 10, 25, 50 and  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . When the antibiotic was diluted in ethanol (chloramphenicol) or DMSO (rifampicin), the same volume of solvent was added to control cultures. All antibiotics were added aseptically before inoculation and the cultures were incubated at  $60^\circ\text{C}$  for 1 week. Strain PH1209<sup>T</sup> was sensitive to vancomycin, streptomycin, chloramphenicol, penicillin, ampicillin and tetracycline, all at  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ . It grew in the presence of  $10 \mu\text{g}$  rifampicin  $\text{ml}^{-1}$  and  $25 \mu\text{g}$  kanamycin  $\text{ml}^{-1}$ , but was sensitive to higher concentrations of these two antibiotics.

The genomic DNA G+C content was determined by the Identification Service of the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) by HPLC analysis of deoxyribo-

nucleosides as described by Mesbah *et al.* (1989). The G+C content of strain PH1209<sup>T</sup> was 35 mol%.

The almost complete 16S rRNA gene (1369 bp) of the strain was double-strand sequenced, as described elsewhere (Alain *et al.*, 2002). This sequence was compared to those in available databases by using the BLAST program (Altschul *et al.*, 1990) and then aligned to its nearest neighbours using the CLUSTAL\_X program (Thompson *et al.*, 1997). Alignments were refined manually using the SEAVIEW program (Galtier *et al.*, 1996). Distance matrixes were calculated with LASERGENE version 6 software. Phylogenetic trees were constructed with PHYLIP version 3.63 software (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/getme.html>) on the basis of evolutionary distance (neighbour-joining method with Jukes and Cantor corrections) (Saitou & Nei, 1987) and maximum-likelihood (Felsenstein, 1981). The robustness of the inferred topologies was assessed by bootstrap analyses based on 1000 bootstrap resamplings for the neighbour-joining and 100 replications for the maximum-likelihood method (Felsenstein, 1985). Comparison of the 16S rRNA gene sequence with sequences of 'Bacteria' indicated that the novel isolate belonged to the class *Epsilonproteobacteria* Garrity *et al.* 2006 (Garrity *et al.*, 2005a, 2006) and, more particularly, to the order *Nautiliales* (Miroshnichenko *et al.*, 2004). Within this lineage, which is composed exclusively of taxa from deep-sea hydrothermal vents, the novel isolate was most closely related to a group of



**Fig. 1.** Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain PH1209<sup>T</sup> and representative members of related genera within the class *Epsilonproteobacteria*. Sequence data of reference strains were obtained from the GenBank/EMBL and/or the Ribosomal Database Project. Two species from the class *Gammaproteobacteria* were chosen as outgroups. Accession numbers are indicated in parentheses. The topology shown corresponds to an unrooted tree obtained by the maximum-likelihood algorithm established using the PHYLIP package. Bootstrap values (from 100 replicates) are indicated at the branch nodes. The positioning of the novel isolate was confirmed by the neighbour-joining method. Bar, 2 nt substitutions per 100 nt.



moderately thermophilic sulfur reducers, all, like PH1209<sup>T</sup>, isolated from the East Pacific Rise 13° N (Fig. 1). The novel isolate shared 98.7% 16S rRNA gene sequence similarity with *N. profundicola* AmH<sup>T</sup> (Smith *et al.*, 2008), 97.2% with *N. lithotrophica* 525<sup>T</sup> (Miroshnichenko *et al.*, 2002) and 97.4% with strain Ex-18.2, a third isolate not formerly described (Campbell *et al.*, 2001). These three closest relatives were all isolated from tubes of the worm *Alvinella pompejana* and belonged to the genus *Nautilia*. The novel isolate was more distantly related to members of the genera *Lebetimonas* and *Caminiibacter*, sharing 91.9–93.2% 16S rRNA gene sequence similarity with strains of representative species of these genera (Table 1). Based on sequence similarity and phylogenetic analyses, the novel isolate could be assigned to the genus *Nautilia*. The level of 16S rRNA gene sequence dissimilarity with *N. profundicola* and *N. lithotrophica* suggests that the new isolate belongs to a novel species (Stackebrandt & Ebers, 2006).

The phenotypic and genotypic properties of the novel isolate described herein generally met the minimal characteristics described for the order *Nautiliales* (Miroshnichenko *et al.*, 2004). Indeed, strain PH1209<sup>T</sup> is a marine, thermophilic, sulfur-reducing bacterium that

grows chemolithoautotrophically from H<sub>2</sub> oxidation. It branches unambiguously with other members of the order *Nautiliales*. Nevertheless, strain PH1209<sup>T</sup> can be distinguished easily from other species of the order *Nautiliales* on the basis of a number of phylogenetic, genotypic and physiological features. These distinctive criteria are detailed in Table 1. In addition to the phylogenetic distance, the novel taxon differs from its closest relatives in its temperature, NaCl and pH ranges for growth. The generation time under optimal growth conditions of the novel strain is also slightly different from those of its relatives. Furthermore, differences in the utilization profiles of carbon sources, electron donors and electron acceptors are also observed. The novel isolate is unable to use formate as energy and carbon source, in contrast to *N. lithotrophica* and *N. profundicola*, which are able utilize formate. Finally, another distinctive criterion is the DNA G+C content. In conclusion, in view of all the above-mentioned distinctive features, it is proposed that strain PH1209<sup>T</sup> should be assigned as the type strain of a novel species, for which the name *Nautilia abyssi* sp. nov. is proposed.

**Table 1.** Differential characteristics of strain PH1209<sup>T</sup> and related species of the order *Nautiliales*

Species/strains: 1, PH1209<sup>T</sup> (this study); 2, *Nautilia profundicola* AmH<sup>T</sup> (Smith *et al.*, 2008); 3, *Nautilia lithotrophica* 525<sup>T</sup> (Miroshnichenko *et al.*, 2002); 4, *Caminiibacter hydrogeniphilus* AM1116<sup>T</sup> (Alain *et al.*, 2002); 5, *Caminiibacter profundus* CR<sup>T</sup> (Miroshnichenko *et al.*, 2004); 6, *Caminiibacter mediantlanticus* TB-2<sup>T</sup> (Voordeckers *et al.*, 2005); 7, *Lebetimonas acidiphila* Pd55<sup>T</sup> (Takai *et al.*, 2005). +, Positive; –, negative; w, weak growth; ND, not determined.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
Growth temperature (°C):							
Range	33–65	30–55	37–68	50–70	45–65	45–70	30–68
Optimum	60	40	53	60	55	55	50
Growth pH:							
Range	5.0–8.0	6.0–9.0	6.4–7.4	5.5–7.5	6.5–7.4	4.5–7.5	4.2–7.0
Optimum	6.0–6.5	7.0	6.8–7.0	5.5–6.0	6.9–7.0	5.5	5.2
NaCl concentration for growth (%):							
Range	2.0–4.0	2.0–5.0	0.8–5.0	1.0–4.0	0.5–5.0	1.0–4.0	0.6–5.0
Optimum	3.0	3.0	3.0	2.0–2.5	3.0	3.0	2.0
Generation time (min)	120	360	140	90	40	50	120
Utilization of C source other than CO <sub>2</sub> :							
Formate	–	+	+	–	–	–	–
Complex organic substrates	+	ND	ND	+	ND	ND	–
Utilization of electron donor other than H <sub>2</sub> :							
Formate	–	+	+	–	–	–	–
Utilization of electron acceptor other than S <sup>0</sup> :							
Oxygen	–	–	–	–	+	–	–
Nitrate	–	–	–	+	+	+	–
Sulfite	–	ND	w	ND	–	–	–
Colloidal sulfur	+	ND	w	ND	ND	ND	ND
DNA G+C content (mol%)	35.0	33.5	34.7	29 ± 1	32.1	25.6	34.0
16S rRNA gene sequence similarity*	100	98.7	97.2	92.8	92.4	93.2	91.9

\*The 16S rRNA gene sequence similarity (%) is calculated in reference to the 16S rRNA gene sequence of the novel isolate PH1209<sup>T</sup>.

## Description of *Nautilia abyssi* sp. nov.

*Nautilia abyssi* (a.bys'si. L. gen. n. *abyssi* of an abyss, of the great deep).

Cells are Gram-negative, motile rods, approximately 1.6 µm in length and 0.4 µm in width, with a single polar flagellum. Optimal growth occurs at 60 °C, with a growth range of 33–65 °C. The pH and NaCl ranges are 5.0–8.0 (optimum 6.0–6.5) and 2–4% (w/v) (optimum, 3% w/v NaCl), respectively. Growth occurs under strictly anaerobic conditions using H<sub>2</sub> as electron donor, elemental sulfur (or colloidal sulfur) as a terminal electron acceptor and CO<sub>2</sub> as a carbon source. Yeast extract and peptone can be used as alternative carbon sources, but not formate, acetate, methanol, lactate, propionate, fumarate, malate, citrate, pyruvate, glucose or glycogen. L-Cystine, thiosulfate, sulfate, sulfite, nitrate, nitrite and oxygen are not utilized as electron acceptors. Formate, acetate, methanol and yeast extract are not used as electron donors. Sensitive to the following antibiotics at 10 µg ml<sup>-1</sup>: vancomycin, streptomycin, chloramphenicol, penicillin, ampicillin and tetracycline. Sensitive to 25 µg rifampicin ml<sup>-1</sup> and 50 µg kanamycin ml<sup>-1</sup>.

The type strain, PH1209<sup>T</sup> (=DSM 21157<sup>T</sup>=JCM 15390<sup>T</sup>), was isolated from the walls of an active deep-sea hydrothermal chimney colonized with alvinellid worms, on the East Pacific Rise (12° 48' N 103° 56' W). It is also available under request at the 'Souchothèque de Bretagne' (catalogue LMBE) culture collection (<http://www.ifremer.fr/souchotheque/>). The genomic DNA G+C content of strain PH1209<sup>T</sup> is 35 mol%.

## Acknowledgements

We acknowledge Professor J. P. Euzéby for support in the Latin etymologies of the species name. We thank the captain and crew of the NO *L'Atalante*, the pilots and support crew of the ROV *Victor* and N. Le Bris, Chief Scientist, for helping us to collect deep-sea hydrothermal vent samples during the PHARE oceanographic cruise. We are grateful to the anonymous reviewers for their constructive comments about the manuscript. This work was supported financially by the Région Bretagne and the joint research unit UMR6197, linking the Université de Bretagne Occidentale to the Ifremer and the Centre National de la Recherche Scientifique.

## References

- Alain, K., Querellou, J., Lesongeur, F., Pignet, P., Crassous, P., Raguénès, G., Cuff, V. & Cambon-Bonavita, M. A. (2002). *Caminiibacter hydrogeniphilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an East Pacific Rise hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1317–1323.
- Alain, K., Zbinden, M., Le Bris, N., Lesongeur, F., Quérillou, J., Gaill, F. & Cambon-Bonavita, M.-A. (2004). Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. *Environ Microbiol* **6**, 227–241.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.
- Campbell, B. J., Jeanthon, C., Kostka, J. E., Luther, G. W., III & Cary, S. C. (2001). Growth and phylogenetic properties of novel bacteria

belonging to the epsilon subdivision of the *Proteobacteria* enriched from *Alvinella pompejana* and deep-sea hydrothermal vents. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4566–4572.

Campbell, B. J., Summers Engel, A., Porter, M. L. & Takai, K. (2006). The versatile  $\epsilon$ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Rev Microbiol* **4**, 458–468.

Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* **4**, 33–36.

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**, 368–376.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.

Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**, 543–548.

Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. (2005a). Class V. *Epsilonproteobacteria* class. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2 (*The Proteobacteria*), part C (*The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*), p. 1145. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.

Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. (2005b). Order I. *Campylobacterales* ord. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2 (*The Proteobacteria*), part C (*The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*), p. 1145. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.

Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. (2006). *Epsilonproteobacteria* class. nov. In *List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly, Published*, Validation List no. 107. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1–6.

Inagaki, F., Takai, K., Kobayashi, H., Neelson, K. H. & Horikoshi, K. (2003). *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing  $\epsilon$ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1801–1805.

Longnecker, K. & Reysenbach, A.-L. (2001). Expansion of the geographic distribution of a novel lineage of  $\epsilon$ -Proteobacteria to a hydrothermal vent site on the Southern East Pacific Rise. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 287–293.

López-García, P., Gaill, F. & Moreira, D. (2002). Wide bacterial diversity associated with tubes of the vent worm *Riftia pachyptila*. *Environ Microbiol* **4**, 204–215.

Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 159–167.

Miroshnichenko, M. L., Kostrikina, N. A., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Hippe, H., Stackebrandt, E. & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2002). *Nautilia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfur-reducing  $\epsilon$ -proteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1299–1304.

Miroshnichenko, M. L., L'Haridon, S., Schumann, P., Spring, S., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Jeanthon, C. & Stackebrandt, E. (2004). *Caminiibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of *Nautiliales* ord. nov. within the class '*Epsilonproteobacteria*' isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 41–45.

Moussard, H., Corre, E., Cambon-Bonavita, M.-A., Fouquet, Y. & Jeanthon, C. (2006). Novel uncultured *Epsilonproteobacteria* dominate a filamentous sulphur mat from the 13° N hydrothermal vent field, East Pacific Rise. *FEMS Microbiol Ecol* **58**, 449–463.

- Polz, M. F. & Cavanaugh, C. M. (1995).** Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7232–7236.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Smith, J. L., Campbell, B. J., Hanson, T. E., Zhang, C. L. & Cary, S. C. (2008).** *Nautilia profundicola* sp. nov., a thermophilic, sulfur-reducing epsilonproteobacterium from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1598–1602.
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006).** Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* **33**, 152–155.
- Takai, K., Inagaki, F., Nakagawa, S., Hirayama, H., Nunoura, T., Sako, Y., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2003).** Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated  $\epsilon$ -Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 167–174.
- Takai, K., Hirayama, H., Nakagawa, T., Suzuki, Y., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2005).** *Lebetimonas acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, acidophilic, hydrogen-oxidizing chemolithoautotroph within the ‘Epsilonproteobacteria’, isolated from a deep-sea hydrothermal fumarole in the Mariana Arc. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 183–189.
- Takai, K., Suzuki, M., Nakagawa, S., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Inagaki, F. & Horikoshi, K. (2006).** *Sulfurimonas paralvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfurimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1725–1733.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876–4882.
- Voordeckers, J. W., Starovoytov, V. & Vetriani, C. (2005).** *Caminiobacter mediatlanticus* sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, nitrate-ammonifying bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the Mid-Atlantic Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 773–779.



## Résumé

Les cheminées et sédiments hydrothermaux actifs du Bassin de Guaymas (Mexique) hébergent diverses communautés microbiennes présentant différents métabolismes, y compris ceux impliqués dans les cycles biogéochimiques du soufre et du fer. Il est établi, que, dans ces écosystèmes dynamiques, les micro-organismes qui dépendent pour leur croissance des substrats présents dans leur environnement pourraient à leur tour, affecter localement la composition du fluide hydrothermal et la minéralogie des cheminées, la composition des sédiments, en favorisant la dissolution et/ou la précipitation de certaines phases minérales.

Pour étudier ces interactions procaryotes-biotopes, et établir des liens entre la structure, l'activité et les signatures isotopiques des communautés microbiennes et les caractéristiques physico-chimiques des systèmes hydrothermaux du Bassin de Guaymas, une approche pluridisciplinaire mettant en œuvre des techniques de microbiologie, de géochimie et d'isotopie, lors des cultures d'enrichissements en bioréacteur et des études de colonisation de substrats basaltiques a été réalisée.

Ces travaux ont permis : 1) de caractériser la diversité des micro-organismes de différents compartiment de l'écosystème hydrothermal (cheminée et sédiments) du Bassin de Guaymas par des approches culturales et moléculaires ; 2) de décrypter le fonctionnement des cycles biogéochimiques du soufre et du fer en mettant en évidence la présence simultanée, à haute température et en anaérobiose, de micro-organismes sulfo-réducteurs, sulfato-réducteurs, sulfo-oxydants mais également ferri-réducteurs et ferro-oxydants ; et 3) de mieux comprendre les interactions procaryotes-minéraux-fluide en soulignant le rôle des microorganismes dans la modification des conditions environnementales, la formation de minéraux ainsi que leur rôle direct ou indirect dans les fractionnements des isotopes du Fer et Soufre.

Ces études ont donc permis de montrer l'importance des interactions croisées entre les différents composantes : communautés microbiennes, le fluide (fluide hydrothermal, eaux interstitielles des sédiments, eau de mer) et les structures minérales des écosystèmes hydrothermaux.

**Mots clés :** Interactions procaryotes-biotopes, cycle du fer, cycle du soufre, thermophiles, cultures en bioréacteurs, cultures en fioles, module de colonisation *in situ*, isotopie du fer, isotopie du soufre, systèmes hydrothermaux du Bassin de Guaymas.

## Summary

Active hydrothermal chimney and sediments of the Guaymas Basin (Mexico) host various microbial communities with different metabolisms, including those involved in biogeochemical cycles of sulfur and iron. It is established that, in these dynamic ecosystems, microbial activity depends on the availability of substrates in their environment and that prokaryotes could, in return locally affect the composition of the hydrothermal fluid and mineralogical composition of the chimney or sediment, by mediating the dissolution and / or precipitation of some mineral phases.

In order to study these prokaryotes-biotope interactions, and establish links between the structure, the activity and the isotopic signatures of microbial communities with the physico-chemical characteristics of hydrothermal systems of Guaymas Basin, a multidisciplinary approach based on the implementation of microbiology, geochemistry and isotope technics was performed using enrichment cultures in bioreactors and the study of the colonization of basaltic substrates.

This work led to: 1) characterize the diversity of microorganisms in different hydrothermal compartments (chimney and sediments) of the Guaymas Basin using both cultural and molecular approaches; 2) to decrypt the functioning of sulfur and iron biogeochemical cycles, by highlighting the occurrence, at high temperature and anaerobic condition, of sulfur-reducing, sulfate-reducing, sulfur-oxidizing and also iron-reducing and iron-oxidizing prokaryotes ; and 3) to better understand the prokaryote-mineral-fluid interactions by pointing out the role of microorganisms in environmental condition changes, mineral precipitation and their direct or indirect role in iron and sulfur isotope fractionation.

Thus these studies have demonstrated the importance of the cross-interactions between the different hydrothermal components: microbial communities, fluids (hydrothermal fluid, sediment pore water, sea water) and mineral structures.

**Keywords :** Prokaryote-biotope interactions, iron cycle, sulfur cycle, thermophilic micro-organisms, cultures in bioreactors, cultures in batch, *in situ* colonization module, iron isotope, sulfur isotope, hydrothermal systems of Guaymas Basin.

