



**HAL**  
open science

## Recherche sur l'injection de nouveaux gaz dans les stockages souterrains (RINGS)

Perla Haddad

► **To cite this version:**

Perla Haddad. Recherche sur l'injection de nouveaux gaz dans les stockages souterrains (RINGS). Génie des procédés. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2021. Français. NNT : 2021PAUU3046 . tel-03630734

**HAL Id: tel-03630734**

**<https://theses.hal.science/tel-03630734v1>**

Submitted on 5 Apr 2022

**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.

# THÈSE

**Université de Pau et des Pays de l'Adour**

Ecole Doctorale des Sciences Exactes et de leurs Applications

présentée par

**Perla HADDAD**

pour obtenir le grade de docteur

de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour

**Spécialité : Génie des Procédés**

---

## RECHERCHE SUR L'INJECTION DE NOUVEAUX GAZ DANS LES STOCKAGES SOUTERRAINS (RINGS)

---

Soutenance prévue le 7 Octobre 2021

### Membres du jury

BENEZETH Pascale	Université de Toulouse III	Rapporteuse
TAILLANDIER Patricia	INP Toulouse	Rapporteuse
COQUELET Christophe	Mines ParisTech	Président du jury
CAUMETTE Guilhem	Téréga	Examineur Invité
CHIQUET Pierre	Téréga	Examineur Invité
DEQUIDT David	Storengy	Examineur Invité
CASTERAN Franck	UPPA	Examineur Invité
CEZAC Pierre	UPPA	Directeur de thèse
RANCHOU-PEYRUSE Anthony	UPPA	Co-directeur de thèse









## Remerciements

Au tout début, je veux remercier les membres du jury présents à ma soutenance. Je remercie M. Christophe Coquelet d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je remercie Mme Pascale Bénézech et Mme Patricia Taillandier d'avoir pris le temps pour évaluer mes travaux de thèse. Je les remercie pour la discussion pertinente qui a suivi ma soutenance et l'échange qui était des plus enrichissants pour moi.

Je tiens à remercier les différents collaborateurs industriels avec qui j'ai pu travailler dans le cadre du projet RINGS notamment Teréga, Storengy, Snam et Enagas. Je remercie Pierre Chiquet et Guilhem Caumette de Teréga et David Dequidt de Storengy pour leur implication dans le projet comme dans la thèse, ainsi que pour la confiance qu'ils m'ont accordée pendant ces 3 ans. Nos échanges considérables nous ont souvent amenés à des discussions pertinentes ce qui m'a beaucoup appris sur le monde de stockage sous-terrain.

Je remercie mes directeurs de thèse qui ont rendu mon expérience exceptionnelle. Merci Pierre pour toute l'expérience scientifique et humaine que tu as pu me transmettre pendant cette thèse et pour ta bienveillance dans les moments les plus compliqués. Merci Anthony pour tout le temps que tu as pris pour pouvoir m'emmener sur le terrain de la microbiologie et pour ton ambition sans limite qui m'a appris à me surpasser. Merci Franck pour m'aider à faire connaissance avec les clés, le sens de serrage-desserrage et pour ta patience. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre soutien au quotidien, pour la motivation et la force que vous m'avez données notamment pendant les dernières semaines de rédaction de ce manuscrit.

Je veux remercier toutes les personnes qui ont travaillé sur RINGS et qui ont réussi à me rapprocher de leur discipline scientifique. Je pense à Marion G, Magali, Pascale, Peter, Marie-Pierre, Guilhem et Marie L dont le support scientifique et technique ont été des plus essentiels et importants dans mon travail. Je remercie aussi Jean-Michel, Marc, Jean et Marion D pour leur aide et leur disponibilité.

A toutes les personnes que j'ai rencontrées dans les différentes entités de l'UPPA, du LaTEP, de l'IPREM, de l'ENSGTI et de l'école doctorale, je vous remercie pour tous les bons moments passés ensemble. Je tiens à remercier Patricia et Jean-Michel pour leurs petites attentions quotidiennes et leur bonne humeur. J'espère que j'ai réussi à laisser ne serait-ce que le souvenir d'un sourire libanais après mon passage.

A mes collègues... je suis tellement contente d'avoir passé ces 3 ans avec vous !

Je remercie tous les doctorants que j'ai pu croiser et avec qui j'ai échangé sur des sujets allant des bactéries infimes jusqu'à la fin du monde en passant par le Covid, l'économie mondiale, les sorties sportives, les histoires d'amour et pleins d'autres.

Le plus grand Merci aux personnes qui ont rendu cette expérience exceptionnelle. Les souvenirs de nos activités, de nos fins de soirées et des moments moins rigolos resteront à toujours. Merci de coopérer avec la boule d'énergie que je suis! Merci Simon pour ta bienveillance et ton amitié même après ton départ. Merci Paulo, soleito, pour tous les débats enrichissants et toutes les bonnes paroles aux bons moments. Merci Lorène, Marion D et Sonia pour tous vos supports et conseils dans les moments les plus compliqués et votre bienveillance. Merci Marie, Queen, d'avoir été la grande sœur et toujours là quand il faut.

Ma Dream Team que je ne changerai jamais. Régis, merci pour ton originalité, pour toutes les discussions qu'on a eues et pour les meilleurs câlins que tu te forçais à faire. Pedrinho, merci pour tout le temps que tu passais à juste m'écouter, à me sourire et à tous tes conseils, guru. Cassie, ma petite, merci d'être toi, d'être ma sœur brésilienne et ma meilleure amie. Merci pour tous les moments sportifs, tous les sushi nights, toutes les soirées et les twerks et merci d'être là dans les moments moins cools.

Je remercie ma famille franco-libanaise que j'ai rencontrée dans un petit coin de la France, à Saint-Nazaire pour leur soutien, leur bienveillance et leur bonne humeur. Je remercie mes amis libanais, qui malgré les distances entre nous, leur force et motivation m'ont permise d'avancer jusqu'au bout.

Mes derniers remerciements sont à ma famille, sans laquelle je n'aurais jamais été capable d'être ce que je suis aujourd'hui. Je remercie ma maman qui m'a appris à croquer la vie à pleines dents et à donner toujours le meilleur de soi. Je remercie Zouz pour sa tendresse et sa motivation quotidienne. Je remercie Fady pour sa confiance, pour tout le temps qu'il m'accorde et l'amour à sa sœur qu'il aime le plus. Je remercie Joellita pour l'attention d'une grande sœur, et à Baby G d'être venu ajouter de l'amour dans nos vies. Merci à ma grande famille pour leur amour inconditionnel. Je ne pourrai jamais vous remercier assez.

A la fin, merci papa, mon ange gardien, pour tout ce que tu m'as appris et j'espère que tu es fier de moi.

Si on me demande de refaire une thèse, je ne voudrais rien changer à ces trois années!





## Résumé

---

Ces dernières années ont connu un développement très important des filières de production de biométhane et de dihydrogène ( $H_2$ ) afin de réduire l'utilisation des énergies fossiles. Dès aujourd'hui, et encore plus dans les années à venir, ces nouveaux gaz sont et seront injectés dans le réseau de gaz naturel de surface mais également dans les stockages géologiques qui lui sont connectés. Le biométhane peut être co-injecté avec de l' $O_2$  (jusqu'à 1% vol) utilisé pour réoxyder et éliminer les sulfures. Est-ce que ces nouveaux gaz injectés  $O_2$  et  $H_2$  (jusqu'à 10 %vol) dans les aquifères profonds auront des effets sur l'évolution du stockage ? L'objet du projet RINGS et de ce travail de doctorat est donc de répondre à cette question et d'estimer des seuils limites de  $O_2$  et de  $H_2$  dans le gaz stocké. Un réacteur Haute Pression a été spécifiquement conçu pour simuler le fonctionnement d'un aquifère de stockage en tenant compte des quatre phases : gazeuse, liquide, solide et microbiologique. Sur des expérimentations allant de 90 à 180 jours, des approches multidisciplinaires mêlant les procédés, la chimie analytique, la physico-chimie, l'imagerie et la microbiologie ont été associées afin d'évaluer les effets sur les quatre phases ciblées. Les premiers résultats montrent des effets importants sur les communautés microbiennes autochtones qui elles-mêmes affectent la physico-chimie de l'aquifère et donc sur l'évolution du stockage.

## Abstract

---

The last few years have seen very significant development of biomethane and hydrogen ( $H_2$ ) production channels in order to reduce the use of fossil fuels. As of today and even more in the years to come, these new gases are and will be injected in the natural gas grid but also in the geological storage facilities connected to it. Biomethane can be co-injected with  $O_2$  (up to 1% vol) that is added to re-oxidize and eliminate sulfide compounds. Will these new injected gases  $O_2$  and  $H_2$  (up to 10 % vol) have effects on the storage evolution in deep aquifers? RINGS project and this doctoral work aim therefore to answer this question and to estimate threshold limits of authorized  $O_2$  and  $H_2$  in the stored gas. A high-pressure reactor has been specifically designed to simulate the storage taking into account the four different phases of an aquifer: gas, liquid, solid and microbiological phases. Throughout experiments lasting between 90 and 180 days, multidisciplinary approaches combining process, analytical chemistry, physical chemistry, imaging and microbiology were applied to assess the effects on the four-targeted phases. The first results show significant effects on autochthonous microbial communities that affect the physico-chemistry of the aquifer and therefore the storage evolution.



## Table des matières

<b>Introduction et contexte de l'étude</b>	21
<b>Chapitre 1. Etude bibliographique</b>	5
I- Les stockages de gaz souterrain	7
Les aquifères profonds en France	8
II- Introduction aux nouveaux gaz	10
III- La problématique du biométhane dans le cadre du stockage en aquifères profonds	11
III.1- Introduction générale sur le biométhane	11
III.2- Développement du biométhane en Europe et en France	12
III.3- Biogaz et dioxygène	13
IV- La problématique du dihydrogène dans le cadre du stockage en aquifères profonds	16
IV.1- Introduction générale sur le dihydrogène	16
IV.2- Développement du dihydrogène en Europe et en France	20
V- Ecologie microbienne liée à la biosphère profonde continentale	22
V.1- Les microorganismes sulfato-réducteurs	26
V.2- Les microorganismes fermentaires	30
V.3- Les archées méthanogènes	32
V.4- Les bactéries homo-acétogènes	34
V.5- Les microorganismes affiliés à des métabolismes aérobies retrouvés dans le sous-sol profond	35
VI- Effets de l'injection du dioxygène sur la microflore du sous-sol	36
VI.1- Bio remédiation avec injection de O <sub>2</sub>	36
VI.2- O <sub>2</sub> comme contaminant de l'injection de CO <sub>2</sub>	37
VI.3- Enhanced Oil Recovery	38
VII- Conclusions	40
<b>Chapitre 2. Matériels et Méthodes</b>	41
I- Pilote expérimental	43
I.1- Présentation du pilote	43
I.2- Instruments de mesure sur le réacteur	45
II- Méthode expérimentale	47
II.1- Protocole de lancement d'une expérience	47
II.2- Protocole d'arrêt de l'expérience	53
III- Techniques et méthodes de mesure	54
III.1- Balances électroniques	54

III.2-	Chromatographie gazeuse	54
III.3-	Chromatographie ionique	55
III.4-	Quantification du benzène et du toluène	56
III.5-	Tomographie du solide	57
III.6-	Minéralogie	59
III.7-	Techniques de microbiologie	60
III.8-	Techniques de biologie moléculaire	65
III.9-	Techniques de microscopie	72
III.10-	Analyses physico-chimiques supplémentaires	73
IV-	Modélisation thermodynamique	75
	Modèles de description de l'équilibre liquide-vapeur	75
	Modèles de description du coefficient d'activité	77
V-	Produits chimiques	78
VI-	Conclusions	83
<b>Chapitre 3. Effet de l'injection du dioxygène dans les aquifères dans le cadre de stockage du biométhane</b>		<b>85</b>
I-	Introduction du chapitre	87
II-	Abstract	90
III-	Introduction	91
IV-	Materials and methods	93
IV.1-	Site description and water formation characteristics	93
IV.2-	High-pressure reactor	94
IV.3-	Physico-chemical analyses	96
IV.4-	Treatment of the solid phase	97
IV.5-	Thermodynamic modelling	98
IV.6-	Cell culture media, strains isolation and brief characterization	98
IV.7-	Nucleic acids extraction and RNA retro-transcription	99
IV.8-	Polymerase chain reaction and sequencing	100
IV.9-	Quantitative PCR	100
IV.10-	X-Ray Tomography	101
IV.11-	X-Ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy	101
V-	Results	102
V.1-	Monitoring of the physico-chemical evolution during abiotic experiments	102
V.2-	Monitoring of the physico-chemical evolution in the liquid phase during biotic experiment	102

V.3-	Monitoring of the physico-chemical evolution in the gas phase during biotic experiment _____	106
V.4-	Evolution of the bacterial community during the experiment _____	107
V.5-	Evolution of the solid phase during the experiment _____	110
VI-	Discussion _____	113
VI.1-	Sampling and pre-incubation _____	114
VI.2-	Physicochemical and bacterial evolution before oxygen injection _____	114
VI.3-	Monoaromatic hydrocarbons biodegradation _____	116
VI.4-	Evolution of the four-phase system after oxygen injection _____	117
VII-	Conclusion _____	119
VIII-	Conclusion du chapitre _____	121
<b>Chapitre 4.</b>	<b>Effet de l'injection du dihydrogène dans les aquifères de stockage _____</b>	<b>123</b>
I-	Introduction du chapitre _____	125
II-	Abstract _____	128
III-	Introduction _____	129
IV-	Materials and methods _____	130
IV.1-	Site description and water formation characteristics _____	130
IV.2-	High-pressure reactor _____	131
IV.3-	Physico-chemical analyses _____	131
IV.4-	Treatment of the solid phase _____	131
IV.5-	Thermodynamic modelling _____	132
IV.6-	Nucleic acids extraction and RNA retro-transcription _____	132
IV.7-	Polymerase chain reaction and sequencing _____	132
IV.8-	Quantitative PCR _____	133
IV.9-	X-Ray Tomography _____	133
IV.10-	X-Ray Diffraction _____	134
V-	Results _____	135
V.1-	Monitoring of the physico-chemical evolution during abiotic experiments _____	135
V.2-	Monitoring of the physico-chemical evolution in the liquid phase during biotic experiment _____	135
V.3-	Monitoring of the physico-chemical evolution in the gas phase during biotic experiment _____	139
V.4-	Evolution of the bacterial community during the experiment _____	140
V.5-	Evolution of the solid phase during the experiment _____	142
VI-	Discussion _____	146

VI.1- Physicochemical and bacterial evolution before hydrogen injection _____	147
VI.2- Physicochemical and bacterial evolution after hydrogen injection before sulfate depletion _____	147
VI.3- Physicochemical and bacterial evolution after hydrogen injection and sulfate depletion _____	148
VI.4- Physicochemical and bacterial evolution after hydrogen injection, sulfate and carbon dioxide depletion _____	149
VII- Conclusion _____	150
VIII- Conclusion du chapitre _____	151
<b>Conclusion générale et perspectives</b> _____	153
<b>Références bibliographiques</b> _____	161
<b>Annexe</b> _____	179

## Liste des figures

Figure 1 - Présentation des réseaux de transport, de stockage et compression de gaz naturel en France, situation au 31 décembre 2019[1]	8
Figure 2 - Schéma représentant les différentes couches d'un aquifère de stockage ( <a href="https://www.storengy.com/en/our-jobs/underground-gas-storage/our-types-storage-facilities">https://www.storengy.com/en/our-jobs/underground-gas-storage/our-types-storage-facilities</a> )	9
Figure 3 - Evolution du nombre d'installations de biométhane en France ("Panorama du gaz renouvelable en 2018," 2018)	12
Figure 4 - (a) Schéma du tambour flottant pour le stockage de biogaz. (b) Schéma du processus de stockage du biométhane dans des citernes à haute pression.	13
Figure 5 - Schéma conceptuel du SLiME (Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystems)	24
Figure 6 - Dégradation séquentielle de la matière organique en présence (A) et en absence (B) de sulfate (modifié d'après (Muyzer and Stams, 2008))	24
Figure 7 - A- voie de dégradation du toluène en anaérobiose (Kube et al., 2004); B- mécanismes d'activation du benzène supposés en anaérobiose, 1 : hydroxylation, 2 : méthylation et 3 : carboxylation (Weelink et al., 2010)).	30
Figure 8 - Schéma du pilote expérimental	44
Figure 9 - Photo du pilote expérimental utilisé avec à droite de la photo la chromatographie ionique et à gauche la chromatographie gazeuse.	46
Figure 10 - Disposition des capillaires de sable dans le panier pour l'expérience de CH <sub>4</sub> -1% CO <sub>2</sub> -1% O <sub>2</sub> . La numérotation permet, à la fin de l'expérience, de récupérer les capillaires analysés avant l'expérience.	49
Figure 11 – Remplissage du capillaire en borosilicate de coton et de sable.	50
Figure 12 - Schéma représentant l'injection de liquide dans le réacteur en utilisant un réacteur mobile.	51
Figure 13- Processus de prélèvement de l'échantillon de gaz avant injection dans la microGC.	55
Figure 14- Fonctionnement de l'analyse élémentaire GC/MS.	57
Figure 15- Scheme of the experimental apparatus used during this experiment	96



Figure 16- Results of the liquid and gas analyses during the biotic high pressure experiment (60 bar). The vertical line at day 6 represents the CH<sub>4</sub>+CO<sub>2</sub> reinjection. The vertical dotted lines at days 48, 104 and 126 represent sulfate injections. The vertical line at day 132 represents the oxygen injection. a) Sulfate variation in the liquid phase; b) Acetate variation in the liquid phase; c) Toluene (represented by the blue squares) and benzene (represented by the red triangles) variations in the liquid phase. The vertical line at day 47 represents toluene injection. d) Methane variation in the gas phase. The red dots and line represent the calculated values; e) Carbon dioxide (represented by the green squares) and oxygen (represented by the red triangles) variations in the gas phase). The lines represent the calculated values. f) Hydrogen variation in the gas phase. \_\_\_\_\_ 105

Figure 17 – Evolution of the bacterial community during the incubation at 60 bar, 36 °C and with a gas mixture (CH<sub>4</sub>, 1% CO<sub>2</sub>, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene) before and after oxygen injection (1%). The taxonomic diversity is monitored by 16S rRNA genes sequencing and the quantification is estimated by qPCR of 16S RDNA gene copies for each mL of sampled water through the experiment. 17a) Monitoring over 180 days of the experiment. Following the injection of oxygen, the quantity of microorganisms has drastically decreased. In order to observe the taxonomic diversity, the boxed part is zoomed in figure 17b. The variation of the sulfate quantity in the liquid phase is represented with the orange dots. Figure 17b- represents a zoom in on results after O<sub>2</sub> injection. \_\_\_\_\_ 109

Figure 18 – Evolution of the active bacterial community (during the incubation at 60 bar, 36 °C with a gas mixture (CH<sub>4</sub>, 1% CO<sub>2</sub>, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene) before and after oxygen injection (1%). The taxonomic diversity is based on the sequencing of cDNA of the 16S RDNA copies and the quantification was estimated by qPCR of CDNA for each mL of sampled water through the experiment. Standard deviation are presented in Table 20. \_\_\_\_\_ 109

Figure 19 - X-ray diffraction patterns of samples collected before the experiment (t<sub>0</sub>) and after the experiment at three depths (top, middle and bottom of the solid basket). I: illite, K: kaolinite, M: maghemite, Q: quartz, C: calcite, Ms: marcasite, P: pyrite. \_\_\_\_\_ 111

Figure 20 – SEM-EDX observations from surface samples collected at the end of experiment showing clay minerals and quartz (A, SE mode) and observation of iron sulfides (B, BSE mode). \_\_\_\_\_ 112

Figure 21 - Results of the liquid and gas analyses during the biotic high-pressure experiment. The vertical line at day 10 represents the CH<sub>4</sub>+CO<sub>2</sub> reinjection. The vertical dotted lines at day 21 represents hydrogen injection. The vertical line at day 52 represents the water formation injection. a) Sulfate variation in the liquid phase; b) Formate variation in the liquid phase; c) Acetate variation in the liquid phase. d) Methane variation in the gas phase. The red squares and line represent the calculated values; e) Carbon dioxide variation in the gas phase. The blue dots and line represent the calculated values. f) Hydrogen variation in the gas phase. The green dots and line represent the calculated values. \_\_\_\_\_ 138

Figure 22 – Evolution of the microbial community during the incubation at 47 °C, at 85 bar (CH<sub>4</sub>, 1% CO<sub>2</sub>, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene) before and after hydrogen injection (95 bar with 10 % H<sub>2</sub>). The taxonomic diversity is monitored by 16S rRNA genes sequencing performed on aqueous phase sampled from the reactor throughout the experiment. \_\_\_\_\_ 143

Figure 23 – Quantitative evolution of the microbial community during the incubation at 47 °C, at 85 bar (CH<sub>4</sub>, 1% CO<sub>2</sub>, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene) before and after hydrogen injection (95 bar with 10 % H<sub>2</sub>). The quantification is estimated by qPCR of 16S rDNA gene copies for each mL of sampled water through the experiment. \_\_\_\_ 144

Figure 24 –Microbial community after the incubation at 47 °C, at 85 bar (CH<sub>4</sub>, 1% CO<sub>2</sub>, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene) followed by hydrogen injection (95 bar with 10 % H<sub>2</sub>). The taxonomic diversity is monitored by 16S rRNA genes sequencing performed on different heights of the solid phase at the end of the experiment. \_\_\_\_\_ 145

## Liste des tableaux

Tableau 1: Compositions du biogaz, du biométhane et du gaz naturel _____	14
Tableau 2: Propriétés physico-chimiques et compositions détaillées des eaux de formations Ab_L_1 et Pb_T_1 utilisées. _____	47
Tableau 3: Préparation de solutions de sulfates injectées au cours de l'expérience CH <sub>4</sub> - 1% CO <sub>2</sub> - % O <sub>2</sub> . _____	48
Tableau 4: Position du piston en fonction du volume de liquide dans le réacteur _____	52
Tableau 5: Milieux de culture pour les dénombrements selon la technique du Nombre le Plus Probable (NPP) _____	60
Tableau 6: Composition des différents milieux synthétiques utilisés lors de cette étude. Les compositions à droite du tableau correspondent aux milieux préparés pour la culture des souches isolées pendant les expériences. _____	62
Tableau 7: Prélèvements réalisés en vue des études de diversité microbienne durant l'expérience de CH <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> -O <sub>2</sub> . _____	65
Tableau 8: Prélèvements réalisés en vue des études de diversité microbienne durant l'expérience de CH <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> . _____	66
Tableau 9: Programmes utilisés en PCR et qPCR. _____	68
Tableau 10: Amorces utilisés en PCR et qPCR _____	69
Tableau 11: Programme utilisé en PCR et qPCR. _____	70
Tableau 12: Amorces utilisés en PCR et qPCR. _____	70
Tableau 13: Volumes et techniques de prélèvement des différents échantillons analysés par UT2A. _____	74
Tableau 14: Produits chimiques utilisés dans le cadre de nos travaux expérimentaux. _____	78
Tableau 15: Produits chimiques utilisés pour les milieux de culture en microbiologie. _____	80
Tableau 16: Produits chimiques composants le SeW pour les milieux de culture en microbiologie. _____	81
Tableau 17: Produits chimiques composants la solution oligo-éléments SL10 pour les milieux de culture en microbiologie. _____	81

Tableau 18: Produits chimiques composants la solution de vitamines V10 pour les milieux de culture en microbiologie. \_\_\_\_\_ 82

Table 19: Physico-chemical parameters and compounds of the formation water sampled from the deep aquifer (Ab\_L\_1 site), analyzed at atmospheric pressure. \_\_\_\_\_ 94

Table 20: Standard deviation related to the 16S rRNA transcripts. \_\_\_\_\_ 110

Table 21: Physico-chemical parameters and compounds of the formation water sampled from the deep aquifer (Pb\_T\_1 site), analyzed at atmospheric pressure. \_\_\_\_\_ 137



*Introduction et contexte de l'étude*

---



Afin de freiner les émissions croissantes de gaz à effet de serre, des filières d'alternatives aux combustibles fossiles se développent depuis plusieurs années. Et dans les prochaines années, un développement de ce qui est appelé « nouveaux gaz » est attendu tels que le biométhane (pouvant contenir du dioxygène) et le dihydrogène produit par électrolyse avec de l'électricité d'origine renouvelable. Ces nouveaux gaz pourront être amenés à circuler *via* le réseau de transport de gaz naturel, représentant un pourcentage croissant avec le développement des filières.

Storengy et Teréga sont les deux opérateurs français principaux de stockage de gaz naturel dans des structures géologiques profondes de très grandes capacités, tels que les aquifères souterrains profonds. Le gaz naturel, bien que principalement composé de méthane et autres hydrocarbures peut contenir quelques pourcentages d'azote et de dioxyde de carbone. Depuis 1998, les deux opérateurs poursuivent un ambitieux programme de recherche destiné notamment à évaluer les interactions entre les micro-organismes autochtones et le stockage de gaz naturel en aquifère. Ils souhaitent poursuivre le développement de leur connaissance et anticiper le comportement des nouveaux gaz dans leurs stockages en aquifères profonds. Il est donc nécessaire d'identifier et de quantifier les processus biogéochimiques entre le gaz stocké, l'eau de l'aquifère et la roche réservoir afin de définir *in fine* une teneur limite acceptable en dioxygène et en dihydrogène dans le gaz injecté dans les stockages.

Le projet RINGS est un projet pluridisciplinaire et implique des laboratoires de l'UPPA présentant des champs d'expertise complémentaires dans les domaines analytiques, microbiologique, minéralogique, de l'imagerie et des procédés, et à même de répondre aux objectifs des deux opérateurs. Lors de la première des quatre années du projet RINGS, un réacteur haute-pression a été développé spécifiquement afin de simuler au mieux les conditions *in situ* des sites d'étude cibles. Mon recrutement a eu lieu sur la fin de cette première année et j'ai ainsi pu commencer rapidement à prendre en main et étalonner le réacteur et les instruments analytiques associés. Mon travail durant ce doctorat mêle étroitement les approches procédés et microbiologiques afin de comprendre et de relier les activités microbiennes observées avec l'évolution des conditions physico-chimiques au sein du réacteur simulant les stockages en profondeur. A ce jour, trois scénarios d'injection ont été testés dans le cadre de ce travail de doctorat mais seulement deux seront présentés dans le manuscrit, le dernier cas d'étude étant en train de s'achever au moment de cette rédaction.



Ce manuscrit est composé de cinq chapitres dont deux sont présentés sous forme de publication :

- Le premier chapitre de ce manuscrit décrit dans un premier temps le contexte de l'étude en faisant des focus sur l'activité de stockage de gaz naturel en aquifères profonds, et le développement des filières de biométhane et de dihydrogène. Dans un second temps, les groupes microbiens majeurs des aquifères profonds et susceptibles d'avoir un rôle clé dans les problématiques du projet seront également présentés.
- Le deuxième chapitre détaille le dispositif expérimental employé au cours des expériences, les protocoles opératoires suivis ainsi que les différentes techniques d'analyse utilisées. Le recours à la modélisation thermodynamique était indispensable par manque de données expérimentales correspondantes à nos conditions de travail. Ainsi, le logiciel PhreeqC utilisé au cours des deux études est présenté dans ce chapitre.
- Le troisième chapitre est sous la forme d'un article scientifique. Les résultats de l'étude des effets du dioxygène lors du stockage du biométhane dans les aquifères profonds y sont présentés. L'article est intitulé « Biological, Geological and Chemical Effects of Oxygen Injection in Underground Gas Storage Aquifers in the setting of Biomethane Deployment ».
- Le quatrième chapitre est également présenté sous la forme d'un article scientifique quant à lui en préparation et est intitulé : « Geological storage of Hydrogen in deep aquifers : towards artificial SLiMEs ».
- Le dernier chapitre présente une conclusion générale et les perspectives de ce travail de doctorat.

*Chapitre 1.*  
*Etude bibliographique*

---



Depuis des centaines d'années, l'utilisation du gaz, du pétrole et de l'électricité a changé le monde et le mode de vie des hommes. Depuis cette ère d'industrialisation, la consommation énergétique ne cesse de croître. Aujourd'hui, avec les données alarmantes sur le changement climatique, de nouvelles ressources d'énergie verte émergent pour substituer les combustibles fossiles et subvenir aux besoins des activités humaines. Le biométhane et le dihydrogène forment deux ressources prometteuses pour remplacer le gaz naturel. Afin d'assurer cette transition, le projet RINGS s'intéresse à l'étude des effets de ces gaz verts dans les stockages souterrains.

## I- Les stockages de gaz souterrain

La consommation d'énergie primaire en France augmente depuis les années 60 et a atteint 245 Mtep\* en 2019. Le gaz naturel correspond à 15,2 % de cette consommation ("Chiffres clés de l'énergie - Édition 2020"). La consommation de ce gaz est en croissance et atteint aujourd'hui une moyenne de 40 milliards de m<sup>3</sup> par an. Les parts des secteurs résidentiels et industriels forment les parts les plus importantes de cette consommation, 29,1 % et 32,6 % respectivement. La plus grande quantité de gaz naturel consommée est importée notamment de la Norvège (42,4 % en 2015, 36 % en 2020). Elle est suivie par la Russie (20 %), les Pays-Bas (8%), le Nigeria (8%), l'Algérie (7%) et le Qatar (4%) qui sont aussi des fournisseurs importants pour l'approvisionnement de la France. L'acheminement du gaz s'effectue tout au long de l'année. Afin de répondre à la variation de la demande, une partie des volumes importés est stockée pour satisfaire la demande en hausse ("Chiffres clés de l'énergie - Édition 2020"). On distingue trois types de structures géologiques susceptibles d'abriter un stockage de gaz naturel : les aquifères, les gisements déplétés et les cavités salines. Les deux premières sont celles qui permettent de stocker le plus de gaz mais impliquent de fortes contraintes liées à la porosité et à la perméabilité du milieu. Les cavités salines ne présentent pas cet inconvénient, mais ont une capacité réduite, elles sont utilisées pour des besoins immédiats mais ponctuels (consommation de pointe). Peu de gisements déplétés étant recensés en France, le stockage est donc réalisé en aquifères. Les volumes stockés en sous-sol assurent plus de 50 % de la consommation française hivernale (INERIS, 2016). Ainsi, une quinzaine de sites de stockage souterrain de gaz naturel sont répartis sur toute la France. Sur ces quinze sites, douze sont des nappes aquifères et trois sont des cavités salines. La localisation de ces sites de stockage ainsi que les réseaux de transport sont présentés dans la Figure 1 ("Chiffres clés de l'énergie - Édition 2020").

---

\*Mtep : Million de tonnes équivalent pétrole

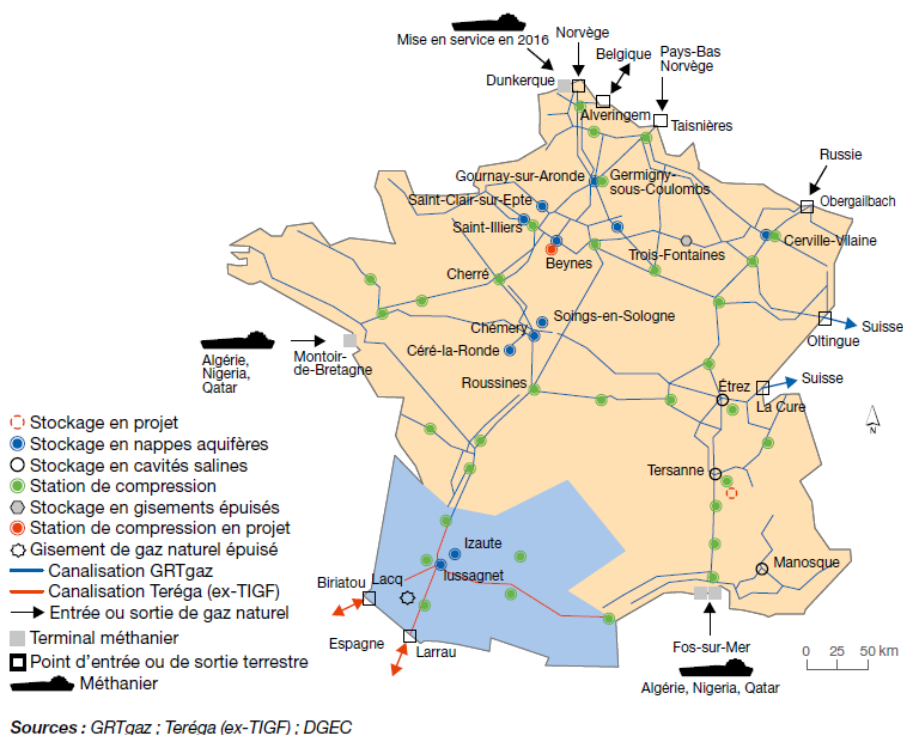


Figure 1 - Présentation des réseaux de transport, de stockage et compression de gaz naturel en France, situation au 31 décembre 2019

Ces réservoirs souterrains présentent plusieurs avantages. D'une part, leurs grands volumes permettent un stockage massif de millions, voire de milliards de Nm<sup>3</sup> de gaz. Ainsi, la capacité à maintenir ce gaz sous haute pression est un avantage pour accroître les volumes stockés. D'autre part, ces stockages à plusieurs centaines de mètres de profondeur sont des installations fiables et sécurisées avec une faible emprise en surface (Gombert et al., 2019).

- Les aquifères profonds en France

Un aquifère est une strate géologique poreuse (sables, grès, calcaires, etc.) contenant de l'eau à l'intérieur des pores. Ainsi, pour que l'aquifère soit adapté à un stockage de gaz souterrain aussi nommé UGS (underground gas storage), plusieurs critères s'imposent (Figure 2). Parmi les critères géologiques, la présence d'une couche de couverture imperméable au futur gaz stocké est indispensable, ainsi que la présence d'une structure anticlinale favorisant le stockage. La porosité et la perméabilité doivent être suffisantes pour permettre un stockage aisé. Les profondeurs visées pour le stockage peuvent aller jusqu'à 2000 mètres. Le stockage en aquifère consiste à injecter le gaz à une pression supérieure à celle de l'eau présente dans les pores afin de la repousser et de la remplacer (INERIS, 2016). Le gaz injecté, peu miscible à l'eau présente dans la structure poreuse, forme une phase séparée : on parle alors de « bulle de gaz ». Cependant, le gaz peut toujours interférer avec la phase liquide présente, ainsi qu'avec la phase minérale composant les roches (Bauer et al., 2013).

Le stockage de gaz en aquifères profonds est un procédé industriel éprouvé puisque le premier sur le territoire a été réalisé en 1956 à Beynes par Gaz de France. Aujourd'hui, il existe une douzaine de sites de stockage en aquifères totalisant un volume utile de 11 milliards de Nm<sup>3</sup> de gaz naturel (Gombert et al.,; INERIS, 2016).

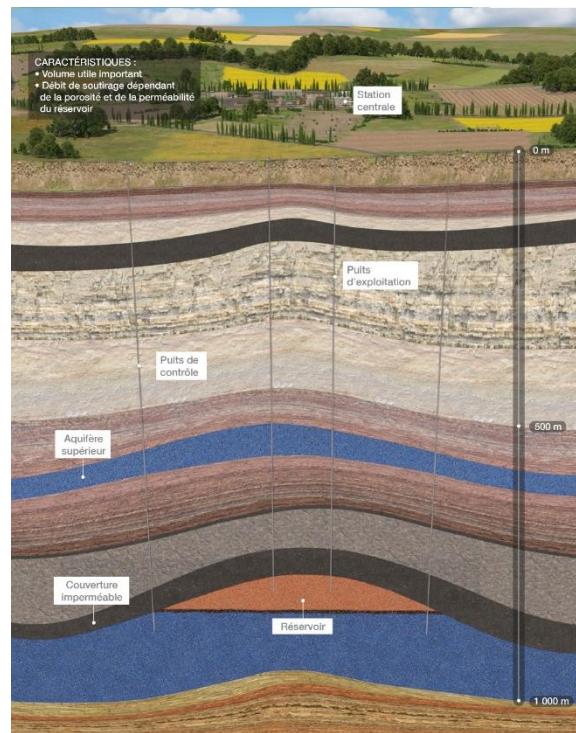


Figure 2 - Schéma représentant les différentes couches d'un aquifère de stockage  
<https://www.storengv.com/en/our-jobs/underground-gas-storage/our-types-storage-facilities>

Les critères physico-chimiques ont un rôle important durant l'étude et le déroulement du stockage. La pression et la température de l'aquifère influent directement sur l'équilibre du stockage. La salinité de l'eau souterraine et le type de roches ont un effet direct sur les interactions gaz-liquide-solide. De plus, le pH et le potentiel d'oxydoréduction sont des paramètres chimiques à prendre en compte.

## II- Introduction aux nouveaux gaz

Afin de limiter le changement climatique, plusieurs actions sont menées afin de contraindre le réchauffement de la planète à un niveau inférieur à 2 °C par rapport aux niveaux préindustriels. Dans le cadre de l'Accord de Paris de 2016, la France s'est fixée comme objectif que 32% de sa consommation énergétique soit d'origine renouvelable d'ici 2030 et que 10% de la consommation de gaz soit du biogaz ou du dihydrogène (Power-to-Gas). Cela implique de multiplier par 5 la production de gaz renouvelable par rapport à 2017, avec une production de 32 TWH en 2028, selon le Ministère de la transition écologique et solidaire (2018). Dans le cas du méthane, ce dernier doit donc être de moins en moins issu des réserves fossiles séquestrées dans les profondeurs depuis des millions d'années. Le recours à des ressources renouvelables entraîne ainsi une recirculation du carbone dans les écosystèmes de surface. La transformation du carbone déjà présent en surface doit permettre de limiter notre impact tout en maintenant des approvisionnements énergétiques pour nos sociétés, participant ainsi à la transition énergétique vers des énergies décarbonées et renouvelables.

Ainsi, l'objectif est de diminuer le volume de gaz naturel utilisé au profit du biogaz et du dihydrogène (H<sub>2</sub>). L'utilisation de ces nouveaux gaz présente un manque de connaissances sur certaines problématiques peu étudiées et peu prises en considération jusqu'à présent. Un de ces sujets est l'effet du stockage de ces nouveaux gaz dans les aquifères profonds pendant les périodes de faible consommation. En effet, l'injection de ces nouveaux gaz dans les réseaux gaziers interconnectés aux niveaux national et international pose la question de leur arrivée massive dans les stockages souterrains. Leurs effets éventuels dans les aquifères profonds restent incertains à ce jour. Afin de comprendre cet aspect du stockage, le projet RINGS s'intéresse à reproduire le stockage du biométhane et du dihydrogène dans un aquifère UGS, dans des conditions similaires à celles *in-situ*.

### III- La problématique du biométhane dans le cadre du stockage en aquifères profonds

#### III.1- Introduction générale sur le biométhane

Le biométhane a le mérite d'être une ressource ( $\text{CH}_4$ ) similaire au gaz naturel et qui peut donc être utilisée avec les installations existantes. Recyclant le carbone déjà présent dans les écosystèmes de surface, le biogaz est donc une alternative intéressante aux combustibles fossiles, lors d'une transition énergétique, dans la production de chaleur, d'électricité ou pour le transport (Kukoyi, 2015; McPhail et al., 2012; Paolini et al., 2018; Renewable Resources Co, 2016).

Le biogaz est produit à partir de la dégradation microbienne de la biomasse dans des conditions anoxiques. La biomasse dégradée peut être :

- les substrats agricoles comme les lisiers agricoles ou déchets de récolte,
- les déchets ménagers,
- et/ou les déchets organiques récupérés des industries, comme des sous-produits de transformation des aliments (Wellinger et al., 2013).

L'utilisation du biogaz participe à la gestion durable des déchets, ainsi qu'à la diminution des émissions des gaz à effet de serre puisqu'il est issu du carbone atmosphérique fixé par la photosynthèse et à l'origine de la biomasse transformée (Barik et al., 2013; Koornneef et al., 2013; Li et al., 2017; McPhail et al., 2012; Paolini et al., 2018; Urriza-Arsuaga et al., 2019; Wellinger et al., 2013). Une fois produit, le biogaz nécessite un traitement de purification. A sa production, le biogaz est principalement composé d'un mélange de méthane  $\text{CH}_4$  (50-75 %) et de dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$  (25-50 %). D'autres gaz sont présents avec des quantités variables comme le dioxygène  $\text{O}_2$ , le sulfure d'hydrogène  $\text{H}_2\text{S}$ , ainsi que de l'eau (Barik et al., 2013; Li et al., 2017). Le biogaz est traité pour donner le biométhane, qui présente des propriétés presque similaires au gaz naturel. Ce biométhane peut contenir jusqu'à 1,5 % volumique d' $\text{O}_2$  (Barik et al., 2013). L'analyse du cycle de vie du biométhane montre que le développement de ce secteur et le remplacement du gaz naturel diminuent les émissions de  $\text{CO}_2$ . Plus spécifiquement, pour chaque kilowattheure (KWh) de biométhane produit, injecté et consommé, une économie sur les émissions de gaz à effet de serre d'une valeur de 188 grammes équivalent de  $\text{CO}_2$  est effectuée (ENEA Consulting, 2017; *Renewable Gas French Panorama*, 2016). Il est estimé que d'ici 2050, la bioénergie pourrait contribuer durablement pour au moins un tiers d'approvisionnement de l'énergie primaire mondiale (McPhail et al., 2012).



### III.2- Développement du biométhane en Europe et en France

Avant l'Accord de Paris et dès 2012, l'Union Européenne (UE) avait établi un nouveau schéma de travail. Ces orientations doivent permettre d'arriver à une réduction de 80 à 95 % des émissions de gaz à effet de serre en 2050 en se référant aux émissions de 1990. A cette fin, l'utilisation des énergies renouvelables devra atteindre entre 55 et 75 % de la consommation finale d'énergie brute de l'UE. En comparant la part des sources renouvelables dans la consommation globale d'énergie de l'UE entre 2005 et 2015, le pourcentage est passé de 8,5 % à 17 %. Cette valeur fixée à 20 % pour 2020 (Scarlat et al., 2018), a atteint 19,7 % en 2019 (Collet, 2020) devra atteindre 32% en 2030 (European Biogas Association, 2019). Dans leur dernière étude, France Biométhane et SIA partners notent que plus de 80% des unités de production de biométhane dans 11 pays européens sont désormais connectées aux réseaux de gaz nationaux ("Biométhane en Europe: Progression à deux vitesses," 2019).

En France, le développement du secteur du biogaz est prometteur et a été initié en 2000 (Torrijos, 2016). A la fin de 2017, 35 sites ont commencé à injecter du biométhane dans les réseaux de gaz, pour une valeur équivalente à 0,05 % de la consommation totale en gaz naturel (ENEA Consulting, 2017). Avec les centaines de projets prévus, le gouvernement français a décidé, en avril 2020, de fixer un objectif de 7 % à atteindre en 2030 (ENEA Consulting, 2017; Maxime Lemonde, 2018). Le nombre d'installations de biométhane a augmenté de 73 % en 2018 (76 sites) et la production a augmenté de 75 % (le total de capacité de production potentielle cumulée est de 14 TWh/an) par rapport à l'année 2017 (Lemonde, 2018; "Panorama du gaz renouvelable en 2018," 2018). La Figure 3 montre l'augmentation du nombre d'installations injectant du biométhane en France. Les installations ont injecté une quantité de biométhane dans les réseaux de distribution français qui a atteint 714 GWh en 2018, soit 76 % de plus qu'en 2017 (Lemonde, 2018) et 2 177 GWh/an en fin d'année 2019 (123 installations) ("Chiffres clés de l'énergie - Édition 2020").

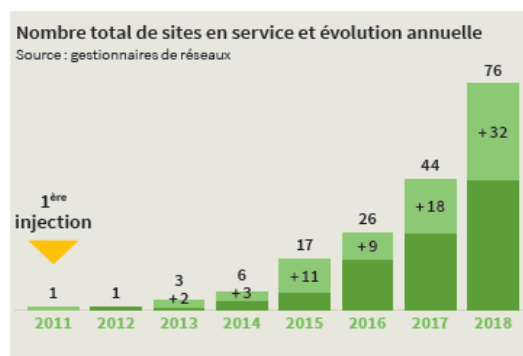


Figure 3 - Evolution du nombre d'installations de biométhane en France  
("Panorama du gaz renouvelable en 2018," 2018)

Avec le développement de ce secteur, les quantités de biogaz produites sont amenées à augmenter. Pour les périodes de faible consommation, l'offre pourra dépasser la demande d'énergie ; à l'inverse, en période de pic de consommation le flux de production pourra être limitant. Afin d'assurer la résilience de ce secteur énergétique, il sera donc nécessaire de stocker le biométhane à la manière du gaz naturel aujourd'hui, à différents niveaux du réseau gazier. Plusieurs techniques de stockage de biogaz existent comme le stockage à basse pression (0,137 bar) dans les tambours flottants (Barik et al., 2013; *Bioénergie et sécurité alimentaire, Biogaz communautaire*, 2014) (schéma dans la Figure 4(a) (Rajendran *et al.*, 2012)) ou le stockage à pression moyenne (entre 0,137 et 13,78 bar). Ce stockage est similaire au stockage dans les réservoirs de propane typiques (17,2 bar).

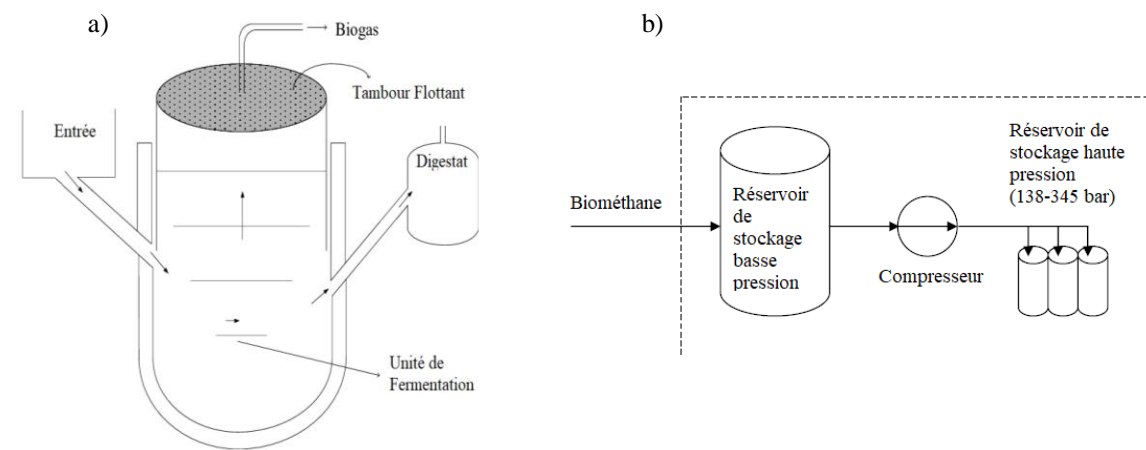


Figure 4 - (a) Schéma du tambour flottant pour le stockage de biogaz.  
(b) Schéma du processus de stockage du biométhane dans des citernes à haute pression.

Quant au stockage du biométhane, plusieurs options s'ajoutent comme le stockage à haute pression où le biométhane est comprimé entre 138 bar et 345 bar dans des citernes adaptées (schéma dans la Figure 4 (b) (Krich et al., 2005)). Le biométhane peut être aussi liquéfié et stocké (Krich et al., 2005). D'autres techniques de stockage de gaz sont utilisées aussi comme dans les canalisations du réseau de gaz, et dans les réservoirs géologiques. Ces derniers peuvent être des cavités salines, des réservoirs déplétés de gaz naturel et de pétrole, ou des aquifères profonds (Budzianowski and Brodacka, 2017).

### III.3- Biogaz et dioxygène

La principale différence entre le gaz naturel et le biogaz est la concentration de produits corrosifs. Le biogaz contient des concentrations de produits corrosifs plus élevées, comme le dioxygène et le dioxyde de carbone. La composition du biogaz varie en fonction de la biomasse utilisée en production. Principalement composé de méthane (50-80 %), le biogaz peut contenir

jusqu'à 50 % de CO<sub>2</sub>, 1,5 % de dioxygène O<sub>2</sub> (Herout et al., 2011; Rasi, 2009; Rasi et al., 2007) et du sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S (Barik et al., 2013; Latosov et al., 2018; Li et al., 2017). Le traitement de ce sulfure d'hydrogène présent dans le biogaz est un procédé indispensable. Connu pour ses effets corrosifs et nocifs, plusieurs techniques existent pour diminuer les concentrations d'H<sub>2</sub>S dans le biogaz. Une de ces techniques est la désulfuration biologique. Elle consiste à transformer chimiquement et biologiquement le sulfure d'hydrogène en sulfate en présence de dioxygène (Díaz et al., 2010). Ce traitement peut être consécutif à la production de biogaz ou incorporé à la production. En effet, dans certains cas, un système d'aération modérée est inclus dans le bioréacteur. Cela permet l'injection d'une faible quantité de dioxygène dans le système. Ainsi, l'oxydation de l'H<sub>2</sub>S est assurée sans diminuer l'efficacité de la digestion anaérobie (Botheju, 2011; Díaz et al., 2010). La désulfuration est principalement responsable de la présence de dioxygène dans le biogaz. Le tableau suivant présente la composition du gaz naturel, du biogaz et du biométhane (Nurjehan Ezzatul et al., 2018).

Tableau 1: Compositions du biogaz, du biométhane et du gaz naturel

Composition du gaz	Biogaz	Biométhane	Gaz naturel
Méthane	50 - 75 %	94 – 99,9 %	93 – 98 %
Dioxyde de carbone	25 – 45 %	0,1 – 4 %	1 %
Nitrogène	< 2 %	< 3 %	1 %
Dioxygène	< 2 %	< 1 %	-
Dihydrogène	< 1 %	-	-
Sulfure d'hydrogène	0,002 – 2 %	< 0,001 %	-

Certains composés plus abondants dans le biogaz que dans le gaz naturel, notamment le dioxygène, sont susceptibles d'interférer avec les milieux de stockage. A titre comparatif, le dioxygène présent dans le gaz naturel ne dépasse pas 0.02 % (Latosov et al., 2018). En France, la concentration maximale de dioxygène dans le gaz autorisée en entrée des stockages souterrains est pour l'instant fixée à 100 ppm (0,01 %) (AFNOR, 2016).

En effet, les aquifères profonds sont des environnements réduits dépourvus de dioxygène. L'absence de photosynthèse, ainsi que leur profondeur, protègent ces environnements de cet élément. Naturellement, le dioxygène présent à la surface est consommé par les réactions biogéochimiques dès les premiers mètres de profondeur. Sans traitement supplémentaire, il est

envisageable que de l'O<sub>2</sub> puisse être co-injecté avec le biométhane dans les aquifères de stockage. Or, le dioxygène est un élément très réactif qui va interagir avec les surfaces minérales réduites, la matière organique et les micro-organismes présents. Ainsi, le dioxygène intervient dans la plupart des réactions corrosives telle que la réaction d'oxydation du fer (Latosov et al., 2018). Or, la corrosion est un problème primordial à éviter dans le domaine du stockage sous-terrain. Les microorganismes strictement anaérobies tels que les sulfato-réducteurs ou les méthanogènes sont sensibles à l'O<sub>2</sub> qui leur est toxique. D'autres micro-organismes présentant des métabolismes aéro-anaérobies pourront au contraire être favorisés.

#### IV- La problématique du dihydrogène dans le cadre du stockage en aquifères profonds

##### IV.1- Introduction générale sur le dihydrogène

Le dihydrogène, dont le nom est communément simplifié en hydrogène ( $H_2$ ), est l'élément le plus abondant dans l'univers. Aujourd'hui, il est considéré comme un élément essentiel dans la transition énergétique. Son utilisation n'entraîne pas d'émission à effet de serre et cela lui confère un atout majeur pour remplacer à terme les combustibles fossiles (Barreto et al., 2003; Johnston et al., 2005). Le dihydrogène est un vecteur énergétique multi-usage. Il peut être utilisé directement dans les industries (Power-to-Industry), mélangé avec le gaz naturel ou le biométhane ou encore utilisé pour la méthanation (Power-to-Gas), stocké dans des piles à combustibles (Power-to-Power) ou utilisé dans les véhicules (Power-to-Mobility).

Dans le sous-sol, le dihydrogène peut être produit comme consommé. Plusieurs voies de production souterraine sont identifiées telles que :

- la graphitisation qui est la décomposition du méthane en graphite. Cette réaction se produit dans des socles cristallins à de très hautes températures, supérieures à 600 °C.
- la serpentinitisation qui est l'altération hydrothermale des silicates ferromagnésiens via des phénomènes d'oxydation et d'hydratation. Ce phénomène se produit à des températures entre 200 et 390 °C et produit de l' $H_2$  (Etiopie et al., 2017). Ou de manière générale, l'hydrothermalisme ou l'altération de minéraux riches en fer (avec oxydation du  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$ ).
- l'interaction de l'eau sur les surfaces minérales lors du broyage minéral (ou cataclase) au niveau de failles tectoniques (Martinez et al., 2019).
- la radiolyse de l'eau, par ionisation de cette molécule par des radionucléides tels l'uranium (U), le thorium (Th) et le potassium (K) (Blair et al., 2007).
- le dégazage magmatique.

En contexte océanique, la réaction d'altération des minéraux riches en fer a été bien décrite et est maintenant acceptée comme à l'origine de la production d' $H_2$  observée. Les flux d' $H_2$  produits aux événements via cette réaction ont été estimés en 2010 à 0,34 Tg  $H_2$ /an (Cannat et al., 2010) puis réévalués à la hausse en 2016 avec une valeur estimée à 2,4 Tg  $H_2$ /an (Worman et al., 2016). En contexte continental, aucune réaction de production d' $H_2$  n'a été identifiée à cause de la diversité de la roche. Les scientifiques estiment que là aussi, l'altération est le premier mécanisme abiotique capable de produire des flux importants d' $H_2$  sur de larges

échelles spatiales, puis visent la radiolyse qui se superpose souvent à l'altération sur les roches précambriennes de la croûte continentale (Sherwood Lollar et al., 2014).

Sur les zones intra-cratoniques, anciennes et stables, plusieurs lithologies et phases minérales ont été invoquées. C'est le cas par exemple des intrusions granitiques hyperalcalines des Lovozero, Khibiny (Péninsule de Kola, Russie), Ilimaussaq (Groenland) et Strange Lake (Canada) (Potter et al., 2013). Ce sont aussi sans doute des granites hyperalcalins identifiés récemment dans les forages effectués au Kansas, qui sont à l'origine de la forte production d' $H_2$  dans cette région (Guélard et al., 2017). A ces réactions physico-chimiques s'ajoute la production biotique souterraine (Gregory et al., 2019). Le dihydrogène produit par ces réactions est appelé l'hydrogène natif (Gaucher, 2020).

Le besoin énergétique a poussé à la recherche de procédés de production de dihydrogène. Le vaporeformage du gaz naturel à la vapeur d'eau est la technique la plus répandue. Elle permet d'obtenir du dihydrogène et du dioxyde de carbone à partir d'une réaction entre le méthane et l'eau. Le dihydrogène peut également être produit par combustion du charbon, connue par la gazéification. Ces deux techniques, bien qu'efficaces, émettent des quantités importantes de gaz à effet de serre (principalement CO et  $CO_2$ ) et imposent le développement de technologies de production 'vertes' ou *a minima* décarbonées pour lutter contre le changement climatique.

Ainsi, les électrolyseurs permettent de séparer l'oxygène et l'hydrogène d'une molécule d'eau. En utilisant de l'électricité fournie par l'énergie solaire, éolienne ou nucléaire, l'électrolyse de l'eau devient intéressante quant à la problématique du changement climatique. De nouvelles études combinant l'énergie solaire et géothermique, par exemple, se développent pour élargir les moyens de production à partir de sources d'énergie renouvelables (Kovač et al., 2021). Biologiquement, le dihydrogène est produit par des enzymes, les hydrogénases, à partir de molécules d'eau et de matière organique. Tous ces procédés sont importants notamment pour promouvoir le dihydrogène durable (Kovač et al., 2021) mais le plus prometteur est aujourd'hui celui de l'électrolyse de l'eau. Et pour que cet dihydrogène soit 'vert', l'utilisation d'électricité renouvelable est essentielle pour accomplir l'objectif de décarbonisation (Barreto et al., 2003; Kovač et al., 2021).

Le stockage du dihydrogène dans les UGS est un sujet qui a récemment suscité l'intérêt de par ses avantages. Cependant les effets de l'injection d' $H_2$  dans le sous-sol sont peu connus et peuvent être sources de problèmes indésirables, ou *a minima* de perte de gaz stocké (Ganzer et al., 2013). Les techniques de stockage du dihydrogène sont diverses. A petite et moyenne échelle, les technologies de compression et les systèmes de stockage par hydrures métalliques

sont bien efficaces (Kovač et al., 2021; Tarasov et al., 2021). A grande échelle, le dihydrogène est parfois stocké dans des réservoirs de stockage comme les cavernes salines et les pipelines souterrains (Johnston et al., 2005). L'utilisation des pipelines et du réseau de distribution déjà existants est d'un très grand avantage économique et temporel. Toutefois, le dihydrogène peut provoquer des problèmes de fragilisation des réseaux de transport et causer des fuites de gaz inflammable (Lins and de Almeida, 2012). L'injection du dihydrogène dans les infrastructures existantes, en le mélangeant au gaz naturel ou au biométhane, pourrait être une technique rentable et écologique (Kovač et al., 2021). Les caractéristiques des couches géologiques du réservoir ainsi que l'eau saturant les pores des roches de réservoirs permettent en principe de rendre imperméable le stockage même pour des petites molécules gazeuses comme le dihydrogène (Reitenbach et al., 2015). Les premiers stockages dans des cavités salines à Teesside en Angleterre (1982) et au Texas (1983) montrent que du dihydrogène à 95 % vol. peut être stocké dans les réservoirs souterrains pour de longues durées (Tarkowski, 2019).

Cependant, le dihydrogène peut réagir avec les différentes composantes du stockage. Si le dihydrogène semble présenter peu d'influence sur le quartz et le feldspath présents dans la phase solide (Flesch et al., 2018; Yekta et al., 2018), des réactions minéralogiques et/ou biologiques mènent à des altérations dans les caractéristiques bio-géo-chimiques du stockage et à des pertes des quantités gazeuses (Boersheim et al., 2019; Crotogino et al., 2010; Flesch et al., 2018; Hemme and van Berk, 2018; Lemieux et al., 2020; Reitenbach et al., 2015; Shi et al., 2020). Dans des expériences sur des roches de réservoir avec des flux de 13 % H<sub>2</sub>-87 % gaz naturel à 262 bar et à 80 °C, l'étude de la porosité et des caractéristiques minéralogiques ont présenté une faible évolution selon Shi et ses collaborateurs (Shi et al., 2020). La perméabilité des échantillons solides varie remarquablement et cette variation peut atteindre les 60 %. Ces roches de réservoir sont principalement composées de quartz avec de l'argile (entre 22 et 35 %) (Shi et al., 2020). Pour des roches de réservoir où les carbonates et les anhydrites sont peu présents, le dihydrogène a peu d'influence sur les caractéristiques de ces solides (Flesch et al., 2018). La porosité et la perméabilité sont susceptibles de varier en présence d'H<sub>2</sub> dû à la dissolution et la réaction de certains composés (Hemme and van Berk, 2018), notamment les roches riches en carbonates et anhydrites (Flesch et al., 2018).

En sous-sol, l'injection du dihydrogène peut susciter des modifications au niveau des métabolismes microbiens. En effet, le dihydrogène est une source d'énergie et un donneur d'électron pour de nombreux procaryotes (micro-organismes unicellulaires sans noyau regroupant les bactéries et les archées, deux domaines du vivant), notamment pour les archées méthanogènes hydrogénotrophes (Hagemann et al., 2016; Panfilov, 2010; Reitenbach et al.,

2015; Strobel et al., 2020; Tarkowski, 2019). La production de méthane par ces archées en sous-sol à partir du dihydrogène et de dioxyde de carbone est appelée la méthanogenèse ou encore bio-méthanation chez les industriels (Strobel et al., 2020). En effet, dans les mêmes conditions de pression et de température qu'un réservoir de stockage (températures inférieures à 120°C, limite de la vie à ce jour), la méthanogenèse peut être observée. Dans le cadre du projet Underground Sun Storage visant à stocker dans un réservoir d'hydrocarbures déplété du dihydrogène et du CO<sub>2</sub>, des analyses méta-génomiques (étude de l'ensemble des génomes d'une communauté microbienne) ont vu une augmentation de la proportion des méthanogènes jusqu'à atteindre 75 % de la communauté (Bauer, 2017). Cette proportion est remarquable quand on sait qu'à moins de 5 % de représentativité, une autre étude a montré qu'elle pouvait produire néanmoins suffisamment de méthane pour soutenir la croissance du reste de la communauté (Simkus et al., 2016). Des estimations sur la perte du dihydrogène due à la thermodynamique et aux réactions H<sub>2</sub>-eau de formation-minéraux ont été obtenues à l'aide de l'outil PhreeqC (Bo et al., 2021). Ces calculs ont montré que la perte d'H<sub>2</sub> due à la thermodynamique est très faible. Dans les aquifères composés de silicates et de minéraux argileux et sous une température de 30 °C, cette perte reste faible mais sa valeur peut atteindre 9,5 % après 30 ans de stockage. La perte de dihydrogène serait due à la dissociation de la calcite en carbonate, ce dernier réagirait avec les ions H<sup>+</sup> pour produire du méthane (Bo et al., 2021). En utilisant le même outil de simulation numérique, Hemme et ses collaborateurs ont décrit l'évolution du système de stockage du dihydrogène pur à 40 °C sous une pression de 40 atm (Hemme and van Berk, 2018). Dans cette étude, les interactions gaz-liquide-solide sont couplées aux deux métabolismes microbiens principaux : la sulfato-réduction et la méthanogenèse. En premier lieu, la sulfato-réduction s'arrête une fois les ions sulfates épuisés du milieu. Ainsi, le dioxyde de carbone présent en sous-sol et le dihydrogène de stockage servent pour les archées méthanogènes afin de produire du méthane. Après 30 ans de stockage, une quantité du dihydrogène estimée à 76 % du stockage cumulé sur trois décennies, a été consommée par les métabolismes microbiens, réactions chimiques et par la phase minérale. Une consommation de dioxyde de carbone, une production de méthane et de sulfure d'hydrogène ont ainsi été observées *via* les simulations avec PhreeqC (Hemme and van Berk, 2018). Des études appliquées sur les stockages sont donc nécessaires afin de déterminer toutes les interactions pouvant avoir lieu dans ces systèmes multiphasiques.

Aujourd'hui, la proportion de dihydrogène autorisée dans le réseau de gaz naturel diffère d'un pays à l'autre avec une valeur maximale de 10 % volumique (Ganzer et al., 2013) et bien que le réseau européen soit interconnecté. Le Danemark autorise 10 % volumique de



dihydrogène alors que la France baisse cette teneur à 6 % volumique. Tandis que la Suède, l'Italie et l'Angleterre gardent ce pourcentage similaire à celui retrouvé naturellement dans le gaz naturel, entre 0,1 et 0,5 % volumique (SINTEF, 2019).

#### IV.2- Développement du dihydrogène en Europe et en France

L'objectif de l'Union Européenne est d'atteindre une neutralité carbone à l'horizon de 2050. Afin de parvenir à cet objectif, le dihydrogène est un acteur clé de cette transition. La 'stratégie hydrogène pour une Europe climatiquement neutre' est développée par les différentes parties formant l'European Clean Hydrogen Alliance. L'objectif de cette alliance est de faciliter la coopération et de fixer les différentes étapes. La première phase de travail consiste à développer les capacités de production et les infrastructures de transport et de stockage de ce gaz d'ici 2024 avec l'objectif d'une production d'1 million de tonnes de dihydrogène vert dans l'UE. L'objectif suivant est d'atteindre 10 millions de tonnes de dihydrogène propre en 2030 jusqu'à arriver à l'utilisation de cet élément dans les secteurs les plus polluants comme l'aviation, le transport maritime et le chauffage/climatisation des bâtiments d'ici 2050 (European Commission, 2020). Comme abordé précédemment, la technique principale de production de dihydrogène adoptée par l'UE est l'électrolyse (Kovač et al., 2021).

Depuis 2018, la France a déployé un plan dihydrogène pour soutenir cette cause. Trois objectifs majeurs sont fixés qui englobent l'installation d'électrolyseurs pour augmenter la production ; le développement des mobilités propres; le développement de la filière industrielle ainsi qu'un soutien à la recherche, l'innovation et le développement des compétences dans ce secteur (Gouvernement Français, 2020). Dans le cadre du projet 'Vendée Hydrogène', le premier site de production de dihydrogène vert européen est en France (Bouin, Vendée) et devait produire ses premiers kilogrammes d'H<sub>2</sub> vert à la fin du premier semestre 2021. Sur ce site, le dihydrogène est produit à partir de l'eau de mer et de l'énergie éolienne (SyDEV, 2020).

Dans le plan de déploiement du dihydrogène, les responsables français considèrent son injection dans les réseaux de gaz naturel (Ministère de la transition écologique et solidaire, 2018). Ainsi, la possibilité du stockage massif de ce gaz dans les 16 sites de stockage français compte comme un soutien au développement large de sa production (Meiller and Ranchou-Peyruse, 2019). Cependant, dans les aquifères profonds, le dihydrogène peut interagir avec les métaux et les semi-métaux présents ainsi qu'altérer l'équilibre en place. En outre, un impact prévisible sera observé sur les communautés microbiennes développées dans ces réservoirs. Dans l'écosystème énergétiquement pauvre qu'est un aquifère profond oligotrophe (pauvre en matière organique ;(Hoehler and Jørgensen, 2013)), l'injection du dihydrogène peut accroître

l'activité et la croissance des communautés microbiennes présentes (Meiller and Ranchou-Peyruse, 2019). Ayant un faible potentiel de réduction, le dihydrogène est un donneur d'électrons très énergétique lorsqu'il est impliqué dans des processus métaboliques. Ainsi, il est une ressource énergétique utilisable par différents métabolismes, notamment dans les environnements oligotrophes souterrains profonds (Gregory et al., 2019). Ainsi, une augmentation de la quantité de sulfures, produits par l'activité des micro-organismes sulfato-réducteurs, pourrait engendrer des problèmes de corrosion ainsi qu'un changement de porosité du réservoir ; alors que l'utilisation massive du dihydrogène par les archées méthanogènes produirait du méthane et provoquerait une diminution de pression dans le stockage. En effet, pour produire une mole de méthane, le nombre de moles de dihydrogène varie selon le métabolisme de réaction mais il reste supérieur à 1, ce qui induit une diminution du nombre de moles de gaz et par suite une diminution de la pression totale du système. Ces problématiques nécessitent des études poussées pour comprendre l'effet de l'injection du dihydrogène dans les aquifères profonds.

## V- Ecologie microbienne liée à la biosphère profonde continentale

Les micro-organismes sont présents partout et se retrouvent dans l'ensemble des grands compartiments terrestres : terre, océan et atmosphère. D'abord pour des raisons appliquées reliées à l'exploitation du sous-sol, puis pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes découverts, les microbiologistes s'intéressent aux environnements profonds depuis plus d'une centaine d'années. Leurs études ont montré la présence d'une variété microbienne importante dans les sous-sols (Bagnoud et al., 2016; Krumholz, 2000; Wang et al., 2013; Magnabosco et al., 2018). Les premières études furent menées sur des réservoirs pétroliers qui ont amené à émettre qu'une partie des microorganismes peut être enfouie lors de la sédimentation et se maintiendrait sur des temps géologiques migrant vers les profondeurs en même temps que les couches géologiques les abritant (Head et al., 2003). D'autres micro-organismes peuvent également pénétrer certaines couches profondes *via* l'infiltration des eaux météoriques (eau de pluie rechargeant les aquifères) sur des temps vertigineux puisque la vitesse d'écoulement de l'eau dans certains aquifères est de l'ordre du mètre, voire quelques mètres, par an. Enfin, une part des micro-organismes présents aujourd'hui est issue des activités humaines, en particulier lors des forages, l'injection d'eau de mer en réservoir pétrolier ou l'excavation de mines, etc. Les sous-sols profonds sont des environnements coupés de la lumière et donc de la photosynthèse, anoxiques et majoritairement oligotrophes (exception des réservoirs pétroliers).

Les environnements profonds possèdent des caractéristiques physico-chimiques qui façonnent les communautés microbiennes et leurs activités. Selon les conditions de l'environnement profond, les microorganismes sont actifs, non-actifs ou dégradés. En sous-sol et à plusieurs centaines de mètres de profondeur, les habitats deviennent des environnements de hautes pressions et températures. Ainsi, la vie existante est sélectionnée par ces conditions, notamment des températures plus élevées que celles habituelles des environnements de la surface. D'autres facteurs limitent la croissance microbienne dans les sous-sols, telles que la porosité et la perméabilité des roches (Krumholz, 2000), ou encore l'accessibilité aux nutriments (Kotelnikova, 2002). Les micro-organismes ont besoin d'une source d'énergie, d'une source de carbone, et d'un accepteur terminal d'électron pour pouvoir se développer.

La source de carbone est nécessaire pour former la biomasse (protéines, lipides, glucides, acides nucléiques) des êtres vivants. Coupé de l'approvisionnement de la matière organique générée par la photosynthèse, le dioxyde de carbone et le dihydrogène y sont parfois les seules sources de carbone et d'énergie présentes originellement grâce à des réactions entre l'eau de formation et la phase minérale du réservoir (Schrenk et al., 2013; Stevens and McKinley, 1995).

Cependant, même sur des temps géologiques, une partie de la matière organique issue de la surface peut parvenir dans les environnements profonds. Les plus grandes présences de matière organique dans le sous-sol restent bien évidemment dues aux grandes crises environnementales du passé qui ont conduit à l'accumulation de matière organique dans le sous-sol à l'origine des gisements de charbon et des réservoirs pétroliers et/ou de gaz naturel. A une échelle plus restreinte, lors de son enfouissement la matière organique va connaître une dégradation d'abord aérobie, puis anaérobie. Seules les molécules les plus récalcitrantes (acides humiques, hydrocarbures polyaromatiques, etc.) et/ou piégées dans la porosité des roches et difficilement accessibles aux micro-organismes vont subsister dans les environnements profonds. Cette matière organique peut alors alimenter les communautés microbiennes via leur oxydation par des respirations anaérobies ou lors de la fermentation.

Les processus de respiration, et donc le métabolisme énergétique, des êtres vivants nécessitent un donneur d'électrons qui peut être une molécule organique ou l' $H_2$ , par exemple, mais nécessitent également un accepteur d'électrons. Si cet accepteur d'électrons est issu du métabolisme cellulaire (donc interne à la cellule), le métabolisme est dit fermentaire. Si l'accepteur d'électrons est externe à la cellule, le métabolisme est une respiration. A la différence des environnements de surface, le dioxygène n'y est pas utilisé comme accepteurs d'électrons. Les microorganismes y sont donc anaérobies. Les accepteurs d'électrons externes les plus fréquemment rencontrés dans le contexte des environnements profonds sont le sulfate (métabolisme de la sulfato-réduction) et le  $CO_2$  (métabolisme de la méthanogénèse ou de l'homoacétogénèse) ; ce qui explique que les deux groupes métaboliques des sulfato-réducteurs et des méthanogènes (voire homoacétogènes) puissent souvent être en compétition dans des écosystèmes pauvres en sources énergétiques et nutritionnelles (Head et al., 2003; Krumholz, 2000) et évoluent avec des micro-organismes fermentaires (Amid et al., 2016).

De ces observations, Stevens et McKinley ont proposé, en 1995, le concept de SLiME (Subsurface **L**ithoautotrophic **M**icrobial **E**cosystems) qui met en évidence l'existence de communautés microbiennes fondées sur la consommation du dihydrogène et du  $CO_2$  (Figure 5).

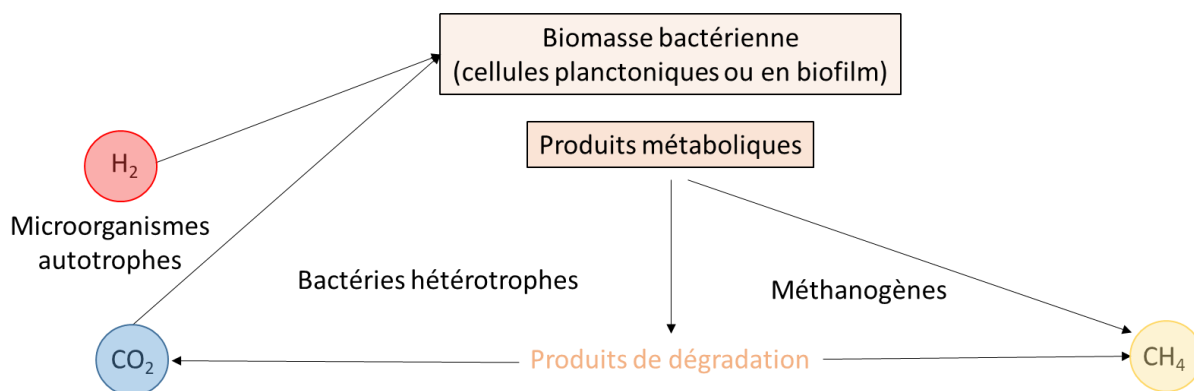


Figure 5 - Schéma conceptuel du SLiME (Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystems)

Que les microorganismes des environnements profonds soient alimentés par l' $H_2$  abiotique,  $H_2$  biotique (issu de la fermentation) ou des molécules organiques, plusieurs groupes métaboliques vont être en compétition vis-à-vis de ces ressources. La structuration de ces communautés va dépendre en grande partie du sulfate qui y est un élément essentiel (Figure 6).

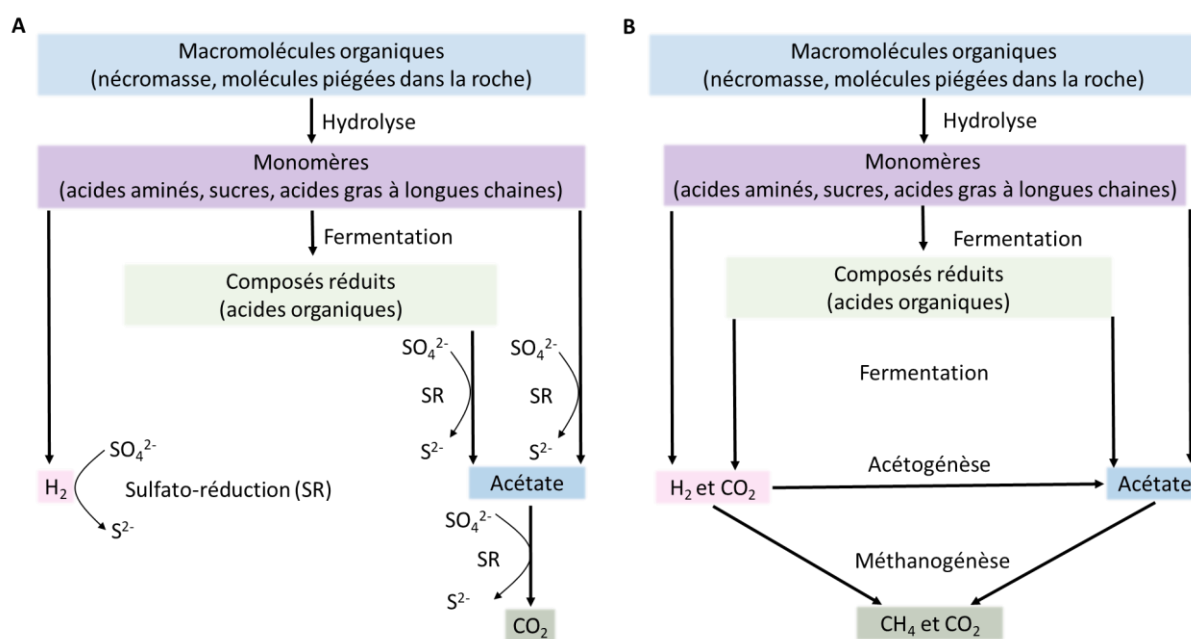


Figure 6 - Dégradation séquentielle de la matière organique en présence (A) et en absence (B) de sulfate (modifié d'après (Muyzer and Stams, 2008))

Dans le cas des molécules organiques séquestrées dans la porosité de la roche (ou provenant du gaz stocké sous la forme d'hydrocarbures), les macromolécules organiques hydrolysées par les bactéries hydrolytiques et les monomères fermentés en composés réduits vont être utilisés dans deux voies microbiennes en fonction de la présence (Figure 6 -A) ou de l'absence (Figure 6 -B) de sulfate. Dans ces environnements, les sulfato-réducteurs seront métaboliquement favorisés et leur activité dominera la communauté microbienne sur l'utilisation de ces molécules. En limitation de sulfate, la méthanogénèse, voire l'acétogénèse,

pourront avoir un rôle majeur dans le fonctionnement de la communauté. En observant la Figure 6, il est facile de comprendre que l'arrivée de dioxygène dans l'écosystème, une molécule toxique pour les micro-organismes strictement anaérobie, en particulier les sulfato-réducteurs et les méthanogènes, aura un effet important sur la structuration de la communauté. L'arrivée massive d' $H_2$  quant à elle, bouleversera également les équilibres entre les micro-organismes en augmentant l'activité des micro-organismes et en déplaçant la compétition sur d'autres éléments devenant alors limitant : le  $CO_2$ , oligo-éléments, vitamines...

Ces environnements profonds bien que peu concentrés en cellules microbiennes représentent des volumes si considérables (bien plus que ceux de la surface) que la dernière étude sur le sujet estime cette biomasse de 2 à  $6 \times 10^{29}$  cellules (Magnabosco et al., 2018). La plupart de ces micro-organismes seraient inactifs ou avec un métabolisme fortement ralenti (D'Hondt, 2002) et leur activité serait dictée notamment par l'abondance des donneurs et des accepteurs d'électron (Adhikari et al., 2016; Bagnoud et al., 2016; D'Hondt, 2002; Magnabosco et al., 2018).

Dans nos études, les aquifères profonds sont les environnements d'intérêt. Sous les conditions de ces milieux complexes, la compétition entre les communautés microbiennes est la règle pour survivre. C'est un environnement anoxique dans lequel la compétition pour les nutriments gère la biodiversité. Parmi les microorganismes qui peuvent se développer dans les environnements profonds en général et dans les aquifères servant au stockage de gaz, figurent principalement les microorganismes sulfato-réducteurs, les microorganismes fermentaires, les archées méthanogènes et les bactéries acétogènes. Cependant, il est à noter que des microorganismes appartenant à d'autres groupes métaboliques ont également été mis en évidence au travers d'analyses de diversité microbienne ; parmi lesquels, des microorganismes décrits jusqu'alors comme strictement aérobies ont paradoxalement été mis en évidence (Kadnikov et al., 2018).

Dans cette partie de l'état de l'art, une présentation des différents types de microorganismes les plus connus dans les aquifères de stockage est présentée. Les métabolismes de ces bactéries et archées sont exposés ainsi que les potentielles réactivités avec leurs environnements.

### V.1- Les microorganismes sulfato-réducteurs

Les microorganismes sulfato-réducteurs (MSR) sont classés selon les caractères moléculaires du gène codant pour l'ARNr 16S au sein des Bactéries et des Archées. Ils peuvent être ainsi classés en 4 groupes (Castro et al., 2000) :

- les bactéries mésophiles à Gram négatif, sont essentiellement incluses dans la classe des delta-Proteobactéries,
- les bactéries sporulantes à Gram positif, appartenant au phylum des Firmicutes,
- les bactéries thermophiles,
- les Archées thermophiles.

Le métabolisme de sulfato-réduction est important dans les environnements profonds. Il est étudié dans des réservoirs pétroliers (Gao et al., 2016, 2015; Guan et al., 2013; Nazina et al., 2013; Ollivier et al., 2014), ainsi que dans des réservoirs de stockage gazeux tels que les aquifères (Amend and Teske, 2005; Bombach et al., 2010; Detmers et al., 2004; Itävaara et al., 2011; Shimizu et al., 2007). Dans certaines études sur les aquifères de stockage de gaz naturel la dominance des bactéries sulfato-réductrices (BSR) dans le sous-sol est démontrée (Basso et al., 2009; Berlendis et al., 2010; Fry et al., 1997; Ranchou-Peyruse et al., 2017; Sahl et al., 2008). Les études portant sur la diversité microbienne des eaux d'aquifères français servant au stockage de gaz ont, à ce jour, permis de mettre en évidence, par différentes méthodes (clonage, séquençage, isollements), la présence de plusieurs MSR dont la classification est présentée dans le Tableau 1.

*Tableau 1: Classification taxonomique des principales familles de microorganismes sulfato-réducteurs identifiés dans les aquifères français servant au stockage de gaz naturel.*

<p><u>Bactéries mésophiles à Gram –</u>            Desulfovibrionaceae (Basso et al., 2009 ; Berlendis et al., 2010 ; Ranchou-Peyruse et al., 2019)            Desulfobulbaceae (Ranchou-Peyruse et al., 2019)            Desulfomicrobiaceae (Berlendis et al., 2010 ; Ranchou-Peyruse et al., 2019)            Desulfobacteraceae (Ranchou-Peyruse et al., 2019)            Desulfonatrumaceae (Ranchou-Peyruse et al., 2019)            Syntrophaceae (Ranchou-Peyruse et al., 2019)</p>
<p><u>Bactéries sporulantes à Gram +</u>            Peptococcaceae :            - genre Desulfotomaculum (Berlendis et al., 2016 ; Ranchou-Peyruse et al., 2016 ; Aüllo et al., 2016)            - genre Desulfosporosinus (Ranchou-Peyruse et al., 2016)            - genre Desulforudis (Ranchou-Peyruse et al., 2016)</p>
<p><u>Bactéries thermophiles</u>            Nitrospiraceae (Ranchou-Peyruse et al., 2016)</p>

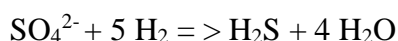
On note tout de même une dominance des *Peptococcaceae* (famille appartenant au phylum des Firmicutes) qui s'explique entre autres par leur capacité à sporuler (Orsi et al., 2016; Sass et al., 1997; Spring and Rosenzweig, 2006). Pour rappel, le règne est le premier niveau de classification. Viennent ensuite le domaine, le phylum, la classe, l'ordre, la famille, le genre et enfin l'espèce qui est l'unité de classification. Un microorganisme est dénommé par son nom de genre suivi par son nom d'espèce.

Ainsi, en prenant l'exemple de deux MSR caractéristiques de ces environnements, *Desulfotomaculum profundi* (ou *D. profundi*) et *Desulfovibrio vulgaris*, leur classification est la suivante :

- |   |   |
|---|---|
| - Règne : Procaryote                        | - Règne : Procaryote                                      |
| - Domaine : Bacteria                        | - Domaine : Bacteria                                      |
| - Phylum : Firmicutes                       | - Phylum : Proteobacteria (nouvellement Desulfobacterota) |
| - Classe : Clostridia                       | - Classe : Deltaproteobacteria                            |
| - Ordre : Eubacteriales                     | - Ordre : Desulfovibrionales                              |
| - Famille : <i>Peptococcaceae</i>           | - Famille : <i>Desulfovibrionaceae</i>                    |
| - Genre : <i>Desulfotomaculum</i>           | - Genre : <i>Desulfovibrio</i>                            |
| - Espèce : <i>Desulfotomaculum profundi</i> | - Espèce : <i>Desulfovibrio vulgaris</i>                  |

Comme pour tout procaryote, il est possible d'étudier la phylogénie des sulfato-réducteurs via l'étude des séquences du gène de l'ARNr16S. Toutefois, la phylogénie spécifique des sulfato-réducteurs peut également l'être en étudiant les gènes fonctionnels *dsr* (dissimilatory sulfite reductase) codant une enzyme clé, la bisulfite réductase, de la voie de la sulfato-réduction et qui intervient dans la réduction du sulfite en sulfure (Klein et al., 2001; Stahl et al., 2002). Il faut noter que les microorganismes sulfato-réducteurs retrouvés par biologie moléculaire ne sont pas tous isolés et décrits. Quand ils le sont, il est également possible de classer ces microorganismes selon d'autres critères qui peuvent être i) leur morphologie, ii) les donneurs d'électrons utilisés, iii) leur capacité à oxyder les substrats de manière complète ou incomplète, iv) leurs capacités ou non à sporuler, v) leurs températures de croissance (mésophilie, thermophilie) ou même vi) leur tolérance au dioxygène.

Les microorganismes sulfato-réducteurs utilisent, en anaérobiose, le sulfate comme accepteur d'électrons pour l'oxydation de composés organiques ou du dihydrogène. Une équation décrivant la sulfato-réduction avec le dihydrogène comme donneur d'électron est présentée par (Hagemann et al., 2016) :



Ce procédé, appelé réduction dissimilatrice du sulfate, conduit à la production de sulfure qui peut ensuite réagir pour donner du sulfure d'hydrogène  $\text{H}_2\text{S}$ , ou du sulfure de fer  $\text{FeS}$  quand le milieu souterrain contient des ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Berlendis et al., 2010; Caldwell et al., 2008; Dolla et al., 2006; Fry et al., 1997; Hallbeck and Pedersen, 2008; Park et al., 2006; Ranchou-Peyruse et al., 2019). La précipitation de ce composé dans la phase solide peut conduire à une variation de porosité du milieu.



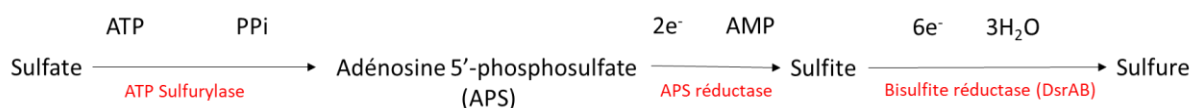


Figure 7 – Réduction Réduction dissimilatrice du sulfate par les microorganismes sulfato-réducteurs.  
 ATP : Adénosine triphosphate ; AMP : Adénosine monophosphate

Les MSR utilisent les composés soufrés comme le sulfate mais également le thiosulfate, le sulfite et même le soufre élémentaire comme accepteurs terminaux d'électrons (Biebl and Pfennig, 1977). Ils utilisent les composés organiques ou le dihydrogène comme donneurs d'électrons. Bien qu'anaérobies, certains MSR tolèrent de faibles pressions partielles en dioxygène (Dolla et al., 2006; STACKEBRANDT et al., 1995) et peuvent même réduire le dioxygène en eau (Jonkers et al., 2005) au cours de leur respiration.

Ainsi, certains MSR ont été montrés capables de maintenir une activité métabolique en présence d'une concentration de 144 ppm d'O<sub>2</sub> maximum (Marschall et al., 1993; Morgan et al., 2017). Enfin, en absence d'accepteurs d'électrons, la versatilité métabolique de certains MSR leur permet de fermenter des composés organiques. Par exemple *Desulfotomaculum aquiferis* Bs105<sup>T</sup> et *Desulfotomaculum profundum* Bs107<sup>T</sup>, isolées d'un aquifère profond du bassin parisien, sont capables de fermenter le fumarate et le pyruvate, respectivement (Berlendis et al., 2016). La seule présence des MSR dans le milieu ne permet donc pas de conclure à une sulfato-réduction dans le milieu puisqu'ils peuvent avoir un métabolisme différent.

Lors de la sulfato-réduction, les MSR sont capables d'utiliser différentes catégories de composés organiques comme donneurs d'électrons et sources de carbone. Dans les aquifères oligotrophes servant au stockage de gaz, peuvent ainsi être catabolisés des composés organiques simples (acétate, pyruvate...), et le dihydrogène (Bagnoud et al., 2016; Detmers et al., 2004; Hagemann et al., 2016). La consommation du dihydrogène est observée dans différents environnements profonds où les MSR sont dominants. Cela a été démontré notamment par Nakagawa et al. (2002) dans un environnement minier à haute-température où les *Desulfotomaculum kuznetsovii* et *Desulfotomaculum thermocisternum* se développaient en puisant le dihydrogène de l'eau de formation. Certaines espèces sont aussi capables de se développer en utilisant le CO<sub>2</sub> comme source de carbone et le formiate comme donneurs d'électrons (Jansen et al., 1984).

A proximité de la bulle de gaz, ces environnements ont aussi la particularité d'abriter des traces d'hydrocarbures mono-aromatiques et autres alcanes. Plusieurs études ont ainsi montré sur les aquifères français, la bioatténuation naturelle des composés benzène, toluène, éthylbenzène et xylène (BTEX) en conditions de sulfato-réduction (Basso et al., 2009; Berlendis et al., 2010; Ranchou-Peyruse et al., 2017). Les études de Aüllo et al. (2016, 2013) et de Ranchou-Peyruse et al. (2019, 2017) sur la diversité microbienne dans un aquifère parisien montrent la présence de *Desulfomaculum* en sous-sol, en confirmant sa capacité à dégrader les hydrocarbures mono-aromatiques. Plusieurs études montrent des résultats similaires en établissant une corrélation entre la sulfato-réduction et la biodégradation des hydrocarbures mono-aromatiques en anaérobiose, en particulier le toluène. *Salanitro et al.* écrivent l'équation de la réaction de dégradation du toluène combinée à la sulfato-réduction comme suit (Salanitro and Wisniewski, 1997) :



Cette biodégradation s'arrêtant lorsque la concentration en sulfate devient nulle (Beller et al., 1992; Edwards et al., 1992; Mackay et al., 2006; Salanitro and Wisniewski, 1997; Vogt et al., 2011). *Wilson et al.* confirme la dégradation anaérobie du toluène, dans les conditions où une source organique plus facile à dégrader, est absente ou présente en faible quantité tel que l'éthanol dans leur cas (Wilson et al., 2016).

En conditions de sulfato-réduction, seul un petit nombre de souches bactériennes dégradant le toluène, appartenant aux genres *Desulfotomaculum*, *Desulfobacula*, *Desulforhabdus*, *Desulfocapsa*, *Desulfosarcina* et *Desulfotignum* (Beller et al., 1992; Harms et al., 1999; Meckenstock, 1999; Morasch et al., 2004; Ommedal and Torsvik, 2007; Rabus et al., 1993) ont pu être isolées, la voie métabolique correspondante est connue (Figure 8-A). A l'inverse, à ce jour, aucune souche pure capable de dégrader le benzène n'a pu être isolée ; trois voies métaboliques sont envisagées, sur la base de l'identification de métabolites intermédiaires (Figure 8 -B).

En 1988, WIDDEL a classé les bactéries sulfato-réductrices en deux groupes : les réducteurs incomplets ou complets selon leur capacité à oxyder les substrats organiques jusqu'à l'acétate (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*...) ou jusqu'au CO<sub>2</sub> (*Desulfobacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema*, *Desulfobacterium*...). Pour oxyder l'acétate, ces derniers peuvent utiliser deux voies différentes, le cycle de l'acide citrique modifié ou la voie de l'acetyl-CoA (Muyzer and Stams, 2008).

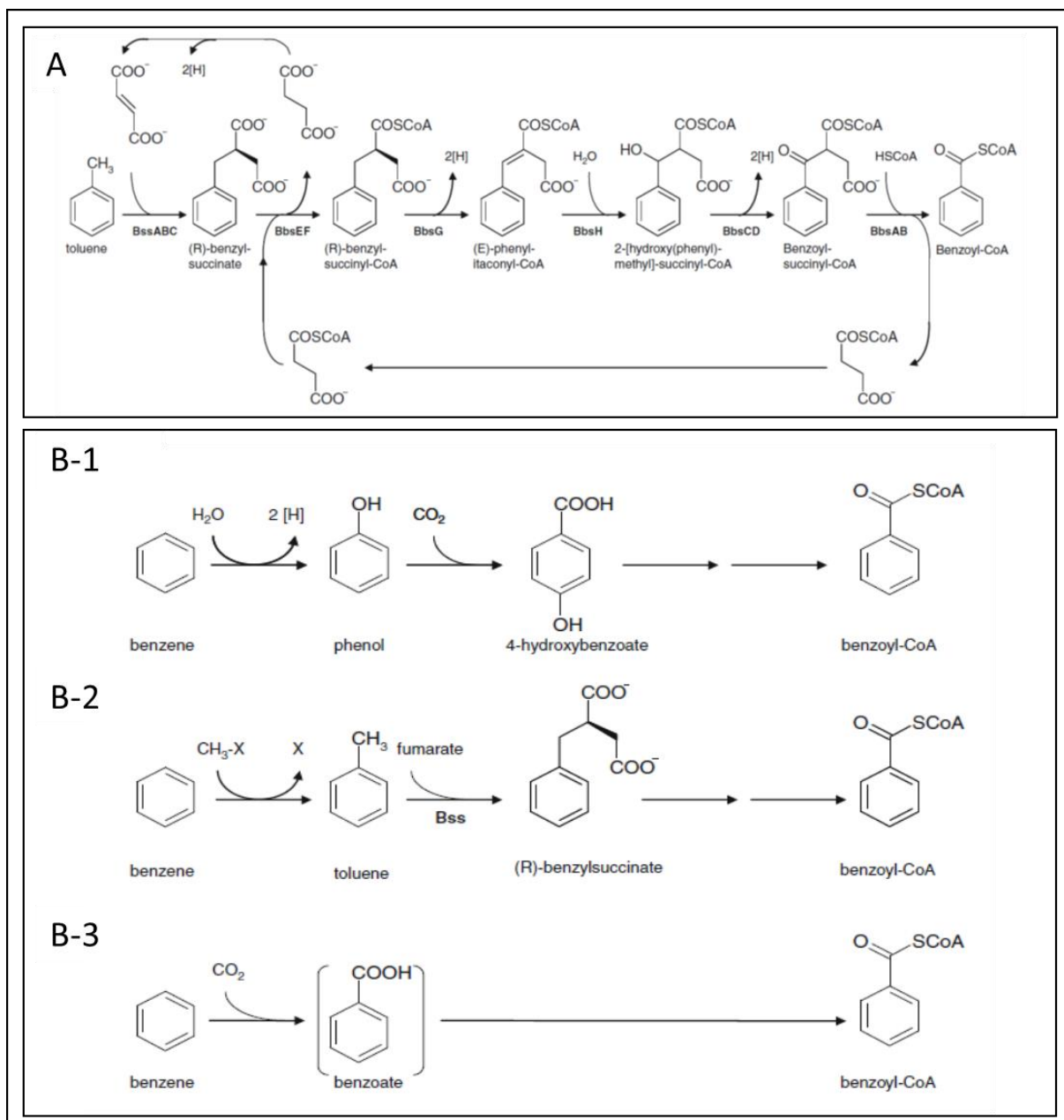


Figure 8 - A- voie de dégradation du toluène en anaérobiose (Kube et al., 2004); B- mécanismes d'activation du benzène supposés en anaérobiose, 1 : hydroxylation, 2 : méthylation et 3 : carboxylation (Weelink et al., 2010).

## V.2- Les microorganismes fermentaires

Souvent présents dans les milieux souterrains, les microorganismes fermentaires sont importants pour le développement des communautés microbiennes (Kimura et al., 2010; McMahan et al., 1992; McMahan and Chapelle, 1991; Morozova et al., 2010; Purkamo et al., 2017; Stevens et al., 1993). En effet, les fermentaires sont capables de dégrader la matière organique en acétate, dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  et acides gras volatiles qui sont utilisés par d'autres microorganismes comme source de carbone et d'énergie. Ce sont donc des acteurs importants, malgré la faible abondance de matière organique dans les aquifères servant au

stockage de gaz en aquifères profonds. Un exemple de fermentation pour produire du dihydrogène et de l'acétate est décrit par l'équation suivante (Gregory et al., 2019):



Certains microorganismes non fermentaires peuvent rester actifs en absence de leurs accepteurs d'électrons et passer à un métabolisme fermentaire (Kimura et al., 2010). Dans des environnements pauvres en sulfates, certains MSR ont la capacité de fermenter pour assurer leur survie (Imachi, 2002; Imachi et al., 2006; Nazina et al., 2005). Par exemple, la fermentation du pyruvate par différentes bactéries sulfato-réductrices est observée une fois le sulfate disparu du milieu (Henry et al., 1994; Nazina et al., 2005). A l'extrême, il peut arriver que pourtant initialement classés phylogénétiquement parmi les sulfato-réducteurs, certains microorganismes aient perdu leurs capacités de sulfato-réduction et soient devenus des fermentaires exclusifs. Cela conduit à la création de nouveaux genres, comme ce fut le cas pour les genres *Sporotomaculum* (Brauman et al., 1998) et *Pelotomaculum* (Imachi et al., 2006), initialement classés parmi le genre des *Desulfotomaculum*.

Dans les réservoirs pétroliers comme dans les aquifères, plusieurs genres de fermentaires sont détectés (Gao et al., 2015; Kimura et al., 2010; Nazina et al., 2013). Au sein des aquifères profonds français servant au stockage de gaz naturel, des organismes fermentaires, même si minoritaires dans les études moléculaires ciblant le gène de l'ARNr16S, sont fréquemment retrouvés. Ils appartiennent aux familles des *Synergistaceae* (genres *Acetobacterium* précédemment *Anaerobaculum*) des *Clostridiaceae* (genres *Clostridium*), des *Thermaneaeobacteraceae* (genres *Moorella*, *Thermoanaerobacter*), des *Desulfomonadaceae* (genre *Pelobacter*) et des *Peptococcaceae* (genres *Pelotomaculum*, *Sporotomaculum*) (Basso et al., 2009; Berlendis et al., 2010; Ranchou-Peyruse et al., 2017).

Plusieurs études ont montré la participation de la fermentation dans la dégradation de la matière organique comme le benzène en produits plus facilement utilisables par les microorganismes souterrains (Ranchou-Peyruse et al., 2019; Vogel and Grbìc-Galić, 1986; Vogt et al., 2011). Le produit principal peut être l'acétate avec, en co-produits, le dioxyde de carbone, le dihydrogène et d'autres acides organiques. Aux Etats-Unis, l'étude d'un aquifère dont les sédiments datent de l'Eocène, a montré que ces derniers renfermaient de la lignite, matériel organique rémanent de la matière organique qui compose les plantes (Ulrich et al., 1998). Des produits de fermentation (acétate, formate et propionate) issus de la dégradation de cette matière organique ont été détectés et les auteurs ont suggéré que leur utilisation soutenait le développement du groupe métabolique des sulfato-réducteurs. Afin que le métabolisme

fermentaire se maintienne, il faut que la pression partielle en dihydrogène soit maintenue basse ce qui est le cas grâce à sa consommation par les autres cohortes microbiennes de la communauté tels que les chimio-lithotrophes et les archées méthanogènes (Schink and Stams, 2013).

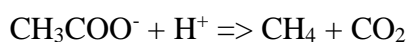
### V.3- Les archées méthanogènes

La méthanogénèse est le métabolisme qui conduit au méthane comme produit final. Les méthanogènes appartiennent à un domaine du vivant différent de celui des bactéries : les archées (Woese et al., 1990). Etant des procaryotes, la diversité archéenne peut être approchée via le gène de l'ARNr 16s mais également par un gène métabolique spécifique, le gène *mcrA* qui code pour la méthyl-coenzyme M réductase qui catalyse la dernière étape de la méthanogénèse chez tous les méthanogènes (Friedrich, 2005). Ces micro-organismes sont communément retrouvés au sein de la biosphère profonde (Biddle et al., 2006; Lipp et al., 2008). Plusieurs études ont montré la présence et l'activité des archées méthanogènes dans des environnements profonds tels que les gisements pétroliers (Gao et al., 2016; Nazina et al., 2017; Ollivier et al., 2014), les mines (C Magnabosco et al., 2018) ainsi que les aquifères de stockage (Kotelnikova and Pedersen, 1997; Shimizu et al., 2007). Les méthanogènes sont classés en trois groupes, en fonction des substrats qu'ils utilisent :

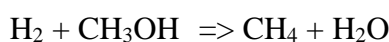
- les méthanogènes hydrogénotrophes réduisent le CO<sub>2</sub>, voire CO, formate et les alcools dans certains cas. Un exemple de méthanogénèse à partir de dihydrogène et de bicarbonate est décrit dans l'équation suivante (Gregory et al., 2019) :



- les méthanogènes acétoclastiques réalisent la 'disproportionation' de l'acétate. Le métabolisme est décrit par l'équation suivante (Silver et al., 2010):



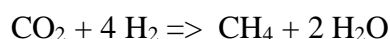
- les méthanogènes méthylophiles, pour leur part, déméthylent les composés en C1 méthylés (méthanol, méthylsulfures et méthylamines). Un exemple de réduction du méthanol en méthane est proposé dans l'équation suivante (Feldewert et al., 2020; Thauer, 1998) :



Différents groupes d'archées méthanogènes ont été mis en évidence au sein des environnements profonds à différentes profondeurs allant de 68 à 446 m d'un aquifère à Suède

(Kotelnikova and Pedersen, 1997), de 400 à 1000 m des aquifères français (Ranchou-Peyruse et al., 2019) et à plus de 1000 m d'un aquifère dans la Caroline du Sud (Park et al., 2006). Ces archées sont souvent présentes dans des environnements pauvres grâce à leur capacité de se développer dans des conditions énergétiques faibles car bien moins énergivores que les bactéries (Ollivier et al., 2014; Van de Vossenberg et al., 1995). La plupart des archées méthanogènes isolées ont été montrées comme ultra-spécialisées vis-à-vis de leur substrat et incapables de croître sur un autre (Whitman et al., 2006). Compte-tenu de notre problématique d'intérêt, la suite de cette partie se rapportera aux archées méthanogènes hydrogénotrophes.

Dans les environnements pauvres, ces microorganismes peuvent se développer en s'alimentant d'une source d'énergie lithogénique comme le dihydrogène en réduisant le dioxyde de carbone pour produire du méthane (Kimura et al., 2010; Kotelnikova and Pedersen, 1997; Nazina et al., 2013; Smigfih and Greksfik, 1990). L'activité de ces micro-organismes peut ainsi être simplifiée par l'équation suivante (Panfilov, 2010; Reitenbach et al., 2015; Silver et al., 2010; Tarkowski, 2019) :



Comme cela a déjà été mentionné dans la partie dédiée aux sulfato-réducteurs, ces derniers sont souvent en compétition avec les méthanogènes. En effet, ces deux groupes métaboliques ont besoin de sources d'énergie qui peuvent parfois être les mêmes et qui les mettent donc en compétition. Cependant, lorsque les sulfates viennent à manquer le rapport de force s'inverse au profit des archées méthanogènes conduisant à une apparition plus importante de méthane (D'Hondt, 2002; Detmers et al., 2004; Bagnoud et al., 2016). Bien que moins documenté, la biodégradation des hydrocarbures par les méthanogènes a déjà été identifiée (Guan et al., 2013; Jones et al., 1989).

L'effet du dioxygène sur les archées méthanogènes crée encore des débats. En effet, ces microorganismes sont connus comme procaryotes strictement anaérobies (Khelaifia et al., 2016). Certaines études montrent que l'exposition à l'air diminue remarquablement le nombre de cellules vivantes de certains groupes d'archées méthanogènes (Jarrell, 1985). D'autres études mettent en évidence la capacité des méthanogènes à résister à une exposition de dioxygène. Au retour des conditions anaérobies, ces organismes sont capables de reprendre leur activité et leur développement (Angel et al., 2012; Jarrell, 1985; Yuan et al., 2009). Dans un bioréacteur, Hirasawa et al. (2008) ont testé l'effet d'une concentration de dioxygène dissout égale à  $3 \pm 0.7 \text{ mg d'O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  sur les microorganismes présents dans une boue granulaire. Leurs résultats montrent que cette faible quantité de dioxygène dans le système n'a pas eu d'effet

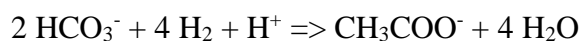
remarquable sur l'activité des sulfato-réducteurs ni sur celles de méthanogènes présents (Hirasawa et al., 2008). A l'inverse, l'étude menée par Khelaifia et ses co-auteurs (2016) semble montrer qu'après une exposition à l'air ambiant pendant 24h suivi d'une période anoxique, les archées méthanogènes ne sont plus actives. Ce travail a montré que les conditions d'activité des méthanogènes face à la présence de dioxygène dépend de plusieurs facteurs tels que la quantité de dioxygène, le temps d'exposition à ce gaz ainsi que la composition du milieu de culture.

#### V.4- Les bactéries homo-acétogènes

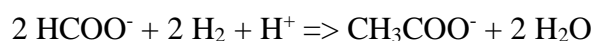
L'acétogénèse se définit comme l'oxydation de substrats conduisant à la formation d'acétate et de dihydrogène à partir de molécules comme les sucres, les alcools, des composés en C1 tel que le méthanol, des composés aromatiques, etc ou encore le formiate (Lever, 2012) et s'apparente à de la fermentation. L'homo-acétogénèse quant à elle se réalise exclusivement à partir du CO<sub>2</sub> et de l'H<sub>2</sub> et les micro-organismes capables de la réaliser représentent le troisième groupe métabolique pouvant métaboliser l'H<sub>2</sub> dans les environnements profonds (Beller, 2002; Kadnikov et al., 2018). Ces microorganismes sont identifiés dans des environnements pauvres tels que des aquifères et sont capables de produire de l'acétate autotrophiquement en présence d'une phase gazeuse H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20) (Kotelnikova and Pedersen, 1997). Les genres *Acetobacterium* et *Clostridium* contiennent des espèces homoacétogènes, telles que *Acetobacterium woodii* (Balch et al., 1977) ou *Clostridium aceticum* (Braun and Gottschalk, 1981). Concernant les environnements profonds, les travaux de Davydova-Charakhchyan (1992) ont mis en évidence la présence d'*Acetobacterium romashkowi*, isolée d'un gisement pétrolier. La réaction de production d'acétate lors de l'homo-acétogénèse du dioxyde de carbone et du dihydrogène est la suivante :



Il semble également possible d'avoir une voie similaire de production d'acétate à partir de bicarbonate présent dans la phase liquide (Lever, 2012) tel que :



Ainsi qu'à partir de formiate et de dihydrogène:



La possibilité du déroulement de ces réactions métaboliques dépend fortement des différentes conditions du milieu. Les acétogènes possèdent un métabolisme assez flexible qui

leur permet de se développer et de cohabiter avec d'autres types de microorganismes (Lever, 2012).

L'acétogenèse est souvent observé dans les sous-sols accompagnant d'autres métabolismes comme la méthanogenèse (Ulrich and Bower, 2008) ou la sulfato-réduction (Kadnikov et al., 2018). En effet, l'acétate joue le rôle de composé intermédiaire entre les différents métabolismes microbiens présents dans la communauté. Plusieurs études mettent en évidence la présence d'archées méthanogènes utilisant l'acétate produit par des acétogènes à partir de plus grandes molécules (Hwu and Lettinga, 1997; Wu et al., 1992). Souvent détectée en sous-sol en présence d'une phase  $H_2/CO_2$ , l'homo-acétogenèse peut constituer un lien énergétique du dihydrogène via l'acétate aux différents microorganismes tels que les méthanogènes et les sulfato-réducteurs (Kotelnikova and Pedersen, 1998).

#### V.5- Les microorganismes affiliés à des métabolismes aérobies retrouvés dans le sous-sol profond

La plupart des études sur les microorganismes souterrains définissent l'environnement profond comme anoxique, dépourvu de dioxygène. Le dioxygène en sous-sol ne semble a priori pas pouvoir être produit dans ces environnements, puisque la photosynthèse y est impossible. Néanmoins, dans la longue histoire de l'étude des environnements profonds continentaux, certaines études ont suggérées ponctuellement que le dioxygène pouvait être présent dans des eaux souterraines profondes (Winograd and Robertson, 1982). Une des hypothèses expliquant sa présence situant son origine à des milliers d'années; au moment de la formation des gisements ou à la solubilité de produits organiques présents dans ces gisements. La variation de la quantité de dioxygène dissous en fonction de la profondeur du gisement est un paramètre supplémentaire qui peut soutenir ces hypothèses (Bodelier et al., 1996; Hervant and Malard, 2019; Kadnikov et al., 2018; Winograd and Robertson, 1982). *Kadnikov et al.* ont récemment mis en évidence la présence de dioxygène dans un aquifère profond de Sibérie dont la communauté microbienne a eu son méta-génome analysé. Ils ont prouvé la capacité de certaines bactéries aérobies à se développer dans ce sous-sol, l'hypothèse expliquant le dioxygène nécessaire pour leur développement étant une arrivée via l'infiltration des eaux météoriques (Kadnikov et al., 2018). Cette explication reste cependant à prendre avec précaution. Cependant, il existe de nombreux cas où le dioxygène a été volontairement ou non injecté dans le sous-sol.



## VI- Effets de l'injection du dioxygène sur la microflore du sous-sol

### VI.1- Bio remédiation avec injection de O<sub>2</sub>

La bio-remédiation aérobie des aquifères peu profonds a été largement étudiée, en particulier celle visant à dégrader les hydrocarbures tels que les mono-aromatiques, les éthylènes chlorés, les solvants trichloréthylènes afin de dépolluer des zones de rejets de produits pétroliers, de déversements ou d'activités industrielles (Wanner et al., 2019; Wilson and Bower, 1997). Ces composés peuvent être piégés dans les pores ou pénétrer dans les couches géologiques. Le dioxygène est l'accepteur terminal d'électron de la chaîne respiratoire, le plus énergétique qui soit dans le monde du vivant ce qui signifie que les organismes aérobies sont plus efficaces que n'importe quel micro-organisme anaérobie. L'O<sub>2</sub> est souvent un des éléments limitants des métabolismes hétérotrophes aérobies dans les environnements profonds où cette molécule n'évolue que par diffusion de la surface, lieu de la photosynthèse et de l'atmosphère, vers le sous-sol. En plus d'être plus efficace, certains métabolismes aérobies permettent la dégradation de molécules récalcitrantes et difficilement biodégradables par des métabolismes anaérobies.

La bio-remédiation consiste à ajouter ou activer des microorganismes responsables de la dégradation et/ou la transformation des contaminants (Lien et al., 2016; Trulli et al., 2016). Cette injection peut avoir différentes formes : 'bioventing', injection de dioxygène pur, injection de peroxyde d'hydrogène ou de l'air (EPA, 2017). Lorsque ce dioxygène devient peu concentré dans le milieu, l'activité des métabolismes anaérobies devient dominante (Baskaran et al., 2020; Kuo et al., 2012; Lien et al., 2016).

Une autre technique de bioremédiation est adoptée par *Trulli et al.* pour le traitement de sol souterrain contaminé par du diesel. Cette technique consiste à injecter à la fois de l'air et des microorganismes aérobies exogènes capables de dégrader les hydrocarbures dans le sous-sol. Afin d'augmenter l'activité biologique de ces micro-organismes, le milieu a été enrichi en nutriments (phosphates et nitrates principalement). La vitesse de disparition des hydrocarbures légers est de  $0,5 \pm 1,9 \text{ mg. (Kg de sol. Jour)}^{-1}$  et celle des hydrocarbures lourds est de  $4,2 \pm 8,5 \text{ mg. (Kg de sol. Jour)}^{-1}$  (Trulli et al., 2016). Bien que l'injection d'O<sub>2</sub> soit nécessaire pour la bio-remédiation, l'ajout de dioxygène dans les sous-sols anaérobies peut modifier leur équilibre ainsi que provoquer des oxydations inattendues.

## VI.2- O<sub>2</sub> comme contaminant de l'injection de CO<sub>2</sub>

Le concept de stockage géologique du CO<sub>2</sub> (CCS) est envisagé depuis plus de vingt ans et est largement accepté au sein de la communauté scientifique, des gouvernements et des industriels comme une option possible pour réduire les émissions de ce gaz à effet de serre. Les procédures de capture, telle que l'oxy-combustion, peuvent aboutir *in fine* à un CO<sub>2</sub> présentant des impuretés. La présence et la concentration de ces impuretés dépendent fortement de l'origine du CO<sub>2</sub>. Le dioxyde de soufre, l'azote et le dioxygène sont parmi ces impuretés (Lu et al., 2016; Renard et al., 2014). Un traitement serait possible mais induirait des coûts supplémentaires. Cependant, des limites maximales de concentration sont fixées. Une concentration maximale de 100 ppm est établie pour les oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) et les oxydes de soufre (SO<sub>x</sub>) afin d'éviter les problèmes de toxicité. Cette même valeur est fixée pour le dioxygène dans le CCS (Posch and Haider, 2012).

Le stockage du dioxyde de carbone dans les réservoirs géologiques induit donc l'introduction de nouveaux éléments (en plus du CO<sub>2</sub>) pouvant servir de sources de soufre oxydé, d'azote et de dioxygène dans ces environnements. Si le réservoir géologique ciblé abrite la vie (températures inférieures à 120 °C), les communautés microbiennes en seront fortement impactées. Cependant, il est difficile de faire la distinction entre les effets observés uniquement imputables au CO<sub>2</sub> qui est majoritaire et ceux liés à la cohorte des impuretés co-injectées. *Morgan et al.* ont montré une réduction remarquable du développement microbien en présence d'une concentration de 100 ppm d'O<sub>2</sub> dans l'eau sous une température d'incubation de 37 °C pour 29 jours (Morgan et al., 2017). Ainsi, les bactéries sulfato-réductrices, micro-organismes typiques des environnements profonds anoxiques, sont inactivées alors qu'à une pression de 1 bar d'un mélange de CO<sub>2</sub> et 10 ppm d'O<sub>2</sub>, leur activité était maintenue (Morgan et al., 2017).

Ces données coïncident avec des expériences sur les bactéries sulfato-réductrices. En effet, selon une étude menée par *Marschall et al.*, la quantité de dioxygène présente dans le milieu agit directement sur l'activité des bactéries sulfato-réductrices. La concentration maximale d'O<sub>2</sub> dans l'eau où les MSR survivent est de 15 µmol/L (6 % de la saturation d'air). Au-dessus de cette concentration, la sulfato-réduction n'est pas détectée. En présence d'une concentration inférieure à 15 µmol/L, la sulfato-réduction est trois fois moins rapide qu'en condition anaérobie (Marschall et al., 1993).

Au-delà de l'effet direct et physiologique de l'O<sub>2</sub> sur la cellule microbienne, l'O<sub>2</sub> comme impureté, même en faible pourcentage, agit sur l'équilibre géochimique du milieu. L'oxydation

de la pyrite est notamment un des effets souvent observés. Le résultat de cette oxydation est l'augmentation des ions sulfates dans l'eau souterraine (Jung et al., 2013; Koenen et al., 2011; Lu et al., 2016; Renard et al., 2014; Shao et al., 2014; Vu et al., 2018; Wei et al., 2015). Cela est observé par *Vu et al.* lors du stockage de CO<sub>2</sub> avec 6150 ppm d'O<sub>2</sub> et 67 ppm de dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) comme impuretés dans un réservoir de stockage à une température de 60 °C et une pression de 140 bar. La concentration de sulfates dans l'eau a augmenté de 10 à 45 mg/L. L'oxydation du dioxyde de soufre n'est pas la seule source de ce sulfate ; cette augmentation est due à l'oxydation de la pyrite présente dans le réservoir aussi (Vu et al., 2018). Le SO<sub>2</sub> est une impureté souvent observée lors du stockage de carbone. Plusieurs études indiquent l'augmentation de l'acidité du milieu et la concentration de sulfate lorsque le SO<sub>2</sub> et l'O<sub>2</sub> se trouvent comme impuretés (Renard et al., 2014). Les ions sulfates abondants dans la phase liquide peuvent ensuite se précipiter en anhydrite ou barite (André et al., 2015; Vu et al., 2018). Dans certains cas, la concentration de sulfate peut augmenter jusqu'à saturation. Ainsi, les sulfates peuvent réagir avec le calcium présent dans la solution pour former de l'anhydrite CaSO<sub>4</sub> ou du gypse CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Jung et al., 2013; Renard et al., 2014). Egalement le sulfate peut être utilisé par les microorganismes présents dans le milieu (sulfato-réduction dissimilatrice mais également assimilatrice). L'activité microbienne anaérobie des MSR peut provoquer un colmatage dans les puits. Cela est observé par *Zettlitzer et al.* où le composé sulfuré produit par ces micro-organismes a réagi avec les ions ferreux pour former le sulfure de fer (Zettlitzer et al., 2010). La production de ce sulfure de fer a causé le colmatage provisoire du puits situé dans la région de Ketzin en Allemagne (Zettlitzer et al., 2010). Ainsi, la présence du dioxygène dans le sous-sol peut avoir des effets inattendus d'où l'importance de ces études.

### VI.3- Enhanced Oil Recovery

L'extraction des huiles brutes est, au début, assurée par des mécanismes primaires, comme la pression du réservoir. Mais au fur et à mesure de la production, les quantités de produits et la pression du réservoir diminuent. La continuité d'une production rentable nécessite alors d'autres mécanismes (Springham, 1984).

L'étude sur la biodégradation des composés aromatiques est bien développée. L'étude consacrée à la biodégradation anaérobie est récente. Les analyses ont permis d'avoir une idée sur le comportement microbien dans les sous-sols profonds où la présence de dioxygène est rare. De son côté, la respiration aérobie est largement étudiée ainsi que la biodégradation aérobie des BTEX qui a permis de dépolluer de nombreux rejets de carburants (Wanner et al., 2019; Wilson and Bouwer, 1997). Le dioxygène nécessaire à la respiration n'est fourni que par

diffusion et dispersion de l'air dans le sous-sol. A cause de la faible quantité de dioxygène, ce gaz est compté comme limitant dans la réaction de dégradation aérobie. Mais dû à sa forte consommation et sa faible solubilité dans l'eau, les zones souterraines deviennent rapidement anoxiques. Les microorganismes facultativement anaérobies/aérobies peuvent se retrouver dans les sous-sols et utiliser, s'il est présent, le dioxygène. Certains composés aromatiques ne sont pas facilement dégradables. Parfois l'ajout de dioxygène est susceptible d'améliorer cette biodégradation, mais il est nocif aux microorganismes strictement anaérobies.

Loin d'être la plus utilisée, une des techniques d'amélioration de la production pétrolière, connue depuis plus de 70 ans, est basée sur la microbiologie : la MEOR (Microbial Enhancement of Oil Recovery). La MEOR consiste à stimuler la biodégradation des hydrocarbures pour alléger l'huile, produire des bio-surfactants afin de diminuer la viscosité, générer des biofilms dans le but de diminuer la perméabilité des plus grands pores, favoriser le passage dans les petits pores et modifier les chemins d'écoulement préférentiel. La stimulation microbienne peut être réalisée par injection de nutriments afin d'enrichir le milieu et ainsi augmenter l'activité microbienne (Dong et al., 2015; Nazina et al., 2019), ou par injection de microorganismes d'intérêt directement dans le réservoir. Une étude préliminaire sur le microbiome présent *in situ* est nécessaire afin de s'assurer de l'efficacité de cette technique. En effet, le microbiome varie beaucoup d'un réservoir à un autre, même parfois d'un puits à un autre (Zhang, 2015). Plusieurs résultats de cette technique sont observés comme l'augmentation de la pression dans le puits dû à la production microbienne de composés gazeux, la diminution de la viscosité de l'huile ce qui facilite la production ainsi que la biodégradation des molécules lourdes (She et al., 2019; Springham, 1984). Les métabolismes microbiens capables de dégrader les hydrocarbures peuvent être anaérobies comme aérobies (Liu et al., 2018; Nazina et al., 2005; Pannekens et al., 2019; Springham, 1984). Pour les métabolismes aérobies, les microorganismes peuvent utiliser le dioxygène présent dans l'eau souvent injecté dans les réservoirs pour faciliter la production (Liu et al., 2018; Nazina et al., 2005; Pannekens et al., 2019). Ainsi, les conditions du réservoir sont favorables pour les deux types de dégradation et les micro-organismes anaérobies peuvent se développer en consommant les produits issus de la biodégradation aérobie. Plusieurs études montrent le développement des bactéries sulfato-réductrices et des méthanogènes dans de telles conditions (Dong et al., 2015; Nazina et al., 2005; Ridley and Voordouw, 2018). Le dioxygène peut également être volontairement injecté dans les réservoirs afin d'augmenter l'activité aérobie (Cai et al., 2015; Jia et al., 2018; Nazina et al., 2019). Malgré l'environnement anaérobie dans les réservoirs, l'injection de dioxygène est capable de développer les microorganismes aérobies inactifs présents. L'augmentation de

la diversité microbienne dans un réservoir observé après l'injection de dioxygène par *Cai et al.* leur a permis de confirmer la présence du potentiel aérobie. L'augmentation de la cinétique de dégradation des hydrocarbures a permis de valider la biodégradation aérobie en sous-sol (Cai et al., 2015).

## VII- Conclusions

Dans le cadre du changement climatique, le biométhane ainsi que le dihydrogène sont deux alternatives prometteuses pour substituer les combustibles fossiles, comme présenté dans ce chapitre. L'état de l'art présenté ci-dessus montrent l'intérêt du stockage massif de ces deux nouveaux gaz dans les réservoirs de stockage existants et utilisés aujourd'hui pour le stockage de gaz naturel. Des études ont été menées pour identifier les interactions pouvant avoir lieu entre le dioxygène ou le dihydrogène et les différentes phases d'un aquifère de stockage. Cependant, peu d'études ont permis d'acquérir les informations nécessaires sur l'effet de ces gaz sur la globalité du stockage dans les conditions de pression et de température du réservoir. D'où l'intérêt du projet RINGS qui consiste à reproduire expérimentalement un aquifère de stockage et à acquérir ces connaissances manquantes sur l'effet de l'injection du dioxygène et du dihydrogène dans les aquifères profonds. Dans le cadre du projet pluridisciplinaire, les résultats permettent de présenter les interactions entre la phase solide, la phase aqueuse, la phase gazeuse et les microorganismes microbiens. Le chapitre suivant présente les matériels et les méthodes utilisés pour aboutir aux résultats.

*Chapitre 2.*  
*Matériels et Méthodes*

---



Le chapitre suivant présente et décrit les différents dispositifs utilisés au cours de cette thèse, ainsi que les méthodes et protocoles expérimentaux. Il permet de présenter le pilote utilisé pour la reproduction des conditions des aquifères et les techniques d'analyses chimiques, biologiques et minéralogiques employées. Les protocoles de manipulation, de lancement et d'arrêt des expériences sont de même développés dans ce chapitre.

## I- Pilote expérimental

### I.1-Présentation du pilote

Notre étude, comme présenté précédemment, consiste à reproduire les conditions des aquifères dans le réacteur et observer l'effet de l'injection de nouveaux gaz ( $O_2$  et  $H_2$ ). Le pilote expérimental utilisé dans cette thèse a été conçu spécialement pour répondre aux conditions des deux aquifères étudiés. Le premier site de stockage est situé dans le Sud-Ouest de la France et est opéré par Teréga. Au niveau du puits ayant servi à l'échantillonnage, la pression de la formation est de 60 bar avec une température de 36 °C. Le puits de prélèvement se situe à 582 m de profondeur et est le puits de contrôle le plus proche de la bulle de gaz, bien que cette distance soit variable en fonction du volume stocké. Le deuxième site UGS est situé dans le bassin parisien en région Centre Val-de-Loire. Le puits échantillonné prélève l'eau de formation à 989 m de profondeur (95 bar, 47 °C). Le réacteur a été conçu pour supporter une pression maximale de 150 bar et une température maximale de 150 °C.

La Figure 9 présente le schéma du dispositif utilisé. Ce dispositif expérimental a été développé spécialement pour nos travaux. Il a été fabriqué par la société **Sanchez Technologies**. Le réacteur est construit pour répondre au cahier des charges que nous avons proposé pour le projet RINGS. Il permet de mettre en interaction les trois phases principales d'un aquifère : la phase solide, la phase liquide et la phase gazeuse. Le pilote possède la certification PED 2014/68/EU, obligatoire pour les équipements sous pression et qui assure la sécurité et la robustesse de l'équipement. Tous les constituants du pilote (à l'exception du panier) sont en Hastelloy C-276 pour éviter tout problème de corrosion.



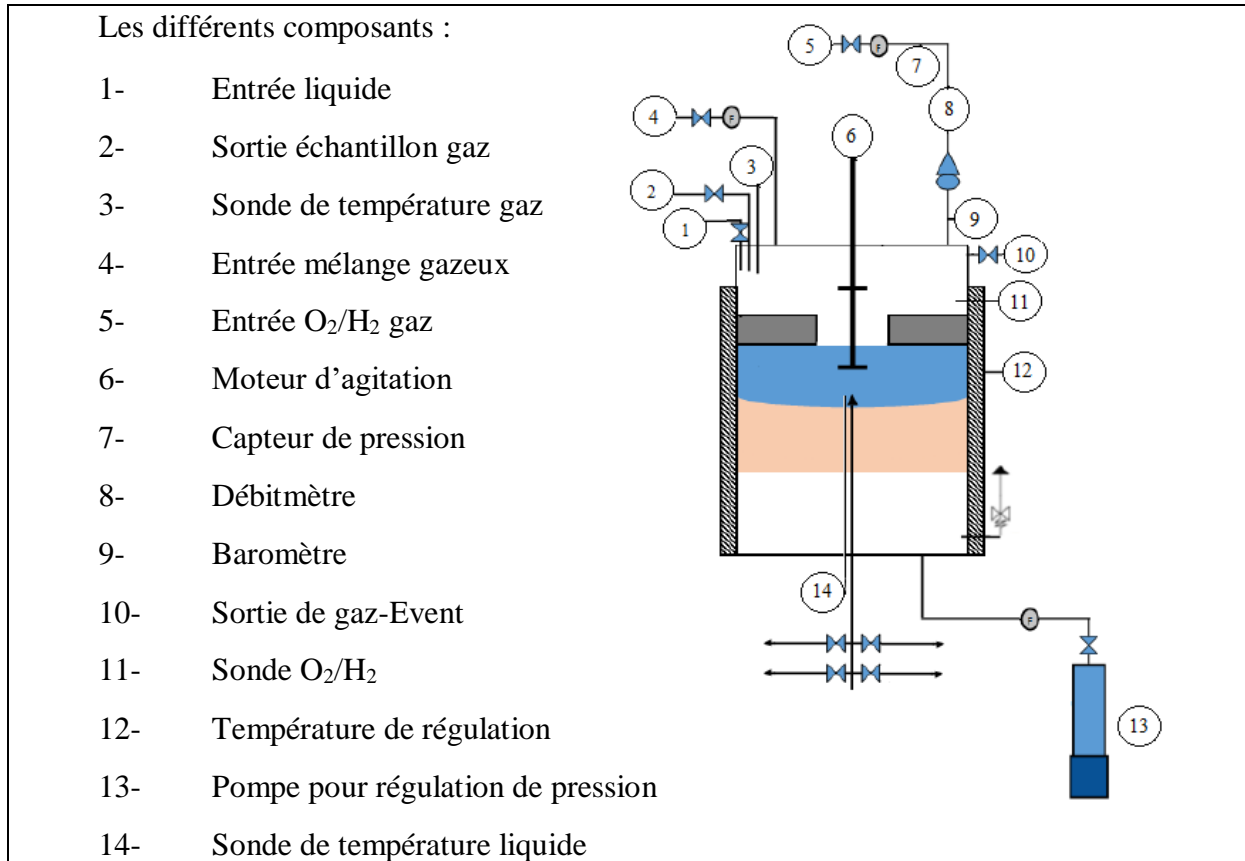


Figure 9 - Schéma du pilote expérimental

Le réacteur a un volume total de 5,41 L. Le volume disponible dans le réacteur est de 4,2 L, cette valeur correspond au volume obtenu lorsque le piston est dans sa position la plus basse.

L'agitation du système est composée d'un moteur à vitesse variable et d'un axe d'agitation facilement démontable. La vitesse maximale d'agitation est de 500 tours/min. Deux axes sont fournis :

- Un axe court qui permet d'agiter la partie supérieure du réacteur (phase gazeuse),
- Un axe long avec un agitateur à double disque à quatre pales verticales pour la phase gazeuse et une turbine Rushton pour la phase liquide.

Pour assurer une pression constante tout au long de l'expérience, un piston libre contrôlé par une pompe STIGMA 1L (Figure 9-point 13) est utilisé. Cette pompe possède un volume de 1000 cm<sup>3</sup>. Grâce à la pompe, la régulation de la pression à l'intérieur de la cellule est effectuée en poussant le piston vers le haut (augmentation de pression interne) ou en tirant le piston vers le bas (diminution de la pression interne). Un capteur de pression est connecté à la pompe, avec une précision de 0,05 % de l'étendue de mesure. La pompe peut tenir jusqu'à 150 bar de

pression. Elle peut fournir un débit de 220 mL/min maximum avec une précision de 0,1 % de la consigne demandée.

Dans le réacteur, un panier en téflon est utilisé pour contenir la phase solide. Ce panier est composé d'un disque fritté métallique soutenu par un support métallique. Il possède un volume de 225 mL. Les pores de ce disque en Hastelloy C-276 ont une taille inférieure à 10  $\mu\text{m}$ .

### I.2- Instruments de mesure sur le réacteur

La pression dans le réacteur est mesurée à l'aide d'un capteur de pression Keller PAA33 X en Hastelloy C-276. Ce capteur peut mesurer jusqu'à 300 bar et possède une précision de 0,1 % de l'étendue de mesure.

De même, un débitmètre  $\text{O}_2/\text{H}_2$  est installé pour mesurer et contrôler les débits de gaz entrants. Le débitmètre utilisé est un Bronkhorst model F-221M Mass Flow Controller (MFC). Afin de le protéger, un clapet anti-retour est placé à la sortie de ce dernier. La valeur mesurée est précise à  $\pm 0,1$  % de l'étendue de mesure qui est de 200 bar.

La température au sein du réacteur est gérée par un manteau chauffant isolant à résistances internes. Ce manteau peut chauffer jusqu'à 150  $^\circ\text{C}$ . La température à l'intérieur de la cellule est mesurée à l'aide de thermocouples. La précision est de  $\pm 1$   $^\circ\text{C}$ .

Pour la sécurité du système, une soupape de sécurité est installée sur une chambre de compensation de pression. Cette soupape permet de transformer le réacteur en un système clos, si le système de sécurité est déclenché. Cela évite de diffuser à l'extérieur les produits présents à l'intérieur du réacteur.

Afin de connaître la position du piston libre au sein du réacteur, des convertisseurs linéaires sans contact sont utilisés. Des capteurs de position sont utilisés et possèdent une précision de  $\pm 100$   $\mu\text{m}$  pour une mesure allant de 0 à 500 mm et de  $\pm 0,02$  % pour les mesures supérieures à 700 mm.

L'équipement expérimental est piloté par le logiciel Falcon Software développé par SANCHEZ TECHNOLOGIES. Il permet le pilotage complet du réacteur et l'acquisition de données : la pression totale dans le réacteur, la température de la phase liquide et de la phase gazeuse, la position du piston dans le réacteur, la pression partielle d' $\text{O}_2$  ou d' $\text{H}_2$  ainsi que la pression et la position du piston dans la pompe.

Le réacteur est monté sur un châssis pouvant supporter l'ensemble du système. Ce châssis sert aussi comme support pour les chromatographies gazeuse et ionique (Figure 10).



*Figure 10 - Photo du pilote expérimental utilisé avec à droite de la photo la chromatographie ionique et à gauche la chromatographie gazeuse.*

## II- Méthode expérimentale

### II.1- Protocole de lancement d'une expérience

#### II.1.a- Préparation des phases liquides

Selon l'expérience, de l'eau de puits ou de l'eau synthétique possédant une composition similaire à l'eau de puits est utilisée. Lors des expériences biotiques, l'eau de puits est de l'eau de formation prélevée directement au fond du puits à l'aide d'un préleveur de fond. Ce mode de prélèvement garantit une procédure évitant toute contamination biologique issue de la canalisation ou de la tête de puits. Deux préleveurs de contenance de 600 mL chacun ont été utilisés tour à tour pour la récupération des échantillons d'eau exploités dans les expérimentations biotiques (avec les microorganismes). De plus, des volumes d'eau supplémentaires ont été récupérés directement en tête de puits et stockés anoxiquement à 4 °C jusqu'à utilisation.

Le tableau suivant présente les caractéristiques physico-chimiques et les compositions de l'eau Ab\_L\_1 (données fournies par Téréga) et de l'eau Pb\_T\_1 (données fournies par Storengy) utilisées au cours de cette thèse :

Tableau 2: Propriétés physico-chimiques et compositions détaillées des eaux de formations Ab\_L\_1 et Pb\_T\_1 utilisées.

Paramètres physico-chimiques	Ab_L_1	Pb_T_1	Unités
pH	7,6	7,9	
Potentiel Redox	-259	-365,6	mV
Conductivité à 25 °C	330	1256	µS/cm
Carbone organique	0,38	<1	mg/L
<b>Composés</b>			
Chlorure	8,54	252	mg/L
Fluorure	0,081	4,5	mg/L
Nitrate	0,213	<0,1	mg/L
Nitrite	0,024	<0,02	mg/L
Phosphate	0,385	<0,05	mg/L
Sulfate	8,017	14,3	mg/L
Carbonate	0,5	0	mg/L
Bicarbonate	183,707	519	mg/L
Calcium	47,53	10,3	mg/L
Fer	369,3	384	µg/L

Fer dissous	304,304	-	µg/L
Magnésium	5,99	3,4	mg/L
Potassium	6,071	10,7	mg/L
Sodium	11,341	342,4	mg/L

II.1.a.1- Préparation des eaux abiotiques à partir des eaux prélevées en tête de puits

L'eau récupérée en tête de puits est filtrée avec des filtres à membrane PES 47 mm, 0,1 µm de porosité (Sartorius Stedim) afin de la stériliser.

Au cours des expériences, des solutions sont injectées dans le réacteur pour approvisionner le milieu. Durant l'expérience CH<sub>4</sub>- 1 % CO<sub>2</sub>-1 % O<sub>2</sub>, plusieurs injections ont eu lieu afin d'alimenter la phase liquide en sulfates. La quantité souhaitée de sulfate de sodium est pesée et solubilisée dans une quantité connue d'eau de formation récupérée en tête de puits, dans la chambre anaérobie. Cette eau a été préalablement filtrée à 0,1 µm (IC Millex®, Millipore). Le Tableau 3 présente la masse de sulfates ajoutée à l'eau de tête puits filtrée. Le sel utilisé est le sulfate de sodium anhydre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Afin d'alimenter la phase liquide en toluène, la solution de toluène injectée durant cette même expérience correspond à un mélange de 8 g d'eau de tête de puits filtrée à 0,1 µm avec 0,3 µL de toluène pur. De ce mélange 7,5 g sont injectés dans le réacteur. Pour assurer cette injection, une pompe seringue est utilisée. Cette pompe 'PHD 4400 Syringe pump' est fournie par Harvard Apparatus.

Tableau 3: Préparation de solutions de sulfates injectées au cours de l'expérience CH<sub>4</sub>- 1% CO<sub>2</sub>- % O<sub>2</sub>.

Jour	Masse Eau (g)	Masse Sulfates (mg)	Masse injectée dans le réacteur (g)
47	500	22,9	370
103	500	22	407
125	300	33	185

Une seule injection d'eau de formation est effectuée durant l'expérience  $\text{CH}_4\text{-CO}_2\text{-H}_2$ . L'eau de formation Pb\_T\_1 récupérée de tête de puits est filtrée à  $0,1 \mu\text{m}$  avec des filtres en membrane PES 47 mm (Sartorius Stedim) dans la chambre anaérobie. Une masse de 855 g est injectée dans le réacteur à  $t = 53 \text{ J}$ .

### II.1.b- Préparation de la phase solide

Un échantillon de roche de réservoir est utilisé pour former la phase solide de notre système. Dans le cas d'étude sur le dioxygène, la roche correspond à des 'cuttings' alors que dans le cas d'étude sur le dihydrogène, la roche correspond à des débris de carottes. Avant utilisation, la roche du réservoir est rincée à l'isopropanol puis à l'eau déminéralisée afin d'évacuer toute matière ajoutée lors du forage telle que les sels de forage. Ensuite l'échantillon de solide est séché à l'étuve sous  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant une nuit. Des capillaires en borosilicate de 1 mm de diamètre et de 3 cm de hauteur sont remplis de la phase solide et placés dans le panier aussi pour des analyses de tomographie à rayons-X (Figure 11). Des imageries à Rayons-X sont menées sur ces capillaires avant l'expérience, ainsi qu'à la fin. L'imagerie est réalisée sur une partie fixe du capillaire. Du coton est utilisé pour boucher le fond des capillaires et maintenir la phase solide tout en permettant le déplacement de la phase liquide (et des micro-organismes) par capillarité (Figure 12).

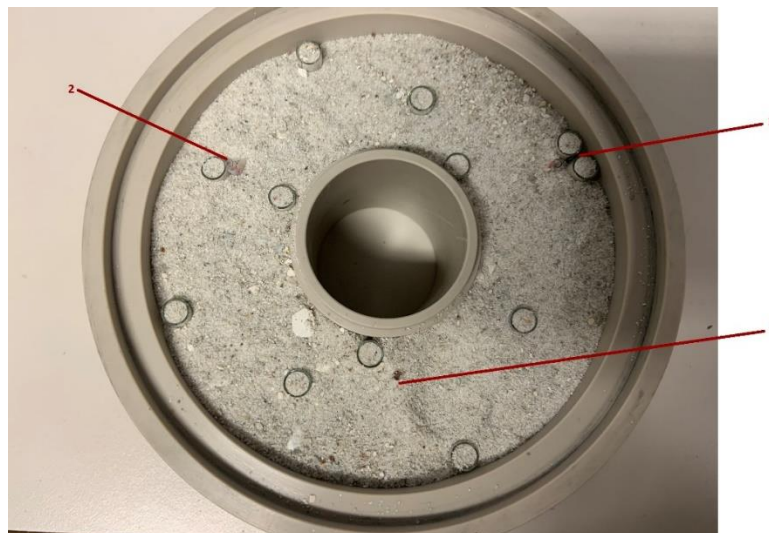


Figure 11 - Disposition des capillaires de sable dans le panier pour l'expérience de  $\text{CH}_4\text{-1\% CO}_2\text{-1\% O}_2$ . La numérotation permet, à la fin de l'expérience, de récupérer les capillaires analysés avant l'expérience.

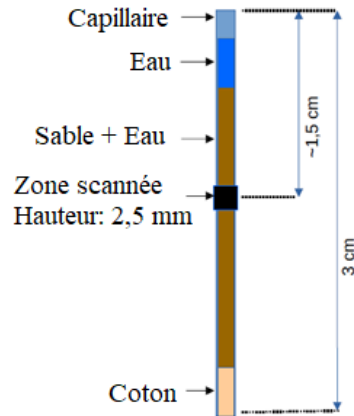


Figure 12 – Remplissage du capillaire en borosilicate de coton et de sable.

### II.1.c- Préparation du pilote

Après disposition du panier rempli de la phase solide et des capillaires dans le réacteur, ce dernier est fermé. Un flux d'azote est appliqué au réacteur pour éliminer le dioxygène présent. Des tests d'étanchéité sont menés pour s'assurer de l'absence de fuite de gaz. Ces tests sont effectués en injectant de l'azote dans le réacteur à une pression de 100 bar. Si la pression du réacteur est constante pendant 24h, l'étanchéité est assurée. Après cette étape, le réacteur est vidé par la sortie de gaz vers l'évent. Avec un petit volume de 60 mg d'eau ultra-pure, le réacteur est chauffé à 110 °C pendant la nuit pour le stériliser.

### II.1.d- Injection de la phase liquide dans le réacteur

En utilisant une pompe à vide, la pression du réacteur est diminuée à 0,35 bar. En effet, le vide absolu n'est pas appliqué puisque les sondes de dioxygène et de dihydrogène utilisées sur le réacteur (Figure 9-11) ne le supportent pas. A l'aide d'une bouteille en téflon de 2 L contenant le liquide à injecter, une faible pression de 2 bar d'azote filtré est appliquée dans cette bouteille. Cette bouteille de téflon est fermée à l'aide d'un bouchon en caoutchouc. Un raccord 'luer lock' métallique stérilisé est branché à la vanne d'entrée liquide du réacteur. A l'aide d'une aiguille, le liquide passe par la vanne vers le réacteur par différence de pression. L'injection de la phase liquide en début d'expérience est ainsi assurée.

La masse de 1,39 Kg de Ab\_L\_1 est injectée en début d'expérience CH<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>. Ce volume provient du mélange de deux échantillons prélevés avec les préleveurs de fond (219 g et 415 g), qui ne sont pas filtrés et qui donc contiennent les microorganismes de fond, avec 854 g d'eau Ab\_L\_1 de tête de puits filtrée à 0,1 µm (en utilisant des membranes PES 47mm, 0,1µm, Sartorius). Avant injection, un échantillon de 100 g est prélevé pour les analyses de

diversité par des approches de biologie moléculaire. Lors du prélèvement d'eau en fond de puits, les volumes théoriques des deux préleveurs ( $2 \times 600$  g) n'ont pu être obtenus. La présence de gaz a pu en être responsable. La quantité totale est stocké à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment d'injection.

Pour l'expérience  $\text{CH}_4\text{-CO}_2\text{-H}_2$ , une quantité de 1 088 g est récupérée par prélèvement souterrain avec deux préleveurs. La masse de 612 g d'eau de tête de puits filtrée à  $0,1\ \mu\text{m}$  est ajoutée pour arriver à une quantité finale de 1 700 g. Après prélèvements pour des analyses sur l'échantillon avant injection, 1 460 g de Pb\_T\_1 sont injectés dans le réacteur.

Une deuxième technique d'injection de liquide, basée sur la différence de pression, a dû être réfléchi afin d'injecter un volume de liquide en cours d'expérience. Elle consiste à remplir, en anaérobiose, le liquide à injecter dans un réacteur mobile stérilisé de 1 L. Avec de l'azote comme phase gazeuse, le liquide est poussé vers le réacteur en appliquant une pression d'azote supérieure à celle présente dans notre système expérimental. La pesée du contenant avant et après injection nous permet de connaître la masse d'eau injectée dans le réacteur. Les analyses de gaz en début d'expérience montrent que très peu d'azote rentre dans le réacteur (inférieur à  $0,1\%$ ). La figure ci-dessous présente le schéma du dispositif.

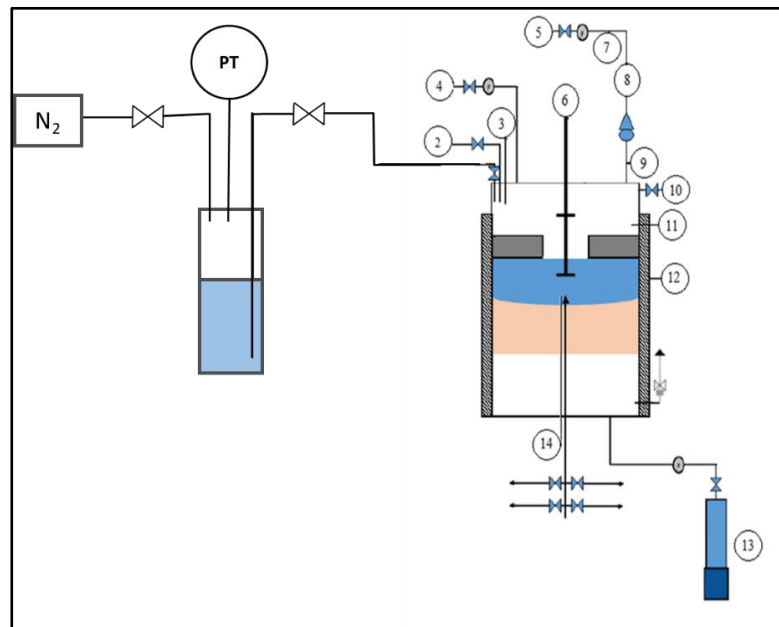


Figure 13 - Schéma représentant l'injection de liquide dans le réacteur en utilisant un réacteur mobile.



II.1.e- Injection de la phase gazeuse

Avant l'injection de la phase gazeuse, la position du piston est ajustée de sorte que le panier baigne dans la phase liquide. Afin de vérifier le bon positionnement, des mesures sont effectuées préalablement et sont présentées dans le Tableau 4. En effet, selon l'axe d'agitation installé dans le réacteur, la position maximale du piston et donc le volume de liquide nécessaire pour baigner 1 cm du panier ou tout le panier sont influencés. Ainsi, selon la masse de liquide restante dans le réacteur et la hauteur de panier immergé souhaitées, la position du piston est fixée grâce à cette pré-étude.

Tableau 4: Position du piston en fonction du volume de liquide dans le réacteur

Position du piston avec agitateur de la phase liquide		
Masse d'eau à l'intérieur (g)	cm du panier immergé	Position piston (mL)
1500	Total	210-220
	1	150
1000	Total	710-720
	1	650
900	Total	810-820
	1	750
> 1800	Total	0-5
1750	1	0-5
Position du piston avec agitateur de la phase liquide		
Masse d'eau à l'intérieur (g)	cm du panier immergé	Position piston (mL)
800	Total	910-920
	1	850
400	Total	1310-1320
	1	1250
350	1	1300

Après cela, un flux continu du mélange gazeux  $\text{CH}_4 - 1\% \text{CO}_2 - 7,95 \text{ ppm}$  de benzène et  $3,57 \text{ ppm}$  de toluène (Tableau 14) est appliqué au réacteur jusqu'à disparition de l'azote. Ce flux est appliqué en même temps qu'une ouverture de la vanne vers l'évent. La composition de la phase gazeuse est suivie par chromatographie gazeuse (partie III.2). Après élimination complète

de l'azote, le mélange gazeux est injecté dans le réacteur jusqu'à atteindre la pression souhaitée.

Le gaz injecté est filtré. Le boîtier de filtre SS117.201 (Classic Filters, Rochester England) est utilisé avec des filtres 12.32.E3 (Classic Filters, Rochester England) en ester époxy à 0,3  $\mu\text{m}$  de diamètre de pores.

## II.2- Protocole d'arrêt de l'expérience

A la fin de l'expérience et après avoir effectué tous les prélèvements de liquide et de gaz nécessaires, le volume de liquide restant est récupéré à l'aide du raccord 'luer lock' vers un flacon d'1L en pyrex bouché avec un bouchon butyl (maintien de l'étanchéité) et dégazé avec de l'azote. Ainsi, le liquide est stocké avec une phase gazeuse inerte, dans une chambre froide à 4 °C. Suite à cette étape, la phase gazeuse du réacteur est évacuée par la sortie gaz vers l'évent. Cette descente en pression s'effectue très lentement afin de ne pas perturber la phase solide (entre 0,3 et 0,45 bar/min). Après que la pression interne ait atteint 2 à 3 bar, un flux continu d'azote est effectué sur le réacteur pour évacuer le mélange gazeux de méthane. Une pression supérieure à la pression atmosphérique est toujours maintenue au sein du réacteur pour éviter l'entrée d'air dans le système. Suite à cela, les étapes s'enchaînent : ouverture du pilote, prélèvement du panier et disposition du panier dans une jarre anaérobie afin d'être transporté vers la chambre anaérobie où les échantillons sont prélevés. Plus précisément, une fois le panier dans la jarre anaérobie, l'atmosphère de cette dernière est aussitôt remplacée par de l'azote et des catalyseurs préalablement installés capturent les dernières traces de dioxygène (sachets Anaerocult par Merck).

### III- Techniques et méthodes de mesure

#### III.1- Balances électroniques

Pour préparer les solutions synthétiques que l'on souhaite étudier, une balance de précision est utilisée. C'est une Ohaus Pioneer PA214C avec une précision de 0,1 mg.

Pour les solutions d'étalonnage, les masses inférieures à 210 g sont pesées à l'aide d'une balance électronique fournie par Denver Instrument (TP-214). Pour les masses supérieures, une deuxième balance Denver Instrument (MXX-2001) est utilisée. Les précisions de ces balances sont  $\pm 0,1$  mg et  $\pm 0,1$  g respectivement.

#### III.2- Chromatographie gazeuse

##### III.2.a- Dispositif utilisé

L'analyse de la composition de la phase gazeuse est assurée par une chromatographie gazeuse en ligne. La machine utilisée est une **Micro GC Fusion** fournie par **CHEMLYS**. Le processus d'analyse est constitué de l'injection de l'échantillon avec un gaz vecteur, de la séparation des composés dans une colonne spécifique, de la détection et du système des données final. Le choix de la colonne de séparation et du gaz vecteur est lié à la nature du gaz détecté. La colonne **Molsieve 5A** est utilisée avec de l'hélium comme gaz vecteur pour quantifier le méthane, l'hydrogène, le dioxygène et l'azote. La colonne **PLOT Q** est utilisée avec de l'argon comme gaz vecteur pour quantifier le dioxyde de carbone et le sulfure d'hydrogène. Cette chromatographie est sélectionnée pour deux critères : le faible volume d'échantillonnage nécessaire pour l'analyse et la rapidité de cette analyse. Les meilleures exactitudes et précisions sont obtenues pour des valeurs supérieures à 200 ppm. Pour effectuer l'étalonnage, une bouteille métallique de 300 mL munie de 2 vannes est utilisée. En se basant sur la pesée, la proportion de chaque gaz dans le mélange est calculée. L'incertitude considérée sur la mesure est de 2 %. L'incertitude relative est calculée à partir des séries de valeurs obtenues.

Avant l'arrivée de l'échantillon gazeux dans la GC, un système de vannes et de piston est installé. Ce système sert à la réduction de la pression de l'échantillon. Après dépressurisation, l'échantillon passe par un filtre à membrane (taille de pores  $< 1\mu\text{m}$  fourni par GENIE 170 Membrane Separator) pour retenir le liquide et les particules accidentellement présentes. Ces matériaux sont inertes et fournis par **SILCOTEK**. La Figure 14 explique le trajet de l'échantillon du pilote jusqu'à la microGC.

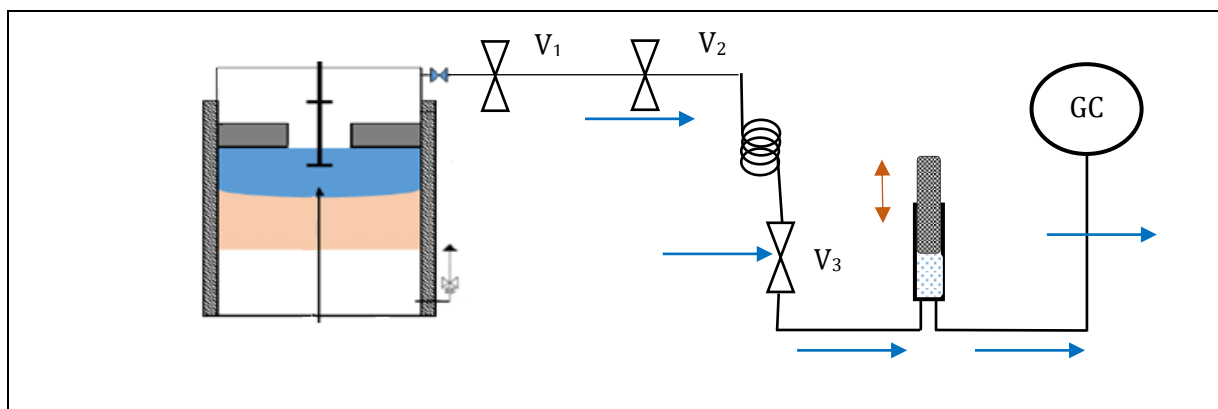


Figure 14- Processus de prélèvement de l'échantillon de gaz avant injection dans la microGC.

Le logiciel MicroGC Fusion permet de fixer le module d'analyse nécessaire, les paramètres de l'analyse ainsi que le lancement d'analyses, la gestion et le traitement des données.

### III.2.b- Protocole d'échantillonnage

Le sens d'ouverture des vannes est une manipulation importante à suivre lors de la prise d'échantillon afin de respecter la pression maximale de l'échantillon injecté dans la MicroGC. En effet, après le prélèvement de l'échantillon du réacteur (vannes  $V_1$  et  $V_2$  ouvertes, vanne  $V_3$  fermée), ce dernier subit une première dépressurisation dans le tube de compensation de pression. Une deuxième dépressurisation a lieu dans le piston (vannes  $V_1$  et  $V_2$  fermées, vanne  $V_3$  ouverte), où l'échantillon possède une pression entre 1 et 3 bar. Après cela, la vanne  $V_3$  est fermée. Il est conseillé d'effectuer 2 prélèvements dans le piston et d'analyser le 3<sup>ème</sup> afin d'avoir une composition fiable du gaz présent dans le réacteur. Le lancement de l'acquisition s'effectue manuellement sur le logiciel.

### III.3- Chromatographie ionique

#### III.3.a- Dispositif utilisé

La chromatographie ionique **Dionex Integrion HPIC** est capable d'analyser les anions présents dans un échantillon liquide. Cette chromatographie est fournie par **ThermoFisher Scientific**. Elle est équipée d'un système de pompe haute pression, d'une vanne d'injection haute pression et d'une détection conductimétrie et UV. La colonne 'Dionex IonPac AS28-Fast-4 $\mu$ m' (de diamètre 4mm et de longueur 150 mm) et une colonne de garde 'Dionex IonPac AG28-4 $\mu$ m' (de diamètre 4 mm et de longueur 30 mm) sont installées pour assurer la stabilité des temps de rétention des ions. La détection conductimétrie permet d'analyser les anions inorganiques, alors que la détection UV permet d'identifier les sulfures présents dans

l'échantillon. Les anions inorganiques analysés sont les fluorures, les acétates, les chlorures, les nitrites, les carbonates et les bicarbonates, les sulfates, les bromures et les nitrates. L'incertitude sur ces analyses est de  $\pm 5\%$ . L'incertitude relative est calculée à partir des séries de valeurs obtenues.

Une deuxième chromatographie 'Dionex DS5 Conductivity Detector' est utilisée. Cette dernière permet d'analyser les cations présents dans la solution comme le sodium, le potassium, le magnésium et le calcium. La colonne utilisée est une 'Dionex IonPac CS12A' (de diamètre 4 mm et de longueur 250 mm) avec une garde-colonne CG12A (de diamètre 4 mm et de longueur 50 mm). L'incertitude est de  $\pm 5\%$ . L'incertitude relative est calculée à partir des séries de valeurs obtenues.

L'étalonnage des deux chromatographies ioniques est effectué en préparant des solutions dont les compositions sont connues (par pesée de produit dans un volume d'eau connu). La solution initiale est ensuite diluée afin d'avoir plusieurs niveaux d'étalonnage. Afin de s'assurer du bon fonctionnement des instruments, un test est effectué chaque 2 à 3 mois. Des solutions de composition connue sont préparées et analysées.

### III.3.b- Protocole d'échantillonnage

Afin de prélever un volume représentatif de la phase liquide, un échantillon de volume 3 mL est évacué à partir de la vanne d'échantillonnage correspondant au volume mort. Pour les analyses de chromatographie ionique en triplicat, un volume de 10 mL de solution est nécessaire. L'échantillonnage du réacteur s'effectue en prélevant un volume de 10 mL dans une seringue connectée à la vanne d'échantillonnage liquide. Ce volume est après versé dans un flacon en verre qui est préalablement dégazé à l'azote ; flacon fermé avec un bouchon caoutchouc. Le flacon est conservé à température ambiante et les analyses sont effectuées aussitôt. Pour chaque analyse, le volume nécessaire est prélevé du flacon en utilisant une seringue munie d'une aiguille.

### III.4- Quantification du benzène et du toluène

#### III.4.a- Dispositif utilisé

L'identification et la quantification du benzène et du toluène dans les phases gaz et liquide sont réalisées à l'aide d'une chromatographie gazeuse (ThermoFisher Scientific) couplée à une spectroscopie de masse (ISQ QD Single Quadrupole MS- Trace 1310). Le pré concentration du benzène et du toluène est réalisée par SPME avec une fibre polydiméthylsilocane/carboxène

(PDMS/CAR) et la séparation chromatographique est réalisée par une colonne DB-624 (Agilent).

La figure suivante montre le fonctionnement du système GC/MS. Ces analyses sont effectuées à l'IPREM, institut partenaire du projet RINGS.

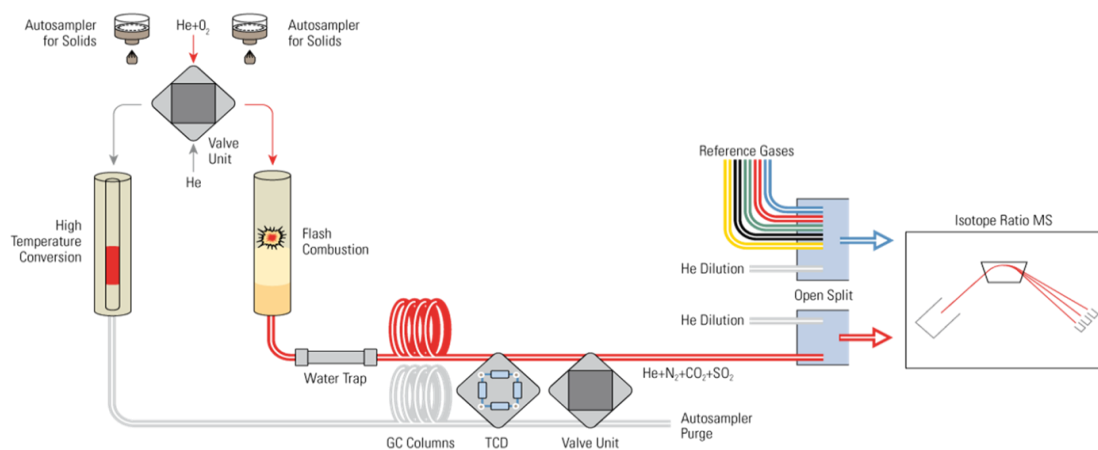


Figure 15- Fonctionnement de l'analyse élémentaire GC/MS.

#### III.4.b- Protocole d'échantillonnage

Pour effectuer les prélèvements, un système de raccord muni d'une aiguille spéciale pour des flacons de 20 mL en verre scellés avec du caoutchouc est utilisé. Les flacons sont sous-vides. Pour la phase liquide et identiquement au prélèvement de chromatographie ionique, 3 mL sont prélevés comme volume mort. Suite à cela, 2 échantillons liquides de 10 mL sont prélevés. Les échantillons liquides sont stockés à une température de 4°C. Avant l'analyse, 90 µL de l'étalon interne 1,2,4-triméthylbenzène à 0,5 ppm sont ajoutés pour chaque 6,9 g de liquide. Le même système de raccord est utilisé en ajoutant un manomètre afin de s'assurer que la pression dans le flacon ne dépasse pas les 2 bars. Trois échantillons de phase gazeuse sont récupérés. La quantification est réalisée avec du méthane contenant 10 ppm de benzène et de toluène comme gaz de référence.

#### III.5- Tomographie du solide

##### III.5.a- Dispositif utilisé

La tomographie à rayons X permet une inspection interne de l'objet scanné de manière non destructive à une résolution submicronique. Le capillaire est placé entre une source de rayons X et un détecteur. Lors de l'acquisition, le faisceau de rayons X conique illumine l'échantillon et une série d'images de projection 2D est enregistrée pour différentes orientations de l'échantillon. Les valeurs de pixels de chacune des images correspondent à l'intensité de

rayons X transmis et dépendent de l'atténuation du matériau qui est liée à sa densité et à son numéro atomique. L'ensemble des images 2D peut être converti en un ensemble de données tridimensionnelles, où chaque voxel (la contrepartie tridimensionnelle d'un pixel) correspond au coefficient d'atténuation linéaire du matériau physique situé à la position du voxel. L'analyse de la distribution 3D des coefficients d'atténuation linéaire permet de distinguer les différentes phases contenues dans l'échantillon, leur géométrie et leur emplacement à l'intérieur de l'échantillon.

Les analyses sont effectuées avec le tomographe à rayons X Zeiss Xradia Versa 510 qui est utilisé par le laboratoire DMEX (UPPA, Pau, France). Les paramètres d'acquisition sont sélectionnés en vue d'optimiser le contraste de l'image, le rapport signal sur bruit et la durée d'acquisition. Le générateur fonctionne à 40 KVp avec une taille de voxel de 2,5  $\mu\text{m}$ . L'ensemble des radiographies enregistrées est reconstitué avec XRM Reconstructor® (Zeiss, version 14) qui permet d'obtenir un empilement de coupes formant un volume numérique de l'échantillon. Ce logiciel de reconstruction est basé sur l'algorithme standard de rétroprojection filtrée.

Les données sont traitées, visualisées et interprétées à l'aide de Dragonfly® (ORS, Version 2020.2.0.11731). Une étape de filtrage est d'abord appliquée pour améliorer le rapport signal sur bruit des données. L'étape de segmentation suivante permet d'extraire les différentes phases pour une analyse quantitative plus poussée (proportion et localisation de chaque phase dans le volume étudié, comparaison des données avant et après l'expérience...).

### III.5.b- Protocole d'échantillonnage

Comme expliqué dans la partie I.4, des capillaires en borosilicate de 2 mm de diamètre et de 3 cm de hauteur remplis de la phase solide sont utilisés pour l'imagerie des rayons X. Du coton est utilisé pour bloquer le fond des capillaires tout en permettant le passage de la phase liquide. Ces analyses sont effectuées sur les capillaires avant et après l'expérience. Après ouverture du réacteur, les capillaires sont manipulés en chambre anaérobie où le haut et le bas du capillaire sont scellés avec une colle époxy résistante à l'eau. Cette étape permet de protéger l'échantillon de l'air ambiant. Les capillaires sont stockés à 4°C jusqu'au moment de l'analyse.

### III.6- Minéralogie

#### III.6.a- Dispositif utilisé

La Diffraction à Rayons-X (DRX) est utilisée pour étudier la minéralogie de la phase solide prélevée de l'aquifère et sur des échantillons de la phase solide après l'expérience. L'identification des minéraux est effectuée à l'aide d'un diffractomètre à poudre (Bruker D2 Phaser) avec une source de rayonnement Cu K $\alpha$ . Les motifs DRX sont enregistrés sur 5° à 90° 2 $\Theta$  avec un pas de 0,02° et un temps de comptage de 0,5 seconde par pas. L'identification minéralogique se fait à l'aide du logiciel 'DIFFRAC.EVA'. Ces analyses sont effectuées au sein du laboratoire IPREM (UPPA, Pau, France).

A la fin de l'expérience, la phase solide est analysée par le microscope électronique à balayage (Gemini SEM 300) fourni par Zeiss et combiné à une analyse à dispersion d'énergie (EDX) à 8 kV en mode électron secondaire (SE) ou électron rétrodiffusé (BSE). Cette technique est utilisée afin de localiser les phases minérales et de détecter la formation potentielle de biofilm. Ces analyses sont effectuées au sein du 'Bordeaux Imaging Center' (Université de Bordeaux, Bordeaux, France).

#### III.6.b- Protocole d'échantillonnage

En premier lieu, des échantillons de la roche de réservoir sont analysés avant l'expérience. Un échantillon homogène de la roche est analysé pour obtenir les phases minérales globales, ensuite un fractionnement entre les couleurs est effectué pour identifier les phases cristallisées potentielles, même si mineures.

Après ouverture du réacteur, des échantillons de la phase solide contenue dans le panier sont récupérés dans la chambre anaérobie. L'épaisseur du solide (3 cm) est divisée en 3 niveaux d'échantillonnage : solide à la surface du panier (incubation dans la phase gazeuse), solide au milieu du panier (interface gaz-liquide) et solide au fond du panier (incubation dans le liquide). Les échantillons sont ensuite séchés sous azote gazeux à température ambiante. Les échantillons sont broyés et moulus avec un mortier et un pilon jusqu'à avoir des particules de diamètre inférieur à 100  $\mu\text{m}$  et une poudre homogène. Chaque échantillon est déposé sur un porte-échantillon et est ainsi prêt à être analysé par DRX.

Pour les échantillons analysés par le microscope à balayage, les échantillons ont été fixés immédiatement dans un mélange de cacodylate 0,1 M et de glutathion à 2,5 % de pH 7,2. Ils sont ensuite séchés dans des solutions successives d'éthanol à 30 jusqu'à 100 % et enfin



évaporés à l'aide d'hexaméthylsilazane (HMDS). Les échantillons sont ensuite montés sur des portes-échantillons revêtus de platine.

### III.7- Techniques de microbiologie

#### III.7.a- Milieux de culture et dénombrements

Plusieurs milieux de culture ont été réalisés afin de dénombrer les microorganismes présents dans le réacteur. Ces études concernent l'expérience CH<sub>4</sub>-1% CO<sub>2</sub>-1% O<sub>2</sub> uniquement. Ils ont été répartis dans des tubes Hungate, ou Bellco pour ceux dont la phase gazeuse est H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 80/20, à raison de 9 mL par tube. Pour ce faire, les milieux de culture utilisés ont été préparés à partir d'une composition minérale reproduisant l'eau du site. Cette eau synthétique a ensuite été supplémentée en fonction des métabolismes ciblés listés dans le Tableau 5.

Tableau 5: Milieux de culture pour les dénombrements selon la technique du Nombre le Plus Probable (NPP)

Désignation	Groupes de microorganismes ciblés
483/2	Hétérotrophes fermentaires
643	Aérobies spécifique <i>Pseudomonas</i>
654	Sulfato-réducteurs
655	Aérobies Oligotrophes autotrophes
783/1	Thiosulfato-réducteurs
792	Ferri-réducteurs
793	Anaérobies nitrate-réducteurs
860	Acétoclastes
861	Méthylotrophes
862	Méthanogènes hydrogénotrophes

Les compositions physico-chimiques des milieux de culture sont présentées dans le Tableau 6. Les solutions d'oligo-éléments (SL10) et de vitamines V10 ont été préparées selon Eichler & Pfennig (1986) et Pfennig et al. (1981), respectivement. La solution de sélénite-tungstate (SeW) a été préparée selon (Widdel and Bak, 1992).

Les dénombrements ont été réalisés par dilutions successives de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup>, en triplicats, selon la technique du Nombre le Plus Probable (NPP) à partir d'un échantillon prélevé dans le réacteur juste avant l'ajout du dioxygène dans le système. Les dilutions ont servi à inoculer (1 mL) en triplicat les tubes (9 mL) et boîtes de Petri contenant les milieux spécifiques. Après

incubation, les cultures présentant des croissances sont identifiées par spectrophotométrie (DO à 600nm ; Spectronic 401, Spectronic Instruments) et confirmées par microscopie optique (BX60; Olympus). Les concentrations cellulaires dans l'échantillon de départ sont ensuite estimées statistiquement *via* la table de Mac Grady pour chaque groupe métabolique microbien.

Tableau 6: Composition des différents milieux synthétiques utilisés lors de cette étude. Les compositions à droite du tableau correspondent aux milieux préparés pour la culture des souches isolées pendant les expériences.

	NPP										Souches pures		
	483/2	643	654	655	783/1	792	793	860	861	862	2A	15A	Rect s6
Croissance en	Tube Hungate	Boîte de Petri	Tube Hungate	Tube à vis	Tube Hungate	Tube Hungate	Tube Hungate	Tube Bellco	Tube Hungate	Tube Bellco			
<b>Constitution pour 1L</b>													
NH <sub>4</sub> Cl (g)	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
KCl (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (g)	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (g)	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Cystéine-HCl (g)	1		1		1	1	1	1	1	1	1	1	1
Resazurine 0,1% (mL)	1		1		1			1	1	1	1	1	1
SeW (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,	0,5	0,5	0,5
NaHCO <sub>3</sub> (g)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Oligo-éléments SL10 (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Vitamines V10 (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Acétate de sodium (g)			0,82			6,8	6,8	0,5	0,5				
Extrait de levure (g)	10		0,5		0,1	1	1			0,2			0,1
Glucose (g)	2,5			0,1							1,8		1,8
Saccharose (g)					1								
Glycérol (mL)		10											
Peptone de caséine (g)	15				5	5	5						
Bactopeptone (g)				1									
Acide ascorbique (g)					0,25								
Acide nalidixique (g)		0,04											
Formiate de sodium (g)			0,68									0,68	
Pyruvate de sodium (g)			1,1										
Citrate de fer (g)						12							
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)			2,84									2,84	
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (g)					3								
NaNO <sub>3</sub> (g)							1,7						
Cétrimide agar (g)		43,5											
<b>Phase gazeuse</b>	N <sub>2</sub>	air	N <sub>2</sub>	air	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> 80/20	N <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> 80/20	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
<b>pH</b>	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8	6,7-6,8

### III.7.b- Isolement de microorganismes et culture des souches pures

Lors de l'expérience d'injection du dioxygène, les souches ont été isolées à partir du dernier tube présentant une croissance lors des dénombrements NPP. Les souches 15A et Rect s6 ont ainsi été isolées à partir des tubes de milieux 654 ciblant les sulfato-réducteurs alors que la souche 2A a, quant à elle, été isolée depuis le milieu 483/2.

Pour chaque souche, les isolements ont été réalisés par la méthode des séries de dilution en gélose profonde (Trüper & Pfennig, 1992). Pour cela, une eau gélosée à 33 g.L<sup>-1</sup> a été préparée avec de l'agar de qualité microbiologique, stérilisée 20 minutes à 121 °C. Elle a ensuite été distribuée stérilement dans des tubes Hungate stériles, à raison de 3 mL par tube, puis dégazée à chaud à l'azote.

Au moment des isolements, les tubes ont été immergés dans un bain marie bouillant puis 6 mL de milieu de culture stérile identique à celui des NPP leur correspondant ont été ajoutés à la gélose maintenue en surfusion. Pour chaque isolement, le premier tube est alors maintenu en surfusion à 45°C avant d'êtreensemencé avec 1 mL de suspension cellulaire, à savoir de cultures sur milieux 654 ou 483/2 comme indiqué ci-dessus. L'ajout de rifampicine à une concentration de 10 µg.mL<sup>-1</sup> a été nécessaire à l'isolement de Rect s6. Après homogénéisation, une série de dilution a été réalisée jusqu'à 10<sup>-6</sup>. Après homogénéisation, refroidissement et solidification des milieux, les tubes ont été incubés à 37 °C. Les colonies s'étant développées dans les géloses ont été prélevées à la seringue et remises en suspension dans 5 mL de milieu indiqué dans le **Tableau 6** puis incubées de nouveau à 37 °C.

La pureté des souches isolées a été vérifiée par des états frais au microscope à contraste de phase ainsi que par séquençage de leurs gènes ADNr 16S.

Les compositions des milieux de culture utilisés pour la croissance des souches pures isolées sont présentées dans le **Tableau 6**.

### III.7.c- Caractérisation des souches

#### III.7.c.1-Etude du métabolisme énergétique

- Souche 2A

Les produits de la fermentation en anaérobiose de la souche 2A ont été recherchés. La souche a été cultivée à 37 °C dans un tube Bellco avec, dans un premier cas, 10 mM de glucose comme source de carbone et avec, dans un second cas, 10 mM de glucose et 0,05 % (w/v) d'extraits de levures. Dans les deux essais, la phase gazeuse était de l'azote. La croissance de

la souche a été suivie par densité optique à 600nm (Spectrophotomètre, Spectronic Instruments, Spectronic 401) et l'évolution de la phase gazeuse par micro-chromatographie gazeuse (Chemlys). Les produits de fermentation ont été recherchés par chromatographie ionique (ThermoFisher). Pour ce faire, en fin de courbe exponentielle de croissance, 0,5 mL de culture ont été prélevés et filtrés à 0,22µm (IC Millex®, Millipore) dans un tube Hungate stérile dégazé puis repris dans de l'eau physiologique stérile jusqu'à un volume final de 2 mL avant d'être analysés.

- Souche 15A

Deux expériences de caractérisation ont été réalisées avec la souche 15A en flacons pénicilline de 120 mL, l'une pour tester l'utilisation de l'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> comme sources d'énergie et de carbone et l'autre pour rechercher les produits issus de sa respiration sulfate.

La première a consisté à cultiver la souche à 37°C avec de l'H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 80/20 comme source de carbone et d'énergie et 20 mM de sulfate comme accepteur terminal d'électrons. La possible utilisation de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> pour la souche a été recherchée par micro-chromatographie gazeuse et la croissance par suivi de la densité optique à 600 nm.

La seconde culture a été réalisée à 37°C, avec 10 mM de formate comme source de carbone et 20 mM de sulfate sous atmosphère d'azote. Comme précédemment, la croissance a été suivie par densité optique à 600 nm et l'évolution de la phase gazeuse par micro-chromatographie. Les produits de la respiration ont été recherchés par chromatographie ionique en prélevant et filtrant à 0,22 µm 0,5 mL de culture en fin de phase exponentielle de croissance. Ce volume a été repris dans un tube Hungate stérile dégazé dans de l'eau physiologique stérile jusqu'à un volume final de 2 mL puis analysé en duplicat en chromatographie ionique.

### III.7.c.2-Tolérance au dioxygène

Les souches 15A et Rect S6 ont chacune été testées vis-à-vis de leurs tolérances au dioxygène. Chaque souche a été cultivée avec différentes concentrations en dioxygène dans sa phase gazeuse. Pour ce faire, différents volumes d'air filtré à 0,1µm ont été ajoutés dans plusieurs tubes Bellco. Un tube ne contenant que de l'azote et un autre ne contenant que de l'air dans leurs phases gazeuses ont servi de témoins.

La concentration de dioxygène dans chaque tube a été dosée à t<sub>0</sub> et t<sub>f</sub>, directement dans la phase gazeuse du tube par micro-chromatographie gazeuse. La croissance dans les tubes a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm et observations microscopiques.

A la fin de l'expérience, chaque culture a été repiquée dans un milieu anoxique afin de savoir si le dioxygène avait simplement inhibé la croissance (souche micro-aérotolérante) ou tué les microorganismes (souche anaérobie stricte).

Pour la souche 2A, une expérience similaire à celle réalisée en anaérobiose (I.10.c.1-Souche 2A) a été réitérée dans un flacon pénicilline de 120 mL contenant 2/3 d'air comme phase gazeuse, sous agitation. Ici, la source de carbone était du glucose à 10mM. Les mêmes analyses que précédemment ont été réalisées.

### III.8- Techniques de biologie moléculaire

#### III.8.a- Prélèvements des échantillons en vue de la co-extraction des acides nucléiques

En vue de rechercher et de comparer la diversité microbienne tout au long de l'expérience, plusieurs prélèvements ont été réalisés en amont de l'expérience puis durant celle-ci. Les Tableau 7 et Tableau 8 indiquent les jours d'échantillonnage et les volumes prélevés respectivement pendant l'expérience de CH<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> et pendant l'expérience CH<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>.

Tableau 7: Prélèvements réalisés en vue des études de diversité microbienne durant l'expérience de CH<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>.

<b>Jour</b>	<b>Masse prélevée et filtrée (g)</b>
Avant injection	100
44	100
49	70
86	70
104	100
107	90
131	80
133	70
140	80
150	90
171	70
178	80

Tableau 8: Prélèvements réalisés en vue des études de diversité microbienne durant l'expérience de  $CH_4$ - $CO_2$ - $H_2$ .

Jour	Masse prélevée et filtrée (g)
Avant injection	100
9	70
21	70
22	70
51	70
56	70
65	90
78	75
84	75
87	70

Les échantillons ont été immédiatement filtrés sous vide sur des filtres en membrane PES 47 mm, 0.1  $\mu$ m de porosité (Sartorius Stedim) en respectant les conditions de stérilité (matériel stérilisé, bec bunsen). Les filtres ont été stockés à -80 °C jusqu'à leur utilisation afin de conserver les acides nucléiques, en particulier les ARN.

### III.8.b- Extraction des acides nucléiques

#### III.8.b.1- Extraction des ADN des souches isolées

Pour chaque souche pure isolée, 2 mL de culture ont été culottés par centrifugation à 10000 g pendant 5 minutes. L'ADN a été extrait depuis le culot à l'aide du kit DNeasy Power Soil (Qiagen), comme préconisé par le fournisseur.

#### III.8.b.2- Co-extraction des acides nucléiques

A partir des eaux, les filtres préalablement stockés à -80 °C ont été broyés dans de l'azote liquide et les acides nucléiques ont été extraits jusqu'à l'étape d'élution au moyen du kit Fast RNA ProSoil Direct (MP BIO). Dans le cas de l'étude avec l'hydrogène, des échantillons de roche incubée ont également été prélevés stérilement à trois profondeurs (surface, milieu et fond) en triplicat, dans la chambre anaérobie dès la fin de l'expérience et stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Les ADN ont ensuite été extraits à l'aide du kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen) selon les recommandations du fabricant.

Les ADN sont ensuite séparés des ARN à l'aide du kit All Prep RNA/DNA (Qiagen).

### III.8.b.3- Dosage des acides nucléiques

Les kits Quant-it™ dsDNA HS (Invitrogen) et Quant-it™ RiboGreen (Invitrogen) ont été utilisés selon les recommandations du fournisseur pour doser respectivement les ADN et les ARN en solution. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de micro-plaques BioTEK SYNERGY HTX.

### III.8.c- La rétro-transcription des ARN

Les ARN ont été rétro-transcrits au moyen de la retro-transcriptase M-MLV (Invitrogen™), selon les instructions du fournisseur. Les produits (ADNc) ont ensuite été conservés à -80 °C.

### III.8.d- Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

#### III.8.d.1- PCR

Les amplifications du gène de l'ARNr 16S des souches pures isolées ont été réalisées par PCR avec le Taq PCR Core kit (Roche) selon les recommandations du fournisseur. Les programmes et les amorces sont présentés dans les Tableau 9 et Tableau 10. Les PCR ont été réalisées sur un thermocycleur 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

La recherche des microorganismes archéens a été réalisée en ciblant par PCR nichée la région 349F-806R du 16S ADNr archéen (Takai and Horikoshi, 2000).

#### III.8.d.2- PCR pour séquençage à haut débit

La séquence nucléotidique des ADNr 16S offre une alternance de régions qui présentent des niveaux de conservation différents d'un point de vue évolutif, appelées régions constantes et variables. Leur analyse par séquençage haut débit permet d'identifier une grande part des microorganismes en présence.

Concernant les échantillons de l'expérience CH<sub>4</sub>-1% CO<sub>2</sub>-1% O<sub>2</sub>, le séquençage de la région V3-V4 a été effectuée. Le séquençage de la région V3-V4 de l'ADNr 16S bactérien, à la fois universelle (présent dans les génomes bactériens extraits) et spécifique (séquences variables selon les taxons) permet de classer taxonomiquement ces microorganismes.

Dans les cas où la biomasse était très faible (expérience avec injection d'oxygène), une approche par PCR nichée a été appliquée afin de travailler sur de faibles concentrations en ADN. La PCR nichée est un protocole faisant intervenir deux PCR successives, la seconde utilisant les amplicons de la première comme matrices (Yu et al., 2015). Pour se faire, le Taq



PCR Core kit (Roche) et un thermocycleur 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) ont été utilisés. Les amorces nécessaires à la seconde PCR contiennent des adaptateurs (soulignés dans le Tableau 10: Amorces utilisés en PCR et qPCR) afin de permettre le séquençage haut débit.

Les programmes et les amorces utilisés sont présentés dans les tableaux Tableau 9 et Tableau 10 respectivement.

Tableau 9: Programmes utilisés en PCR et qPCR.

<b>A</b>			<b>B</b>			<b>C</b>			
94°C	2 min	30 cycles	94°C	2 min	15 cycles	94°C	2 min	30 cycles	
94°C	40 sec		94°C	40 sec		94°C	30 sec		
55°C	40 sec		55°C	40 sec		65°C	30 sec		
72°C	35 sec		72°C	45 sec		72°C	40 sec		
72°C	7 min		72°C	7 min		72°C	7 min		
<b>D</b>			<b>E</b>			<b>F</b>			
94°C	2 min	30 cycles	94°C	2 min	15 cycles	94°C	2 min	30 cycles	
94°C	40 sec		94°C	40 sec		94°C	30 sec		
65°C	40 sec		55°C	40 sec		57°C	30 sec		
72°C	35 sec		72°C	45 sec		72°C	40 sec		
72°C	7 min		72°C	7 min		72°C	7 min		
<b>G</b>			<b>H</b>			<b>I</b>			
95°C	3 min	40 cycles	95°C	3 min	40 cycles	95°C	3 min	40 cycles	
95°C	10 sec		95°C	10 sec		95°C	10 sec		
55°C	20 sec		65°C	20 sec		52°C	20 sec		
72°C	20 sec		72°C	20 sec		72°C	20 sec		
courbe de dissociation			courbe de dissociation			courbe de dissociation			
			<b>J</b>						
			95°C	3 min	7 cycles, 1°C de moins à chaque cycle				
			95°C	10 sec		60 à			
			54°C	20 sec		72°C			
			72°C	40 sec					
			95°C	10 sec	40 cycles				
			54°C	20 sec					
			72°C	40 sec					
			courbe de dissociation						

Tableau 10: Amorces utilisés en PCR et qPCR

Gène amplifié	Type de PCR	Nom de l'amorce	Séquence 5'=>3'	Etude	Programme	Référence
ARNr 16S microbien	Directe	8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Avec O <sub>2</sub>	A	(Lane, 1991)
		1489R	TACCTTGTTACGACTTCA			(Weisburg et al., 1991)
	Nichée PCR 1	8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Avec O <sub>2</sub>	B	(Lane, 1991)
		1489R	TACCTTGTTACGACTTCA			(Weisburg et al., 1991)
	Nichée V3/V4 PCR 2	V3 -344F	<u>CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGR</u> AGGCAGCAG	Avec O <sub>2</sub>	C	Plateforme GenoToul
		V4 -801R	<u>GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCA</u> GGGTATCTAATCCT			Plateforme GenoToul
	Directe V4/V5	V4-515F	<u>CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGY</u> CAGCMGCCGCGGTA	Avec H <sub>2</sub>	D	Plateforme GenoToul
		V5-928R	<u>GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCC</u> GYCAATTCMTTTRAGT			Plateforme GenoToul
ARNr 16S archéen	Nichée PCR 1	21F	TTCCGGTTGATCCYGCAGGA	Avec O <sub>2</sub>	E	(DeLong, 1992)
		958F	YCCGGCGTTGAMTCCAATT			(DeLong, 1992)
	Nichée PCR 2	519F	CAGCCGCCGCGGTA		F	(Coolen et al., 2004)
		915R	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT			(Coolen et al., 2004)
ARNr 16S microbien	qPCR	338F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Avec O <sub>2</sub>	G	(Lane, 1991)
		518R	ATTACCGCGGCTGCTGG			(Muyzer et al., 1993)
	qPCR	515F	GTGYCAGCMGCCGCGGTA	Avec H <sub>2</sub>	H	(Wang and Qian, 2009)
		928R	CCCCGYCAATTCMTTTRAGT			(Wang and Qian, 2009)
<i>mcrA</i>	qPCR	mlasF	GGTGGTGTMGDDTTCACMCARTA	Avec H <sub>2</sub>	I	Steinberg et al., 2008 ; 2009
mcrA-rev		CGTTCATBGCAGTAGTTVGGRTAGT				
<i>dsrB</i>	qPCR	2060F	CAACATCGTYCAYACCCAGGG	Avec H <sub>2</sub>	J	(Geets et al., 2006)
		4R	GTGTAGCAGTTACCGCA			(Wagner et al., 1998)

Pour les échantillons de l'expérience CH<sub>4</sub>-1% CO<sub>2</sub>-10% H<sub>2</sub>, le séquençage de la région V4-V5 a été effectué. Le séquençage de la région V3-V4 de l'ARNr 16S est présent dans les génomes bactériens et archéens. Ce séquençage permet de classer taxonomiquement ces microorganismes. Les tags illumina de la plateforme Genotoul (Toulouse) ont été utilisés. Afin de réduire l'inhibition du fer présent dans les extraits d'ADN, de la BSA (Bovine Serum Albumin, fournie par NEB- B9200S) à 1 mg/mL a été ajoutée aux échantillons (Fukuzawa et al., 2005). Le Taq PCR Core kit (Roche) et un thermocycleur 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) ont été utilisés.

Le programme utilisé est présenté dans le Tableau 11 et les amorces sélectionnés dans le Tableau 12.

Tableau 11: Programme utilisé en PCR et qPCR.

94°C	2 min	30 cycles
94°C	30 s	
65°C	30 s	
72°C	40 s	
72°C	7 min	

Tableau 12: Amorces utilisés en PCR et qPCR.

Gène amplifié	Nom de l'amorphe	Séquence 5'=>3'	Référence
ARNr 16S	515F	GTGYCAGCMGCCGCGGTA	(Wang and Qian, 2009)
	928R	CCCCGYCAATTCMTTTRAGT	

### III.8.d.3- PCR quantitative (qPCR)

La quantification des gènes de l'ARNr 16S a été réalisée en duplicata par PCR quantitative à l'aide du kit Takyon™ One Step Converter, No Rox SYBR MasterMix dTTP Blue (Eurogentec) sur un thermocycleur Bio-Rad CFX Connect Real Time System. Les amorces utilisées ainsi que le programme correspondant sont indiqués dans le Tableau 10.

#### III.8.d.4- Electrophorèse

La qualité et la taille des acides nucléiques extraits et des amplifications par PCR ont été vérifiées par électrophorèse en gels d'agarose à 1 % (m/v) dans un tampon TAE 1X (Tris – acétate, EDTA) auquel ont été ajoutés du bromure d'éthidium (BET) à une concentration finale de 0,5 µg.mL<sup>-1</sup>. Afin d'estimer la taille des fragments, la migration des échantillons a été réalisée en parallèle avec un marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder, 200 à 10000 pb (Eurogentec) ou ExactLadder® DNA Premix 100pb Plus (Ozyme) en fonction de la taille des fragments attendus) dans une cuve pendant 30 minutes sous 100 volts. La révélation des acides nucléiques a été réalisée par fluorescence des gels d'agarose sous UV (Uvitec Cambridge).

#### III.8.d.5- Analyses moléculaires de la diversité taxonomique et analyses bioinformatiques

- Par séquençage Sanger

Les amplicons générés (ADNr 16S) des souches isolées ont été envoyés à Qiagen (Genomic Services ; Hilden, Allemagne) pour séquençage. Les séquences nucléotidiques ont été assemblées en contigs puis comparées avec celles de la banque de données NCBI afin d'être affiliées taxonomiquement (BlastN).

- Par séquençage haut-débit

Le séquençage à haut débit a été réalisé selon la technologie Miseq Illumina 2 x 250 pb par la plateforme génomique GenoToul de Toulouse en suivant les recommandations du fabricant. Les séquences ont été analysées via le workflow FROGS sur Galaxy (Escudié et al., 2018). Le pipeline FROGS (Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution) a été utilisé pour traiter les données comme suit :

- i- Pre-processing

Les reads 1 et 2 ont été assemblés en utilisant Flash (Magoč and Salzberg, 2011). Les séquences ont été filtrées selon leur taille. Seules celles comprises entre 280 et 500 pb et comprenant les 2 amorces ont été conservées. Un ratio de mésappariement de 10 % maximum est toléré.

## ii/ Clustering

Les séquences par la suite ont été regroupées en clusters en utilisant Swarm (Mahé et al., 2014).

## iii/ Elimination des chimères

La détection des chimères a été réalisée via VSEARCH selon la méthode *de novo* UCHIME (Edgar et al., 2011; Rognes et al., 2016), puis ces dernières ont été éliminées.

## iv/ Filtre d'abondance

Afin d'enlever les séquences rares et les singletons, un filtre est appliqué qui prend en compte l'abondance des séquences et leurs distributions parmi les échantillons, leur affiliation taxonomique et leur éventuelle présence dans une base de données rassemblant des contaminants.

## v/ Affiliation

L'affiliation taxonomique des OTU a été réalisée à l'aide de la base de données SILVA132-16S.

## vi/ Analyses statistiques

Les analyses statistiques à partir des données traitées ont été réalisées à partir de FROGSTAT avec le package R Phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013).

### III.9- Techniques de microscopie

A différents temps de l'expérience, un faible volume de la phase liquide du réacteur a été prélevé dans une cellule Saphyr et transféré dans un tube stérile dégazé. Selon la densité de microorganismes, 40 à 100  $\mu$ L ont été prélevés et de l'eau physiologique stérile a été ajoutée afin d'obtenir un volume final de 1 mL. La concentration et la viabilité cellulaire dans ces échantillons d'eau ont été estimées par microscopie à épifluorescence avec le LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit, selon les recommandations du fabricant. Brièvement, 1,5  $\mu$ L d'iodure de propidium et de SYTO9 sont ajoutés et le mélange a été placé 15 minutes à l'obscurité avant filtration sous vide (Isopore membrane filter, 0,2  $\mu$ m, GTBP, Millipore).

Le filtre est ensuite placé entre lame et lamelle comme préconisé par le fournisseur et observé par microscopie à épifluorescence (Zeiss Observer.Z1). Les cellules présentes sur dix champs observés aléatoirement ont été comptées sur chaque filtre, avec une distinction lors du

comptage des cellules vertes (membranes intègres) et rouges (membranes altérées). Il est ainsi possible de connaître le nombre total de cellules présentes mais aussi la proportion de cellules supposées mortes ou vivantes.

Toutes les analyses de microbiologie (III.7-,III.8- et III.9-) sont effectuées à l'IPREM (UPPA, Pau, France).

### III.10- Analyses physico-chimiques supplémentaires

#### III.10.a- UT2A

Afin de valider les résultats obtenus par notre chromatographie ionique et d'approfondir la composition de la solution liquide, des analyses supplémentaires sont effectuées par le laboratoire extérieur UT2A (Ultra Traces Analyses Aquitaine). Les informations supplémentaires fournies par ces analyses sont les carbonates/bicarbonates, l'aluminium, le fer, le soufre, le silicium, l'ammonium, et le carbone total. Le volume des échantillons et la technique de prélèvement sont présentés dans le Tableau 13.

#### III.10.b- SOBEGI

Afin de valider des analyses de quantification du benzène et du toluène dans le système, un prélèvement a été envoyé au laboratoire extérieur SOBEGI. Cet échantillonnage a eu lieu pendant l'expérience de  $\text{CH}_4\text{-CO}_2\text{-O}_2$  à  $t= 104$  J. Un volume de 25 mL est prélevé du réacteur dans un flacon stérilisé et dégazé à l'aide d'un raccord 'luer lock' muni d'une aiguille.

Tableau 13: Volumes et techniques de prélèvement des différents échantillons analysés par UT2A.

	Date	Solution	Volume	Prélèvement
Expérience CH <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> - O <sub>2</sub>	09/07/2019	Eau Ab_L_1_tête de puits_Janv2019	100 mL	Récupération du volume dans la chambre anaérobie le filtré à 0,1 µm, stocké dans un flacon stérile dégazé.
		Solution Réacteur t = 32 J	25 mL	Prélèvement du réacteur avec un raccord 'luer lock' directement dans un flacon stérile dégazé.
	04/02/2020	Solution Réacteur t = 179 J	100 mL	Prélèvement du réacteur avec un raccord 'luer lock' directement dans un flacon stérile dégazé, échantillon récupéré du volume restant. après l'expérience, filtré à 0,1µm
		Eau Ab_L_1_tête de puits_Janv2019	100 mL	Récupération du volume dans la chambre anaérobie le filtré à 0,1 µm, stocké dans un flacon stérile dégazé.
		Dépôt solide dissout	100 mL	Dépôt solide récupéré du réacteur après ouverture du réacteur, séché ( 0,0227 g) puis diluer dans 100 mL d'eau déminéralisée.
Expérience CH <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> - H <sub>2</sub>	14/09/2020	Eau Pb_T_1_tête de puits_10/10/2019	100 mL	Récupération du volume dans la chambre anaérobie le filtré à 0,1 µm, stocké dans un flacon stérile dégazé.
	09/11/2020	Solution Réacteur t = 52 J	100 mL	Prélèvement du réacteur dans un flacon rempli à bord.
		Solution Réacteur t = 60 J	100 mL	Prélèvement du réacteur dans un flacon rempli à bord.
	10/12/2020	Solution Réacteur t = 87 J	2*50 mL	Prélèvement du réacteur dans un flacon rempli à bord.
06/01/2021	Solution Réacteur t = 87 J	100 mL	Echantillon récupéré du volume restant après l'expérience, filtré à 0,1µm.	

#### IV- Modélisation thermodynamique

Dans nos systèmes d'étude, la phase gazeuse est composée d'un mélange de composés : méthane, dioxyde de carbone, dioxygène et/ou dihydrogène. De même, la phase liquide est constituée de l'eau de puits prélevée des sites de stockage étudiés. Ces paramètres rendent notre étude rare et particulière selon chaque aquifère. Le manque de données sur l'équilibre thermodynamique dans de tels systèmes nous ont conduit à simuler les équilibres de phases. Ces calculs nous ont permis d'estimer la solubilité des composés gazeux dans l'eau de formation pour chaque expérience. En connaissant la quantité théorique de gaz dissous dans la phase liquide, l'estimation de la quantité consommée par des réactions chimiques ou des métabolismes microbiens est devenue accessible.

Les calculs thermodynamiques sont effectués à l'aide du logiciel PhreeqC. C'est un logiciel développé par l'Institut d'Études Géologiques des États-Unis (United States Geological Survey-USGS). PhreeqC utilise une approche  $\gamma$ - $\phi$ . La base de données choisie pour les simulations était PhreeqC.dat qui utilise le modèle de coefficients d'activité de Debye Huckel étendu. Les coefficients de fugacité sont calculés grâce à l'équation d'état de Peng-Robinson (Appelo, 2015).

- Modèles de description de l'équilibre liquide-vapeur

L'équilibre thermodynamique d'un système liquide L et gaz V se traduit par l'égalité des températures et l'égalité des pressions de ces deux phases ainsi que par l'égalité des potentiels chimiques de chaque constituant de ces deux phases.

$\mu_i^L = \mu_i^V$	1
---------------------	---

Cette dernière est identique à l'égalité des fugacités du constituant i dans chacune des deux phases.

$f_i^L(T, P, x_i^L) = f_i^V(T, P, y_i^V)$	2
---	---

Où  $x_i^L$  indique la composition de l'espèce i dans la phase L et  $y_i^V$  sa composition dans la phase V.



Dans une approche dissymétrique  $\gamma$ - $\phi$ , la phase gazeuse est décrite par le coefficient de fugacité du composé dans chacune des phases à l'équilibre  $\phi_i^v$ . La phase liquide quant à elle, est représentée par le coefficient d'activité qui décrit la fugacité de l'espèce  $i$ . L'équation d'équilibre liquide-vapeur pour le solvant est donc :

$\phi_i^v(T, P, y_i) \cdot y_i \cdot P = \gamma_i^*(T, P, x_i) \cdot x_i \cdot \phi_i^{sat}(T) \cdot P_i^{sat}(T) \cdot \mathcal{P}_i(T, P)$	3
--	---

Le coefficient de fugacité  $\phi_i^{sat}(T)$  est pris à sa pression de vapeur saturante pour une température  $T$ . L'indice \* est utilisé pour indiquer l'écart par rapport à l'état de référence du corps pur liquide dans les mêmes conditions de pression et température du système. Le terme  $\mathcal{P}_i(T, P)$  est le facteur correctif de Poynting du constituant  $i$ . Ce facteur correctif de Poynting s'écrit comme suit, en considérant le volume molaire de l'espèce  $i$  pure ( $v_i$ ) est indépendant de la pression :

$\mathcal{P}_i(T, P) = \exp\left(\frac{v_i \cdot (P - P_i^{sat}(T))}{RT}\right)$	4
--	---

Pour le soluté, le choix de l'état de référence pour la phase liquide est nécessaire. Souvent, la référence est une solution à dilution infinie. Ce choix permet d'exprimer la phase liquide en impliquant la constante d'Henry ( $H_i$ ), prise aux conditions de pression et de température du mélange, comme suit :

$\phi_i^v(T, P, y_i) \cdot y_i \cdot P = \gamma_i^\infty(T, P, m_i) \cdot m_i \cdot H_i^m(T, P)$	5
--	---

Si la détermination d'une expression de la constante de Henry en fonction de la pression n'est pas possible, un facteur de correction de Poynting pris à l'état de dilution infinie du soluté est utilisé. La constante de Henry à la pression de vapeur saturante du solvant à la température  $T$  est considérée. L'équation du soluté devient :

$\phi_i^v(T, P, y_i) \cdot y_i \cdot P = \gamma_i^\infty(T, P, m_i) \cdot m_i \cdot H_i^{sat,m}(T) \cdot \mathcal{P}_i^\infty(T, P)$	6
--	---

Le facteur correctif de Poynting à dilution infinie s'exprime par l'équation suivante :

$P_i^\infty = \exp\left(\frac{v_i^\infty \cdot (P - P_s^{sat}(T))}{RT}\right)$	7
--	---

- Modèles de description du coefficient d'activité

Le modèle de Debye et Hückel est le premier à décrire la non-idéalité des systèmes thermodynamiques en proposant le calcul du coefficient d'activité. Ce modèle est appliqué aux solutions diluées de force ionique allant jusqu'à 0,1 mol/Kg. Des évolutions de ce modèle permettent de représenter des solutions plus concentrées jusqu'à même des solutions saturées en sel, comme le modèle de Pitzer.

L'équation de Debye-Hückel étendue qui permet de décrire le coefficient d'activité de l'espèce i est la suivante :

$-\log \gamma_i = \frac{A_\gamma \cdot z_i^2 \cdot \sqrt{I}}{1 + a_i^0 \cdot B_\gamma \cdot \sqrt{I}}$	8
--	---

Où I est la force ionique de la solution,  $a_i^0$  est la distance minimale entre deux ions et  $z_i$  la charge entière de l'ion.

En se basant sur cette équation, des scientifiques ont développé des extensions pour mieux décrire les systèmes. Le modèle de Pitzer est souvent utilisé pour la description des phases liquides des solutions électrolytiques allant jusqu'à saturation en sel. Le modèle E-NRTL est appliqué aux solutions électrolytiques à hautes pressions.

Pour la modélisation du système liquide-vapeur, la base de données 'Phreeqc.dat' est considérée. Cette base de données utilise la loi de Debye et Hückel étendue pour calculer le coefficient d'activité de la phase liquide.

V- Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans le cadre de cette thèse ont été répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 14: Produits chimiques utilisés dans le cadre de nos travaux expérimentaux.

Nature	Nom	Fournisseur	N° CAS	Pureté
Liquide	Eau	Smart2 Pure System par ThermoFisher		18,2 MΩ.cm
	Toluène	Sigma Aldrich	108-88-3	≥ 99.5 %
Sels utilisés pour les solutions	Sulfate de sodium anhydre (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	VWR	7757-82-6	≥ 99 %
	Chlorure de sodium (NaCl)	Sigma Aldrich	7647-14-5	≥ 99 %
	Bicarbonate de potassium (KHCO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	298-14-6	≥ 99.5 %
	Bicarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	144-55-8	99.5-100.5 %
	Sulfate de calcium dihydraté (CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	10101-41-4	99.0-101.0 %
	Chlorure de calcium dihydraté (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	10035-04-8	≥ 99.0 %
	Chlorure de magnésium hexahydraté (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	7791-18-6	≥ 99.0 %
Sels pour étalonnage de la chromatographie ionique	Fluorure de sodium (NaF)	VWR	7681-49-4	99.0-100.5 %
	Acétate de potassium (KCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich	127-08-2	≥ 99.0 %
	Bromure de potassium (KBr)	VWR	7758-02-3	≥ 98.5 %
	Sulfate de sodium (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Acros Organics	7757-82-6	≥ 99.0 %
	Nitrate de sodium (NaNO <sub>3</sub> )	Acros Organics	7631-99-4	> 95.0 %
	Nitrite de sodium (NaNO <sub>2</sub> )	Acros Organics	7632-00-0	> 95.0 %

	Carbonate de sodium (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Acros Organics	497-19-8	> 95.0 %
	Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> )	Acros Organics	10043-52-4	> 95.0 %
	Formiate de sodium (HCOONa)	Sigma Aldrich	141-53-7	> 99.0 %
Gaz	Méthane et dioxyde de carbone (CH <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> )	Air Liquide	Mélange Crystal	99 % - 1%
	Méthane, dioxyde de carbone, benzène et toluène (CH <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> - C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> )	Air Liquide	Mélange Crystal	99 % - 1 % - 7.95 ppm – 3.57 ppm
	Méthane (CH <sub>4</sub> )	Air Liquide	74-82-8	≥ 99.995 %
	Dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> )	Air Liquide	124-38-9	≥ 99.7 %
	Dioxygène (O <sub>2</sub> )	Air Liquide	7782-55-7	≥ 99.995 %
	Dihydrogène (H <sub>2</sub> )	Air Liquide	1333-74-0	≥ 99.999 %
	Azote (N <sub>2</sub> )	Air Liquide	7727-37-9	≥ 99.995 %
Gaz de GC	Hélium (He)	Air Liquide	7440-59-7	≥ 99.9999 %
	Argon (Ar)	Air Liquide	7440-37-1	≥ 99.9999 %

Tableau 15: Produits chimiques utilisés pour les milieux de culture en microbiologie.

Nature	Nom	Fournisseur	N° CAS	Pureté
Produits utilisés en étude microbiologique	Chlorure d'ammonium (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma Aldrich	12125- 02-9	>99.5%
	Chlorure de potassium (KCl)	VWR	7447-40- 7	>99.5%
	Chlorure de calcium dihydraté (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	10035- 04-8	>99.0%
	Chlorure de magnésium hexahydraté (MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	7791-18- 6	>99.0%
	Dipotassium hydrogénophosphate (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich	7758-11- 4	>98.0%
	Cystéine-HCl	Sigma Aldrich	52-89-1	>98.0%
	Resazurine sodium salt	Sigma Aldrich	62758- 13-8	n.d.
	Bicarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	144-55-8	99.5- 100.5%
	Acétate de sodium (NaCH <sub>3</sub> COO)	Sigma Aldrich	127-09-3	>99.0%
	Extrait de levure	Applichem Panreac	8013-01- 2	n.a.
	D-Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Biosolve	50-99-7	n.a.
	Saccharose (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	Sigma Aldrich	57-50-1	>99.5%
	Glycérol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	56-81-5	>99.0%
	Peptone de caséine	Merck	91079- 40-2	n.d.
	Bactopeptone	Difco	n.d.	n.d.
	Acide ascorbique (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> )	Sigma Aldrich	50-81-7	>98.0%
	Acide nalidixique (C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	3374-05- 8	n.d.
	Formiate de sodium (HCOONa)	Sigma Aldrich	141-53-7	>99.0%
	Pyruvate de sodium (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	113-24-6	>99.0%
	Citrate de fer (III)	Sigma Aldrich	3522-50- 7	n.d.
	Sulfate de sodium (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	VWR	7727-73- 3	>99.0%
	Nitrate de sodium (NaNO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	7631-99- 4	>99.0%
	Cétrimide agar	Fluka	n.d.	n.d.

Tableau 16: Produits chimiques composants le SeW pour les milieux de culture en microbiologie.

Nom	Fournisseur	N° CAS	Pureté
Hydroxyde de sodium (NaOH)	Sigma Aldrich	1310-73-2	> 98.0%
Sélénite de sodium (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	10102-18-8	> 98.0%
Tungstate de sodium (Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich	10213-10-2	> 99.0%

Tableau 17: Produits chimiques composants la solution oligo-éléments SL10 pour les milieux de culture en microbiologie.

Nom	Fournisseur	N° CAS	Pureté
Chlorure de fer tétrahydraté (FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	13478-10-9	> 99.0%
Chlorure de zinc (ZnCl <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich	7646-85-7	> 98.0%
Chlorure de manganèse tétrahydraté (MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	13446-34-39	> 99.0%
Acide borique (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	10043-35-3	> 99.5%
Chlorure de cobalt hexahydraté (CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	7791-13-1	> 99.0%
Chlorure de cuivre dihydraté (CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	1012-13-0	> 99.0%
Chlorure de nickel hexahydraté (NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	7791-20-0	n.d.
Molibdate de sodium dihydraté (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	10102-40-6	n.d.

Tableau 18: Produits chimiques composants la solution de vitamines V10 pour les milieux de culture en microbiologie.

Nom	Fournisseur	N° CAS	Pureté
Acide folique (C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> )	Sigma Aldrich	59-30-3	> 97.0%
Pyroxidine.HCl (C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> .HCl)	Sigma Aldrich	58-56-0	> 98.0%
Riboflavine (C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> )	Sigma Aldrich	83-88-5	> 98.0%
Biotine (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S)	Sigma Aldrich	58-85-5	> 99.0%
Thiamine (C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS.HCl)	Sigma Aldrich	67-03-8	> 99.0%
Acide nicotinique (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich	59-67-6	> 98.0%
Sel hémicalcique d'acide D- pantothénique ( <sup>13</sup> C <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> <sup>15</sup> NO <sub>5</sub> .0.5Ca)	Sigma Aldrich	137-08-6	> 98.0%
Vitamine B12 (C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P)	Sigma Aldrich	68-19-9	> 98.0%
Acide 4- aminobenzoïque (H <sub>2</sub> NC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO <sub>2</sub> H)	Sigma Aldrich	150-13-0	> 99.0%
Acide thioctique (C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich	1077-28-7	> 99.0%

## VI- Conclusions

Ce chapitre a permis de présenter le réacteur, les différents dispositifs et méthodes d'analyses utilisés au cours de nos travaux expérimentaux. Les protocoles opératoires sont développés et présentés également.

Le pilote haute pression et haute température permettant la reproduction des conditions in-situ des aquifères a été conçu et utilisé spécialement pour les expériences effectuées dans le cadre de cette thèse. Les analyses de la phase liquide et de la phase gazeuse accompagnées des analyses de microbiologie ont permis un suivi continu du système présent dans le réacteur. Pour chaque expérience, une première étape a confirmé notre capacité à reproduire l'aquifère dans le réacteur ainsi que la possibilité de développer le métagénome microbien présent dans le sous-sol. La seconde étape a servi à trouver l'effet de l'injection des nouveaux gaz sur les différentes phases de cet aquifère.

La simulation numérique a permis de connaître théoriquement la quantité de gaz dissous dans la phase aqueuse afin d'estimer les consommations dues à des métabolismes microbiens ou à des interactions chimiques et minéralogiques.





*Chapitre 3.*  
*Effet de l'injection du dioxygène dans les*  
*aquifères dans le cadre de stockage du*  
*biométhane*

---



## I- Introduction du chapitre

La consommation énergétique, et notamment celle de gaz naturel, est fluctuante dans le temps et connaît de fortes variations saisonnières. Pour garantir la sécurisation des approvisionnements jusqu'aux clients et réguler le réseau, il est indispensable de disposer de réservoirs de stockage qui représentent en France des milliards de m<sup>3</sup>. En effet, la géologie du territoire français permet de disposer de stockages importants en cavités salines et en aquifères profonds. Depuis les années 2000, la production de biométhane se développe largement dans le monde, et en particulier en Europe. Initiatives ponctuelles au début, les créations d'usines de méthanisation tendent à se multiplier et à s'organiser en réseaux. Le biométhane produit peut désormais commencer à être injecté dans le réseau de gaz naturel : l'objectif étant de substituer ce méthane renouvelable issu de la biomasse au méthane fossile séquestré depuis des millions d'années hors des écosystèmes de surface.

A terme, du biométhane est donc amené à être injecté dans les aquifères profonds. L'objectif du projet RINGS est d'identifier les effets indésirables pouvant survenir lors de son stockage dans les systèmes de stockages souterrains (UGS). Le biométhane, qui n'est formellement que du méthane, ne pose pas en soit de problème. Seulement, d'autres éléments peuvent être co-injectés avec ce dernier, tel que le dioxygène (O<sub>2</sub>) utilisé afin d'oxyder le sulfure d'hydrogène, initialement présent, et protéger ainsi le réseau de canalisations de gaz naturel de la corrosion. Afin d'identifier les effets éventuels du dioxygène présent dans le biométhane sur les aquifères, une reproduction du système a été réalisée expérimentalement. L'aquifère simulé est opéré par Téréga pour le stockage de gaz naturel dans le sud-ouest de la France.

Au-delà du fait que nous soyons parmi les premiers à nous intéresser à cette problématique, l'une des originalités de notre approche est de considérer un système quadriphasique : i) la phase solide correspond à un échantillon de roches du réservoir ; ii) la phase liquide est l'eau de formation de l'aquifère ; iii) la phase gazeuse est composée en majorité de CH<sub>4</sub> avec 1% de CO<sub>2</sub> (avant injection d'O<sub>2</sub> à 1 %) ; iv) le compartiment biologique avec les micro-organismes autochtones prélevés en même temps que l'eau de formation à l'aide d'un préleveur de fond en garantissant l'absence de contamination par des microorganismes de surface ou présents dans les éléments du puits comme la tête et le tube de production (Annexe).

Les aquifères profonds sont des écosystèmes anoxiques abritant des communautés microbiennes originales qui, dans ces systèmes oligotrophes, sont souvent dominées par l'activité des sulfato-réducteurs. Les micro-organismes sulfato-réducteurs réduisent le sulfate

en sulfure lors de leur respiration et ils ont été montrés comme des acteurs clés de la biodégradation des hydrocarbures mono-aromatiques provenant du gaz naturel dans ces stockages. Quels que soient les micro-organismes considérés dans ces communautés, ils sont tous capables d'activité en anaérobiose puisque l'O<sub>2</sub> y est absent.

Les conditions expérimentales fixées ont donc été un mélange de gaz simulant la composition moyenne d'un gaz naturel stocké (99 % CH<sub>4</sub>/ 1% CO<sub>2</sub>) additionné de 7,95 ppm de benzène et 3,57 ppm de toluène. La pression totale et la température du système, identiques à l'aquifère étudié, étaient de 60 bar et 36 °C respectivement. Une fois l'équilibre thermodynamique atteint et la vie microbienne démontrée comme active, la dynamique du système a été estimée similaire à celle du site d'étude. L'injection de dioxygène O<sub>2</sub> a été alors effectuée, avec une fraction de 1% de la phase gazeuse. Cette quantité d'O<sub>2</sub> est considérée après une étude bibliographique montrant que c'est la quantité maximale pouvant être présente dans le biométhane.

L'effet de l'injection de 1 % de dioxygène dans la phase gazeuse lors d'un stockage en aquifère est exposé dans ce chapitre. Les variations dans les compositions des phases liquide et gazeuse, les interactions minéralogiques ainsi que l'évolution au niveau de la communauté bactérienne tout au long de l'expérience sont présentées sous la forme d'un article scientifique. Cet article a été soumis dans la revue *Science of the Total Environment*.

## **Biological, Geological and Chemical Effects of Oxygen Injection in Underground Gas Storage Aquifers in the setting of Biomethane Deployment**

PG. HADDAD<sup>1</sup>, J. MURA<sup>1</sup>, F. CASTERAN<sup>1,2</sup>, M. GUIGNARD<sup>3</sup>, M. RANCHOU-PEYRUSE<sup>1,2,3</sup>, P. SENECHAL<sup>4</sup>, M. LARREGIEU<sup>3</sup>, M-P. ISAURE<sup>3</sup>, I. SVAHN<sup>5</sup>, P. MOONEN<sup>4</sup>, I. LE HECHO<sup>2,3</sup>, G. HOAREAU<sup>6</sup>, P. CHIQUET<sup>2,7</sup>, G. CAUMETTE<sup>2,7</sup>, D. DEQUIDT<sup>8</sup>, P. CEZAC<sup>1,2</sup>, A. RANCHOU-PEYRUSE<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Pau et Pays de l'Adour, E2S UPPA, LaTEP, Pau, France.

<sup>2</sup> Joint Laboratory SEnGA, UPPA-E2S-Teréga, Pau, 64000, Pau, France.

<sup>3</sup> Université de Pau et Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, IPREM, Pau, France.

<sup>4</sup> Université de Pau et Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, DMEX, Pau, France.

<sup>5</sup> Bordeaux Imaging Center (BIC), CNRS, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

<sup>6</sup> Université de Pau et Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, TOTAL, LFCR, Pau, France.

<sup>7</sup> Teréga – 40 Avenue de l'Europe, CS 20 522, 64010 Pau, France.

<sup>8</sup> STORENGY – Geosciences Department, Bois-Colombes, France.

\*Correspondence: [anthony.ranchou-peyruse@univ-pau.fr](mailto:anthony.ranchou-peyruse@univ-pau.fr)

Phone: +33 540 145 164

## II- Abstract

The last few years have seen the proliferation of anaerobic digestion plants to produce biomethane. Oxygen (O<sub>2</sub>) traces added to biogas during the desulfurization process are co-injected in the gas network and can be stored in Underground Gas Storage (UGS). However, there are no data available for the undesirable effects of O<sub>2</sub> on these anoxic environments, especially on deep aquifers. In addition to mineral alteration, O<sub>2</sub> can have an impact on the anaerobic autochthonous microbial life. In our study, the storage conditions of an UGS aquifer were reproduced in a high-pressure reactor and bio-geo-chemical interactions between the aqueous, gas and solid phases were studied. Sulfate was depleted from the liquid phase for three consecutive times during the first 130 days of incubation reproducing the storage conditions (36 °C, 60 bar, methane with 1% CO<sub>2</sub>). Sulfate-reducers, such as Desulfovibrionaceae, were identified from the high-pressure system. Simulations with PHREEQC were used to determine the thermodynamic equilibrium to confirm any gas consumption. CO<sub>2</sub> quantities decreased in the gas phase, suggesting its use as carbon source by microbial life. Benzene and toluene, hydrocarbons found in traces and known to be biodegradable in storages, were monitored and a decrease of toluene was revealed and associated to the Peptococcaceae family. Afterwards, O<sub>2</sub> was added as 1% of the gas phase, corresponding to the maximum quantity found in biomethane after desulfurization process. Re-oxidation of sulfide to sulfate was observed along with the end of sulfate reducing activity and toluene biodegradation and the disappearance of most of the community. H<sub>2</sub> surprisingly appeared and accumulated as soon as hydrogenotrophic sulfate-reducers decreased. H<sub>2</sub> would be produced via the necromass fermentation accomplished by microorganisms able to resist the oxic conditions of 4.42·10<sup>-4</sup> mol.Kgw<sup>-1</sup> of O<sub>2</sub>. The solid phase composed essentially of quartz, presented no remarkable changes.

**Keywords:** deep aquifers, biomethane, oxygen, deep subsurface, high pressure, UGS, geological storage

### III- Introduction

Oxygen (O<sub>2</sub>) can be injected in deep underground for many purposes. Its ability to promote aerobic microbial metabolism is a key factor to achieve the endpoint in multiple current practices especially during the application of enhanced oil recovery techniques on oil reservoir (Cai et al., 2015; Liu et al., 2018; Pannekens et al., 2019) and the bio-remediation of groundwater (EPA, 2017; Lien et al., 2016; Trulli et al., 2016). However, despite its aforementioned beneficial applications, the presence of oxygen can be deleterious during other procedures such as Carbon Capture and Storage (CCS) (Morgan et al., 2017; Wei et al., 2015), compressed air energy storage (CAES) (Guo et al., 2021; Kushnir et al., 2012) and underground natural gas storage (UGS). Many studies have been undergone in the context of CCS storage in order to define the effect of carbon dioxide, but also the effect of oxygen injected as an impurity on the geological formations. Similarly, the deep underground storage of biomethane can also involve co-injection of O<sub>2</sub>. Indeed, O<sub>2</sub> is added to the biomethane during sulfide reoxidation at the outlet of the anaerobic digestion plant. Depending on the initial sulfide quantity, the proportion of O<sub>2</sub> may attain 1.5 % of the final gas mixture (Barik et al., 2013). For underground gas storage, France sets a maximal O<sub>2</sub> proportion of 100 ppm, whereas Germany sets a maximal of 10 ppm.

Biomethane is an attractive alternative to fossil fuels particularly because biogas produced from biomass, such as green waste and sludge from wastewater, prevents re-circulating carbon from oil, natural gas and coal. With a reported production of 1.2 billion m<sup>3</sup> in 2015, Europe is the world's leading biomethane producer. The lead application of the produced biomethane consists of its use as vehicle fuel or its injection into the natural gas grid (Scarlat et al., 2018). With the fluctuating and unpredictable demand throughout the year, biomethane storage is recently gaining an increasing interest. Due to their large storage capacity and their ability to preserve gas under pressure, deep aquifers emerge as attractive underground storage systems. Deep Underground Gas Storages (UGS) such as deep aquifers, are known for being anoxic environments that form large ecosystems and harbor a much-diverse anaerobic microbial life (Magnabosco et al., 2018). The biodegradation of hydrocarbons was notably studied in this setting, especially the anaerobic degradation of BTEX (Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes isomers) by autochthonous microorganisms in these ecosystems (Aüllo et al., 2016; Bombach et al., 2010; Ranchou-Peyruse et al., 2017). Sulfate-reducing bacteria (SRB) are particularly known to be active and to be key players in such anoxic environments (Berlendis et al., 2010; Bombach et al., 2010; Detmers et al., 2004; Fry et al., 1997; Itävaara et al., 2011; Ranchou-Peyruse et al., 2019). Part of the O<sub>2</sub> co-injected with the biomethane during its storage



can solubilize into the formation water leading to alterations of the preexisting thermodynamic equilibrium, which can result in drastic modifications in the microbial communities and depletion of strictly anoxic micro-organisms. O<sub>2</sub> may also cause mineral oxidation of the reservoir rock (Guo et al., 2021; Jung et al., 2013; Kushnir et al., 2012; Lu et al., 2016; Vu et al., 2018). For instance, the oxidation of pyrite (FeS<sub>2</sub>) was observed during CAES in different studies (Guo et al., 2021; Kushnir et al., 2012) and during CCS (Jung et al., 2013; Shao et al., 2014). This alteration can cause a variation in the reservoir's porosity and permeability especially if large amounts of redox-sensitive minerals were present (Lu et al., 2016). Dissolution of rocks, mineral precipitations and corrosion of well materials were shown as possible (Zettlitzer et al., 2010; Wang et al., 2011). Variation in the aqueous phase composition resulting from mineral dissolution can impact the thermodynamic equilibrium. Identifying this equilibrium is important to determine the material balance and to estimate any production or consumption of gas such as carbon dioxide consumption by the microbial life as a carbon source or oxygen consumption due to chemical reactions. However, experimental solubility data corresponding to our aqueous and gas compositions under aquifer's conditions are very limited. The studied conditions of the system were a temperature of 36 °C and a total pressure of 60 bar, similar to the aquifer's real storage conditions. Even though many CCS studies targeted storage effects on the site, multiple uncertainties remain regarding the effects of impurities namely O<sub>2</sub> during biomethane storage in natural gas reservoirs such as aquifers. In order to elucidate more answers on this topic, a multi-disciplinary study is undergone and, to our knowledge, this is one of few studies involving the reproduction of the aquifer's *in-situ* conditions in a reactor using solid, liquid and microbial underground samples. During this study, the aqueous and gas compositions were followed up regularly *via* chromatography techniques. Samples from the aqueous phase were recovered under anoxic conditions for microbial studies. Afterwards, O<sub>2</sub> was injected at 1% of the gas mixture, corresponding to the maximum quantity found in biomethane. Before and in the end of the experiment, the solid phase composed of a reservoir rock sample undergone mineral analyses. The subsequent bio-geo-chemical interactions between the gas mixture, reservoir rock, formation water and harbored microbial life were determined under temperature and pressure of a selected aquifer UGS.

#### IV- Materials and methods

##### IV.1- Site description and water formation characteristics

The studied reservoir is a UGS in the South Aquitaine sedimentary basin (582 m depth), in Southwest France used for natural gas storage since 1981. The well that was selected for this study is the closest to the gas bubble (about 250 m) and has already been identified in previous studies with the code name Ab\_L\_1 (Ranchou-Peyruse et al., 2019). Thus, sampled water is the most exposed for gases interactions due to its proximity to the gas bubble. Some of the physicochemical characteristics of the formation water (LCE-SOBEGI Laboratory, Lacq, France) and its overall composition were summarized in Table 1. Formation water (0.634 L) was recovered from the well under pressure (January 2019) with a downhole sampler, equipped with a PDS Sampler (Leutert Bottom Hole Positive Displacement Sampler) (Kampman et al., 2014). Wellhead water samples were also recovered. Samples were stored at 4°C until use. Wellhead samples were filter-sterilized at 0.1 µm (PES 47 mm membranes, 0.1 µm, Sartorius) while maintaining anoxic conditions: 0.854 L of these samples was added to the formation water (0.634 L) to increase the volume, a month before the injection into the high-pressure reactor. A volume of 0.1 L was taken from the final mixture for a microbial diversity study, whereas the rest (1.39 L) was injected into the reactor.

The reservoir rock was composed of infra-molassic sands, with a porosity varying between 25 and 35 % (Ranchou-Peyruse et al., 2019). The rock samples were composed of cuttings collected by TEREKA from a drilling carried out near the studied site. X-ray diffraction analysis applied on the solid sample before the experiment showed that the solid phase was mainly composed of quartz with minor calcite content (Figure S1). Iron sulfides (pyrite and marcasite), iron oxi-hydroxides (maghemite and hematite) and clay minerals were also identified as trace minerals.

Table 19: Physico-chemical parameters and compounds of the formation water sampled from the deep aquifer (Ab\_L\_1 site), analyzed at atmospheric pressure.

Physico-chemical Parameters	Value	Unit
Pressure	60	Bar
Temperature	36	°C
pH	7.6	
Redox potential	-259	mV
Conductivity at 25 °C	330	µS_cm
Organic Carbon	0.38	mg.L <sup>-1</sup>
Compounds		
Chloride	0.2475	mM
Fluoride	0.0043	mM
Nitrate	0.0034	mM
Nitrite	0.0005	mM
Phosphate	0.0041	mM
Sulfate	0.0835	mM
Carbonate	0.0083	mM
Bicarbonate	3.0116	mM
Calcium	1.1884	mM
Iron	6.6122	µM
Dissolved Iron	5.4486	µM
Magnesium	0.2465	mM
Potassium	0.1556	mM
Sodium	0.4930	mM

#### IV.2- High-pressure reactor

The apparatus was composed of an experimental cell presented in Figure 1. The autoclave was made of Hastelloy C-276 in order to prevent any corrosion problems. A basket held the solid phase and was composed of a metallic disc with pores of less than 10 µm in order to prevent particles from falling to the bottom of the reactor without interfering with the movement of microorganisms. The operating pressure and temperature can go up to 150 bar and 150 °C respectively. A safety valve of 150 bar connected to a pressure compensation chamber protected

the overall system. An insulating coating with heating resistors heated the autoclave. Two thermocouples permitted monitoring of the liquid and gas phase temperatures with a precision of  $\pm 1$  °C. A double jacket was used to maintain the temperature of the experimental cell. The cell pressure was monitored by the Keller PA(A)-33X pressure gauge with a precision of 0.3 bar. In order to maintain a constant pressure throughout the experiment, a mobile piston was placed into the reactor. A 1L capacity pump allowed the piston to move upwards in order to increase the cell pressure and downwards to decrease it. The pump can operate at a maximum pressure of 150 bar and was monitored by a pressure gauge with a precision of 0.05 %. A flow rate of up to 220 mL/min can be imposed with a precision of 0.1 % of the set point. The overall autoclave volume was 5.41 L with an available volume of 4.2 L when the piston was at its lowest level. The solid basket had a volume of 0.8 L. The system was mixed using a stirring shaft operated by a variable speed motor with a maximum stirring speed of 500 rpm. A Rushton turbine was used for the liquid phase and a double disc stirrer with four vertical blades for the gas phase. The composition of the gas mixture injected at the beginning of the biotic experiment was methane, 1 % of carbon dioxide, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene. The oxygen added to simulate biomethane injection had a purity of >99.995% (CAS: 7782-55-7).

The experiment ran over 180 days. Initially, a volume of 1.39 L of aqueous phase was injected in the reactor and  $4.57 \pm 2.2 \cdot 10^{-1}$  mol of gas mixture. The system liquid-gas-solid-biomass was under development for 130 days under a total pressure of 60 bar and a temperature of 36 °C. The oxygen injection (1 % of 60 bar) occurred at day 131. The Figure 2 presents the analysis undergone through the experiment at different timings.

#### IV.3- Abiotic experiment

A preliminary abiotic experiment was initially undergone in order to detect the liquid-solid interactions before adding the microbial life to the system. 500 mL of distilled water were mixed with 100 mL of sand reservoir in a sealed 1L bottle that was subsequently flushed with N<sub>2</sub> gas at atmospheric pressure. The composition of the aqueous phase was followed in order to detect compounds dissolution from the solid into the liquid phase.

- The different components:
- 1- Liquid Input
  - 2- Gas Output
  - 3- Gas temperature probe
  - 4- Gas Mixture Input
  - 5- O<sub>2</sub> Input
  - 6- Stirrer Motor
  - 7- Barometer
  - 8- Flowmeter
  - 9- Barometer
  - 10- Gas Output
  - 11- O<sub>2</sub> sensor
  - 12- Regulation temperature
  - 13- Pressure regulation pump
  - 14- Liquid Temperature probe
  - 15- Liquid Phase
  - 16- Piston
  - 17- Water from the pressure regulation pump
  - 18- Basket containing reservoir rock and

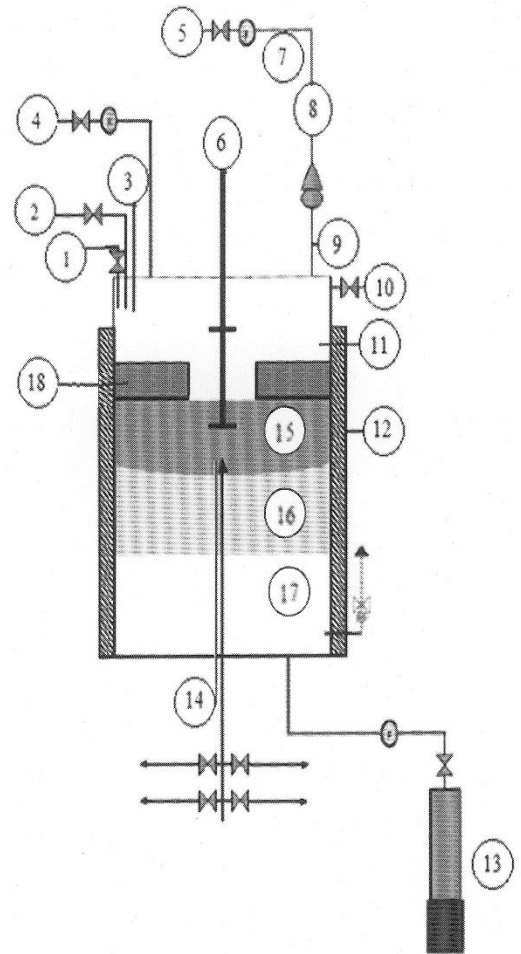


Figure 16- Scheme of the experimental apparatus used during this experiment

#### IV.4- Analytical analyses

The liquid phase was analyzed using an ionic chromatography with a variable wavelength detector from ThermoFisher Scientific (Dionex Integrion HPIC). The column IonPac AS28-Fast-4 $\mu$ m (4x150 mm) was used with the AG28-4 $\mu$ m (4x30 mm) guard-column for anion detection, particularly fluoride, chloride, sulfate, acetate, carbonate/bicarbonate and sulfide. The cations were quantified with the Dionex Easion System (ThermoFisher Scientific). The column IC Dionex IonPac CS12A (4x250 mm) was used with the guard-column CG12A (4x50 mm) for sodium, potassium, magnesium and calcium. A liquid sample was taken from the liquid output using a syringe and stored in a flask that was sealed with rubber. Air was immediately extracted from the flask using N<sub>2</sub> gas flush. The sample (1 mL) was directly injected into the instrument. The analyses were performed in triplicate. The supposed measurement uncertainty on both techniques was  $\pm 5\%$ .

The gas phase composition was monitored by a gas chromatography in line with a micro thermal conductivity detector (GC- $\mu$ TCD; Micro GC Fusion; Chemlys; France). The 'Molsieve

5A' column was used with helium as a carrier gas for quantification of methane, hydrogen, oxygen and nitrogen. The column 'Plot Q' was used with argon as carrier gas for quantification of carbon dioxide and hydrogen sulfide. The instrument was connected to the reactor's valve. Once open, the sample traversed a pressure compensation tube to reach the piston where it attained the atmospheric pressure and it undergone analysis at that moment. All measures were obtained after three analyses, and the uncertainty was  $\pm 2\%$ . The obtained results were used to calculate the quantity of each component in the gas phase. The non-ideal gas equation was used to calculate the total number of moles in the autoclave at the moment of analysis. The selected compressibility factor was 0.9 (calculated with PHREEQC using phreeqc.dat as database).

The identification and quantification of benzene and toluene in the liquid and gas phases were performed using a ThermoFisher Scientific gas chromatograph coupled with a quadrupole mass spectrometer (GC-MS) (ISQ QD Single Quadrupole MS - Trace 1310). Preconcentration of benzene and toluene was performed by SPME with a polydimethylsiloxane/carboxene (PDMS/CAR) fiber and the chromatographic separation was performed by a DB-624 column (Agilent). For each sample, two 10 mL water samples were taken and stored at 4°C. Prior to the analysis, 90  $\mu$ L of the 0.5 ppm 1,2,4-trimethylbenzene internal standard were added to each 6.9 g sample. Gas samples were collected using a needle sampling system controlled by a manometer (1bar/vial). Quantification was performed with methane as reference gas containing 10 mol-ppm of benzene and toluene.

#### IV.5- Treatment of the solid phase

Before the experiment, the reservoir rock is rinsed with isopropanol followed by water in order to eliminate potential hydrocarbons and salts such as calcium chloride used during the drilling operation. After rinsing, the solid sample is dried and sterilized overnight in the oven at 90°C. The solid phase is placed in the basket inside the high-pressure reactor. Capillaries used for X-ray tomography are also filled with the solid phase and placed in the basket. Once the reactor is closed, a volume of 60 mL of demineralized water is injected and a flush of N<sub>2</sub> gas is applied. The autoclave is heated to 100 °C during 24h for sterilization. Afterwards the reactor is cooled down, heated to the desired temperature and the water phase (with autochthonous microorganisms) is injected.

After 180 days of experiment at 36 °C and 60 bar, the remaining liquid phase is removed but maintained in sterile and anoxic conditions and is kept at 4°C awaiting further analysis. Afterwards, the solid basket is quickly and carefully removed from the reactor and stored in a

sealed anaerobic jar with anaerobiosis generator and indicator pockets (Dutscher Ref 0260001) before being transported to an anaerobic glove box.

#### IV.6- Thermodynamic modelling

The thermodynamic equilibrium at different times of the experiment was calculated using PHREEQC thermodynamic software (Parkhurst and Appelo, 1999). This software allows a comprehensive introduction of dissolved species, solid and gaseous phases and the corresponding chemical reactions. The thermodynamic data were obtained from 'Phreeqc' database without any optimization or modification. Phreeqc.dat uses the extended Debye-Hückel law for activity coefficients and the Redlich-type equation of state for the gas phase. Steady state was assumed for all calculations. All the gas species were considered, but redox reactions of methane and nitrogen were neglected. Water evaporation was considered. Sulfate reduction reaction was not considered in the anoxic part of the experiment. Phreeqc was mainly used to calculate gas solubilities in absence of reactions, thus interactions with the solid phase were not considered. The calculations took into account the different water injections occurring during the experiment and the quantity of gas sampled during the chromatography analysis.

#### IV.7- Cell culture media, strains isolation and brief characterization

Different synthetic culture media were prepared for the assessment of the microorganisms developed in the reactor just before O<sub>2</sub> addition to the system. In order to prepare these media, a mineral base mimicking the formation water composition was prepared (per liter) by adding 0.0002g NH<sub>4</sub>Cl; 0.01g KCl; 0.13g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.023g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O and 0.015g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 ml of trace elements solution (SL12; (Eichler and Pfennig, 1986)) and 0.5 mL of selenite tungstate solution (Widdel and Bak, 1992). One gram of cysteine as reducing agent and 1 mL resazurine (0.1% solution, w/v) as redox indicator were supplemented. Depending on the targeted metabolic groups, other compounds were also added. For fermentative bacteria, 10g yeast extract; 2.5g glucose; 15g casein peptone were added whereas for sulfate-reducers, 0.82g sodium acetate; 0.5g yeast extract; 0.68g sodium formate; 1.1g sodium pyruvate; 2.84g sodium sulfate were added. Media were autoclaved at 110°C for 30 minutes and then cooled down at room temperature under a stream of N<sub>2</sub>. At room temperature, 0.2g of NaHCO<sub>3</sub> prepared in anoxic conditions and autoclaved separately from the medium was added to each culture medium. Five milliliters of filtered anoxic V10 vitamins solution (Pfennig et al., 1981) were added. Media were adjusted to a pH of 6.7 and distributed anoxically in Hungate tubes. Enrichment cultures were incubated at 36 °C. The growth was followed by optical density at 600 nm (Spectrophotometer, Spectronic Instruments, Spectronic 401).

Several strains were isolated from the last tube showing growth during the Most Probable Number technique. The 15A and Recti\_s6 strains were thus isolated from the medium targeting the sulfate-reducers, whereas the 2A strain was isolated from the medium dedicated to the fermentative metabolic group. Isolation of each strain was carried out by the method of dilution series in deep agar (Pfennig and Trüper, 1992). Rifampicin was added at a concentration of 10 µg/mL during the Recti\_s6 isolation (Koelschbach et al., 2017). The purity of the isolated strains was checked under a phase contrast microscope (BX60; Olympus) as well as by sequencing their 16S rDNA genes. For the fermentative strains (2A & Recti\_S6), searching for the anaerobic fermentation products was conducted using 10 mM of glucose and a N<sub>2</sub> gas phase (1 bar). The gas phase was followed by GC-µTCD (Micro GC Fusion; Chemlys; France). The fermentation products were analyzed using ion chromatography (ThermoFisher). This process was conducted at the end of the exponential growth curve, by taking 0.5 mL of culture and filtering it at 0.22 µm (IC Millex®, Millipore) in a sterile degassed Hungate tube. Sterile physiological water was added afterwards in order to reach a final volume of 2 mL. For the sulfate-reducing strain (15A), the experiments were conducted in 120 mL penicillin flasks. The strain was cultivated with H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, 1 bar) as energy and carbon sources respectively, in addition to 20 mM of sulfate as terminal electron acceptor. The final products obtained from the sulfate consumption by this strain were monitored in these conditions, then with 10 mM of formate as carbon and energy sources and 20 mM of sulfate under N<sub>2</sub> atmosphere. The changes in the gas and liquid phases were investigated by gas micro-chromatography and ion chromatography, respectively. The microbial growth was followed by optical density at 600 nm as described above. The isolated strains were tested for their oxygen tolerance. Different volumes of air, filtered at 0.1 µm, were added to several Bellco tubes. A tube with a nitrogen gas phase and another one containing only air served as controls. The gas phase was analyzed at the beginning and at the end of the experiment by a microthermal conductivity detector (Gc-µTCD; MicroGC Fusion; Chemlys; France). The microbial growth was followed by optical density at 600 nm.

#### IV.8- Nucleic acids extraction and RNA retro-transcription

At different times of the experiment, samples from the liquid phase were collected in order to co-extract the nucleic acids. The samples were directly filtered under vacuum using a 47mm PES membrane filters of 0.1 µm porosity (by Sartorius Stedim). Afterwards, the collected filters were stored at -80 °C in order to protect the RNA. Filters were crushed in liquid nitrogen and the nucleic acids were extracted using the Fast RNA Prosoil Direct kit (MP BIO). DNA was separated from RNA with All Prep RNA/DNA (Qiagen) kit. From the isolated



strains, 2 mL of each culture were pelleted by centrifugation at 10·000 g for 5 minutes. The DNA was then extracted using DNeasy Power Soil (Qiagen) kit. After extraction, DNA and RNA were quantified using the Quant-it™ dsDNA HS (Invitrogen) and the Quant-it™ RiboGreen (Invitrogen) kits, respectively. The measurements were done using a BioTEK SYNERGY HTX microplate reader. The reverse transcription of the RNA was performed via retro transcriptase M-MLV (Invitrogen™) according to the supplier's recommendations.

#### IV.9- Polymerase chain reaction and sequencing

The V3-V4 regions of the 16S rRNA gene of the genomic DNA and cDNA were amplified by nested PCR as previously described (Yu et al., 2015). The search for archaeas was carried out by targeting successively the 21F-958R and 349F-806R regions of the Archean 16S rRNA via a nested PCR (Takai and Horikoshi, 2000). The Taq PCR Core Kit (Roche) and the 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) were used. The bacterial PCR primer pairs (344F-801R) that were used contained CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT (forward) and GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC (reverse) adapters. Afterwards, high-throughput sequencing conducted by the GenoToul genomics platform (Toulouse, France), using Illumina's MiSeq 2x250bp technology in accordance with the manufacturer's instructions was undergone. Sequencing data were processed via FROGS analysis pipeline developed by the GenoToul genomics platform in the Galaxy interface (Escudié et al., 2018).

Using the DNA of the isolated strains, the 16S rRNA genes amplifications were conducted with the primers set 8F-1489R (Lane, 1991; Weisburg et al., 1991). The amplicons were sequenced by Qiagen Genomic Services (Sanger sequencing; Hilden, Germany).

Raw sequences were archived in public NCBI database (SAMN19579666-SAMN19579701). The Genbank/ EMBL/ DDBJ accession numbers of the 16S rRNA gene sequences of isolated strains were: 15A (MZ317661), Recti\_s6 (MZ317662) and 2A (MZ317660).

#### IV.10- Quantitative PCR

Quantitative PCR (qPCR; Biorad CFX Connect) *via* Takyon NO ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP (Eurogentec) was used to determine the number of 16S rRNA gene copies present in each sample during the incubation at high pressure (from DNA and cDNA). The primers used were 338F (Suzuki and Giovannoni, 1996) and 518R (Muyzer et al., 1993). All reactions had a 20µL final reaction volume in accordance with the supplier's instructions. The reactions were denatured at 95°C/3min followed by 40 cycles of 95°C/10sec, 55°C/20sec

and 72°C/20sec. The number of copies was calculated starting from a standard with serially 10-fold diluted pCRTM 2.1-TOPO plasmid (TOPO TA cloning kit, Invitrogen).

#### IV.11- X-Ray Tomography

The morphological alterations of the solid phase were followed by X-ray tomography. Capillaries made of borosilicate with an internal diameter of 2 mm and a height of 3 cm were filled with the solid phase (sand) and positioned in the reactor. The bottom of each capillary was blocked with cotton to prevent loss of material. Before the experiment, capillaries were scanned by X-ray tomography for initial reference. After the completion of the experiment, the capillaries were removed and sealed at both ends with waterproof glue and stored at 4 °C in anaerobic glove-box until scanning. A Zeiss Xradia Versa 510 tomograph was used. Based on a prior sensitivity study, the selection of the acquisition parameters was centered on optimizing the image contrast, signal-to-noise ratio and acquisition duration. Typically a set of 1601 radiographies of 1024x1024 pixels with a pixel size of 2.5µm was acquired. The X-ray generator was operated at 40 kV and the exposure time of a single radiography is 10s. The set of recorded radiographs was reconstructed with XRM Reconstructor® (Zeiss, version 14) in order to obtain a stack of cross-sections forming a digital volume of the sample. This reconstruction software was based on the standard filtered back projection algorithm. The data were processed, visualized and interpreted using Dragonfly® (ORS, Version 2020.2.0.11731). A filtering step was first applied in order to improve the signal-to-noise ratio of the data. The subsequent segmentation step enabled the extraction of the different phases (solid, liquid, biomass) for further quantitative analyses such as assessment of the proportion and location of each phase in the studied volume and comparison of data sets before and after the experiment.

#### IV.12- X-Ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy

X-Ray diffraction (XRD) was used to study the mineralogy of the reservoir rock. Mineral identification was performed using a Bruker D2 Phaser powder diffractometer with a Cu K $\alpha$  radiation source. XRD patterns were recorded over 5° to 90° 2 $\Omega$  with a 0.02° step and a 0.5 s counting time per step. Samples from the reservoir rock were analyzed before the experiment. Bulk rock was analyzed in order to obtain the global mineral phases and a color-based fractionation was performed in order to identify potential minor crystallized phases. After the completion of the reactor experiment, samples from different locations of the basket were collected in the glove box. The collections were performed from three different depths that were 1 cm away from each other. The samples were then dried up under gaseous N<sub>2</sub> in an anaerobic glovebox at ambient temperature. All samples were manually ground and sieved into a

homogeneous powder at 100 µm, the product was then analyzed by XRD. Identification of crystallized phases was done using the DIFFRAC.EVA software.

Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to localize mineral phases and to detect potential formation of biofilm. Collected samples from three different depths, that were 1 cm away from each other, were immediately fixed in a mixture of cacodylate 0.1M and 2.5 % glutathione pH 7.2. They were then dried out in successive solutions containing 30 to 100 % ethanol and finally evaporated using hexamethyldisilazane (HMDS). Afterwards, the samples were mounted on stubs and platinum coated. Observations were carried out using a Gemini SEM 300 (Zeiss) combined to Energy Dispersive Analysis (EDX) at 8 kV in secondary electron mode (SE) or backscattering electron mode (BSE).

## V- Results

### V.1- Monitoring of the physico-chemical evolution during abiotic experiments

After approximatively 10 days of mixing the liquid and the solid phases, water composition showed an increase of chloride ( $3.05 \pm 0.15$  mM), sulfate ( $0.29 \pm 0.01$  mM) and calcium ( $2.18 \pm 0.22$  mM) concentrations in the water, indicating that the mineral matrix released these ions. Very limited quantity of acetate appeared in the liquid phase ( $0.005 \pm 0.0003$  mM). The solubilities at the thermodynamic equilibrium of the system liquid – solid – gas were calculated according to the measured variations in the liquid phase. Under a total pressure of 60 bar, a temperature of 36 °C and with a gas composition of 98.3% CH<sub>4</sub>, 0.8% CO<sub>2</sub> and 0.9 % O<sub>2</sub> at equilibrium, the calculated solubility of CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> using PhreeqC and phreeqc.dat are  $5.96 \cdot 10^{-2}$ ,  $8.88 \cdot 10^{-3}$  and  $5.25 \cdot 10^{-4}$  mol.Kgw<sup>-1</sup>, respectively.

### V.2- Monitoring of the physico-chemical evolution in the liquid phase during biotic experiment

Throughout the experiment, liquid and gas samples were collected in order to perform the different analyses. The solid phase was analyzed before and after the experiment. The liquid phase was composed of the formation water with indigenous microorganisms. As expected from a deep aquifer formation water (- 582 m), the latter is highly reduced with an Eh around - 200 mV (Table 1). The ionic water content is dominated by bicarbonate and sulfate amongst anions and calcium amongst cations. The total concentration of dissolved elements in the water can be estimated by summing bicarbonate, sulfate, chloride, calcium, magnesium, potassium and sodium knowing that 4.79 mM (286,6 mg.L<sup>-1</sup>) represents only 0.8 % of seawater salinity (Banks et al., 2014). Such low salinity strongly suggests that the formation water is of meteoric origin. The concentrations of dissolved Ca<sup>+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> confirm an interaction between water

and carbonate minerals such as lithoclasts observed in the reservoir rock. The origin of sulfate can be hardly depicted and could have resulted from the dissolution of trace amounts of gypsum or anhydrite or from oxidation of sulfides in more crucial conditions. Despite its relatively low concentration, the dominance of sulfate as a terminal electron acceptor in the formation water suggests that sulfate-reducing bacteria are the dominant microorganisms in such ecosystem.

One month before its injection into the reactor, the formation water (downhole sample) containing the microorganisms, stored until now at 4°C, was supplemented with wellhead water, sterilized by 0.1µm-filtration and maintained at room temperature. At the beginning of the biotic experiment, sulfate concentration was  $9.20 \cdot 10^{-2} \pm 4.60 \cdot 10^{-3}$  mM (*i.e.*  $1.28 \cdot 10^{-1} \pm 6.40 \cdot 10^{-3}$  mmol; Figure 3a). During the experiment, analytical measurements showed an initial decrease in the amount of sulfate after 10 days from the start, followed by its complete consumption on day 32. In order to maintain the dynamic equilibrium, formation water supplemented with sulfate was added. The whole added formation water was filter-sterilized with a 0.1 µm filter to avoid any microbial interference. Three successive water injections were performed on days 48, 104 and 126, respectively. After each injection, an expected increase in sulfate quantity was noted. Sulfate quantity increased by  $9.62 \cdot 10^{-2} \pm 4.81 \cdot 10^{-3}$  mmol,  $5.10 \cdot 10^{-2} \pm 2.55 \cdot 10^{-3}$  mmol and  $1.50 \cdot 10^{-2} \pm 7.50 \cdot 10^{-4}$  mmol on days 50, 105 and 131, respectively. Following these increases and before O<sub>2</sub> injection, sulfate consumption resumed and continued until sulfate's complete depletion from the system. During the first 130 days,  $2.61 \cdot 10^{-1} \pm 1.31 \cdot 10^{-2}$  mmol of sulfate were consumed. The third injection was applied to refill the sulfate quantity in order to replenish the system stores before O<sub>2</sub> injection.

During this first period of the experiment, sulfate quantity showed a notable progressive reduction. However, after oxygen injection into the system, the previously noted progressive reduction in sulfate quantity was noted to subside and even reverse into a remarkable upsurge. This estimated increase in sulfate quantity was of  $4.30 \cdot 10^{-2} \pm 2.15 \cdot 10^{-3}$  mmol. Using ionic chromatography coupled with a variable wavelength detector, no sulfide ions were detected in the liquid phase. Similarly no hydrogen sulfide was detected in the gas phase by gas chromatography (1 ppm as minimum detection limit). Taking into account the amount of sulfate depleted from the system, sulfate-reducers were expected to produce  $2.61 \cdot 10^{-1} \pm 1.31 \cdot 10^{-2}$  mmol of sulfide, bisulfide or hydrogen sulfide at most. Even if the sulfur was supposedly only in the form of hydrogen sulfide, it constituted less than 0.006 % of the total gas quantity. The value is too low to be detected by gas chromatography.

At the beginning of the experiment and simultaneously with sulfate consumption, an increase in acetate quantity was noted and is shown in Figure 3b. Acetate was produced in the reactor during the first 45 days despite not being detected initially in the formation water. Its quantity increased from zero to  $1.23 \pm 6 \cdot 10^{-2}$  mmol at day 13, then attained  $2.09 \pm 1 \cdot 10^{-1}$  mmol at day 50 with an additional increase until reaching a peak of  $2.34 \pm 1 \cdot 10^{-1}$  mmol. This quantity remained stable until the end of the incubation.

Similarly to *in situ* conditions, mono-aromatic hydrocarbons including toluene and benzene were supplemented in the gas phase. Monitoring of these compounds was carried out in the liquid phase. At day 8, the molar quantity of toluene was around  $2.55 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4}$  mmol (Figure 3c), which decreased after 35 days before increasing again after toluene injection. After this injection,  $2.08 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-4}$  mmol were present in the system at day 49. Afterwards, the toluene gradually decreased to  $4.12 \cdot 10^{-4} \pm 6 \cdot 10^{-5}$  mmol at the end of the experiment (day 179). During 180 days of incubation including, 130 days in anaerobiosis and 50 days in aerobiosis, no benzene degradation was observed in these conditions.

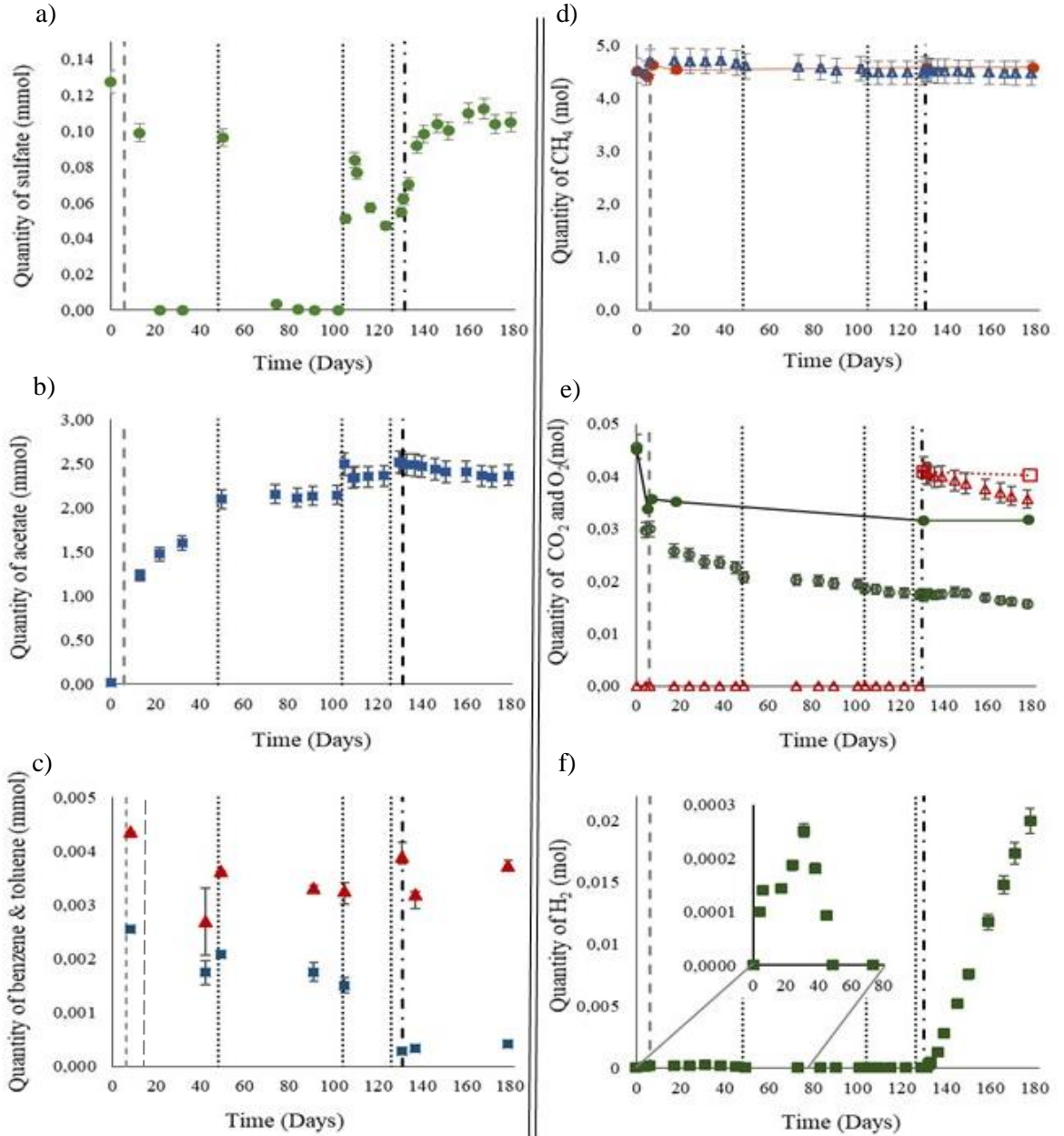


Figure 17- Results of the liquid and gas analyses during the biotic high pressure experiment (60 bar).

The vertical line at day 6 represents the CH<sub>4</sub>+CO<sub>2</sub> reinjection. The vertical dotted lines at days 48, 104 and 126 represent sulfate injections. The vertical line at day 132 represents the oxygen injection.

a) Sulfate variation in the liquid phase; b) Acetate variation in the liquid phase;

c) Toluene (represented by the blue squares) and benzene (represented by the red triangles) variations in the liquid phase. The vertical line at day 47 represents toluene injection.

d) Methane variation in the gas phase. The red dots and line represent the calculated values;

e) Carbon dioxide (represented by the green squares) and oxygen (represented by the red triangles) variations in the gas phase). The lines represent the calculated values.

f) Hydrogen variation in the gas phase.

### V.3- Monitoring of the physico-chemical evolution in the gas phase during biotic experiment

Methane is the most abundant component in the gas phase. At the beginning of the experiment,  $60.4 \pm 0.6$  bar of the gas mixture  $\text{CH}_4 + 1\% \text{CO}_2$  was added to the system at a temperature of  $36^\circ\text{C}$ . Considering the compressibility factor of 0.9 which is calculated by the PhreeqC model based on Peng-Robinson's equation,  $4.52 \pm 2 \cdot 10^{-1}$  mol of  $\text{CH}_4$  were injected. At day 4,  $5.99 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-3}$  mol of  $\text{CH}_4$  were lost from the gas phase (Figure 3d). Gas quantities were calculated based on the total pressure measured by the barometer and the gas phase composition analyzed by the gas chromatography. The calculation performed *via* Phreeqc indicated a solubility of  $6.25 \cdot 10^{-2}$  mol.Kgw<sup>-1</sup> in this experiment's conditions. Thus, taking into account the uncertainty, the  $\text{CH}_4$  quantity lost from the gas phase corresponded entirely to its soluble equivalent in the liquid phase. In order to readjust the total pressure after stabilizing the piston position, a second and last injection of the gas mixture was performed on day 6. This injection induced a  $2.16 \cdot 10^{-1} \pm 1 \cdot 10^{-2}$  mol increase in methane quantity. After each water injection, a certain number of methane moles transfer to the liquid phase in order to preserve the gas-unsaturated liquid equilibrium. The quantities transferred to the formation water were  $6.27 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-3}$  mol,  $7.77 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-3}$  mol and  $7.13 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$  mol after the first, second and third water injections, respectively. Afterwards, no variations in methane quantity were observed until the end of the experiment. The curve in the Figure 3d represents the variations in methane quantity throughout the experiment based on the thermodynamic model. This model fits well the experimental data obtained during the study.

Carbon dioxide was present in an initial proportion of 1 % of the gas mixture, corresponding to an initial quantity of  $4.56 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-3}$  mol in the gas phase. Figure 3e showed the variations of  $\text{CO}_2$  quantity during the experiment. Similarly, to methane, an initial decrease in  $\text{CO}_2$  quantity was observed due to the gas-liquid equilibrium. Following this phase, the  $\text{CH}_4/\text{CO}_2$  injection applied to readjust the pressure generated an increase in  $\text{CO}_2$  quantity of  $2.34 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$  mol. Throughout the experiment, a decrease in  $\text{CO}_2$  quantity was observed. The last measurement that was done on day 178 showed  $1.56 \cdot 10^{-2} \pm 7 \cdot 10^{-4}$  mol of  $\text{CO}_2$  in the gas phase. The curve representing the thermodynamic variations of  $\text{CO}_2$  in the gas phase was presented in the same figure. The model showed that the thermodynamic equilibrium and gases solubility were reached before the reinjection of  $\text{CH}_4/\text{CO}_2$ . The reinjection did not have any significant impact on the thermodynamic equilibrium in view of the minimal quantity that was added. The calculated pH was estimated at 5.1. However, the continuous decrease in the carbon dioxide quantity as well as the remarkable difference between the model and the experimental

measurements cannot solely be explained by thermodynamic calculations and suggested the presence of an autotrophic metabolism and the incorporation of the carbon inside the biomass.

On day 130 of incubation, O<sub>2</sub> was injected in the reactor. At day 131,  $4.16 \cdot 10^{-2} \pm 2 \cdot 10^{-3}$  mol were quantified, constituting 1% of the gas phase (Figure 3e). The quantity of oxygen is calculated based on the total pressure of the reactor with a compressibility factor of 0.9 and the molar fraction of O<sub>2</sub> analyzed by the gas chromatography. At the end of the experiment (day 178),  $3.57 \cdot 10^{-2} \pm 1 \cdot 10^{-3}$  mol of O<sub>2</sub> remained in the gas mixture. Noting the increase in sulfate in the liquid phase after O<sub>2</sub> injection,  $8.60 \times 10^{-2}$  mmol of O<sub>2</sub> had potentially oxidized sulfide into sulfate. Calculated variations of O<sub>2</sub>, taking into account the number of moles lost due to analysis, are represented in the curve. Note that the difference between the experimental and calculated values could be due to potential mineral oxidation that occurred in the reactor such as sulfur oxidation.

As previously explained, the experiment aims at studying the effects of the CH<sub>4</sub> -1% CO<sub>2</sub> -1% O<sub>2</sub> mixture in a deep storage aquifer. Hydrogen was not present in the injected gas mixture. However, limited quantities of H<sub>2</sub> near detection threshold were detected between day 4 and day 45 of the experiment as shown in Figure 3f. Before its depletion, the maximum measured quantity at day 31 was estimated at  $2.51 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$  mol, which represented 0.005% of the gas phase. In fact, this amount is too low to be considered at that time of the experiment. However, it is worth mentioning that the peak of H<sub>2</sub> was observed at a period when sulfate was undetected in the system. Surprisingly, H<sub>2</sub> accumulation clearly occurred after O<sub>2</sub> injection into the system. The amount of H<sub>2</sub> over time was shown through a positive slope that started one day after oxygen injection and continued until the end of the experiment. The last measurement of H<sub>2</sub> in the gas phase was  $1.99 \cdot 10^{-2} \pm 9 \cdot 10^{-4}$  mol, which represented 0.5% of the gas phase. The experimental H<sub>2</sub> values indicated continuous production of this gas. Considering a solubility of  $2 \cdot 10^{-4}$  mol.Kgw<sup>-1</sup> (*via* PhreeqC),  $1.75 \cdot 10^{-4}$  mol of H<sub>2</sub> were present in the liquid phase at the end of the experiment.

#### V.4- Evolution of the bacterial community during the experiment.

Besides the importance of identifying O<sub>2</sub> effect on microbial life, analyzing the qualitative and quantitative variations in microbial diversity throughout the experiment can help understanding the changes in the liquid and the gas phases. The presence of archaea could not be demonstrated by PCR and nested-PCR approaches targeting this taxonomic group. The



bacterial diversity results based on the sequencing of bacterial 16S rRNA genes were combined with the results of quantification of these same genes obtained by quantitative PCR in each sample (Figure 4). At the beginning of the experiment, the microbial community of  $2.1 \cdot 10^5 \pm 1.3 \cdot 10^5$  cells/mL stored since five months at ambient pressure at 4 °C was dominated by *Geobacteraceae* > *Desulfovibrionaceae* > *Rhodocyclaceae* > *Spirochaetaceae*. The proportions of each of the aforementioned strain species were noted to vary during the first 43 days of incubation. On one hand a reduction in *Geobacteraceae* and *Desulfovibrionaceae* was observed, in contrast to a growth in *Spirochaetaceae* and *Peptococcaceae*. This new equilibrium in the community was relatively stable until incubation day 105 when the *Peptococcaceae* concentration was noted to be increasing. *Peptococcaceae* growth coincided with the reduction in toluene in the liquid phase (Figure 3c). The oxygen injection had a significant impact on the microbial community presented by a substantial reduction in the bacterial cell concentration from  $1.1 \cdot 10^5 \pm 2.0 \cdot 10^4$  cells/mL ( $t_{130}$ ) to  $3.7 \cdot 10^3 \pm 1.2 \cdot 10^3$  cell/mL ( $t_{133}$ ) reaching an endpoint of  $4.1 \cdot 10^2 \pm 8.4 \cdot 10^1$  cell/mL ( $t_{179}$ ). *Desulfovibrionaceae* and *Sphingomonodaceae* retained a detectable presence despite having higher concentrations prior to oxygen injection. Members of the *Sphingomonodaceae* may have aerobic metabolism in addition to having fermentation capacities allowing them to produce H<sub>2</sub> by degrading organic molecules.

Via the 16S rRNA gene, the bacterial taxonomic diversity of active cells was monitored and the results are presented in the Figure 5 and Table 2. The bacterial strains' activity seems to be restricted and different from that seen at atmospheric pressure (intensity of activity at day 0 compared to the activity during the incubation). Thus, the *Geobacteraceae* (blue), *Rhizobiaceae* (brown), *Desulfovibrionaceae* (black yellow, below) and *Spirochaetaceae* (dark blue) were the most active in the original community obtained from the sampler that evolved for several months at atmospheric pressure in anaerobiosis. Just before O<sub>2</sub> injection (day 130), strong activities of *Desulfovibrionaceae* (yellow), *Peptococcaceae* (green) and *Thermodesulfovibrionaceae* (blue) were detected. On day 179 at the end of the incubation and even though their microbial activity were quite low, *Spirochaetaceae* and *Desulfovibrionaceae* strains could still be detected. Hence, the sulfate-reducing metabolic group had suffered but has not completely disappeared.

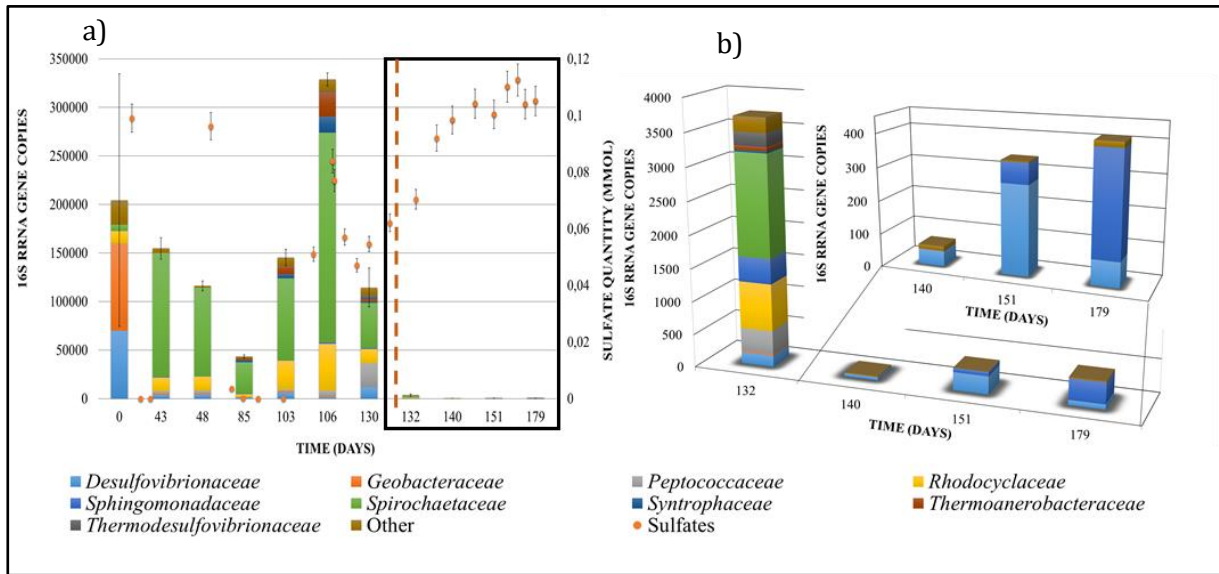


Figure 18 – Evolution of the bacterial community during the incubation at 60 bar, 36 °C and with a gas mixture (CH<sub>4</sub>, 1% CO<sub>2</sub>, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene) before and after oxygen injection (1%). The taxonomic diversity is monitored by 16S rRNA genes sequencing and the quantification is estimated by qPCR of 16S RDNA gene copies for each mL of sampled water through the experiment. 17a) Monitoring over 180 days of the experiment. Following the injection of oxygen, the quantity of microorganisms has drastically decreased. In order to observe the taxonomic diversity, the boxed part is zoomed in figure 17b. The variation of the sulfate quantity in the liquid phase is represented with the orange dots. Figure 17b- represents a zoom in on results after O<sub>2</sub> injection.

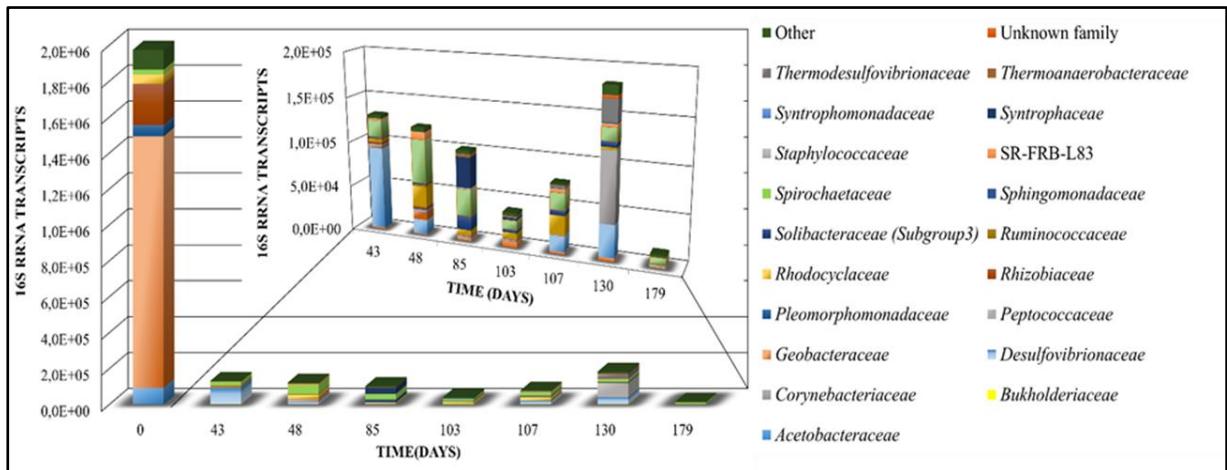


Figure 19 – Evolution of the active bacterial community (during the incubation at 60 bar, 36 °C with a gas mixture (CH<sub>4</sub>, 1% CO<sub>2</sub>, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene) before and after oxygen injection (1%). The taxonomic diversity is based on the sequencing of cDNA of the 16S RDNA copies and the quantification was estimated by qPCR of CDNA for each mL of sampled water through the experiment. Standard deviation are presented in Table 20.

In addition, the liquid phase was sampled prior to O<sub>2</sub> injection in order to target and cultivate sulfate-reducers and fermenters in special media, as those microorganisms are considered key players in deep aquifers. From the sulfate-reducers' medium, the strain 15A, a representative of the *Desulfovibrio vulgaris* strains, was isolated and identified (99.72% identity with 16S rDNA sequence of *D. vulgaris* strain "Miyazaki F"). The strain 15A had a strictly anaerobic growth. It was capable of growth with CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> as sole carbon and energy sources. Regarding its heterotrophic growth, formate oxidization was tested and turned to be incomplete with noted production of acetate. As expected, the strain 15A did not produce acetate when grown autotrophically. Two fermenters were isolated, strain 2A and strain Recti\_s6. Strain 2A is phylogenetically close to *Pleomorphomonas koreensis* (99.70% of identity; 16S rDNA). Grown on glucose-based medium, strain 2A produces formate, acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> even in oxic conditions such as the air in the head space. Strain Recti\_s6 is related to *Rectinema cohabitans* strain HM (99.83% of identity) which a spirochaete isolated from an anaerobic naphthalene-degrading enrichment culture (Koelschbach et al., 2017). Finally, representatives of the *Bacillus* genus were also detected through the identification of their characteristic structures and spore forms (data not shown). These bacteria are strictly aerobic and are able to maintain under anoxic conditions through their ability to sporulate. Spores protect these bacterial until more favorable conditions for germination occur.

Table 20: Standard deviation related to the 16S rRNA transcripts.

Time (Days)	Standard Deviation
0	1.14E+5
43	5.87E+5
48	5.32E+4
85	4.05E+3
103	2.01E+3
107	3.65E+3
130	6.19E+3
179	1.71E+3

#### V.5- Evolution of the solid phase during the experiment.

XRD was performed on the reservoir rock that is sampled from the deep aquifer and introduced in the reactor and on the solid sample after the experiment. At the end of the experiment, X-ray diffraction performed on the collected rock did not demonstrate any significant changes in the solid crystallized phases before and after the experiment (Figure 6). Mainly composed of quartz with minor calcite components, the solid sample did not vary

significantly after the experiment. However parallel measurements were performed on a reservoir rock sample that was immersed in the formation water containing the microbial life with the substitution of CH<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> for N<sub>2</sub> gas. These measurements indicated the formation of iron sulfide (Figure 6). Thus the possibility of iron sulfides production during the experiment with its subsequent oxidation after O<sub>2</sub> injection cannot be excluded. SEM-EDX showed high amount of clay minerals in between quartz grains, and Fe and S colocalization suggested the presence of iron sulfides in agreement with XRD (Figure 7). No variations was observed by depth in the basket and no biofilm could be detected in these conditions.

The average porosity obtained by means of X-ray tomography from four different capillaries did not show any significant variation with an initial porosity of around 43.5 % and a final one of around 44.5% with an estimated uncertainty of  $\pm 2$  %. Thus, no recrystallization or potential biofilm could be demonstrated in agreement with mineralogical observations. Note that black particles were observed in the solid phase at the end of the experiment. Similar black particles produced during a bio-geochemical interactions study were identified as pyrite.

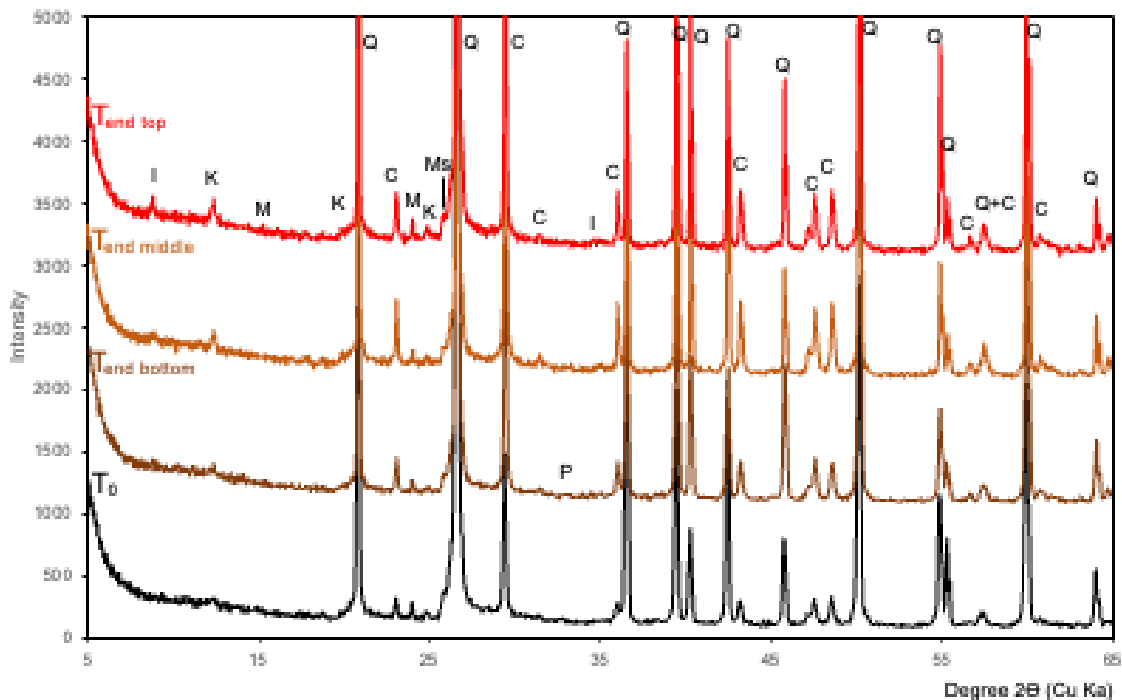


Figure 20 - X-ray diffraction patterns of samples collected before the experiment ( $t_0$ ) and after the experiment at three depths (top, middle and bottom of the solid basket). I: illite, K: kaolinite, M: maghemite, Q: quartz, C: calcite, P: pyrite.

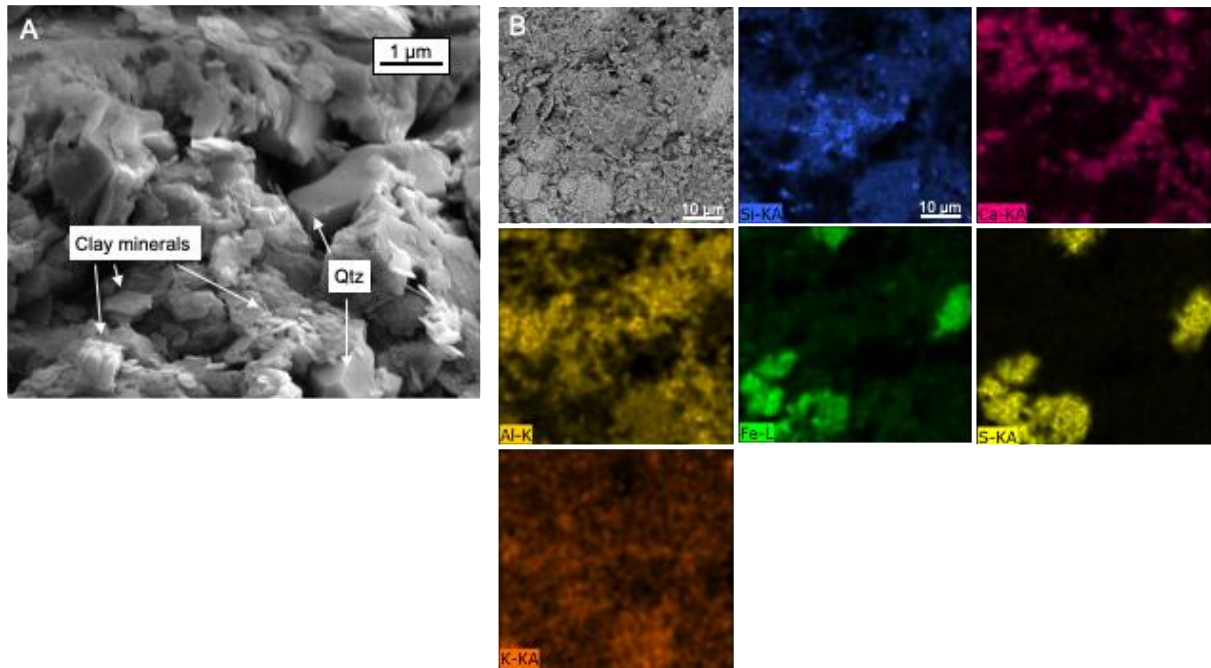


Figure 21 – SEM-EDX observations from surface samples collected at the end of experiment showing clay minerals and quartz (A, SE mode) and observation of iron sulfides (B, BSE mode).

## VI- Discussion

The role and contribution of green and renewable energy in the energy mix is more than ever required in order to counteract and reduce the notorious effects of greenhouse gas emissions. As part of energy transition, natural gas will become greener through the production and storage of biomethane. However, despite that biomethane is an attractive source of renewable energy, the effects of its storage particularly in massive amounts remains unknown. Thus, identification and comprehension of associated phenomena to biomethane storage is fundamental for the basis of any territory's energy strategy. In order to secure energy supplies, to face consumption peaks and variations between summer and winter, a significant part of natural gas can be stored in geological structures such as salt cavities or deep aquifers. That said, biomethane could replace natural gas on the long term and can be stored within these geological structures. Unlike natural gas, O<sub>2</sub> is added to biomethane during sulfide reoxidation process before injection into the gas network. To our knowledge, this is the first study to evaluate the potential impact of O<sub>2</sub> in anoxic ecosystems such as deep aquifers in this setting. The scenario tested in this study is the most unfavorable case of biomethane storage consisting of an O<sub>2</sub> supply of 1% in the context of an Eocene aquifer which is mainly composed of sands, sandstones and carbonate deposits (Brenot et al., 2015). Based on the X-ray diffraction results, calcite, iron sulfides (pyrite and marcasite), oxi-hydroxides (maghemite and hematite) and clay minerals were detected in traces. The monitoring well Ab\_L\_1 sampled for this study is the closest to the natural gas bubble (Ranchou-Peyruse et al., 2019). At an approximate depth of 600 m, interactions between the formation water and the injected gas are at their peak. Under a high pressure of 60 bar, oxygen solubility is more important than its solubility at the surface even at a 1% proportion. The Ab\_L\_1 formation water has a very low salinity of 4.79 mM (286.56 mg.L<sup>-1</sup>) which is equivalent to only 0.8 % of marine salinity (Table 1). However the abiotic experiment showed salt release from the solid into the liquid phase despite rinsing of the rock during the preparation. Calcium and chloride were the main ions detected. Calcium chloride is a brine known to be used during drilling operations. Nevertheless, stoichiometry suggests another origin for calcium which could be released from the calcite detected in the reservoir rock. Even in small quantities of few mmoles, changes in the liquid's salinity have the potential to alter the thermodynamic equilibrium.

### VI.1- Sampling and pre-incubation

The formation water containing indigenous microorganisms was sampled 5 months before the start of the high-pressure biotic experiment. Water was collected using a downhole sampler ensuring the purity of the microbiological sample and maintaining it under high-pressure until reaching the laboratory. Under controlled conditions, the pressure was gradually lowered in order to avoid damaging or destroying the microorganisms through rapid depressurization. The formation water was then stored at ambient temperature and under anoxic conditions with N<sub>2</sub> as gas phase. One month before the experiment, the formation water with the microorganisms was supplemented with sterile water from the same study site in order to reactivate the microorganisms. During this pre-incubation period, the microorganisms already started to consume different elements present in the water particularly sulfate. Once injected in the reactor, liquid phase was supplemented with sulfate by the release of these ions from the rock. Sulfate ions present in the solid phase may be due to pyrite oxidation or to drilling brines. Incubation at atmospheric pressure seems to have particularly favored the *Geobacteraceae* family, which proportion drastically decreased in the pressurized reactor. Similar changes affected the *Desulfovibrionaceae* family which are sulfate-reducing proteobacteria previously described in this site (Ranchou-Peyruse et al., 2019). These findings encourage undergoing further studies assessing the behavior of microbial communities in deep environments under high pressures, even in continental undergrounds where pressures are known to be lower than deep marine ecosystems.

### VI.2- Physicochemical and bacterial evolution before oxygen injection

The objective of the custom-designed reactor in this study is to simulate as precisely as possible a gas storage aquifer. Anoxic conditions were applied from the beginning of the experiment with a gas phase composed of CH<sub>4</sub> with 1% of CO<sub>2</sub> and small quantities of benzene and toluene. The entire rock was initially immersed in the formation water during the first 5 days in order to colonize it with microorganisms. Afterwards the water level was lowered allowing the upper part of the rock to bath in the gas phase whereas its lower part remained in the liquid phase with the microorganisms. Microbial communities were able to grow under a pressure of 60 bar and a temperature of 36 °C, similarly to the aquifer's *in situ* conditions. The thermodynamic modeling studies helped to identify the equilibrium status of our system. The parameters such as the gas quantity and volume, the aqueous phase composition and quantity and the temperature of the system were fixed. PhreeqC model calculated the solubility of each gas in the aqueous phase under the system's conditions, and the quantity of each gas in the gas phase at equilibrium. At day 5 and before the reinjection of CH<sub>4</sub>+CO<sub>2</sub>, the quantities of CH<sub>4</sub>

( $4.46 \pm 2.2 \cdot 10^{-1}$  mol) and CO<sub>2</sub> ( $2.97 \cdot 10^{-2} \pm 1.5 \cdot 10^{-3}$  mol) in the gas phase were equal to those calculated by PhreeqC (4.41 and  $3.37 \cdot 10^{-2}$  mol), respectively. These findings confirm that the thermodynamic equilibrium was attained on day 5. The re-injection of the gas mixture on day 6 inducing a small increase in the quantities of these gases (Figures 2d and 2e) did not cause a significant difference in the thermodynamic equilibrium. On day 20, the reduction in CO<sub>2</sub> quantity from the gas phase was greater than the value calculated at the thermodynamic equilibrium suggesting an additional consumption which can only be explained by integration of CO<sub>2</sub> in the bacterial biomass. The detection of H<sub>2</sub> followed by its consumption supports this hypothesis. Carbon dioxide and hydrogen are consumed by autotrophic microorganisms that use H<sub>2</sub> as a source of energy and electrons. The absence of archaea in the microbial community confirms the lack of CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> consumption *via* methanogenesis in this study. Since the beginning of the experiment, sulfate reduction was noted in the liquid phase in the absence of O<sub>2</sub>. That observation necessitated three sulfate-supplemented formation water injections in order to maintain the incubation. The bacterial community analysis confirmed the presence of the *Desulfovibrionaceae* family (Figure 4). Moreover, the 16S rRNA transcripts studies confirmed their activity in the original community (Figure 5). Previous studies on the Ab\_L\_1 site recognized the activity of the sulfate-reducing bacteria, particularly the delta-proteobacteria which include the *Desulfovibrionaceae* family (Ranchou-Peyruse et al., 2019). We conclude that the anaerobic activity of sulfate-reducing bacteria was responsible for the depletion of sulfate from the system. The *Desulfovibrio vulgaris* 15A strain isolated in this study showed an ability to produce acetate under heterotrophic conditions. Acetate level was noted to increase during the first month of incubation and remained stable until the end of the experiment suggesting a simultaneous absence of acetoclastic bacteria (Figure 3b). Moreover, acetate was not among the ions released from the solid phase during the abiotic experiments. Acetate could have also been produced by fermentative bacteria present in the community such as isolated *Pleomophomonas koreensis* 2A and *Rectinema cohabitans* Recti\_s6 strains. Under fermentative conditions, these two strains have been shown to produce formate, acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. Therefore we conclude that in the first days of incubation, there was a significant activity of fermenters particularly *Spirochaetaceae* and heterotrophic sulfate-reducers. The latter reduce sulfate from organic molecules present in the water, mineral matrix but also in the necromass. It is also evident that the H<sub>2</sub> produced during fermentation was directly consumed by the sulfate-reducers including the *Desulfovibrio vulgaris* 15A strain, as sulfate depletion coincided with H<sub>2</sub> detection. The hydrogenotrophic ability of certain strains of the *Desulfovibrio* genus has been previously reported (Bagnoud et al., 2016; Detmers et al., 2004).



Conversely, sulfate supplementation resulted in H<sub>2</sub> disappearance. Similarly, the reduction in CO<sub>2</sub> (Figure 3e) could be partially explained by this autotrophic growth that uses this carbon source for its biomass and metabolism. However the sulfide compounds produced through the sulfate-reduction metabolism were not detected in the liquid nor the gas phases. The black particles observed in the solid basket and the reactor at the end of the experiment, identified as pyrite by XRD, suggest that iron sulfide was formed by the interaction of ferrous irons present in the reservoir rock and the formation water with the produced sulfide compounds (Berlendis et al., 2010; Caldwell et al., 2008; Fry et al., 1997; Park et al., 2006; Zettlitzer et al., 2010).

### VI.3- Monoaromatic hydrocarbons biodegradation

Several studies have demonstrated the potential for biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by autochthonous microbial communities in deep aquifers used for natural gas storage (Berlendis et al., 2010; Aüllo et al., 2016; Ranchou-Peyruse et al., 2017). In this study, the gas phase was supplemented with benzene and toluene at concentrations similar to those typically found in natural gas (7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene). A reduction in toluene started around day 100 until the injection of O<sub>2</sub>. No toluene reduction was noted in oxic conditions. A growth of the *Peptococcaceae* strains (Figures 4 and 5) can be noted in the same period. This bacterial family includes gram-positive sulfate-reducing and fermentative bacteria that have previously been associated with biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in similar environments (Abu Laban et al., 2010; Aüllo et al., 2016; Kleinsteuber et al., 2008; Liu et al., 2004; Morasch et al., 2004; Ranchou-Peyruse et al., 2017; Robertson et al., 2000; Taubert et al., 2012). This hypothesis is consistent with the current level of understanding of the behavior of microbial communities at the gas bubble / formation water interface. In close proximity to the gas bubble, exogenous molecules specifically carbon molecules transferred from the gas to the formation water become more accessible to the microorganisms. This zone that is less oligotrophic than the rest of the aquifer appears to be more favorable for the development of microorganisms such as *Desulfovibrio*. The *Desulfovibrio* genus is known to be more competitive and faster growing than *Desulfotomaculum* (*Peptococcaceae*) when present in environments with abundant organic molecules (Aüllo et al., 2013). After O<sub>2</sub> injection, a notable decline in sulfate reduction, microbial activity and toluene degradation were noted. Terminating the natural bio-attenuation of aromatic hydrocarbons could be a side effect of massive O<sub>2</sub> influx into UGS and should not be neglected in the management of these geological storages.

#### VI.4- Evolution of the four-phase system after oxygen injection

Once the O<sub>2</sub> was injected in the gas phase and based on abiotic physicochemical reactions, the simulation model predict that the value at saturation ( $4.42 \cdot 10^{-4}$  mol.Kgw<sup>-1</sup>) in the liquid phase was experimentally reached 5 days after the O<sub>2</sub> injection (*i.e.*, t<sub>136</sub>). However, the experimental data showed a constant decrease in the gas phase of O<sub>2</sub> until the end of the experiment. This reduction is linked to: i) the solubilization of O<sub>2</sub> in the liquid phase (0.67 mmol estimated from the model); ii) the reoxidation of sulfide into sulfate ( $8.60 \times 10^{-2}$  mmol), the sulfide potentially trapped in the form of iron sulfides in the rock matrix (*e.g.* pyrite). Many studies showed the immediate underground oxidation of pyrite after O<sub>2</sub> injection in the storage systems (Guo et al., 2021; Kushnir et al., 2012; Lu et al., 2016; Vu et al., 2018) causing an increase in sulfate quantities (Yuan et al., 2009); iii) and a possible reoxidation of other reduced elements, such as ferrous ions. The decrease in O<sub>2</sub> quantity was more significant and may be due to different gas-solid interactions not identified during our study. The solubility of O<sub>2</sub> simulated by the model can be estimated to be around  $4.42 \cdot 10^{-4}$  mol.Kgw<sup>-1</sup> in the liquid phase during the last 50 days of the experiment. If a comparable water is placed under different environment and conditions such as air and 36 °C temperature, O<sub>2</sub> saturation would be of around  $2.1 \cdot 10^{-4}$  mol.Kgw<sup>-1</sup> at equilibrium (Benson and Krause, 1980; Millero et al., 2002) and an aerobic microbial ecosystem would develop (Stiff et al., 1992). The hyperoxic water in our reactor was clearly toxic to the strictly anaerobic microorganisms, as evidenced by the drastic decrease in bacterial taxonomic diversity and its activity from the day following O<sub>2</sub> injection (Figures 4 and 5) even if the existence of some anoxic micro-niches could be supposed. It is probable that part of O<sub>2</sub> could have reacted with the organic matter resulting from necromass.

Some microorganisms survived these new environmental conditions and retained a metabolic activity as demonstrated by a surprising constant production of H<sub>2</sub> following O<sub>2</sub> injection that persists till the end of the experiment. Analyses performed on fermentative strains 2A and Recti\_s6 demonstrated their capability to produce H<sub>2</sub> in oxic conditions. With the reduction in the majority of strict anaerobic bacteria and the decline in hydrogenotrophic sulfate-reducers such as *Desulfovibrio vulgaris* 15A, sulfate and H<sub>2</sub> were no longer consumed, explaining its accumulation in the gas phase. Despite that some strains of the *Desulfovibrionaceae* family were able to survive O<sub>2</sub>, their activity is significantly slow and even negligible. A study conducted by Yuan et al. showed the occurrence of sulfate-reduction in anaerobic environment after undergoing phases of oxygen stress. Sulfate-reducing bacteria can have a relative temporary resistance to oxic environments (Yuan et al., 2009) which explains the detection of their low activity. It is possible that some aerobic microorganisms such as *Bacillus* strains

and/or aero-anaerobic microorganisms such as *Sphingomonadaceae* may have consumed some of the O<sub>2</sub> as well (Kosako et al., 2000).

Despite that the solid phase demonstrated no changes in porosity % or mineral composition among others, the pre and post experimental analyses cannot completely rule out the possibility of potential changes secondary to O<sub>2</sub> injection in the UGS. In fact, the reservoir rock sample was in contact with O<sub>2</sub> present in the air before the experiment and was scanned by X-ray tomography and XRD in oxic conditions. During the experiment, interactions occurred in anoxic environment and produce minerals such as metal sulfides. Following O<sub>2</sub> injection, changes such as mineral oxidation occurred. At this stage, the solid phase was in oxic conditions, similarly to its state before the beginning of the experiment. There were no signs suggesting that the metal sulfides precipitates could have significantly reduced the porosity of the rock prior to oxygen injection. However considering these facts, further studies are required in order to assess the state of the solid phase after incubation and before O<sub>2</sub> injection in the system.

During the multidisciplinary experiment, oxygen effects on the different phases of an aquifer during biomethane storage were assessed. Oxygen injection induced mineral oxidation to the reservoir rock (Lu et al., 2016; Vu et al., 2018), especially iron sulfide oxidation causing increase in sulfate concentration in the aqueous phase. In fact, iron sulfide oxidation was already observed during CAES (Guo et al., 2021; Jung et al., 2013) and CCS (Jung et al., 2013; Shao et al., 2014; Wei et al., 2015) where oxygen was injected as impurity. On a larger scale, reaction of minerals and their dissolution in the aqueous phase can alter the reservoir rock's porosity and therefore affect the storage volume. Another clear result obtained was the deleterious effect of oxygen on the anaerobic microbial communities. Many studies were conducted to confirm the capability of these communities to underground biodegrade hydrocarbons, especially the sulfate-reducing bacteria (Aüllo et al., 2013; Ranchou-Peyruse et al., 2019). Even though the microbial concentration drastically decreased after O<sub>2</sub> injection, some of the communities were able to survive. In order to develop, those communities might adapt to the new aquifer conditions. To get their needs of carbon, microorganisms might develop capabilities for hydrocarbon biodegradation and therefore, the microbial community would adapt to their new environment. During CCS or biomethane storage in deep aquifers, oxygen's effects should be considered on many levels depending on the storage conditions such as the reservoir rock's composition and the microbial communities harbored *in-situ*.

## VII- Conclusion

In this experiment, we were able to simulate the aquifer Ab\_L\_1 situated in South Aquitaine, Southwest France in a reactor. Through a multidisciplinary approach, the impact of 1% of O<sub>2</sub> under 60 bar total pressure was evaluated in a UGS aquifer for the first time ever. The relatively simple composition of the rock matrix at the Ab\_L\_1 site mainly containing sand and to a lesser degree calcite did not seem to react after the addition of O<sub>2</sub> at low concentration. Reoxidation of metal sulfide precipitates was expected with subsequent minimal increase in the porosity of the aquifer rock. As of the early 1990s, sulfate was noted to decrease in the Ab\_L\_1 site as a result of the sulfate-reducing activity amplified by the proximity of the gas bubble and by the consumption of organic molecules dissolved in water by sulfate-reducers (1992:  $\approx 18$  mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 2013:  $< 7$  mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; (Ranchou-Peyruse et al., 2019)). The reoxidation of metal sulfides would therefore contribute to the restoration of higher sulfate concentrations. Similarly the direct effect on the gases stored in the aquifer (99% CH<sub>4</sub>, 1% CO<sub>2</sub>) seemed negligible and even absent. Conversely, O<sub>2</sub> had a deleterious effect on the strictly anaerobic microbial community interacting with the UGS. This effect manifested as a decline and even a complete arrest of the natural bioattenuation of monoaromatic hydrocarbons, a decrease in oxygen amount and finally a surprising H<sub>2</sub> accumulation in the gas phase deriving from fermentative bacteria able to survive the new oxic conditions.

The different biological, geological and chemical impacts of biomethane storage containing 1% of O<sub>2</sub> as impurity were evaluated in this study. It will be necessary to carry out new studies with lower oxygen concentrations and for other storage conditions (temperature, pressure, rocks). Nevertheless, in view of these first results, the elimination of oxygen from the gas mixture before its injection must be considered. However oxygen is widely used during different stages of the processing of various other resources such as in CCS or CAES in geological sites. The findings noted in our study shed a new light on O<sub>2</sub> gas effects on the underground environment which is an important step in the green energy era. Such observations lay the cornerstone for the future selection of accessible, secure and stable ways of biomethane underground storage which is crucial for building a successful global clean energy strategy. Further studies involving the use of various amounts of oxygen during storage of different gases compositions and their subsequent implications are required for a better understanding of the static and dynamic interactions occurring during gas storage practices.

---



### VIII- Conclusion du chapitre

Cette première expérience a permis de confirmer notre capacité à reproduire un aquifère de stockage dans notre dispositif expérimental. Les microorganismes autochtones se sont développés dans le système et l'activité de cette communauté bactérienne a été suivie sous pression tout au long de l'expérience à 60 bar et 36 °C.

Dans les conditions actuelles du stockage et sous une phase gazeuse constituée de méthane, de dioxyde de carbone, de benzène et de toluène, les sulfato-réducteurs ont consommé complètement le sulfate au fur et à mesure de sa recharge. Or, ce phénomène est observé depuis le début des années 90 sur le site d'étude. Dans le même temps, une diminution de la quantité de toluène a également été observée et a été rapprochée du développement concomitant de la famille des *Peptococcaceae*. Cette famille abritant des bactéries fermentaires et sulfato-réductrices a déjà été mise en évidence dans la biodégradation des hydrocarbures mono-aromatiques, dont le toluène, dans les aquifères profonds (Aüillo et al., 2016). Après l'injection de 1% de dioxygène dans la phase gazeuse, la sulfato-réduction s'est arrêtée ainsi que la biodégradation du toluène. Au niveau de la communauté bactérienne, l'essentiel des microorganismes ont disparu et une fraction minime de la communauté bactérienne de départ semble avoir résisté. Dans le même temps, une accumulation de dihydrogène est constatée dans la phase gazeuse après l'injection d'O<sub>2</sub>. Le scénario microbiologique confirmé par les études de diversité taxonomique bactérienne à chaque stade de l'expérience et les expériences culturelles, laisse supposer que l'hydrogène serait produit par des microorganismes fermentaires présents dans le sous-sol. En conditions anoxiques, cet hydrogène serait consommé par les micro-organismes hydrogénotrophes telles que les bactéries sulfato-réductrices. Une fois en conditions oxiques, l'arrêt de la sulfato-réduction (et de l'hydrogénotrophie associée) aurait induit l'accumulation de cet hydrogène. Bien que l'injection de dioxygène ait eu un effet drastique sur la diversité bactérienne et leurs quantités, l'activité des microorganismes fermentaires, probablement sur la nécromasse, a été montrée possible même en conditions oxiques. Les micro-organismes hydrogénotrophes sont également capables de fixer le CO<sub>2</sub> dans leur biomasse et pourraient expliquer la disparition d'une partie du CO<sub>2</sub> de la phase gazeuse durant l'expérimentation. La phase solide, quant à elle, était un échantillon de la roche du réservoir constituée principalement de quartz. Les analyses effectuées sur cette phase n'ont pas montré une variation significative au niveau de la porosité, cependant des particules noires identifiées comme de la pyrite sont remarquées en fin d'expérience dans des endroits du panier supposés plus difficilement accessibles à l'O<sub>2</sub>.

L'effet de l'injection du dioxygène sur l'environnement souterrain durant le stockage de biométhane a été étudié dans le cadre de ce projet multidisciplinaire. La connaissance des interactions biogéochimiques pouvant avoir lieu est une étape primordiale et essentielle pour le développement de la filière biométhane et l'établissement de valeurs limites. Cependant, la méthodologie et les réponses apportées par ce travail dépassent le stockage géologique en aquifère profond du seul biométhane et peuvent être étendues à d'autres activités humaines utilisatrices du sous-sol, tel que le stockage de CO<sub>2</sub> et ses impuretés dues à l'oxy-combustion.

*Chapitre 4.*  
*Effet de l'injection du dihydrogène dans les*  
*aquifères de stockage*

---





## I- Introduction du chapitre

Comme le biométhane, le dihydrogène est considéré comme une des alternatives aux combustibles fossiles. Dans le cadre de la transition énergétique, le dihydrogène prend une place importante de par ses utilisations multiples. Ces caractéristiques rendent le dihydrogène une source énergétique qui gagne de l'intérêt plus en plus. En effet, l'Agence internationale de l'énergie a estimé une consommation mondiale de dihydrogène égale à 13 % du mix énergétique mondial, une production dix fois plus que celle d'aujourd'hui (1,2 % en 2018) ("Tout savoir sur l'hydrogène," 2021). Une des utilisations de l'H<sub>2</sub> est son injection directe dans les réseaux de gaz naturel, appelée 'Power-to-gas'. Cette voie permet de stocker l'excédent d'électricité en le convertissant en dihydrogène par électrolyse de l'eau et qui par suite pourra être transformé en méthane de synthèse *via* le processus de méthanation. En 2019, les opérateurs de gaz français ont recommandé une fraction du dihydrogène égale à 10 % dans le mélange gazeux circulant dans les réseaux à l'horizon de 2030 (Trouvé et al., 2019). Après l'injection dans les réseaux, le dihydrogène pourra être stocké massivement avec le gaz dans les systèmes de stockage tels que les aquifères profonds.

Ainsi, un des objectifs du projet RINGS est de déterminer les effets de l'injection du dihydrogène dans les aquifères de stockage souterrains (UGS). Dans cette étude, une reproduction d'un aquifère appartenant au bassin parisien en région Centre Val-de-Loire. Ce site de stockage est opéré par Storengy. Similairement à l'expérience sur le dioxygène, les phases solides et liquides sont prélevées du site étudié. La phase solide est composée de morceaux de carottes prélevées lors du forage et de déblais de forage. L'eau de formation est prélevée du sous-sol en fond de puits dans une bouteille stérile sous-pression. Elle contient les microorganismes autochtones formant ainsi la phase liquide du réacteur contenant la vie microbienne. La phase gazeuse du réacteur est initialement composée de CH<sub>4</sub> avec 1 % de CO<sub>2</sub> à 85 bar, après injection du dihydrogène à 10 %, la pression totale du système est 95 bar.

Le dihydrogène est un composé qui forme une source d'énergie pour les communautés microbiennes souterraines. Parmi ces communautés, les métabolismes de sulfato-réduction sont souvent dominants. Les archées méthanogènes sont toutefois identifiées dans les écosystèmes souterrains. Une des voies de méthanogénèse est la consommation du dihydrogène et du dioxyde de carbone pour produire du méthane. En effet, la consommation de l'H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> est une des voies de survie dans les systèmes oligotrophes. Des écosystèmes basés sur l'H<sub>2</sub> comme source d'énergie et le CO<sub>2</sub> comme source de carbone sont identifiés comme SLiMEs (Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystems).

Afin de déterminer l'effet de l'injection du dihydrogène dans ces environnements, initialement les conditions expérimentales ont été une pression totale de 85 bar (99 % de CH<sub>4</sub>/ 1 % de CO<sub>2</sub> / 7,95 ppm de benzène / 3,75 ppm de toluène) et une température de 47 °C. L'injection du dihydrogène a eu lieu une fois l'équilibre thermodynamique liquide –gaz est atteint et l'activité microbienne est confirmée. Au moment de l'injection, le dihydrogène a composé 10 % de la phase gazeuse sous une pression de 95 bar et une température de 47 °C. Les effets de cette teneur de dihydrogène sur l'aquifère étudié sont présentés dans cette partie du manuscrit. Les résultats sont présentés sous forme d'un article scientifique qui sera soumis prochainement.

## **Geological storage of Hydrogen in deep aquifers: towards artificial SLiMEs**

PG. HADDAD<sup>1</sup>, M. RANCHOU-PEYRUSE<sup>1,2,3</sup>, M. GUIGNARD<sup>3</sup>, J. MURA<sup>1</sup>,  
F. CASTERAN<sup>1,2</sup>, L. RONJON-MAGAND<sup>3</sup>, P. SENECHAL<sup>4</sup>, M-P. ISAURE<sup>2</sup>, I. SVAHN<sup>5</sup>,  
P. MOONEN<sup>4</sup>, G. HOAREAU<sup>6</sup>, D. DEQUIDT<sup>7</sup>, P. CHIQUET<sup>2,8</sup>, G. CAUMETTE<sup>2,8</sup>,  
P. CEZAC<sup>1,2</sup>, A. RANCHOU-PEYRUSE<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Pau et Pays de l'Adour, E2S UPPA, LaTEP, Pau, France.

<sup>2</sup> Joint Laboratory SEnGA, UPPA-E2S-Teréga, Pau, 64000, Pau, France.

<sup>3</sup> Université de Pau et Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, IPREM, Pau, France.

<sup>4</sup> Université de Pau et Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, DMEX, Pau, France.

<sup>5</sup> Bordeaux Imaging Center (BIC), CNRS, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

<sup>6</sup> Université de Pau et Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, TOTAL, LFCR, Pau, France.

<sup>7</sup> STORENGY – Geosciences Department, Bois-Colombes, France.

<sup>8</sup> Teréga – 40 Avenue de l'Europe, CS 20 522, 64010 Pau, France.

\*Correspondence: [anthony.ranchou-peyruse@univ-pau.fr](mailto:anthony.ranchou-peyruse@univ-pau.fr)

Phone: +33 540 145 164

## II- Abstract

Hydrogen (H<sub>2</sub>) is considered the new promising energy source in the context of energy transition. Hydrogen can be found naturally in the subsurface it is called native hydrogen. Many ways of production are being developed in order to increase its production. A way to store H<sub>2</sub> is to mix it with methane in existing transmission pipelines and store it in underground gas storages (UGS) such as deep aquifers. However, interactions between water formation, reservoir rock, gas mixture and the microbial ecosystems are still unknown and need to be determined. Our study aims to define those interactions and to identify the effect of hydrogen injection. The aquifer is reproduced experimentally in a reactor. From the beginning of the experiment (pressure of 85 bar methane – 1% carbon dioxide, 47 °C), sulfate was consumed from the liquid phase. Directly after hydrogen injection (10 % H<sub>2</sub> of 95 bar), formate was produced simultaneously with sulfate consumption in the aqueous phase and carbon dioxide consumption from the gas phase. Once sulfate was depleted, hydrogen and carbon dioxide consumptions increased at a higher rate indicating a switch in the microbial ecosystems towards SLiMEs. Microbial analyses confirmed the increased activity of methanogens after H<sub>2</sub> injection. Moreover, methanogenic archaea became the majority in the ecosystem. Once the carbon dioxide was depleted from the gas phase, hydrogen consumption and formate production stopped instantly.

**Keywords:** Hydrogen, deep aquifers, UGS, SLiMEs, high pressure

### III- Introduction

Hydrogen (H<sub>2</sub>) is getting interest for its use as a green energy source in the context of energy transition. Historically, H<sub>2</sub> was found in the underground reservoirs by means of many reactions such as the graphitization of methane into graphite, alteration of iron-rich minerals (Cannat et al., 2010; Worman et al., 2016), water radiolysis or even magmatic degassing. On the surface, different pathways are used to produce hydrogen. And depending on H<sub>2</sub>'s production technology and its cleanness, it is labeled by three main colours code: grey, blue and green (Dawood et al., 2020). The grey is considered the most polluting when produced from fossil resources, for example through steam methane reforming of natural gas. The hydrogen is designated as blue when its produced from fossil resources but includes CCS (CO<sub>2</sub> capture system), and green when produced from renewable resources such as biomass gasification or wind-powered electrolysis (Dawood et al., 2020; Navas-Anguita et al., 2021). Water electrolysis is one way where combining solar and geothermal energies can expand the means of green hydrogen production (Kovač et al., 2021). The growing interest toward using H<sub>2</sub> as an alternative for fossil fuels involved the increase of its production. Thus, large storage capacity solutions are needed to support production. Used for their large capacities and capability to store natural gas, deep aquifers represent attractive underground storage systems. Deep aquifers are well known to harbor underground ecosystems with much diversified microbial metabolisms (C. Magnabosco et al., 2018). Hydrogen is an important energy donor for many microorganisms developed in such rich ecosystems as underground gas storage (UGS) aquifers. In fact, metabolisms known as SLiMEs (Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystems) are based on hydrogen and carbon dioxide as energy and carbon sources respectively (Stevens and McKinley, 1995). Hydrogen can become the primary energy source for microbial life. Thus, microorganisms might compete for their energy source. Sulfate-reducing bacteria is often developed in deep aquifers and responsible for hydrocarbon biodegradation in such ecosystems (Aüillo et al., 2016; Bombach et al., 2010; Ranchou-Peyruse et al., 2017). The abundance of sulfate in the water formation is a necessity for sulfate-reducers to be active. Consequently, when sulfate becomes rare sulfate-reduction will automatically stop. Methanogenic archaea are the first competitors to come after the sulfate-reduction (Kotelnikova and Pedersen, 1997; Shimizu et al., 2007). Methanogens are also found in the subsurface (Kotelnikova and Pedersen, 1997; Park et al., 2006; Ranchou-Peyruse et al., 2019) and compete for hydrogen and carbon dioxide to produce methane (D'Hondt, 2002; Kimura et al., 2010; Nazina et al., 2013; Smigfih and Greksfik, 1990).

In order to understand the effect of hydrogen injection on such diversified ecosystems, a multidisciplinary study is conducted to get the needed answers. Aquifers are reproduced in a reactor. Water formation is sampled from the aquifer and used as the aqueous phase. Water samples are not filtered, which means it harbors the autochthonous microbial life developed in the studied aquifer. A sample of reservoir rock represented the solid phase. In the beginning of the experiment, the gas phase was composed of methane, 1% of carbon dioxide, 7.95 ppm of benzene and 3.75 ppm of toluene representing the current stored natural gas in the aquifer. The pressure and the temperature were 85 bar and 47 °C. Hydrogen was injected after 21 days with a proportion of 10 % from the total pressure of 95 bar, at the same temperature of 47 °C. Samples of the aqueous and the gas phases were taken throughout the experiment for analyses and microbial studies. The solid phase was analyzed before and after the experiment. Therefore, results were correlated to identify interactions between liquid, solid gas phases and the microbial ecosystems.

#### IV- Materials and methods

##### IV.1- Site description and water formation characteristics.

The studied reservoir is an aquifer from the Paris basin (989 m depth). The formation water was sampled from the closest well to the gas bubble. Thus, the liquid sample was exposed for gases interactions in the underground. The selected well has already been identified in a previous study with the code name Pb\_T\_1 (Ranchou-Peyruse et al., 2019). The sampling was accomplished from the well under pressure with a downhole sampler (1.088 L), equipped with a PDS Sampler (Leutert Bottom Hole Positive Displacement Sampler) and from the wellhead (Kampman et al., 2014). Formation water was stored in sealed bottle at 4 °C until use. Its composition as well as physicochemical characteristics (CARSO Laboratory, Lyon, France) are presented in Table 21. In anoxic conditions, a volume of 0.612 L of water sampled from the wellhead were filter-sterilized at 0.1 µm (PES 47 mm membranes, 0.1 µm, Sartorius) and added to underground sampled formation water. Before injection in the reactor, a volume of 0.1 L was taken from the final mixture for a microbial diversity study. The volume of 1.46 L from the rest of the final mixture was injected into the reactor.

The solid phase is a mix of rock cuttings recovered from two drillings carried out near the aquifer. The reservoir rock is known to contain sandstone with clays and calcite, with a porosity of around 20 % (Ranchou-Peyruse et al., 2019).

#### IV.2- High-pressure reactor

The experimental apparatus used was described in a previous study (Haddad et al., submitted). At the beginning of the experiment, the gas phase was composed of methane, 1 % of carbon dioxide, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene. The initial pressure was 86 bar. At day 21, the hydrogen injection occurred with a fraction of 10 % of the gas phase (CAS: 1333-74-0, purity > 99.999 %), the total pressure becoming 95 bar. The experiment's temperature is 47 °C.

#### IV.3- Physico-chemical analyses

The Dionex Integriion HPIC ionic chromatography (ThermoFisher Scientific) is used to analyze the liquid phase throughout the experiment, as previously described (Haddad et al., submitted). Chloride, sulfate, acetate, formate, sulfide, sodium, potassium, magnesium and calcium were monitored throughout the experimentation. The given values correspond to analyses performed in triplicate with a measurement uncertainty of 5 %.

In order to observe the variations in the gas phase, an in line gas chromatography with a micro-thermal conductivity detector (GC- $\mu$ TCD; Micro GC Fusion; Chemlys; France) are used according to the specifications detailed previously (Haddad et al., submitted). The measurements are performed in triplicate and the measurement uncertainty is 5 %. Based on the measured molar composition of the gas phase and the non-ideal gas law, the quantity of each component is calculated. The compressibility factor of the gas mixture is calculated *via* PHREEQC using phreeqc.dat as database and is considered 0.9.

#### IV.4- Treatment of the solid phase

Before use, the reservoir rock is rinsed with isopropanol and water successively to eliminate potential hydrocarbons and drilling salts. Afterwards, it is dried overnight in the oven at 90 °C. For X-ray tomography, capillaries filled with the reservoir rock samples are used. The solid phase along with the capillaries are then deposited in the basket and placed inside the high-pressure reactor. Subsequently, 60 mL of demineralized water are poured in the reactor. The reactor is then closed and flushed with N<sub>2</sub> gas to remove oxygen particles. The autoclave containing the solid phase is sterilized by heating it to 100 °C during 24 h. Once cooled down to the desired temperature, the water phase containing the autochthonous microorganisms is injected.



The experiment lasted 86 days. At the end, the remaining aqueous phase is recovered under anoxic and sterilized conditions and stored at 4 °C. The gas phase is evacuated and the reactor is flushed with filtered N<sub>2</sub> gas (Classic Filters, Rochester England, 0.3 µm filter). Afterwards, the basket containing the solid phase is quickly and carefully removed from the reactor, placed in a sealed anaerobic jar. The jar contains anaerobiosis generator and indicator pockets (Dutscher Ref 0260001) before being transported to an anaerobic glove box.

#### IV.5- Thermodynamic modelling

PHREEQC software (Parkhurst and Appelo, 1999) was used to calculate the thermodynamic equilibrium during the experiment. The solubility of each gaseous compound was estimated. 'Phreeqc.dat' database was selected to obtain the calculations. It is based on the extended Debye-Hückel law for activity coefficients calculations and the Redlich-type equation of state for the non-ideal gas phase. By knowing the theoretical quantity of gas dissolved in the aqueous phase, the quantity of gas consumed by chemical reactions or microbial metabolisms can be estimated.

#### IV.6- Nucleic acids extraction and RNA retro-transcription

In order to co-extract the nucleic acids, water samples were collected at different times of the experiment. The 47mm PES membrane filters of 0.1 µm porosity (by Sartorius Stedim) were used to filter the samples. Filters were then stored at -80 °C to protect the RNA. Afterwards, they were crushed in liquid nitrogen and the Fast RNA Prosoil Direct kit (MP BIO) was used to collect the nucleic acids. To separate the DNA from the RNS, All Prep RNA/DNA (Qiagen) kit was utilized. Extracted DNA were quantified using the Quant-it™ dsDNA HS (Invitrogen) kit and the extracted RNA using the Quant-it™ RiboGreen (Invitrogen) kit. DNA and RNA were then measured *via* BioTEK SYNERGY HTX microplate reader. The retro transcriptase M-MLV (Invitrogen™) was applied to obtain reverse transcription of the RNA.

#### IV.7- Polymerase chain reaction and sequencing

The V4-V5 region of the 16S rRNA gene of the genomic DNA and cDNA were sequenced. The sequencing of the V4-V5 region of the 16S rRNA was applied because it is present in both bacterial and Archean genomes. In order to reduce the inhibition of iron present in DNA extracts, BSA (Bovine Serum Albumin, supplied by NEB-B9200S) at 1 mg/mL was added to the samples (Fukuzawa et al., 2005). The Taq PCR Core Kit (Roche) and the 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) were used. The PCR primer pairs (515F-928R) that were used contained GTGYCAGCMGCCGCGGTA (forward) and

CCCCGYCAATTCMTTTRAGT (reverse) adapters (Wang and Qian, 2009). Afterwards, high-throughput sequencing conducted by the GenoToul genomics platform (Toulouse, France), using Illumina's MiSeq 2x250bp technology in accordance with the manufacturer's instructions was undergone. Sequencing data obtained were analyzed *via* FROGS analysis pipeline (GenoToul genomics platform in the Galaxy interface (Escudié et al., 2018)).

#### IV.8- Quantitative PCR

As a mean to quantify the 16S rRNA gene copies present in each sample during the incubation at high pressure (from DNA and cDNA), Quantitative PCR (qPCR; Biorad CFX Connect) *via* Takyon NO ROX SYBR 2X MasterMix blue dTTP (Eurogentec) was used.

The primers used were 515F and 928R (400nM of each; (Wang and Qian, 2009)), DSR 2060F and DSR 4R (300nM of each; (Geets et al., 2006; Wagner et al., 1998)), mlas and mcrA-rev (400nM of each; (Steinberg and Regan, 2009, 2008)) for the ARNr16S, dsrB and mcrA genes respectively. All reactions were in 20µL final reaction volume, in accordance with the supplier's instructions. The number of copies was calculated from a standard with serially 10-fold diluted pCRTM 2.1-TOPO plasmid (TOPO TA cloning kit, Invitrogen).

For the ARNr16S quantification, reactions were denatured at 95°C/3min followed by 40 cycles of 95°C/10sec, 65°C/20sec and 72°C/20sec. For the dsrB quantification, reactions were denatured at 95°C/3min followed by 7 cycles of 95°C/10sec, touchdown 60°C à 54°C//20sec (1°C de moins par cycle and 72°C/20sec suivi de 40 cycles of 95°C/10sec, 54°C/20sec and 72°C/20sec. For the mcrA quantification, reactions were denatured at 95°C/3min followed by 40 cycles of 95°C/10sec, 52°C/20sec and 72°C/20sec.

#### IV.9- X-Ray Tomography

In order to detect any morphological alterations occurring in the solid phase, X-ray tomography was applied. The three borosilicate capillaries used have an internal diameter of 2 mm and a height of 3 cm. To prevent the loss of the solid phase, the bottom was blocked with cotton. Each capillary was scanned by X-ray tomography before the experiment for an initial reference. Once the experiment ended, the capillaries were removed from the basket and sealed at both ends with waterproof glue and immediately scanned for the first one and stored at room temperature in anaerobic glove box for the following ones awaiting scans. To accomplish the analysis, Zeiss Xradia Versa 510 tomograph was used as previously (Haddad et al., submitted).

#### IV.10- X-Ray Diffraction

X-Ray diffraction (XRD) was applied on the reservoir rock before and after the experiment. Bruker D2 Phaser powder diffractometer with a Cu K $\alpha$  radiation source was used to identify the mineralogy of the solid phase. XRD patterns were recorded over 5° to 90° 2 $\theta$  with a 0.02° step and a 0.5 s counting time per step. After taking the basket containing the solid phase into the anaerobic glove box, samples were collected from three different depths that were 1 cm away from each other. Afterwards, the solid phases were dried up under a flow of N<sub>2</sub>. Samples were then ground and sieved into a homogenous powder at 100  $\mu$ m. once ready, the samples were taken out from the glove box and analyzed by XRD. The DIFFRAC.EVA software was used to identify the crystallized phases.

## V- Results

### V.1- Monitoring of the physico-chemical evolution during abiotic experiments

Even after the rinsing process, the reservoir rock can still contain chemical compounds coming from the drilling brines. In order to identify and to quantify those products, a preliminary experiment was conducted. It consisted of mixing 500 mL of distilled water with 50 g of the reservoir rock in a sealed 1L bottle. The bottle was flushed before use with N<sub>2</sub> gas to remove any oxygen present inside. After around 15 days, the water composition was analyzed by ionic chromatography. An increase of acetate ( $0.24 \pm 0.012$  mM), chloride ( $0.15 \pm 0.008$  mM), sulfate ( $0.5 \pm 0.025$  mM), sodium ( $0.99 \pm 0.049$  mM), calcium ( $0.12 \pm 0.006$  mM), magnesium ( $0.25 \pm 0.013$  mM) and potassium ( $0.71 \pm 0.036$  mM) was obtained, indicating the dissolution of these ions from the solid phase.

The rock sample was obtained from the studied site during drilling operations using bentonite-based drilling mud. It is also rich in barite (BaSO<sub>4</sub>) which explains the sulfate increase in water. Calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) is known to be used as a brine during drilling operations.

### V.2- Monitoring of the physico-chemical evolution in the liquid phase during biotic experiment

The experiment lasted for 87 days. During the first 20 days, the gas phase was composed of mainly methane and carbon dioxide with a total pressure of 85 bar and a temperature of 47 °C. At day 21, the hydrogen injection occurred. Thereby the total pressure went up to 95 bar with a molar fraction of 10 % H<sub>2</sub> in the gas phase. Liquid and gas were sampled throughout the experiment for analyses whereas the characteristics of the solid phase were studied before and after the experiment.

The formation water sampled from the Paris basin aquifer (989 m depth) contains the autochthonous microorganisms harbor in the storage reservoir. Liquid phase parameters (Table 21) show that it is highly reduced (Eh around -365 mV), which is not surprising for a deep aquifer formation water. The concentration of dissolved elements is not very high (31.3 mM or 1152.6 mg.L<sup>-1</sup>) and the salinity can be estimated to 5 % of seawater salinity (Banks et al., 2014). The most important anions are chloride and bicarbonate and the most important cations are sodium, potassium and calcium. The nature of the reservoir rock and the concentrations of dissolved calcium and bicarbonate indicate that those two ions result from an interaction between formation water and minerals. Compounds like barite or gypsum contained in the solid

phase could be the source of sulfate analyzed in the liquid phase. Sulfate is an important ion to observe since it is an electron donor for sulfate-reducing bacteria; microorganisms frequently identified and studied in deep storage aquifers.

The aqueous mixture prepared for the biotic experiment contained initially  $6.81 \cdot 10^{-2} \pm 3.41 \cdot 10^{-3}$  mmol of sulfate. After the injection in the reactor and interaction with the reservoir rock, the sulfate quantity increased in the aqueous phase to attain  $2.13 \pm 0.11$  mmol (Figure 22-a). At day 15, sulfate quantity started decreasing remarkably indicating that the sulfate-reduction metabolism was launched. Hydrogen injection occurred at day 21. Sulfate consumption continued till  $3.51 \cdot 10^{-2} \pm 1.75 \cdot 10^{-3}$  mmol left in the aqueous phase. In order to keep up the experiment, aqueous phase was refilled at day 52. The added 854 mL volume was composed of formation water filtered with a 0.1  $\mu$ m filter to avoid any microbial interference. The water injection induced a  $3.15 \cdot 10^{-2} \pm 1.58 \cdot 10^{-3}$  mmol increase in sulfate quantity. At day 64, sulfate was completely depleted from the aqueous phase. The total sulfate quantity consumed during the experiment was around  $2.51 \pm 1.25 \cdot 10^{-1}$  mmol.

The quantity of acetate increased in the reactor. At day 21 and after hydrogen injection, acetate hit a plateau until the injection of formation water. The injected water induced a small increase of  $2.80 \cdot 10^{-1} \pm 1.40 \cdot 10^{-2}$  mmol in acetate quantity (Figure 22-c). Afterwards, no remarkable variation in acetate was noted until the end of the experiment.

After hydrogen injection in the gas phase, surprisingly, formate appeared in the aqueous phase (Figure 22-b). Formate was not detected in the formation water used during the experiment. The production of formate continued until reaching a peak of  $12.13 \pm 6.07 \cdot 10^{-1}$  at day 71. From day 78 and until the end of the experiment, the formate quantity was stable at around  $10.58 \pm 0.53 \cdot 10^{-1}$  mmol.

Table 21: Physico-chemical parameters and compounds of the formation water sampled from the deep aquifer (Pb\_T\_1 site), analyzed at atmospheric pressure.

Physico-chemical Parameters	Value	Unit
Pressure	95	Bar
Temperature	47	°C
pH	7.9	
Redox potential	-365.6	mV
Conductivity at 25 °C	1256	µS_cm
Organic Carbon	< 1	mg.L <sup>-1</sup>
Compounds		
Chloride	7.0986	mM
Nitrate	< 0.0016	mM
Nitrite	< 0.0004	mM
Sulfate	0.1489	mM
Carbonate	0	mM
Bicarbonate	8.5082	mM
Calcium	0.2575	mM
Ferrous Iron	< 0.8953	µM
Total Iron	6.8756	µM
Magnesium	0.1399	mM
Potassium	0.2744	mM
Sodium	14.8869	mM

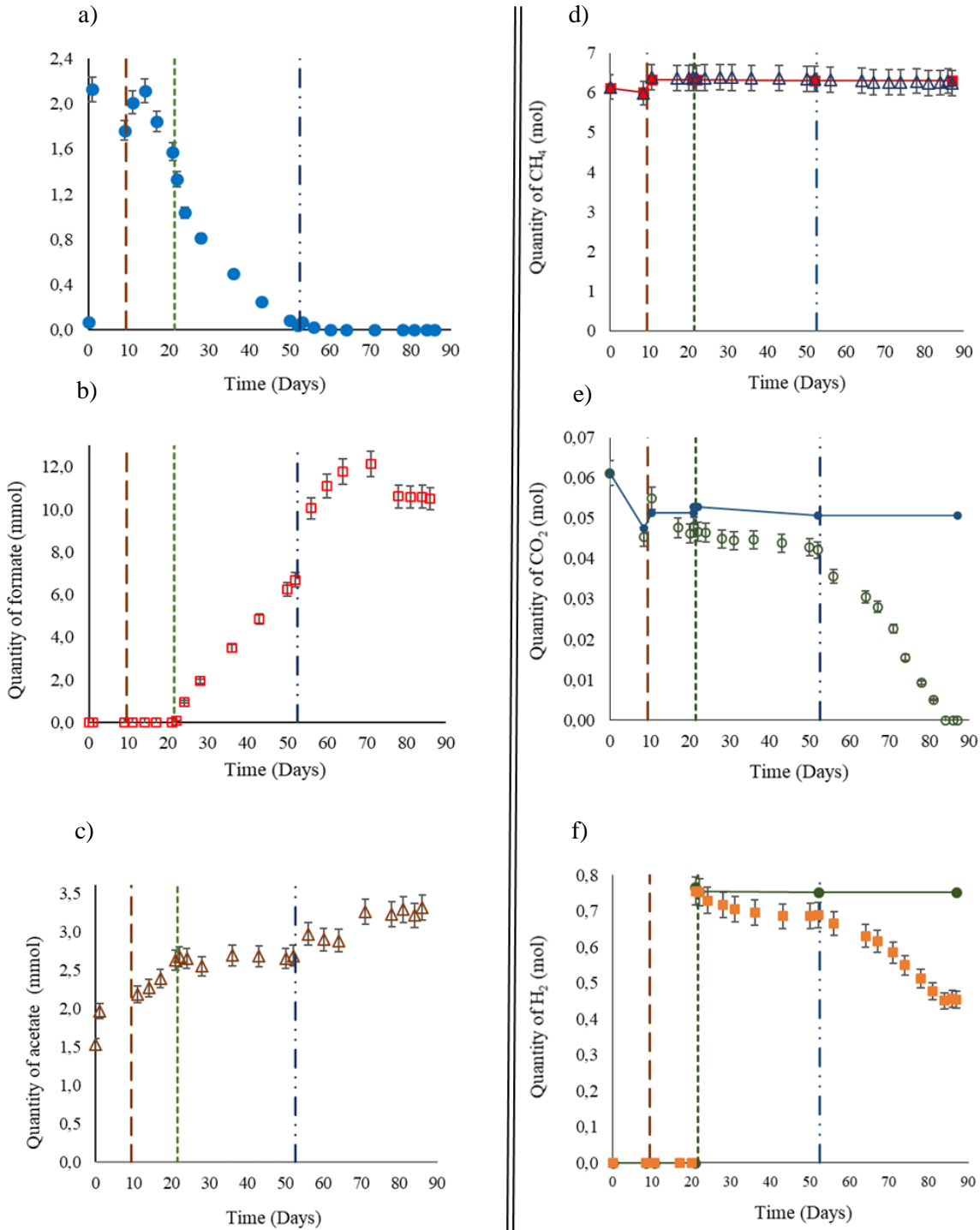


Figure 22 - Results of the liquid and gas analyses during the biotic high-pressure experiment. The vertical line at day 10 represents the CH<sub>4</sub>+CO<sub>2</sub> reinjection. The vertical dotted lines at day 21 represents hydrogen injection. The vertical line at day 52 represents the water formation injection. a) Sulfate variation in the liquid phase; b) Formate variation in the liquid phase; c) Acetate variation in the liquid phase. d) Methane variation in the gas phase. The red squares and line represent the calculated values; e) Carbon dioxide variation in the gas phase. The blue dots and line represent the calculated values. f) Hydrogen variation in the gas phase. The green dots and line represent the calculated values.

As observed during the abiotic experiment, calcium increased in the aqueous phase due to solid-liquid interactions. Calcium quantity attained  $3.15 \pm 1.57 \cdot 10^{-1}$  mmol at day 21. After the water injection at day 52, calcium increased to around  $4.55 \pm 2.28 \cdot 10^{-1}$  mmol and did not afterwards.

### V.3- Monitoring of the physico-chemical evolution in the gas phase during biotic experiment

The gas phase is mainly composed of methane. Initially, 85.8 bar  $\pm$  0.8 bar of CH<sub>4</sub> + 1% CO<sub>2</sub> were injected in the reactor at a temperature of 47 °C. In order to determine the quantity of gaseous moles, the ideal gas law adjusted with the compressibility factor is used. The total pressure is measured by the barometer and the gas temperature by the gas temperature sensor. The volume of the gas phase is calculated based on the total volume of the reactor, minus the volume of the piston, the solid basket and the volume of water remaining in the reactor. The gas phase composition is given by the  $\mu$ GC analysis (IV.3). PhreeqC model was used to calculate the compressibility factor of the gas mixture based on Peng-Robinson's equation. The compressibility was then considered 0.9. Thereby,  $6.14 \pm 3.07 \cdot 10^{-1}$  moles of methane were injected at the beginning of the experiment. At day 10, the quantity of  $1.53 \cdot 10^{-1} \pm 7.66 \cdot 10^{-3}$  moles of CH<sub>4</sub> were lost from the gas phase (Figure 22-d). The calculated solubility with PhreeqC with the experiment's conditions was  $7.16 \cdot 10^{-2}$  mol.Kgw<sup>-1</sup> confirming that the lost quantity of methane corresponds to the gas-liquid thermodynamic equilibrium. After stabilizing the piston's position, gas mixture was added at day 10 inducing a  $3.22 \cdot 10^{-1} \pm 1.60 \cdot 10^{-2}$  moles increase in methane quantity. No variations were observed afterwards until the injection of filtered formation water (day 52) when  $4.92 \cdot 10^{-2} \pm 2.46 \cdot 10^{-3}$  moles were lost from the gas phase due to solubility. From there on and until the end of the experiment, no remarkable changes were observed in methane quantity. Theoretical thermodynamic methane evolution calculated with PhreeqC is presented in the curve Figure 22-d.

Initially, carbon dioxide represented 1 % of the gas mixture. At the beginning of the experiment,  $6.14 \cdot 10^{-2} \pm 3.07 \cdot 10^{-3}$  moles were injected (Figure 22-e). A decrease of  $1.58 \cdot 10^{-2} \pm 7.89 \cdot 10^{-4}$  moles due to solubility was observed at day 10 similarly to methane. Following the reinjection of the gas mixture CH<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>,  $3.25 \cdot 10^{-3} \pm 1.63 \cdot 10^{-4}$  moles of carbon dioxide were added. The variations calculated with PhreeqC showed that the thermodynamic equilibrium was reached and established before day 17. Before the hydrogen injection, the remaining quantity of CO<sub>2</sub> was less than expected. Even after hydrogen injection, the quantity of CO<sub>2</sub> continued



decreasing. However, from day 53 until the depletion of CO<sub>2</sub> from the gas phase, the rate of CO<sub>2</sub> consumption was higher than the one between days 10 to 52. At day 84, the carbon dioxide was completely depleted from the gas phase suggesting a microbial consumption.

The hydrogen injection occurred at day 21. A quantity of  $7.66 \cdot 10^{-1} \pm 3.83 \cdot 10^{-2}$  moles were injected and the total pressure of the system became  $95.2 \pm 9.5 \cdot 10^{-1}$  bar. Hydrogen is poorly soluble ( $7.38 \cdot 10^{-3}$  mol.Kgw<sup>-1</sup> via PhreeqC). At the day 52, hydrogen quantity remaining in the gas phase was  $6.89 \cdot 10^{-1} \pm 3.45 \cdot 10^{-2}$  moles. The variations between the calculated and the measured values suggested a hydrogen consumption. Decrease in hydrogen continued after the water formation injection. However, similarly to what was observed with the carbon dioxide consumption between day 53 to 84, the rate of H<sub>2</sub> decrease was obviously greater than the one before day 52. From day 84 and until the end of the experiment, hydrogen consumption completely stopped and hydrogen quantity was stable at  $4.54 \cdot 10^{-1} \pm 2.27 \cdot 10^{-2}$  moles (Figure 22-f).

#### V.4- Evolution of the bacterial community during the experiment

One of the main knowledge needed to understand the effect of hydrogen storage on aquifers is to study its effect on microbial life. The formation water containing the autochthonous microorganisms was sampled using two down hole sterile samplers to ensure the non-contamination of the microbial flora by biofilms located in the well and at the well head. The microorganisms were stored at 30 °C, a lower temperature than on site to slow down microbial activities, under anoxic conditions until use in the reactor. Throughout the experiment, after extraction of nucleic acids on water samples taken from the reactor, *16S rRNA*, *dsrB* and *mcrA* genes and transcripts were quantified using qPCR and qRT-PCR in order to follow the evolution and expression of total microorganisms, sulfate-reducers and methanogens (% efficiency mean of 96 % ± 8 % ; Figure 24). *dsrB* encodes for the disulfite reductase and *mcrA* encodes for the methyl coenzyme M reductase, which are enzymes characteristic of sulfate-reducers and methanogens, respectively. Total microorganisms were relatively stable during the 87 days of the experiment with values between  $6.5 \cdot 10^4 \pm 6.1 \cdot 10^3$  and  $1.7 \cdot 10^6 \pm 6.1 \cdot 10^3$  copies of 16S rRNA genes.mL<sup>-1</sup>. Their overall activity followed by quantification of 16S rRNA transcripts (cDNA) tended to be greatest during the first 56 days of incubation. Sulfate-reducers peaked at  $3.1 \cdot 10^6 \pm 4.4 \cdot 10^5$  copies of the *dsrB* gene.mL<sup>-1</sup> on day 22, the day following the injection of H<sub>2</sub>, and then decreased steadily until the concentration of  $7.9 \cdot 10^3 \pm 9.0 \cdot 10^2$  copies of the *dsrB* gene.mL<sup>-1</sup> reached at the end of incubation. The *dsrB* transcripts logically decreased with

the disappearance of the sulfate and their value was between  $5.2 \cdot 10^1 \pm 1.1 \cdot 10^1$  and  $2.8 \cdot 10^1 \pm 4.1 \cdot 10^0$  copies *dsrB* transcripts.mL<sup>-1</sup>. On the contrary from the 51<sup>st</sup> day, when the sulfate quantity was less than 0.08 mmol, the methanogenic activity increased with a peak at  $1.8 \cdot 10^4 \pm 2.8 \cdot 10^2$  copies of *mcrA* gene.mL<sup>-1</sup> transcripts before dropping after the disappearance of CO<sub>2</sub> in the gas phase of the reactor. If sulfate-reducing was a key metabolism of the microbial community at the start of the experiment, the decrease in sulfate in presence of hydrogen and CO<sub>2</sub> allowed an increase in methanogenesis with a peak of *mcrA* transcripts of  $1.8 \cdot 10^4 \pm 2.8 \cdot 10^2$  copies.mL<sup>-1</sup> on day 78.

With a temperature of 47 °C, several families described to harbor thermophilic members were present throughout incubation such as *Thermodesulfovibrionaceae*, *Thermicanaceae*, *Methanothermobacteriaceae*, *Desulfotomaculaceae* and *Thermacetogeniaceae* (Figure 23). During the first days of incubation simulating the current storage conditions with a gas phase composed of CH<sub>4</sub> + 1% CO<sub>2</sub> at 85 bar, the microbial community was largely dominated by the *Spirochaetaceae* family which, under these conditions, most certainly functioned *via* the fermentation of organic molecules trapped in rock or from necromass. Sulfate-reducers, dominated by the *Desulfurisporaceae* and *Thermodesulfovibrionaceae* families, were less numerous at the start of incubation. Nevertheless, the monitoring of the concentration of *16S rRNA* and *dsrB* transcripts demonstrated their high activity that naturally preceded the increase in their growth and their increasingly important part in the community (Figure 23 and Figure 24). After the injection of 10 % of H<sub>2</sub> into the gas phase at a total pressure of 95 bar and with sulfate quantities between 1.33 and 0.08 mmol, the *Thermodesulfovibrionaceae* family continued to develop and be very active with up to 55 % of the relative diversity on day 51 and 83 % of the relative active diversity. The phylum Acidobacteria was maintained until the 78<sup>th</sup> day of incubation with an increase in its transcripts from the injection of H<sub>2</sub> and the onset of formate production. A water sample taken from the reactor on day 56 was used to isolate, in deep agar after serial dilutions, a bacterial strain belonging to the Acidobacteria phylum and producing formate in the presence of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. When CO<sub>2</sub> started to become limiting, formate production slowed down, eventually stopping when CO<sub>2</sub> was no longer detectable while *Methanothermobacteriaceae* continued to be active. When the sulfate was less than 0.08 mmol, the members of *Desulfotomaculaceae* family went from 2 % to 20 % of the community and those of *Desulfitibacteraceae* from 2.5 % to 19 %. At the same time, the *Methanothermobacteriaceae* family became more and more important until it represented about half of the microbial community between the 56<sup>th</sup> and the 78<sup>th</sup> day of incubation. With the

disappearance of sulfate on the 65<sup>th</sup> day, the activity of *Thermodesulfovibrionaceae*, *Desulfotomaculaceae*, *Desulfotibacteraceae* decreased for the benefit of families known as chemo-organotrophic such as *Caldicoprobacteraceae*, *Lentimicrobiaceae*, *Eubacteriaceae* or *Hungateiclostridiaceae*.

Analyses of the microbial community's diversity were also carried out at three depths of the basket containing the rock at the end of the experiment after the opening of the reactor: at the bottom of the basket always immersed in the liquid phase; at the middle at the gas-liquid interface and at the top of the basket where the solid was in contact with the gas phase (Figure 25). There is a clear dominance of *Methanothermobacteriaceae* at the three depths but even more in the solid at the top and the middle of the basket. The major families in the liquid phase at the end of the incubation (Figure 23) were found to be the same in the solid phase: *Methanothermobacteriaceae*, *Thermodesulfovibrionaceae*, *Spirochaetaceae*, *Hungateiclostridiaceae*, *Desulfotomaculaceae* and *Caldicoprobacteraceae*.

#### V.5- Evolution of the solid phase during the experiment

Capillaries filled with the reservoir rock and positioned in the solid basket were scanned by X-ray tomography before and after the experiment. Decrease in porosity was observed on both analyzed samples. Along with changes in porosity, a deposit formation was observed after the experiment between the rock particles. On each capillary, two zones were targeted: the middle (1.5 cm from the top of the 3 cm capillary) and the bottom (2.3 cm from the top) which is always in touch with the aqueous phase. Both zones presented similar decrease in porosity. However, the fraction of new deposit was much larger in the middle of the capillaries (average of 6.6 %) than in the bottom (average of 3.9 %). Note that black particles were observed in the solid phase once the basket was transported to the anaerobic glove box.

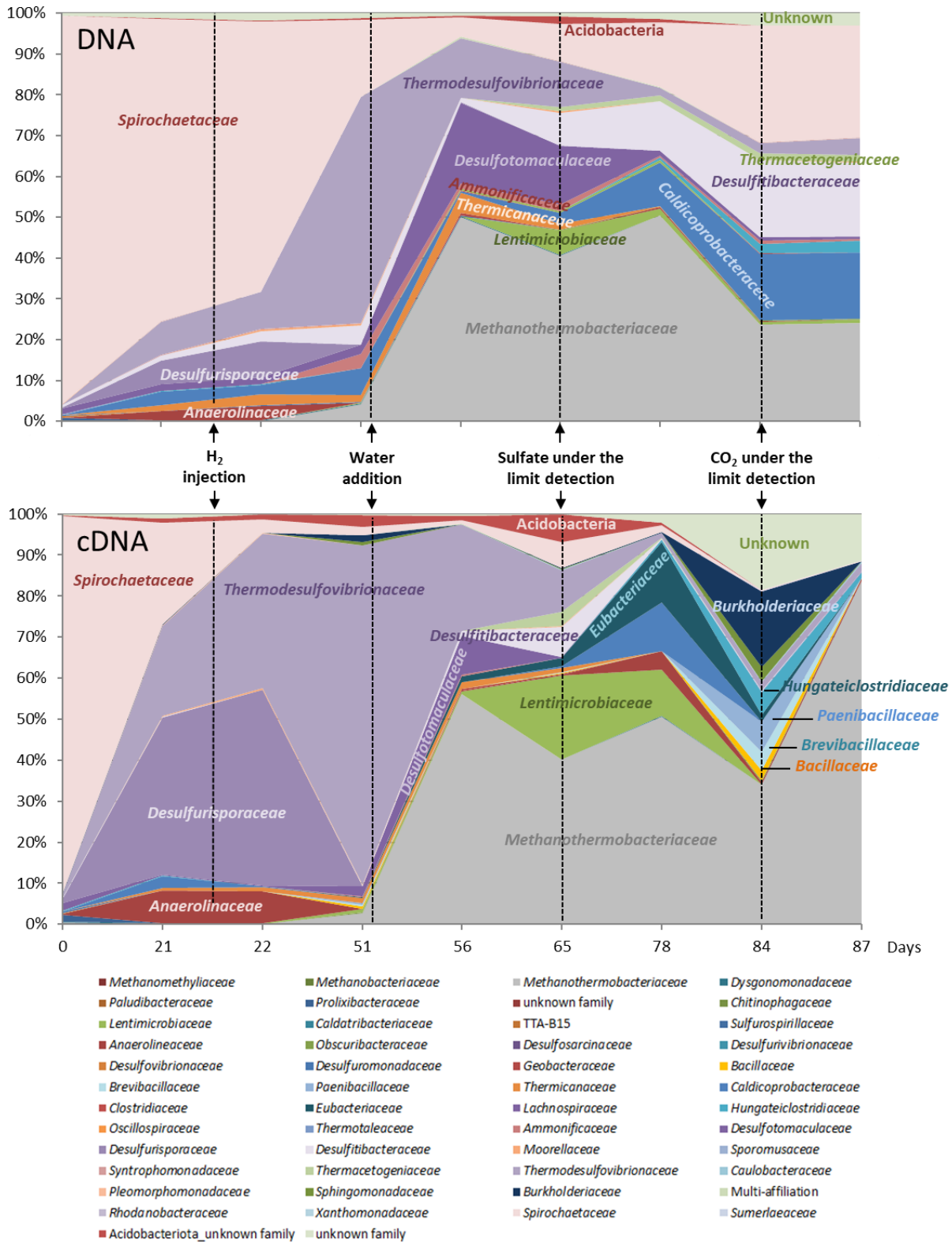


Figure 23 – Evolution of the microbial community during the incubation at 47 °C, at 85 bar (CH<sub>4</sub>, 1% CO<sub>2</sub>, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene) before and after hydrogen injection (95 bar with 10 % H<sub>2</sub>). The taxonomic diversity is monitored by 16S rRNA genes sequencing performed on aqueous phase sampled from the reactor throughout the experiment.

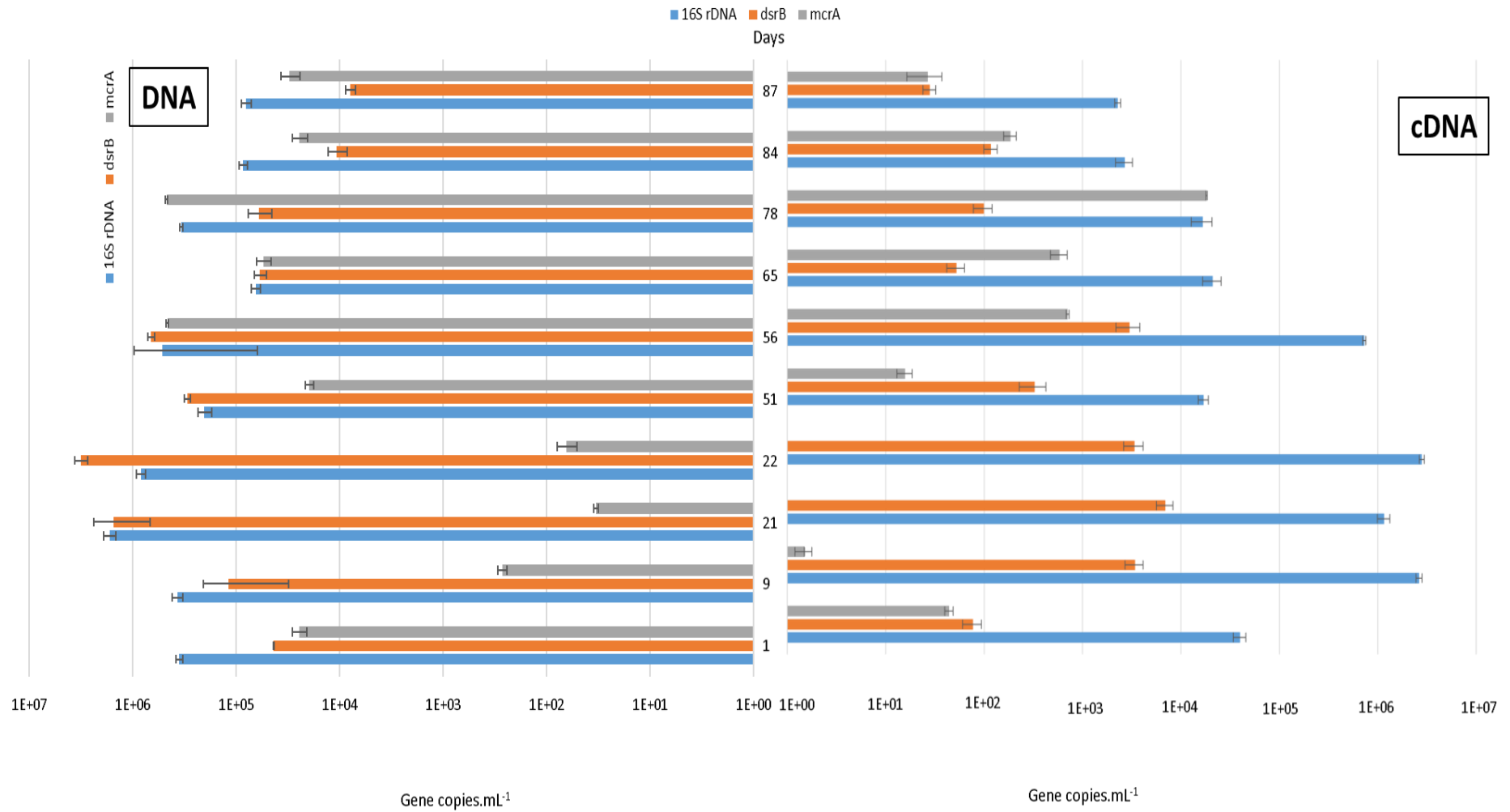


Figure 24 – Quantitative evolution of the microbial community during the incubation at 47 °C, at 85 bar (CH<sub>4</sub>, 1% CO<sub>2</sub>, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene) before and after hydrogen injection (95 bar with 10 % H<sub>2</sub>). The quantification is estimated by qPCR of 16S rDNA gene copies for each mL of sampled water through the experiment.

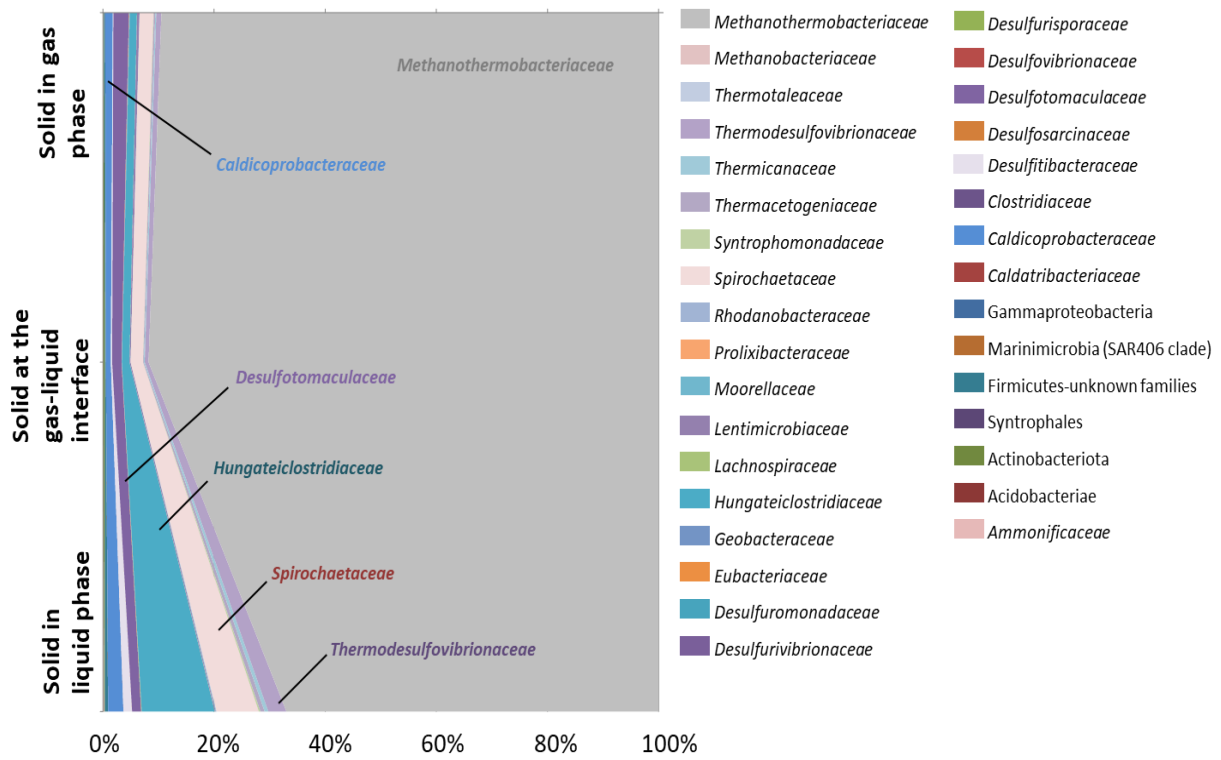


Figure 25 –Microbial community after the incubation at 47 °C, at 85 bar (CH<sub>4</sub>, 1% CO<sub>2</sub>, 7.95 ppm of benzene and 3.57 ppm of toluene) followed by hydrogen injection (95 bar with 10 % H<sub>2</sub>). The taxonomic diversity is monitored by 16S rRNA genes sequencing performed on different heights of the solid phase at the end of the experiment.

## VI- Discussion

To decrease green gas emissions, dihydrogen (H<sub>2</sub>) is a credible alternative for fossil fuels. In fact, H<sub>2</sub> is a multi-use energy vector and can make a difference in the energy transition scenario (Barreto et al., 2003; Johnston et al., 2005). But to play this key role in the future energy mix, large-scale H<sub>2</sub> storage in geological reservoirs such as salt caves, depleted hydrocarbons reservoirs and deep aquifers will be necessary (Elberry et al., 2021; RAG, 2017). While waiting to produce enough H<sub>2</sub> to be stored pure in these reservoirs, the European objective is to inject 10% of H<sub>2</sub> inside the natural gas network (Trouvé et al., 2019). In such context, H<sub>2</sub> mixed with natural gas or biomethane makes H<sub>2</sub> transport and storage more cost-effective and environmentally friendly (Kovač et al., 2021). Nevertheless, the interconnection of surface gas networks with geological storage means that a massive arrival of H<sub>2</sub> is to be expected in the deep aquifers, which are home to an indigenous microbial community capable of using this molecule and consequences remain unknown.

H<sub>2</sub> is considered as an energy source and an electron donor for many of those prokaryotic microorganisms (Hagemann et al., 2016; Panfilov, 2010; Reitenbach et al., 2015; Strobel et al., 2020; Tarkowski, 2019). Moreover, many studies highlighted the existence of microbial communities based on the consumption of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in such deep environments. Those communities are known by the term SLiMEs (Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystems) created by Stevens and McKinley (1995). Understanding the effect of H<sub>2</sub> injection on these ecosystems is an inevitable step toward an effective energetic transition.

In this study, the injection of 10 % hydrogen with a methane – 1 % carbon dioxide gas phase in a Parisian aquifer was tested. The analyses applied on the reservoir rock showed a disappearance of calcite at the end of the incubation. The well Pb\_T\_1 selected for sampling is the closest to the natural gas bubble (Ranchou-Peyruse et al., 2019), maximizing the interactions between water formation and the stored gas. The aqueous phase had a low salinity, estimated to 5 % of seawater salinity. Results from the abiotic experiment showed the dissolution of different ions from the solid phase. In fact, high concentrations of calcium and sodium found in Pb\_T\_1 could be related to solid-liquid interactions from the deep aquifer. Calcium and chloride could be due to brines used during drilling operations. Sulfate ions detected during the abiotic experiment could originate from barite detected in the rock cuttings (Storengy, industrial operator, personal communication).

### VI.1- Physicochemical and bacterial evolution before hydrogen injection

The first phase of the experiment was to reproduce studied aquifer conditions. Once the solid and aqueous phases were placed in the reactor, the gas phase injected was composed of CH<sub>4</sub> with 1 % CO<sub>2</sub> and small quantities of benzene and toluene in order to reproduce the natural gas storage. For the first 10 days, the solid basket was completely immersed in the aqueous phase to colonize it with microorganisms and reproduce the aquifer. After this period, the water phase level was lowered using the piston in order to get 1 cm of the solid immersed. Modeling *via* PhreeqC showed that after the reinjection of CH<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>, the thermodynamic equilibrium was established at day 17 (Figure 22- d,e,f). At day 21 and before H<sub>2</sub> injection (Figure 22 -e), the measured quantity of CO<sub>2</sub> that disappeared from the gas phase was higher from the one theoretically calculated. Thus, results suggest an additional consumption of CO<sub>2</sub> that might be due to microbial activities. Under a pressure of 85 bar and a temperature of 47 °C, microorganisms were able to develop and be active. The demonstrated activity of bacteria belonging to the *Spirochaetaceae* and *Anaerolinaceae* families (Figure 23) indicate a fermentation activity probably generating limited quantities of H<sub>2</sub> (Dong et al., 2018) that can be immediately consumed in litho-autotrophy by bacteria such as those belonging to the *Thermodesulfovibrionaceae* family, for example (Haouari et al., 2008). The sulfate-reduction was clear in the aqueous phase with the decrease of sulfate and the presence of active sulfate-reducers such as members of the families *Thermodesulfovibrionaceae* and *Desulfurisporaceae*. Acetate was observed to increase until 3.31 mmol during the experiment. This presence of acetate could be explained by the microbial fermentative and sulfate-reducing activities, with regard to incomplete oxidizers (Frank et al., 2016). This accumulation seems to argue in favor of the absence of acetoclastic microorganisms in the community.

### VI.2- Physicochemical and bacterial evolution after hydrogen injection before sulfate depletion

H<sub>2</sub> was injected in the gas phase at day 21. Sulfate consumption continued even after H<sub>2</sub> injection until the complete sulfate depletion at day 60. Meantime in the gas phase CO<sub>2</sub> presented a small decrease along with a small decrease in H<sub>2</sub> quantity. Thermodynamic simulations of gas-liquid equilibrium showed that the H<sub>2</sub> decrease was not due to thermodynamic equilibrium since this latter was established 3 days after the injection (Figure 22-f). Surprisingly, formate quantities appeared in the liquid phase after H<sub>2</sub> injection. Formate production kept on during all the period between day 21 and day 60 and was related to the members of the phylum Acidobacteria with the isolation of the strain RHS6 characterized as a



formate producer. This strain is closely related to an environmental sequence retrieved in subsurface lithoautotrophic ecosystems (KM410334;(Hamilton et al., 2015)). The phylum Acidobacteria is abundant and ubiquitous and its members are found in particular in aquifers (Eichorst et al., 2018) Despite their wide distribution, they are little considered, due to their study difficulties linked to their difficulties in cultivation on conventional media (Kalam et al., 2020). Thus, only 56 cultivable species have been described among 6500 identified taxa. This is in part due to their oligotrophic nature which serves them up when rich growing media favor other microorganisms. Acidobacteria group together (homo)-acetogens (Drake et al., 2006; Liesack et al., 1994), and are described as versatile heterotrophs (Eichorst et al., 2018). Although energetically disadvantaged face to hydrogenotrophic methanogens, especially at low H<sub>2</sub> concentrations, (homo)-acetogens have the kinetic advantage under certain physicochemical conditions (Conrad et al., 1989). In chemolithotrophic homoacetogenic bacteria in the presence of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>, the production of formate is normally only transient in their energy metabolism but can sometimes be generated as a terminal product by certain microorganisms (Peters et al., 1999). Although this part of the work was never published, a formate production had also been highlighted in Márton Berta's PhD Thesis during the simulation of subsurface hydrogen storage (Berta, 2017). In the reactor situation, the sulfate-reducing micro-organisms were able to inhibit the methanogens via the sulfides emitted in particular, making the conditions more favorable for the development of acetogens in a context where neither H<sub>2</sub> nor CO<sub>2</sub> were yet limiting. In addition, although aquifers are not acidic, the formation of biofilms can allow local acidification (Jia et al., 2019), making the development of Acidobacteria favorable.

### VI.3- Physicochemical and bacterial evolution after hydrogen injection and sulfate depletion

At day 60, sulfate was completely consumed by sulfate-reducing bacteria. Even after the sulfate depletion from the aqueous phase, formate production kept on. In the gas phase, results presented decrease in carbon dioxide and hydrogen quantities. However, rates of consumption of these two gases were more important than the consumption rates in the previous periods. H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> fast consumptions suggested an autotrophic growth. Such metabolisms were hypothesized to maintain deep underground ecosystems as SLiMEs. Methanogenic archaea were detected in the microbial diversity studies. Methanogens activity was remarkably high after sulfate was below 0.08 mmol. However, no methane production was revealed because of the high concentration of methane in the gas phase (90 % methane, 95 bar). In fact, if the carbon dioxide quantity was transformed into methane from day 56, the produced CH<sub>4</sub> would be equal to  $3.57 \cdot 10^{-2} \pm 1.78 \cdot 10^{-3}$  moles. Considering the quantity of CH<sub>4</sub> at that time ( $6.33 \pm$

$3.17 \cdot 10^{-1}$  moles), produced CH<sub>4</sub> due to methanogenic archaea was too weak to be detected. Nevertheless, the activity of methanogens could be clearly demonstrated via the quantification of *mcrA* transcripts by RTqPCR, and the sequencing of cDNAs from *16S rRNA* transcripts (Figure 23 and Figure 24 ). Methanogens metabolism continued until the complete depletion of CO<sub>2</sub> from the gas phase at day 84.

#### VI.4- Physicochemical and bacterial evolution after hydrogen injection, sulfate and carbon dioxide depletion

During the last few days, the gas phase was composed of CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>. H<sub>2</sub> consumption and formate production observed after the H<sub>2</sub> injection until day 84 stopped with the disappearance of CO<sub>2</sub> from the gas phase. Thus, this observation confirmed the relation between H<sub>2</sub>, formate and CO<sub>2</sub>. The analysis of the composition of the mineral phase by XRD at the end of incubation showed a decrease in the quantity of calcite (CaCO<sub>3</sub>) in the reservoir rock. The increase of calcium observed in the aqueous phase could be correlated with those mineralogical results. Indeed, it is obvious that the CO<sub>2</sub>, carbonates/bicarbonates and calcite were in equilibrium in the reactor and that the disappearance of CO<sub>2</sub> via the various autotrophic metabolisms (sulfate-reduction, (homo)-acetogenesis and methanogenesis) coupled with hydrogenotrophy participated in the disappearance of these minerals.

Once the experiment ended and the solid basket was removed from the reactor, the solid phase was analyzed by X-ray tomography and XRD. X-ray tomography results showed decrease in porosity along with the formation of new deposits between the reservoir rock particles. Comparing the fraction of new deposit in the middle and in the bottom of the capillaries, the fraction is higher in the former case. In fact, the bottom of the capillary was always immersed in the aqueous phase. After each liquid sampling, the piston was elevated to immerse 1 cm of the capillary. Liquid movement might have influenced the formation of deposits and made it unstable in the bottom of the capillaries. However, this formation of deposits due to fine particles does not explain the majority of the loss of porosity between -5.5 and -8.6 %. It is to be assumed that biomineralization processes may have participated in this reduction in porosity *via*, for example, the production of iron sulfide. Some of the microorganisms are supposed to be able to maintain themselves in the rock bathed in the gas phase, taking into account the humidity of the latter and the residual formation water supposed to be trapped in a part of the porosity of the rock as in the actual conditions of the aquifer studied. Thus, at the end of the experiment, a microbial community dominated by *Methanothermobacteriaceae* was highlighted. These hydrogenotrophic methanogenic archaea

present in the residual water were thus found as close as possible to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>, the former serving as carbon and electron acceptor sources and the latter as an energy and electron donor sources. It may be hypothesized this volume of water supposedly reduced can be quickly depleted in sulfate and other molecules which were detrimental to other functional groups such as sulfate-reducing microorganisms or fermenters.

## VII- Conclusion

In this study, the UGS aquifer Pb\_T\_1 situated in the Paris region was simulated in a High Pressure reactor. Effects of 10 % H<sub>2</sub> stored with methane are studied through the identification of interactions between reservoir rock, water formation, autochthonous microbial life and the new gas mixture. Even though the DRX analyses shown a disappearance of calcite from the solid because of a probably dissolution in the aqueous phase, the solid matrix presented a decrease in porosity due to formation of a deposit hypothesized as clays. In less than 90 days of experience simulating a current storage of natural gas, nearly 40 % of the injected H<sub>2</sub> has disappeared into sulfide compounds, formate and methane and solubility into the aqueous phase. This disappearance of H<sub>2</sub> has slowed down considerably with the disappearance of the original 1 % of CO<sub>2</sub> and a large part of the calcite present in the rock. It is likely that on a smaller scale, H<sub>2</sub> continues to be consumed by hydrogenotrophic microorganisms associated with consumption of CO<sub>2</sub> produced by degradation of organic matter by heterotrophic microorganisms. In order to model the evolution of future storage in deep aquifers housing life, and perhaps in saline cavities with potential microorganisms in the residual brines, this study shows that it is essential to take into account the sulfate concentrations, the CO<sub>2</sub> and microbial activities.

In 1995, Stevens and McKinley theorized the concept of ecosystems capable of evolving unrelated to organic matter and energy from photosynthesis. These H<sub>2</sub>-based deep environmental ecosystems have been named SLiMEs for Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystems. Since then, dozens of articles have attempted to invalidate, confirm or refine this concept, sometimes with a redefinition of terminology such as True-SLiMEs and HyperSLiME (Nealson et al., 2005; Takai et al., 2006). The massive arrival of H<sub>2</sub> of anthropogenic origin in deep aquifers will be at the origin of the advent of Artificial-SLiMEs and therefore the creation of new microbial ecosystems.

---

### VIII- Conclusion du chapitre

Durant cette étude, un aquifère de stockage de gaz naturel appartenant au bassin parisien a été simulé dans un réacteur haute pression déformable. Le système triphasique (+ compartiment biologique) a été maintenu à une pression comprise entre 85 et 95 bar et 47 °C. L'évolution ionique de la phase liquide, de la composition de la phase gazeuse et de la diversité taxonomique microbienne ont été suivies tout au long de l'incubation. En début et fin d'expérience, la composition minéralogique et la porosité de la roche ont été évaluées par DRX et tomographie à rayons X.

Dès le début de l'expérience, une disparition du sulfate respiré par les sulfato-réducteurs a été mise en évidence de manière concomitante à une production d'acétate rejeté dans le milieu liquide. L'acétate a pu être produit par les micro-organismes fermentaires, ainsi que certains sulfato-réducteurs pratiquant une oxydation incomplète des molécules organiques telles que la nécromasse. A la suite de l'injection de 10%vol de H<sub>2</sub>, la sulfato-réduction s'est poursuivie favorisant probablement des sulfato-réducteurs hydrogénotrophes dont certains appartiennent à la famille des *Thermodesulfobionaceae* mais également le phylum bactérien des Acidobacteria. Une souche de ce phylum a été isolée lors de cette étude et a montré la capacité à produire du formiate à partir de CO<sub>2</sub> et de H<sub>2</sub> via une homo-acétogenèse incomplète déjà décrite auparavant dans un contexte similaire mais jamais encore publiée. Durant cette période, une baisse régulière du CO<sub>2</sub>, qui a été attribuée à une consommation par des micro-organismes autotrophes, a été constatée au niveau de la phase de gazeuse.

En présence de suffisamment de sulfate, les sulfato-réducteurs hydrogénotrophes sont les gagnants de la compétition face aux archées méthanogènes. Par contre, lorsque le sulfate a été inférieur à 0.08 mmole, l'activité des *Thermomethanobacteraceae*, des archées méthanogènes hydrogénotrophes, est devenue dominante dans la communauté microbienne et la consommation en CO<sub>2</sub> (et en H<sub>2</sub>) s'est accrue. La production de CH<sub>4</sub> n'a pas pu être confirmée par les analyses puisque les quantités produites étaient très inférieures à la quantité de méthane initiale de la phase gazeuse. Cependant, les analyses de diversité taxonomique et d'activités microbiennes de la communauté microbienne ont montré clairement le rôle clé de ces micro-organismes dans le fonctionnement de la communauté.

L'un des principaux enseignements de ce travail a été de montrer que dans des conditions de stockage géologique permettant une vie microbienne, l'H<sub>2</sub> stocké sera inévitablement consommé et transformé en composés sulfurés, formate ou CH<sub>4</sub> à moins qu'un élément tel que le CO<sub>2</sub>, par exemple, vienne à manquer. Néanmoins, il est intéressant de voir qu'à la fin de

l'incubation, et bien que le CO<sub>2</sub> soit en dessous du seuil de détection dans la phase gazeuse, une activité de méthanogenèse semble se maintenir. Il est possible que du CO<sub>2</sub> résiduel soit toujours présent dans la phase liquide *via* la solubilisation de la calcite en équilibre dans le système ou encore la fermentation de la nécromasse et des molécules organiques produites par la communauté microbienne.

En 1995, Stevens et McKinley avait théorisé le concept d'écosystèmes capables d'évoluer sans lien avec la matière organique et l'énergie issues de la photosynthèse. Ces écosystèmes d'environnement profonds basés sur l'H<sub>2</sub> ont été nommés SLiMEs pour Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystems. Depuis, des dizaines d'articles ont tenté d'invalidier, de confirmer ou d'affiner ce concept (True-SLiMEs). L'arrivée massive de H<sub>2</sub> d'origine anthropique dans les aquifères profonds, pourrait constituer les premiers exemples d'Artificial-SLiMEs et donc la création de nouveaux écosystèmes microbiens.

D'un point de vue plus appliqué, il est indéniable que l'arrivée de 10 %vol de H<sub>2</sub> dans les aquifères de stockage va entraîner de profonds changements dans les communautés microbiennes qui sont en équilibre et en interactions avec la partie abiotique de l'aquifère. Les simulations, telles que dans ce travail, sont essentielles pour estimer les interactions biogéochimiques pouvant avoir lieu ainsi que l'effet sur l'évolution du stockage (perte de volume, modification de la composition du gaz stocké, etc.). La prise en compte de ces modifications et leur modélisation à moyens termes sont des étapes clés pour garantir un stockage géologique efficace et sécurisé et ainsi permettre de réguler le réseau de gaz de demain dans le cadre de la transition énergétique, puis du futur mix énergétique renouvelable.

## *Conclusion générale et perspectives*

---



Depuis plusieurs années, les politiques de transition énergétique française et européennes tendent à favoriser le développement de filières produisant des énergies renouvelables et *a contrario* à diminuer l'utilisation des énergies fossiles. Ainsi, le biométhane et le dihydrogène ( $H_2$ ) se présentent comme des alternatives crédibles et prometteuses en tant que substituts. En effet, le biométhane permet de recycler le carbone déjà présent dans l'atmosphère *via* la transformation de la biomasse et peut permettre dans le même temps de valoriser des boues de stations d'épuration. L' $H_2$  quant à lui ne génère que de l'eau comme déchet. Cependant, des progrès doivent encore être faits sur des modes de production plus énergétiquement efficient et plus respectueux de l'environnement. Il pourrait ainsi permettre de stocker les surplus d'énergie issus du solaire ou de l'éolien (Power-to-gas), ou encore être produit à plus long terme à partir de méthane transformé en  $H_2$  et graphite *via* l'utilisation de torche plasma, par exemple. Quoiqu'il en soit, ces deux formes d'énergie peuvent être qualifiées de nouveaux gaz « verts ». Grâce aux soutiens de financements public et privé importants, ces deux filières énergétiques sont amenées à poursuivre leur croissance.

Afin de transporter et de stocker ces nouveaux gaz, ces derniers peuvent être injectés dans le réseau de gaz naturel et donc aboutir dans les stockages géologiques qui y sont interconnectés. Pour prévoir l'évolution des stockages suite à l'arrivée de ces nouveaux gaz, l'identification de leurs effets éventuels et la détermination de seuils limites de l' $O_2$  provenant du biométhane ou de l' $H_2$  dans le mélange de gaz stocké si nécessaire sont des étapes essentielles dans la transition énergétique.

Ainsi, Storengy et Téréga et plusieurs laboratoires de l'UPPA ont décidé de travailler en partenariat dans le cadre du projet RINGS. Ce projet a pour objectif de répondre à la problématique du stockage du biométhane qui peut contenir du dioxygène ( $O_2$ ) et à la problématique du stockage de l' $H_2$  dans les aquifères profonds. L'objectif de ce projet pluridisciplinaire est d'identifier les interactions pouvant avoir lieu entre les nouveaux gaz, le stockage, l'eau de formation des sites étudiés, la roche du réservoir et la vie microbienne développée *in-situ*. En effet, les réactions bio-géochimiques entre les différentes phases du réservoir peuvent induire des changements dans les caractéristiques du stockage : modification de la composition du gaz stocké, variation de la perméabilité et la porosité de la roche réservoir, influence sur la diversité taxonomique et donc l'activité des communautés microbiennes autochtones.

Au début du projet RINGS, un réacteur haute pression a été conçu spécifiquement pour reproduire les conditions physico-chimiques des aquifères profonds opérés par Storengy et



Teréga et étudier l'effet sur les 4 phases du système : gazeuse, liquide, solide et microbienne. Son volume, ses matériaux, les lignes de gaz, etc. ont été prévus pour répondre aux exigences de stérilisation et aux prélèvements récurrents nécessaires pour les nombreuses analyses physico-chimiques, chimiques et microbiologiques nécessaires sur des périodes d'expérimentation de 3 à 6 mois.

Durant le temps du doctorat, 3 scénarios d'injection ont été expérimentés : i) la simulation d'une injection de 1% de O<sub>2</sub> ; ii) la simulation d'une injection de 10% de H<sub>2</sub> ; iii) la simulation d'une injection de 100 ppm de O<sub>2</sub>. Seuls les résultats obtenus dans le cadre des deux premiers scénarios sont présentés dans ce manuscrit (Chapitres 4 et 5). La troisième expérience s'est quant à elle achevée début juillet 2021.

La première expérience a permis de reproduire les conditions de stockage d'un aquifère situé dans le sud-ouest de la France et opéré par Teréga. En un premier temps, cette expérience a confirmé notre capacité à simuler, dans un réacteur haute pression, un aquifère de stockage avec ses quatre phases : l'eau de formation, la roche du réservoir, le gaz stocké et l'écosystème microbien. La vie microbienne s'est développée dans notre dispositif expérimental à haute pression et les analyses ont permis de suivre son activité dans les conditions de l'aquifère : une pression totale de 60 bar et une température de 36 °C. Dans les conditions actuelles de stockage, le mélange gazeux est composé de méthane et de dioxyde de carbone avec des traces d'hydrocarbures représentés dans le réacteur par le benzène et le toluène. Sous ces conditions, une activité sulfato-réductrice a été observée conduisant à une disparition du sulfate dans la phase liquide ; phénomènes de diminution du sulfate similaires à ceux observés sur le site depuis le début des années 1990. Une disparition du toluène a également été montrée et associée au développement de bactéries appartenant à la famille des *Peptococcaceae* regroupant des micro-organismes sulfato-réducteurs et fermentaires déjà mis en évidence dans la dégradation des hydrocarbures mono-aromatiques dont le benzène et le toluène sur d'autres stockages en aquifères. La concentration maximale autorisée en O<sub>2</sub> dans le gaz naturel en entrée dans les stockages est actuellement de 100 ppm. Toutefois, pour cette première expérience l'injection de 1% d'O<sub>2</sub> (maximum détecté sur un point d'injection de biométhane dans le réseau) a été testé afin d'évaluer le pire scénario avec la quantité de O<sub>2</sub> la plus élevée pouvant être présente dans le biométhane.

Après l'injection de 1% de O<sub>2</sub>, l'écosystème microbien initialement anaérobie a été confronté à des conditions hyper-oxiques toxiques à la majorité des micro-organismes présents qui ont vu leurs effectifs et leur activité chuter drastiquement. La sulfato-réduction s'est arrêtée

ainsi que la biodégradation du toluène. L'apparition de sulfate a été rapprochée de la réoxydation des sulfures générés lors de la sulfato-réduction avant l'injection de O<sub>2</sub>. Néanmoins, une inattendue accumulation de H<sub>2</sub> dans la phase gazeuse en fin d'expérience a été détectée et expliquée par le maintien de bactéries fermentaires dégradant la nécromasse. Les suivis de la composition de la phase gazeuse et l'analyse de diversité suggèrent que cette production d'H<sub>2</sub> s'est produite tout au long de l'expérience mais l'H<sub>2</sub> était consommé directement par les micro-organismes hydrogénotrophes, en particulier des sulfato-réducteurs. Aucune variation remarquable au niveau de la porosité de la roche, essentiellement constituée de quartz, n'a pu être mise en évidence. Au-delà de la problématique du biométhane, les connaissances apportées par cette étude pluridisciplinaire peuvent servir dans d'autres utilisations du sous-sol incluant l'injection du dioxygène comme impureté tel que le stockage du dioxyde de carbone CCS.

La seconde expérience présentée dans ce manuscrit, visait à reproduire les conditions de stockage dans un aquifère situé dans le bassin parisien opéré par Storengy afin d'étudier l'effet de l'injection de 10% de H<sub>2</sub> dans les conditions de fond (95 bar, 47°C). Similairement aux résultats observés dans la première expérience, la sulfato-réduction a été le premier métabolisme microbien qui s'est dévoilé par la diminution des sulfates de la phase aqueuse. Après l'injection de l'H<sub>2</sub> dans la phase gazeuse, une accumulation de formiate a été observée dans la phase aqueuse. Cette production a été reliée à un métabolisme bactérien, l'homo-acétogénèse, appartenant au phylum des Acidobacteria, capable de produire du formiate à partir de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>. La sulfato-réduction, probablement par des bactéries hydrogénotrophes appartenant à la famille des *Thermodesulfobionaceae*, s'est poursuivie jusqu'à la disparition complète du sulfate. Parallèlement à ces observations, une baisse remarquable de la quantité de CO<sub>2</sub> a été constatée dans la phase gazeuse. Les sulfato-réducteurs ont cessé d'être dominants lorsque le sulfate est passé en dessous de 0.08 mmole, ce qui a permis aux archées méthanogènes hydrogénotrophes de devenir les micro-organismes clés de la communauté. Même si la production de méthane n'a pas pu être observée dans la phase gazeuse, les analyses microbiennes sur la phase liquide et sur la phase solide ont confirmé le développement de ces microorganismes. La consommation de l'hydrogène s'est poursuivie jusqu'à épuisement du CO<sub>2</sub>. En couplant les résultats physico-chimiques aux analyses microbiologiques, la modification et l'adaptation de l'écosystème microbien aux nouvelles conditions ont bien pu être montrées aboutissant à un écosystème basé sur la consommation de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub> comme sources de carbone et d'énergie, respectivement. En 1995, Stevens et McKinley ont décrit le fonctionnement de ce type d'écosystèmes dans les environnements profonds coupés de la

lumière et donc de la photosynthèse comme source d'énergie et de molécules organiques, et les ont appelés SLiMEs pour « Subsurface Lithoautotrophic Microbial Ecosystems ». L'injection de 10% de H<sub>2</sub> dans un aquifère sous 95 bar a donc induit une altération incontestable dans la communauté microbienne souterraine. Les observations obtenues grâce à la reproduction du stockage dans le réacteur ont permis de mettre en avant l'effet de l'injection de l'H<sub>2</sub> sur les écosystèmes souterrains profonds et ce qui peut être engendré sur les caractéristiques physico-chimiques du réservoir de stockage.

Ces études sont les premières réalisées sur les aquifères de stockage en France et en Europe dans le contexte de l'arrivée prochaine de ces « nouveaux » gaz. Elles ont permis de montrer que l'O<sub>2</sub> arrivant massivement, à raison d'une injection à 1 %, dans un tel stockage aurait d'importantes conséquences sur la communauté microbienne. La dernière expérience réalisée dans le cadre de ce doctorat, avec une injection de 100 ppm dans la phase gazeuse, tendrait même à montrer un effet certes amoindri sur la communauté microbienne (maintien d'une communauté) qui est très probablement différente, voire aérobie dans un écosystème n'ayant encore jamais connu de telles conditions. Si ces hypothèses se révèlent correctes, cela pourrait conduire à la nécessité d'étudier ces nouvelles communautés et leurs interactions avec le stockage sur le long terme en ce qui concerne leurs capacités de bio-atténuation des hydrocarbures solubilisés et des interactions avec l'aquifère et les installations industrielles. Dans le contexte de l'injection d'H<sub>2</sub>, d'autres sites de stockage doivent encore être étudiés. Ainsi, dès octobre 2021 et janvier 2022, deux nouveaux scénarios seront testés en présence d'H<sub>2</sub> dans les conditions de sites opérés par Storengy. Ainsi sur la base des résultats et de modélisations complémentaires, des limites seuils pourront être fixées servant de normes dans le contexte de stockages des nouveaux gaz. Déterminer les valeurs seuils à partir desquelles les sites de stockage sont peu impactés est une perspective inévitable pour la continuité de la transition énergétique.

Au cours de ce travail, le recours à la simulation thermodynamique a été indispensable afin de fixer les équilibres liquide-vapeur. La validation des modèles par des résultats expérimentaux est un point majeur. Le LaTEP possède des compétences bien avancées dans le cadre des équilibres liquide-vapeur à haute-pression ainsi que dans la mise en place d'outils d'instrumentation. Les données thermodynamiques sur les équilibres eau de formation – mélange gazeux (CH<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>) dans les conditions de stockage (pression entre 60 et 100 bar, température entre 35 et 60 °C) sont quasi-inexistantes. Pour aller plus loin, l'acquisition de données sur les équilibres liquide-gaz-solide en suivant les variations de ces trois phases permettra de cadrer les réactions géochimiques pouvant avoir lieu dans les aquifères profonds.

Le suivi de l'évolution peut être effectué par les chromatographies gazeuse et ionique et par DRX de la phase solide. La compréhension des réactions géochimiques sur d'autres phases minérales, notamment l'oxydation de la pyrite en présence du dioxygène est une information complémentaire pour étudier l'évolution des caractéristiques physico-chimiques du stockage. Toutes ces données pourront servir à alimenter des modèles du système de stockage permettant ainsi de prévoir l'effet de l'injection de ces « nouveaux » gaz à moyen et long termes. Représenter les aquifères reproduits dans le réacteur par une phase liquide, gazeuse, solide et microbienne et décrire les interactions entre elles par des équations permettrait d'offrir un modèle complet du système de stockage afin d'extrapoler les résultats observés sur d'autres sites de stockage et dans d'autres procédés de stockages, tels que le CCS dans les aquifères profonds avec le dioxygène comme impureté. Enfin, cette perspective de modéliser les résultats obtenus au cours de ce travail est envisagée et fera le sujet d'une thèse dans la continuité du projet RINGS.



*Références bibliographiques*

---



- Abu Laban, N., Selesi, D., Rattei, T., Tischler, P., Meckenstock, R.U., 2010. Identification of enzymes involved in anaerobic benzene degradation by a strictly anaerobic iron-reducing enrichment culture: Enzymes involved in anaerobic benzene degradation. *Environmental Microbiology* no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02248.x>
- Adhikari, R.R., Glombitza, C., Nickel, J.C., Anderson, C.H., Dunlea, A.G., Spivack, A.J., Murray, R.W., D'Hondt, S., Kallmeyer, J., 2016. Hydrogen Utilization Potential in Subsurface Sediments. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00008>
- AFNOR, 2016. Norme française. Infrastructures gazières, Qualité du gaz, Groupe H, NF EN 16726.
- Amend, J.P., Teske, A., 2005. Expanding frontiers in deep subsurface microbiology. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 219, 131–155. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2004.10.018>
- Amid, A., Mignard, D., Wilkinson, M., 2016. Seasonal storage of hydrogen in a depleted natural gas reservoir. *International Journal of Hydrogen Energy* 41, 5549–5558. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.02.036>
- André, L., Azaroual, M., Bernstone, C., Wittek, A., 2015. Modeling the Geochemical Impact of an Injection of  $\text{CO}_2$  and Associated Reactive Impurities ( $\text{SO}_2$  and  $\text{O}_2$ ) into a Saline Reservoir. *Transport in Porous Media* 108, 185–205. <https://doi.org/10.1007/s11242-014-0359-7>
- Angel, R., Claus, P., Conrad, R., 2012. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *The ISME Journal* 6, 847–862. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.141>
- Appelo, C.A.J., 2015. Principles, caveats and improvements in databases for calculating hydrogeochemical reactions in saline waters from 0 to 200 °C and 1 to 1000 atm. *Applied Geochemistry* 55, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.11.007>
- Aüllo, T., Berlendis, S., Lascourrèges, J.-F., Dessort, D., Duclerc, D., Saint-Laurent, S., Schraauwers, B., Mas, J., Patriarche, D., Boesinger, C., Magot, M., Ranchou-Peyruse, A., 2016. New Bio-Indicators for Long Term Natural Attenuation of Monoaromatic Compounds in Deep Terrestrial Aquifers. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00122>
- Aüllo, T., Ranchou-Peyruse, A., Ollivier, B., Magot, M., 2013. *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments. *Frontiers in Microbiology* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00362>
- Bagnoud, A., Chourey, K., Hettich, R.L., de Bruijn, I., Andersson, A.F., Leupin, O.X., Schwyn, B., Bernier-Latmani, R., 2016. Reconstructing a hydrogen-driven microbial metabolic network in Opalinus Clay rock. *Nature Communications* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12770>
- Balch, W.E., SCHOBERTH, S., TANNER, R.S., WOLFE, R.S.Y. 1977, 1977. *Acetobacterium*, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing, Carbon Dioxide-Reducing, Anaerobic Bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 27, 355–361. <https://doi.org/10.1099/00207713-27-4-355>
- Banks, D., Kadnikov, V.V., Franck, 2014. Hydrochemical data report from sampling of two deep abandoned hydrocarbon exploration wells: Byelii Yar and Parabel', Tomsk oblast', western Siberia, Russian Federation. (No. 2014.034). Geological Survey of Norway.
- Barik, D., Sah, S., Murugan, S., 2013. BIOGAS PRODUCTION AND STORAGE FOR FUELING INTERNAL COMBUSTION ENGINES 3, 10.
- Barreto, L., Makihiro, A., Riahi, K., 2003. The hydrogen economy in the 21st century: a sustainable development scenario. *International Journal of Hydrogen Energy* 18.
- Baskaran, D., Sinharoy, A., Pakshirajan, K., Rajamanickam, R., 2020. Gas-phase trichloroethylene removal by *Rhodococcus opacus* using an airlift bioreactor and its modeling by artificial neural network. *Chemosphere* 247, 125806. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125806>
- Basso, O., Lascourreges, J.-F., Le Borgne, F., Le Goff, C., Magot, M., 2009. Characterization by culture and molecular analysis of the microbial diversity of a deep subsurface gas



- storage aquifer. *Research in Microbiology* 160, 107–116.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.10.010>
- Bauer, S., 2017. *Underground Sun Storage Final Report*. Vienna.
- Bauer, S., Beyer, C., Dethlefsen, F., Dietrich, P., Duttmann, R., Ebert, M., Feeser, V., Görke, U., Köber, R., Kolditz, O., Rabbel, W., Schanz, T., Schäfer, D., Würdemann, H., Dahmke, A., 2013. Impacts of the use of the geological subsurface for energy storage: an investigation concept. *Environmental Earth Sciences* 70, 3935–3943.  
<https://doi.org/10.1007/s12665-013-2883-0>
- Beller, H., 2002. Anaerobic biotransformation of RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine) by aquifer bacteria using hydrogen as the sole electron donor. *Water Research* 36, 2533–2540. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00480-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00480-8)
- Beller, H.R., Grbic-Galic, D., Reinhard, M., 1992. Microbial Degradation of Toluene under Sulfate-Reducing Conditions and the Influence of Iron on the Process. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 8.
- Benson, B.B., Krause, D., 1980. The concentration and isotopic fractionation of gases dissolved in freshwater in equilibrium with the atmosphere. 1. Oxygen: Oxygen in freshwater. *Limnology and Oceanography* 25, 662–671. <https://doi.org/10.4319/lo.1980.25.4.0662>
- Berlendis, S., Lascourreges, J.-F., Schraauwers, B., Sivadon, P., Magot, M., 2010. Anaerobic Biodegradation of BTEX by Original Bacterial Communities from an Underground Gas Storage Aquifer. *Environmental Science & Technology* 44, 3621–3628.  
<https://doi.org/10.1021/es100123b>
- Berta, M., 2017. Experimental investigation of hydrogeochemical consequences of gas leakages into shallow aquifers.
- 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., Hinrichs, K.-U., 2006. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *PNAS* 103, 3846–3851.
- Biebl, H., Pfennig, N., 1977. Growth of sulfate-reducing bacteria with sulfur as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 112, 115–117. <https://doi.org/10.1007/BF00446664>
- Bioénergie et sécurité alimentaire, Biogaz communautaire, 2014. . BEFS.
- Biométhane en Europe: Progression à deux vitesses [WWW Document], 2019. URL <https://lenergeek.com/2019/12/26/biomethane-gaz-vert-biogaz-europe/>
- Blair, C.C., D'Hondt, S., Spivack, A.J., Kingsley, R.H., 2007. Radiolytic Hydrogen and Microbial Respiration in Subsurface Sediments. *Astrobiology* 7, 951–970.  
<https://doi.org/10.1089/ast.2007.0150>
- Bo, Z., Zeng, L., Chen, Y., Xie, Q., 2021. Geochemical reactions-induced hydrogen loss during underground hydrogen storage in sandstone reservoirs. *International Journal of Hydrogen Energy* 46, 19998–20009. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.03.116>
- Bodelier, P., Libochant, J.A., Blom, C., Laanbroek, H.J., 1996. Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. *Applied and environmental microbiology* 62, 4100–4107. <https://doi.org/10.1128/AEM.62.11.4100-4107.1996>
- Boersheim, E.C., Reitenbach, V., Albrecht, D., Pudlo, D., Ganzer, L., 2019. Experimental Investigation of Integrity Issues of UGS Containing Hydrogen, in: Day 4 Thu, June 06, 2019. Presented at the SPE Europec featured at 81st EAGE Conference and Exhibition, SPE, London, England, UK. <https://doi.org/10.2118/195555-MS>
- Bombach, P., Chatzinotas, A., Neu, T.R., Kästner, M., Lueders, T., Vogt, C., 2010. Enrichment and characterization of a sulfate-reducing toluene-degrading microbial consortium by combining *in situ* microcosms and stable isotope probing techniques. *FEMS Microbiology Ecology* 71, 237–246. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00809.x>
- Botheju, D., 2011. Oxygen Effects in Anaerobic Digestion – A Review. *The Open Waste Management Journal* 4, 1–19. <https://doi.org/10.2174/1876400201104010001>
- Brauman, A., Muller, J.A., Garcia, J.-L., Brune, A., Schink, B., 1998. Fermentative degradation of 3-hydroxybenzoate in pure culture by a novel strictly anaerobic bacterium,

- Sporotomaculum hydroxybenzoicum gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 215–221. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-1-215>
- Braun, K., Gottschalk, G., 1981. Effect of molecular hydrogen and carbon dioxide on chemo-organotrophic growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium aceticum*. *Arch. Microbiol.* 128, 294–298. <https://doi.org/10.1007/BF00422533>
- Brenot, A., Négrel, P., Petelet-Giraud, E., Millot, R., Malcuit, E., 2015. Insights from the salinity origins and interconnections of aquifers in a regional scale sedimentary aquifer system (Adour-Garonne district, SW France): Contributions of  $\delta^{34}\text{S}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  from dissolved sulfates and the  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratio. *Applied Geochemistry* 53, 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.12.002>
- Budzianowski, W.M., Brodacka, M., 2017. Biomethane storage: Evaluation of technologies, end uses, business models, and sustainability. *Energy Conversion and Management* 141, 254–273. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.08.071>
- Cai, M., Yu, C., Wang, R., Si, Y., Masakorala, K., Yuan, H., Yao, J., Zhang, J., 2015. Effects of oxygen injection on oil biodegradation and biodiversity of reservoir microorganisms in Dagang oil field, China. *International Biodeterioration & Biodegradation* 98, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.003>
- Caldwell, S.L., Laidler, J.R., Brewer, E.A., Eberly, J.O., Sandborgh, S.C., Colwell, F.S., 2008. Anaerobic Oxidation of Methane: Mechanisms, Bioenergetics, and the Ecology of Associated Microorganisms. *Environmental Science & Technology* 42, 6791–6799. <https://doi.org/10.1021/es800120b>
- Cannat, M., Fontaine, F., Escartín, J., 2010. Serpentinization and associated hydrogen and methane fluxes at slow spreading ridges, in: Rona, P.A., Devey, C.W., Dymont, J., Murton, B.J. (Eds.), *Geophysical Monograph Series*. American Geophysical Union, Washington, D. C., pp. 241–264. <https://doi.org/10.1029/2008GM000760>
- Castro, H.F., Williams, N.H., Ogram, A., 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria1. *FEMS Microbiology Ecology* 31, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00665.x>
- Chiffres clés de l'énergie - Édition 2020, n.d. 80.
- Collet, P., 2020. La part des renouvelables atteint 19,7 % en Europe en 2019 [WWW Document]. *Actu-Environnement*. URL <https://www.actu-environnement.com/ae/news/eurostat-part-renouvelables-europe-36769.php4> (accessed 7.8.21).
- Conrad, R., Bak, F., Seitz, H.J., Thebrath, B., Mayer, H.P., Schütz, H., 1989. Hydrogen turnover by psychrotrophic homoacetogenic and mesophilic methanogenic bacteria in anoxic paddy soil and lake sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 5, 285–293. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03382.x>
- Coolen, M.J.L., Hopmans, E.C., Rijpstra, W.I.C., Muyzer, G., 2004. Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Haolocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change. *Organic Geochemistry* 35, 1151–1167.
- Crotogino, F., Donadei, S., Bungler, U., Landinger, H., 2010. Large-scale hydrogen underground storage for securing future energy supplies. Research paper presented at the 18th World Hydrogen Energy Conference held 16-21 May 2010 in Essen, Germany.
- Davydova-Charakhchyan, I.A., MILEEVA, A.N., MITYUSHINA, L.L., BELYAEV, S.S., 1992. The acetogenic bacteria from the oil fields in Tataria and Western Siberia. *Mikrobiologîâ (Mosk., 1932)* 61, 306–315.
- Dawood, F., Anda, M., Shafiullah, G.M., 2020. Hydrogen production for energy: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy* 45, 3847–3869. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.059>
- DeLong, E.F., 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 89, 5685–5689.
- Detmers, J., Strauss, H., Schulte, U., Bergmann, A., Knittel, K., Kuever, J., 2004. FISH Shows That *Desulfotomaculum* spp. Are the Dominating Sulfate-Reducing Bacteria in a Pristine Aquifer. *Microbial Ecology* 47. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-9952-6>
- D'Hondt, S., 2002. Metabolic Activity of Subsurface Life in Deep-Sea Sediments. *Science* 295, 2067–2070. <https://doi.org/10.1126/science.1064878>

- Díaz, I., Lopes, A.C., Pérez, S.I., Fdz-Polanco, M., 2010. Performance evaluation of oxygen, air and nitrate for the microaerobic removal of hydrogen sulphide in biogas from sludge digestion. *Bioresource Technology* 101, 7724–7730. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.062>
- Dolla, A., Fournier, M., Dermoun, Z., 2006. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology* 126, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.041>
- Dong, H., Zhang, Z.Z., He, Y.L., Luo, Y.J., Xia, W.J., Sun, S.S., Zhang, G.Q., Zhang, Z.Y., Gao, D.L., 2015. Biostimulation of biogas producing microcosm for enhancing oil recovery in low-permeability oil reservoir. *RSC Advances* 5, 91869–91877. <https://doi.org/10.1039/C5RA18089A>
- Dong, X., Greening, C., Bröls, T., Conrad, R., Guo, K., Blaskowski, S., Kaschani, F., Kaiser, M., Laban, N.A., Meckenstock, R.U., 2018. Fermentative Spirochaetes mediate necromass recycling in anoxic hydrocarbon-contaminated habitats. *ISME J* 12, 2039–2050. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0148-3>
- Drake, Kusel, H.L., Matthies, C., 2006. “Acetogenic prokaryotes”, in *The Prokaryotes Ecophysiology and Biochemistry*, eds E. Dworkin, M. Rosenberg, E. Schleifer and K.H. Stackebrandt. Springer, New York, NY, pp. 354–420.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Edwards, E.A., Wills, L.E., Reinhard, M., Grbic-Galic, D., 1992. Anaerobic Degradation of Toluene and Xylene by Aquifer Microorganisms under Sulfate-Reducing Conditions. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 7.
- Eichler, B., Pfennig, N., 1986. Characterization of a new platelet-forming purple sulfur bacterium, *Amoebobacter pediformis* sp. nov. *Archives of Microbiology* 146, 295–300. <https://doi.org/10.1007/BF00403233>
- Eichorst, S.A., Trojan, D., Roux, S., Herbold, C., Rattei, T., Woebken, D., 2018. Genomic insights into the Acidobacteria reveal strategies for their success in terrestrial environments. *Environmental Microbiology* 20, 1041–1063. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14043>
- Elberry, A.M., Thakur, J., Santasalo-Aarnio, A., Larmi, M., 2021. Large-scale compressed hydrogen storage as part of renewable electricity storage systems. *International Journal of Hydrogen Energy* 46, 15671–15690. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.02.080>
- ENEA Consulting, 2017. Overview of the biomethane sector in France.
- EPA, 2017. How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites (No. EPA 510-B-17-003). EPA (United States Environmental Protection Agency).
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Etioppe, G., Samardžić, N., Grassa, F., Hrvatović, H., Miošić, N., Skopljak, F., 2017. Methane and hydrogen in hyperalkaline groundwaters of the serpentinized Dinaride ophiolite belt, Bosnia and Herzegovina. *Applied Geochemistry* 84, 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2017.07.006>
- European Biogas Association, 2019. Biogas trends for this year.
- European Commission, 2020. A hydrogen strategy for a climate-neutral Europe. European commission, Brussels.
- Feldewert, C., Lang, K., Brune, A., 2020. The hydrogen threshold of obligately methyl-reducing methanogens. *FEMS Microbiology Letters* 367. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa137>
- Flesch, S., Pudlo, D., Albrecht, D., Jacob, A., Enzmann, F., 2018. Hydrogen underground storage—Petrographic and petrophysical variations in reservoir sandstones from laboratory experiments under simulated reservoir conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* 43, 20822–20835. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.09.112>
- Frank, Y.A., Kadnikov, V.V., Lukina, A.P., Banks, D., Beletsky, A.V., Mardanov, A.V., Sen’kina, E.I., Avakyan, M.R., Karnachuk, O.V., Ravin, N.V., 2016. Characterization and Genome Analysis

- of the First Facultatively Alkaliphilic Thermodesulfovibrio Isolated from the Deep Terrestrial Subsurface. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02000>
- Friedrich, M.W., 2005. Methyl-Coenzyme M Reductase Genes: Unique Functional Markers for Methanogenic and Anaerobic Methane-Oxidizing Archaea, in: *Methods in Enzymology, Environmental Microbiology*. Academic Press, pp. 428–442. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)97026-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)97026-2)
- Fry, N.K., Fredrickson, J.K., Fishbain, S., Wagner, M., Stahl, D.A., 1997. Population structure of microbial communities associated with two deep, anaerobic, alkaline aquifers. *Applied and environmental microbiology* 63, 1498–1504. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.4.1498-1504.1997>
- Fukuzawa, K., Saitoh, Y., Akai, K., Kogure, K., Ueno, S., Tokumura, A., Otagiri, M., Shibata, A., 2005. Antioxidant effect of bovine serum albumin on membrane lipid peroxidation induced by iron chelate and superoxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1668, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.12.006>
- Ganzer, L., Reitenbach, V., Pudlo, D., Panfilov, M., Albrecht, D., Gaupp, R., 2013. The H2STORE Project - Experimental and Numerical Simulation Approach to Investigate Processes in Underground Hydrogen Reservoir Storage, in: *All Days*. Presented at the EAGE Annual Conference & Exhibition incorporating SPE Europec, SPE, London, UK. <https://doi.org/10.2118/164936-MS>
- Gao, P., Tian, H., Wang, Y., Li, Yanshu, Li, Yan, Xie, J., Zeng, B., Zhou, J., Li, G., Ma, T., 2016. Spatial isolation and environmental factors drive distinct bacterial and archaeal communities in different types of petroleum reservoirs in China. *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep20174>
- Gao, P.K., Li, G.Q., Tian, H.M., Wang, Y.S., Sun, H.W., Ma, T., 2015. Differences in microbial community composition between injection and production water samples of water flooding petroleum reservoirs. *Biogeosciences* 12, 3403–3414. <https://doi.org/10.5194/bg-12-3403-2015>
- Gaucher, E.C., 2020. New Perspectives in the Industrial Exploration for Native Hydrogen. *Elements* 16, 8–9. <https://doi.org/10.2138/gselements.16.1.8>
- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., Vanbroekhoven, K., 2006. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* 66, 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.11.002>
- Gombert, P., Ghoreychi, M., Lahaie, F., Salmon, R., Thoraval, A., 2019. Place du stockage souterrain d'énergie dans la transition énergétique. *Rapport scientifique Ineris 2017-2018* 24–25.
- Gouvernement Français, 2020. *Stratégie nationale pour le développement de l'hydrogène décarboné en France*.
- Gregory, S., Barnett, M., Field, L., Milodowski, A., 2019. Subsurface Microbial Hydrogen Cycling: Natural Occurrence and Implications for Industry. *Microorganisms* 7, 53. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020053>
- Guan, J., Xia, L.-P., Wang, L.-Y., Liu, J.-F., Gu, J.-D., Mu, B.-Z., 2013. Diversity and distribution of sulfate-reducing bacteria in four petroleum reservoirs detected by using 16S rRNA and dsrAB genes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 76, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.021>
- Guélard, J., Beaumont, V., Rouchon, V., Guyot, F., Pillot, D., Jézéquel, D., Ader, M., Newell, K.D., Deville, E., 2017. Natural H<sub>2</sub> in Kansas: Deep or shallow origin?: H<sub>2</sub> IN KANSAS, DEEP OR SHALLOW ORIGIN? *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 18, 1841–1865. <https://doi.org/10.1002/2016GC006544>
- Guo, C., Li, C., Zhang, K., Cai, Z., Ma, T., Maggi, F., Gan, Y., El-Zein, A., Pan, Z., Shen, L., 2021. The promise and challenges of utility-scale compressed air energy storage in aquifers. *Applied Energy* 286, 116513. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2021.116513>
- Hagemann, B., Rasoulzadeh, M., Panfilov, M., Ganzer, L., Reitenbach, V., 2016. Hydrogenization of underground storage of natural gas: Impact of hydrogen on the hydrodynamic and bio-

- chemical behavior. *Computational Geosciences* 20, 595–606.  
<https://doi.org/10.1007/s10596-015-9515-6>
- Hallbeck, L., Pedersen, K., 2008. Characterization of microbial processes in deep aquifers of the Fennoscandian Shield. *Applied Geochemistry* 23, 1796–1819.  
<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2008.02.012>
- Hamilton, T.L., Jones, D.S., Schaperdoth, I., Macalady, J.L., 2015. Metagenomic insights into S(0) precipitation in a terrestrial subsurface lithoautotrophic ecosystem. *Front. Microbiol.* 5.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00756>
- Haouari, O., Fardeau, M.-L., Cayol, J.-L., Fauque, G., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., Hamdi, M., Ollivier, B., 2008. *Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus* sp. nov., a new thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a Tunisian hot spring. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.12.002>
- Harms, G., Zengler, K., Rabus, R., Aeckersberg, F., Minz, D., Rosselló-Mora, R., Widdel, F., 1999. Anaerobic Oxidation of o -Xylene, m -Xylene, and Homologous Alkylbenzenes by New Types of Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 999–1004. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.999-1004.1999>
- Head, I.M., Jones, D.M., Larter, S.R., 2003. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature* 426, 344–352. <https://doi.org/10.1038/nature02134>
- Hemme, C., van Berk, W., 2018. Hydrogeochemical Modeling to Identify Potential Risks of Underground Hydrogen Storage in Depleted Gas Fields. *Applied Sciences* 8, 2282.  
<https://doi.org/10.3390/app8112282>
- Henry, E.A., Devereux, R., Maki, J.S., Gilmour, C.C., Woese, C.R., Mandelco, L., Schauder, R., Remsen, C.C., Mitchell, R., 1994. Characterization of a new thermophilic sulfate-reducing bacterium: *Thermodesulfovibrio yellowstonii*, gen. nov. and sp. nov.: its phylogenetic relationship to *Thermodesulfo bacterium commune* and their origins deep within the bacterial domain. *Archives of Microbiology* 161, 62–69.  
<https://doi.org/10.1007/BF00248894>
- Herout, M., Malat'ák, J., Kučera, L., Dlabaja, T., 2011. Biogas composition depending on the type of plant biomass used. *Research in Agricultural Engineering* 57, 137–143.  
<https://doi.org/10.17221/41/2010-RAE>
- Hervant, F., Malard, F., 2019. Adaptations: Low oxygen, in: *Encyclopedia of Caves*. Elsevier, pp. 8–15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814124-3.00002-9>
- Hirasawa, J.S., Sarti, A., Del Aguila, N.K.S., Varesche, M.B.A., 2008. Application of molecular techniques to evaluate the methanogenic archaea and anaerobic bacteria in the presence of oxygen with different COD:Sulfate ratios in a UASB reactor. *Anaerobe* 14, 209–218.  
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.06.003>
- Hoehler, T.M., Jørgensen, B.B., 2013. Microbial life under extreme energy limitation. *Nature Reviews Microbiology* 11, 83–94. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2939>
- Hwu, C.-S., Lettinga, G., 1997. Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges. *Enzyme and Microbial Technology* 21, 297–301. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00050-1)
- Imachi, H., 2002. *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 52, 1729–1735.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02212-0>
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Loy, A., Qiu, Y.-L., Hugenholtz, P., Kimura, N., Wagner, M., Ohashi, A., Harada, H., 2006. Non-Sulfate-Reducing, Syntrophic Bacteria Affiliated with *Desulfotomaculum* Cluster I Are Widely Distributed in Methanogenic Environments. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2080–2091.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2080-2091.2006>
- INERIS, 2016. Le stockage souterrain dans le contexte de la transition énergétique.
- Itävaara, M., Nyyssönen, M., Kapanen, A., Nousiainen, A., Ahonen, L., Kukkonen, I., 2011. Characterization of bacterial diversity to a depth of 1500 m in the Outokumpu deep borehole, Fennoscandian Shield: Deep terrestrial biodiversity. *FEMS Microbiology Ecology* 77, 295–309. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01111.x>

- Jansen, K., Thauer, R.K., Widdel, F., Fuchs, G., 1984. Carbon assimilation pathways in sulfate reducing bacteria. Formate, carbon dioxide, carbon monoxide, and acetate assimilation by *Desulfovibrio baarsii*. *Archives of Microbiology* 138, 257–262. <https://doi.org/10.1007/BF00402132>
- Jarrell, K.F., 1985. Extreme Oxygen Sensitivity in Methanogenic Archaeobacteria. *BioScience* 35, 298–302. <https://doi.org/10.2307/1309929>
- Jia, H., Yin, S.-P., Ma, X.-P., 2018. Enhanced oil recovery mechanism of low oxygen air injection in high water cut reservoir. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology* 8, 917–923. <https://doi.org/10.1007/s13202-017-0389-0>
- Jia, R., Unsal, T., Xu, D., Leckbach, Y., Gu, T., 2019. Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 137, 42–58. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.11.007>
- Johnston, B., Mayo, M.C., Khare, A., 2005. Hydrogen: the energy source for the 21st century. *Technovation* 25, 569–585. <https://doi.org/10.1016/j.technovation.2003.11.005>
- Jones, R.E., Beeman, R.E., Suflita, J.M., 1989. Anaerobic metabolic processes in the deep terrestrial subsurface. *Geomicrobiology Journal* 7, 117–130. <https://doi.org/10.1080/01490458909377854>
- Jonkers, H.M., Koh, I.-O., Behrend, P., Muyzer, G., de Beer, D., 2005. Aerobic Organic Carbon Mineralization by Sulfate-Reducing Bacteria in the Oxygen-Saturated Photic Zone of a Hypersaline Microbial Mat. *Microbial Ecology* 49, 291–300. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0260-y>
- Jung, H.B., Um, W., Cantrell, K.J., 2013. Effect of oxygen co-injected with carbon dioxide on Gothic shale caprock–CO<sub>2</sub>–brine interaction during geologic carbon sequestration. *Chemical Geology* 354, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.06.019>
- Kadnikov, V.V., Mardanov, A.V., Beletsky, A.V., Banks, D., Pimenov, N.V., Frank, Y.A., Karnachuk, O.V., Ravin, N.V., 2018. A metagenomic window into the 2-km-deep terrestrial subsurface aquifer revealed multiple pathways of organic matter decomposition. *FEMS Microbiology Ecology* 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy152>
- Kalam, S., Basu, A., Ahmad, I., Sayyed, R.Z., El-Enshasy, H.A., Dailin, D.J., Suriani, N.L., 2020. Recent Understanding of Soil Acidobacteria and Their Ecological Significance: A Critical Review. *Frontiers in Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580024>
- Kampman, N., Bickle, M.J., Maskell, A., Chapman, H.J., Evans, J.P., Purser, G., Zhou, Z., Schaller, M.F., Gattacceca, J.C., Bertier, P., Chen, F., Turchyn, A.V., Assayag, N., Rochelle, C., Ballentine, C.J., Busch, A., 2014. Drilling and sampling a natural CO<sub>2</sub> reservoir: Implications for fluid flow and CO<sub>2</sub>-fluid–rock reactions during CO<sub>2</sub> migration through the overburden. *Chemical Geology* 369, 51–82. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.11.015>
- Khelaifia, S., Lagier, J.-C., Nkamga, V.D., Guilhot, E., Drancourt, M., Raoult, D., 2016. Aerobic culture of methanogenic archaea without an external source of hydrogen. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 35, 985–991. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2627-7>
- Kimura, H., Nashimoto, H., Shimizu, M., Hattori, S., Yamada, K., Koba, K., Yoshida, N., Kato, K., 2010. Microbial methane production in deep aquifer associated with the accretionary prism in Southwest Japan. *The ISME Journal* 4, 531–541. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.132>
- Klein, M., Friedrich, M., Roger, A.J., Hugenholtz, P., Fishbain, S., Abicht, H., Blackall, L.L., Stahl, D.A., Wagner, M., 2001. Multiple Lateral Transfers of Dissimilatory Sulfite Reductase Genes between Major Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes. *Journal of Bacteriology* 183, 6028–6035. <https://doi.org/10.1128/JB.183.20.6028-6035.2001>
- Kleinstuber, S., Schleinitz, K.M., Breifeld, J., Harms, H., Richnow, H.H., Vogt, C., 2008. Molecular characterization of bacterial communities mineralizing benzene under sulfate-reducing conditions: Benzene mineralization under sulfate-reducing conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 143–157. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00536.x>
- Koelschbach, J.S., Mouttaki, H., Pickl, C., Heipieper, H.J., Rachel, R., Lawson, P.A., Meckenstock, R.U., 2017. *Rectinema cohabitans* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped spirochaete isolated from an anaerobic naphthalene-degrading enrichment culture. *International Journal of*

- Systematic and Evolutionary Microbiology 67, 1288–1295.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001799>
- Koenen, M., Tambach, T.J., Neele, F.P., 2011. Geochemical effects of impurities in CO<sub>2</sub> on a sandstone reservoir. *Energy Procedia* 4, 5343–5349.  
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.02.516>
- Koornneef, J., van Breevoort, P., Noothout, P., Hendriks, C., Luning, uchien, Camps, A., 2013. Global Potential for Biomethane Production with Carbon Capture, Transport and Storage up to 2050. *Energy Procedia* 37, 6043–6052.  
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.06.533>
- Kosako, Y., Yabuuchi, E., Naka, T., Fujiwara, N., Kobayashi, K., 2000. Proposal of Sphingomonadaceae fam. nov., consisting of *Sphingomonas* Yabuuchi et al. 1990, *Erythrobacter* Shiba and Shimidu 1982, *Erythromicrobium* Yurkov et al. 1994, *Porphyrobacter* Fuerst et al. 1993, *Zymomonas* Kluyver and van Niel 1936, and *Sandaracinobacter* Yurkov et al. 1997, with the type genus *Sphingomonas* Yabuuchi et al. 1990. *Microbiology and immunology* 44, 563–575.
- Kotelnikova, S., 2002. Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface. *Earth-Science Reviews* 58, 367–395. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(01\)00082-4](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(01)00082-4)
- Kotelnikova, S., Pedersen, K., 1998. Distribution and activity of methanogens and homoacetogens in deep granitic aquifers at Äspö Hard Rock Laboratory, Sweden. *FEMS Microbiology Ecology* 26, 121–134. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00498.x>
- Kotelnikova, S., Pedersen, K., 1997. Evidence for methanogenic *Archaea* and homoacetogenic *Bacteria* in deep granitic rock aquifers. *FEMS Microbiology Reviews* 20, 339–349. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00319.x>
- Kovač, A., Paranos, M., Marciuš, D., 2021. Hydrogen in energy transition: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 46, 10016–10035.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.256>
- Krich, Augenstein, Batmale, 2005. Biomethane From Dairy Waste: A sourcebook for the production and use of renewable natural gas in california.
- Krumholz, L.R., 2000. Microbial communities in the deep subsurface. *Hydrogeology Journal* 7.
- Kube, M., Heider, J., Amann, J., Hufnagel, P., Kühner, S., Beck, A., Reinhardt, R., Rabus, R., 2004. Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 181, 182–194. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0627-3>
- Kukoyi, 2015. Biomethane and Bioethanol as Alternative Transport Fuels, in: 7th International Conference on Latest Trends in Engineering and Technology (ICLTET'2015) Nov. 26-27, 2015 Irene, Pretoria (South Africa). Presented at the 7th International Conference on Latest Trends in Engineering and Technology, International Institute of Engineers. <https://doi.org/10.15242/IIE.E1115054>
- Kuo, Y.C., Cheng, P.W.G., Chiou, H.Y., Kao, C.M., 2012. Application of enhanced bioremediation for TCE-contaminated groundwater: a pilot-scale study. *Desalination and Water Treatment* 364–371.
- Kushnir, R., Ullmann, A., Dayan, A., 2012. Thermodynamic and hydrodynamic response of compressed air energy storage reservoirs: a review. *Reviews in Chemical Engineering* 28. <https://doi.org/10.1515/revce-2012-0006>
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* 115–175.
- Latosov, E., Maaten, B., Siirde, A., Konist, A., 2018. The influence of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> on the possible corrosion on steel transmission lines of natural gas. *Energy Procedia* 147, 63–70.  
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.07.034>
- Lemieux, A., Shkarupin, A., Sharp, K., 2020. Geologic feasibility of underground hydrogen storage in Canada. *International Journal of Hydrogen Energy* 45, 32243–32259.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.08.244>
- Lever, M.A., 2012. Acetogenesis in the Energy-Starved Deep Biosphere – A Paradox? *Frontiers in Microbiology* 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00284>

- Li, H., Mehmood, D., Thorin, E., Yu, Z., 2017. Biomethane Production Via Anaerobic Digestion and Biomass Gasification. *Energy Procedia* 105, 1172–1177.  
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.490>
- Lien, P.J., Yang, Z.H., Chang, Y.M., Tu, Y.T., Kao, C.M., 2016. Enhanced bioremediation of TCE-contaminated groundwater with coexistence of fuel oil: Effectiveness and mechanism study. *Chemical Engineering Journal* 289, 525–536.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.01.011>
- Liesack, W., Bak, F., Kreft, J.-U., Stackebrandt, E., 1994. *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* 162, 85–90. <https://doi.org/10.1007/BF00264378>
- Lins, P.H.C., de Almeida, A.T., 2012. Multidimensional risk analysis of hydrogen pipelines. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 13545–13554.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.06.078>
- 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.  
<https://doi.org/10.1038/nature07174>
- Liu, A., Garcia-Dominguez, E., Rhine, E., Young, L., 2004. A novel arsenate respiring isolate that can utilize aromatic substrates. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 323–332.  
<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.02.008>
- Liu, Y.-F., Galzerani, D.D., Mbadinga, S.M., Zaramela, L.S., Gu, J.-D., Mu, B.-Z., Zengler, K., 2018. Metabolic capability and in situ activity of microorganisms in an oil reservoir. *Microbiome* 6. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0392-1>
- Lu, J., Mickler, P.J., Nicot, J.-P., Yang, C., Darvari, R., 2016. Geochemical impact of O<sub>2</sub> impurity in CO<sub>2</sub> stream on carbonate carbon-storage reservoirs. *International Journal of Greenhouse Gas Control* 47, 159–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2016.01.039>
- Mackay, D.M., de Sieyes, N.R., Einarson, M.D., Feris, K.P., Pappas, A.A., Wood, I.A., Jacobson, L., Justice, L.G., Noske, M.N., Scow, K.M., Wilson, J.T., 2006. Impact of Ethanol on the Natural Attenuation of Benzene, Toluene, and *o*-Xylene in a Normally Sulfate-Reducing Aquifer. *Environmental Science & Technology* 40, 6123–6130.  
<https://doi.org/10.1021/es060505a>
- Magnabosco, C., Lin, L.-H., Dong, H., Bomberg, M., Ghiorse, W., Stan-Lotter, H., Pedersen, K., Kieft, T.L., van Heerden, E., Onstott, T.C., 2018. The biomass and biodiversity of the continental subsurface. *Nature Geoscience* 11, 707–717. <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0221-6>
- Magnabosco, C., Timmers, P.H.A., Lau, M.C.Y., Borgonie, G., Linage-Alvarez, B., Kuloyo, O., Alleva, R., Kieft, T.L., Slater, G.F., van Heerden, E., Sherwood Lollar, B., Onstott, T.C., 2018. Fluctuations in populations of subsurface methane oxidizers in coordination with changes in electron acceptor availability. *FEMS Microbiology Ecology* 94.  
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiy089>
- Magoč, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. de, Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, e593.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Marschall, C., Frenzel, P., Cypionka, H., 1993. Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology* 159, 168–173.  
<https://doi.org/10.1007/BF00250278>
- Martinez, I., Moretti, I., Deville, E., 2019. H<sub>2</sub> naturel. Alliance nationale de coordination de la recherche pour l'énergie.
- Maxime Lemonde, 2018. What is the state of biogas and biometane market in France?
- McMahon, P.B., Chapelle, F.H., 1991. Microbial production of organic acids in aquitard sediments and its role in aquifer geochemistry. *Nature* 349, 233–235.  
<https://doi.org/10.1038/349233a0>



- McMahon, P.B., Chapelle, F.H., Falls, W.F., Bradley, P.M., 1992. Role of microbial processes in linking sandstone diagenesis with organic-rich clays. *Journal of Sedimentary Research* 62, 1–10. <https://doi.org/10.1306/D4267870-2B26-11D7-8648000102C1865D>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McPhail, S.J., Cigolotti, V., Moreno, A., 2012. Fuel cells in the waste-to-energy chain: distributed generation through non-conventional fuels and fuel cells, *Green energy and technology*. Springer, London ; New York.
- Meckenstock, R.U., 1999. Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *FEMS Microbiology Letters* 177, 67–73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13715.x>
- Meiller, C., Ranchou-Peyruse, A., 2019. Le stockage souterrain d'hydrogène, un enjeu clé pour une filière de l'hydrogène en France.
- Millero, F.J., Huang, F., Laferiere, A.L., 2002. Solubility of oxygen in the major sea salts as a function of concentration and temperature. *Marine Chemistry* 78, 217–230. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(02\)00034-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(02)00034-8)
- Ministère de la transition écologique et solidaire, 2018. Plan de déploiement de l'hydrogène pour la transition énergétique.
- Ministère de la transition écologique et solidaire, R. française, 2018. Stratégie française pour l'énergie et le climat - Présentation de la programmation pluriannuelle de l'énergie et de la stratégie nationale bas carbone.
- Morasch, B., Schink, B., Tebbe, C.C., Meckenstock, R.U., 2004. Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Archives of Microbiology* 181, 407–417. <https://doi.org/10.1007/s00203-004-0672-6>
- Morgan, H., Large, D., Bateman, K., Hanstock, D., Gregory, S., 2017. The Effect of Variable Oxygen Impurities on Microbial Activity in Conditions Resembling Geological Storage Sites. *Energy Procedia* 114, 3077–3087. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.1437>
- Morozova, D., Zettlitzer, M., Vieth, A., Würdemann, H., 2010. Microbial community response to the CO<sub>2</sub> injection and storage in the saline aquifer, Ketzin, Germany 11146.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.3.695-700.1993>
- Muyzer, G., Stams, A., 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6, 441–454.
- Nakagawa, T., Hanada, S., Maruyama, A., Marumo, K., Urabe, T., Fukui, M., 2002. Distribution and diversity of thermophilic sulfate-reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine (Toyoha, Japan). *FEMS Microbiology Ecology* 41, 199–209. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00981.x>
- Navas-Angueta, Z., García-Gusano, D., Dufour, J., Iribarren, D., 2021. Revisiting the role of steam methane reforming with CO<sub>2</sub> capture and storage for long-term hydrogen production. *Science of The Total Environment* 771, 145432. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145432>
- Nazina, T., Sokolova, D., Grouzdev, D., Semenova, E., Babich, T., Bidzhieva, S., Serdukov, D., Volkov, D., Bugaev, K., Ershov, A., Khisametdinov, M., Borzenkov, I., 2019. The Potential Application of Microorganisms for Sustainable Petroleum Recovery from Heavy Oil Reservoirs. *Sustainability* 12, 15. <https://doi.org/10.3390/su12010015>
- Nazina, T.N., Rozanova, E.P., Belyakova, E.V., Lysenko, A.M., Poltarau, A.B., Tourova, T.P., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., 2005. Description of “*Desulfotomaculum nigrificans* subsp. *salinus*” as a New Species, *Desulfotomaculum salinum* sp. nov. *Microbiology* 74, 567–574. <https://doi.org/10.1007/s11021-005-0104-x>
- Nazina, T.N., Shestakova, N.M., Pavlova, N.K., Tatarkin, Y.V., Ivoilov, V.S., Khisametdinov, M.R., Sokolova, D.S., Babich, T.L., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Belyaev, S.S., Ivanov, M.V., 2013. Functional and phylogenetic microbial diversity in formation waters of a low-

- temperature carbonate petroleum reservoir. *International Biodeterioration & Biodegradation* 81, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.008>
- Nazina, T.N., Shestakova, N.M., Semenova, E.M., Korshunova, A.V., Kostrukova, N.K., Tourova, T.P., Min, L., Feng, Q., Poltarau, A.B., 2017. Diversity of Metabolically Active Bacteria in Water-Flooded High-Temperature Heavy Oil Reservoir. *Frontiers in Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00707>
- Nealson, K.H., Inagaki, F., Takai, K., 2005. Hydrogen-driven subsurface lithoautotrophic microbial ecosystems (SLiMEs): do they exist and why should we care? *Trends in Microbiology* 13, 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.07.010>
- Nurjehan Ezzatul, A., Maizirwan, M., Nazaruddin, S., 2018. Design of liquefaction process of biogas using Aspen HYSYS simulation. *Journal of advanced research in biofuel and bioenergy* 2, 10–15.
- Ollivier, B., Borgomano, J., Oger, P., 2014. 8. Petroleum: from formation to microbiology, in: Kallmeyer, J., Wagner, D. (Eds.), *Microbial Life of the Deep Biosphere*. DE GRUYTER, Berlin, Boston. <https://doi.org/10.1515/9783110300130.161>
- Ommedal, H., Torsvik, T., 2007. *Desulfotignum toluenicum* sp. nov., a novel toluene-degrading, sulphate-reducing bacterium isolated from an oil-reservoir model column. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2865–2869. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65067-0>
- Orsi, W.D., Barker Jørgensen, B., Biddle, J.F., 2016. Transcriptional analysis of sulfate reducing and chemolithoautotrophic sulfur oxidizing bacteria in the deep seafloor: Seafloor sulfate reducing bacteria. *Environmental Microbiology Reports* 8, 452–460. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12387>
- Panfilov, M., 2010. Underground Storage of Hydrogen: In Situ Self-Organisation and Methane Generation. *Transport in Porous Media* 85, 841–865. <https://doi.org/10.1007/s11242-010-9595-7>
- Pannekens, M., Kroll, L., Müller, H., Mbow, F.T., Meckenstock, R.U., 2019. Oil reservoirs, an exceptional habitat for microorganisms. *New Biotechnology* 49, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.11.006>
- Panorama du gaz renouvelable en 2018, 2018.
- Paolini, V., Petracchini, F., Segreto, M., Tomassetti, L., Naja, N., Cecinato, A., 2018. Environmental impact of biogas: A short review of current knowledge. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 53, 899–906. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1459076>
- Park, J., Sanford, R.A., Bethke, C.M., 2006. Geochemical and microbiological zonation of the Middendorf aquifer, South Carolina. *Chemical Geology* 230, 88–104. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2005.12.001>
- Parkhurst, D.L., Appelo, C.A.J., 1999. User's guide to PHREEQC (Version 2): a computer program for speciation reaction-path, 1D-transport, and inverse geochemical calculations (No. 312). U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations.
- Peters, V., Janssen, P.H., Conrad, R., 1999. Transient Production of Formate During Chemolithotrophic Growth of Anaerobic Microorganisms on Hydrogen. *Curr Microbiol* 38, 285–289. <https://doi.org/10.1007/PL00006803>
- Pfennig, N., Trüper, H.G., 1992. The family Chromatiaceae, in: *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY.
- Pfennig, N., Widdel, F., Trüper, H.G., 1981. The Dissimilatory Sulfate-Reducing Bacteria, in: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 926–940. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9\\_74](https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_74)
- Posch, S., Haider, M., 2012. Optimization of CO<sub>2</sub> compression and purification units (CO<sub>2</sub>CPU) for CCS power plants. *Fuel*, 8th European Conference on Coal Research and Its Applications 101, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.07.039>
- Potter, J., Salvi, S., Longstaffe, F.J., 2013. Abiogenic hydrocarbon isotopic signatures in granitic rocks: Identifying pathways of formation. *Lithos* 182–183, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.lithos.2013.10.001>

- Purkamo, L., Bomberg, M., Nyyssönen, M., Ahonen, L., Kukkonen, I., Itävaara, M., 2017. Response of Deep Subsurface Microbial Community to Different Carbon Sources and Electron Acceptors during ~2 months Incubation in Microcosms. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00232>
- Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W., Widdel, F., 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1444–1451. <https://doi.org/10.1128/aem.59.5.1444-1451.1993>
- RAG, 2017. Underground SUN Storage - chemical storage of renewable energy in porous subsurface reservoirs with exemplary testbed [WWW Document]. URL <https://www.underground-sun-storage.at/> (accessed 7.12.21).
- Rajendran, K., Aslanzadeh, S., Taherzadeh, M.J., 2012. Household Biogas Digesters—A Review. *Energies* 5, 2911–2942. <https://doi.org/10.3390/en5082911>
- Ranchou-Peyruse, M., Auguet, J.-C., Mazière, C., Restrepo-Ortiz, C.X., Guignard, M., Dequidt, D., Chiquet, P., Cezac, P., Ranchou-Peyruse, A., 2019. Geological gas-storage shapes deep life. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14745>
- Ranchou-Peyruse, M., Gasc, C., Guignard, M., Aüllo, T., Dequidt, D., Peyret, P., Ranchou-Peyruse, A., 2017. The sequence capture by hybridization: a new approach for revealing the potential of mono-aromatic hydrocarbons bioattenuation in a deep oligotrophic aquifer. *Microbial Biotechnology* 10, 469–479. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12426>
- Rasi, S., 2009. Biogas composition and upgrading to biomethane 79.
- Rasi, S., Veijanen, A., Rintala, J., 2007. Trace compounds of biogas from different biogas production plants. *Energy* 32, 1375–1380. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2006.10.018>
- Reitenbach, V., Ganzer, L., Albrecht, D., Hagemann, B., 2015. Influence of added hydrogen on underground gas storage: a review of key issues. *Environmental Earth Sciences* 73, 6927–6937. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4176-2>
- Renard, S., Sterpenich, J., Pironon, J., Chiquet, P., Randi, A., 2014. Geochemical effects of an oxycombustion stream containing SO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> on carbonate rocks in the context of CO<sub>2</sub> storage. *Chemical Geology* 382, 140–152. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2014.05.032>
- Renewable Gas French Panorama, 2016. . GRDF, GRTGaz, Syndicat des énergies renouvelables, SPEGNN, TIGF.
- Renewable Resources Co, 2016. 11 Different Sources of Alternative Energy.
- Ridley, C.M., Voordouw, G., 2018. Aerobic microbial taxa dominate deep subsurface cores from the Alberta oil sands. *FEMS Microbiology Ecology* 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy073>
- Robertson, W.J., Franzmann, P.D., Mee, B.J., 2000. Spore-forming, Desulfosporosinus-like sulphate-reducing bacteria from a shallow aquifer contaminated with gasoline. *Journal of Applied Microbiology* 88, 248–259. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00957.x>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Sahl, J.W., Schmidt, R., Swanner, E.D., Mandernack, K.W., Templeton, A.S., Kieft, T.L., Smith, R.L., Sanford, W.E., Callaghan, R.L., Mitton, J.B., Spear, J.R., 2008. Subsurface Microbial Diversity in Deep-Granitic-Fracture Water in Colorado. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 143–152. <https://doi.org/10.1128/AEM.01133-07>
- Salanitro, J.P., Wisniewski, 1997. Use of aerobic and anaerobic microcosms to assess BTEX biodegradation in aquifers. *SUMMER 1997 GWMR* 210–221.
- Sass, H., Cypionka, H., Babenzien, H.-D., 1997. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiology Ecology* 22, 245–255. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00377.x>
- Scarlat, N., Dallemand, J.-F., Fahl, F., 2018. Biogas: Developments and perspectives in Europe. *Renewable Energy* 129, 457–472. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.006>

- Schink, B., Stams, A.J.M., 2013. Syntrophism among prokaryotes. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The prokaryotes - prokaryotic communities and ecophysiology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Schrenk, M.O., Brazelton, W.J., Lang, S.Q., 2013. Serpentinization, Carbon, and Deep Life. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 75, 575–606. <https://doi.org/10.2138/rmg.2013.75.18>
- Shao, H., Kukkadapu, R.K., Krogstad, E.J., Newburn, M.K., Cantrell, K.J., 2014. Mobilization of metals from Eau Claire siltstone and the impact of oxygen under geological carbon dioxide sequestration conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 141, 62–82. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2014.06.011>
- She, H., Kong, D., Li, Y., Hu, Z., Guo, H., 2019. Recent Advance of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) in China 17.
- Sherwood Lollar, B., Onstott, T.C., Lacrampe-Couloume, G., Ballentine, C.J., 2014. The contribution of the Precambrian continental lithosphere to global H<sub>2</sub> production. *Nature* 516, 379–382. <https://doi.org/10.1038/nature14017>
- Shi, Z., Jessen, K., Tsotsis, T.T., 2020. Impacts of the subsurface storage of natural gas and hydrogen mixtures. *International Journal of Hydrogen Energy* 45, 8757–8773. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.01.044>
- Shimizu, S., Akiyama, M., Naganuma, T., Fujioka, M., Nako, M., Ishijima, Y., 2007. Molecular characterization of microbial communities in deep coal seam groundwater of northern Japan. *Geobiology* 5, 423–433. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00123.x>
- Silver, M., Buck, J., Taylor, N., 2010. Systems and devices for treating and monitoring water, wastewater and other biodegradable matter. WO2010147683A1.
- Simkus, D.N., Slater, G.F., Lollar, B.S., Wilkie, K., Kieft, T.L., Magnabosco, C., Lau, M.C.Y., Pullin, M.J., Hendrickson, S.B., Wommack, K.E., Sakowski, E.G., Heerden, E. van, Kuloyo, O., Linage, B., Borgonie, G., Onstott, T.C., 2016. Variations in microbial carbon sources and cycling in the deep continental subsurface. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 173, 264–283. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.10.003>
- SINTEF, 2019. Hydrogen for Europe - Pre-Study- Key Findings.
- Smigfih, P., Greksfik, M., 1990. Methanogenic bacteria as a key factor involved in changes of town gas stored in an underground reservoir 4.
- Spring, S., Rosenzweig, F., 2006. The genera *Desulfotobacterium* and *Desulfosporosinus*: taxonomy. *Prokaryotes* 4, 771–786.
- Springham, D.G., 1984. Microbiological Methods for the Enhancement of Oil Recovery. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1, 187–222. <https://doi.org/10.1080/02648725.1984.10647786>
- STACKEBRANDT, E., KOCH, C., GVOZDIK, O., SCHUMANN, P. 1995, 1995. Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45, 682–692. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-682>
- Stahl, D.A., Fishbain, S., Klein, M., Baker, B.J., Wagner, M., 2002. Origins and diversification of sulfate-respiring microorganisms 7.
- Steinberg, L.M., Regan, J.M., 2009. mcrA-Targeted Real-Time Quantitative PCR Method To Examine Methanogen Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4435–4442. <https://doi.org/10.1128/AEM.02858-08>
- Steinberg, L.M., Regan, J.M., 2008. Phylogenetic Comparison of the Methanogenic Communities from an Acidic, Oligotrophic Fen and an Anaerobic Digester Treating Municipal Wastewater Sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6663–6671. <https://doi.org/10.1128/AEM.00553-08>
- Stevens, T.O., McKinley, J.P., 1995. Lithoautotrophic Microbial Ecosystems in Deep Basalt Aquifers. *Science* 270, 450–455. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.450>
- Stevens, T.O., McKinley, J.P., Fredrickson, J.K., 1993. Bacteria associated with deep, alkaline, anaerobic groundwaters in Southeast Washington. *Microbial Ecology* 25. <https://doi.org/10.1007/BF00182128>

- Stiff, M.J., Cartwright, N.G., Crane, R.I., 1992. ENVIRONMENTAL QUALITY STANDARDS FOR DISSOLVED OXYGEN 132.
- Strobel, G., Hagemann, B., Huppertz, T.M., Ganzer, L., 2020. Underground bio-methanation: Concept and potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 123, 109747. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109747>
- Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J., 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and environmental microbiology* 62, 625–630. <https://doi.org/10.1128/AEM.62.2.625-630.1996>
- SyDEV, 2020. Produire de l'hydrogene avec l'electricité des eoliennes de Vendee [WWW Document]. URL <https://www.sydev-vendee.fr/transition-energetique/mobilite-durable/hydrogene> (accessed 6.30.21).
- Takai, K., Horikoshi, K., 2000. Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5066–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.5066-5072.2000>
- Takai, K., Nakamura, K., Suzuki, K., Inagaki, F., Nealson, K.H., Kumagai, H., 2006. Ultramafics-Hydrothermalism-Hydrogenesis-HyperSLiME (UltraH<sup>3</sup>) linkage: a key insight into early microbial ecosystem in the Archean deep-sea hydrothermal systems. *Paleontological Research* 10, 269–282. <https://doi.org/10.2517/prpsj.10.269>
- Tarasov, B.P., Fursikov, P.V., Volodin, A.A., Bocharnikov, M.S., Shimkus, Y.Y., Kashin, A.M., Yartys, V.A., Chidziva, S., Pasupathi, S., Lototsky, M.V., 2021. Metal hydride hydrogen storage and compression systems for energy storage technologies. *International Journal of Hydrogen Energy* 46, 13647–13657. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.07.085>
- Tarkowski, R., 2019. Underground hydrogen storage: Characteristics and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 105, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.051>
- Taubert, M., Vogt, C., Wubet, T., Kleinsteuber, S., Tarkka, M.T., Harms, H., Buscot, F., Richnow, H.-H., von Bergen, M., Seifert, J., 2012. Protein-SIP enables time-resolved analysis of the carbon flux in a sulfate-reducing, benzene-degrading microbial consortium. *The ISME Journal* 6, 2291–2301. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.68>
- Thauer, R.K.Y. 1998, 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson:1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology* 144, 2377–2406. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-9-2377>
- Torrijos, M., 2016. State of Development of Biogas Production in Europe. *Procedia Environmental Sciences* 35, 881–889. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.043>
- Tout savoir sur l'hydrogène [WWW Document], 2021. . IFPEN. URL <https://www.ifpenergiesnouvelles.fr/enjeux-et-prospective/decryptages/energies-renouvelables/tout-savoir-lhydrogene> (accessed 7.10.21).
- Trouvé, T., Sauvage, E., Mockly, D., Chambon, P., Noé, J.M., Roche Vu Quang, S., Mack, M., Ferré, F., Schnell, B., 2019. Conditions techniques et économiques d'injection d'hydrogène dans les réseaux de gaz naturel. GRTgaz - GRDF - Téréga - Storengy - Géométhane - Elengy - GDS - Régaz-Bordeaux - SPEGNN.
- Trulli, E., Morosini, C., Rada, E., Torretta, V., 2016. Remediation in Situ of Hydrocarbons by Combined Treatment in a Contaminated Alluvial Soil due to an Accidental Spill of LNAPL. *Sustainability* 8, 1086. <https://doi.org/10.3390/su8111086>
- Ulrich, G., Bower, S., 2008. Active methanogenesis and acetate utilization in Powder River Basin coals, United States. *International Journal of Coal Geology* 76, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2008.03.006>
- Ulrich, G.A., Martino, D., Burger, K., Routh, J., Grossman, E.L., Ammerman, J.W., Suflita, J.M., 1998. Sulfur Cycling in the Terrestrial Subsurface: Commensal Interactions, Spatial Scales, and Microbial Heterogeneity. *Microb Ecol* 36, 141–151. <https://doi.org/10.1007/s002489900101>
- Urriza-Arsuaga, I., Bedoya, M., Orellana, G., 2019. Luminescent sensor for O<sub>2</sub> detection in biomethane streams. *Sensors and Actuators B: Chemical* 279, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.108>

- Van de Vossenberg, J.L.C.M.V.D., Ubbink-Kok, T., Elferink, M.G.L., Driessen, A.J.M., Konings, W.N., 1995. Ion permeability of the cytoplasmic membrane limits the maximum growth temperature of bacteria and archaea. *Molecular Microbiology* 18, 925–932. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.18050925.x>
- Vogel, T.M., Grbìc-Galic, D., 1986. Incorporation of Oxygen from Water into Toluene and Benzene during Anaerobic Fermentative Transformation. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 200–202. <https://doi.org/10.1128/AEM.52.1.200-202.1986>
- Vogt, C., Kleinstaub, S., Richnow, H.-H., 2011. Anaerobic benzene degradation by bacteria: Anaerobic benzene degradation by bacteria. *Microbial Biotechnology* 4, 710–724. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00260.x>
- Vu, H.P., Black, J.R., Haese, R.R., 2018. The geochemical effects of O<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub> as CO<sub>2</sub> impurities on fluid-rock reactions in a CO<sub>2</sub> storage reservoir. *International Journal of Greenhouse Gas Control* 68, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2017.11.001>
- Wagner, M., Roger, A.J., Brusseau, G., Stahl, D.A., 1998. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *Journal of Bacteriology* 180, 2975–2982.
- Wang, F., Lu, S., Orcutt, B.N., Xie, W., Chen, Y., Xiao, X., Edwards, K.J., 2013. Discovering the roles of subsurface microorganisms: Progress and future of deep biosphere investigation. *Chinese Science Bulletin* 58, 456–467. <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5358-x>
- Wang, Y., Qian, P.-Y., 2009. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS ONE* 4, e7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
- Wanner, P., Aravena, R., Fernandes, J., Ben-Israel, M., Haack, E.A., Tsao, D.T., Dunfield, K.E., Parker, B.L., 2019. Assessing toluene biodegradation under temporally varying redox conditions in a fractured bedrock aquifer using stable isotope methods. *Water Research* 165, 114986. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114986>
- Weelink, S.A.B., van Eekert, M.H.A., Stams, A.J.M., 2010. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 9, 359–385. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9219-2>
- Wei, N., Li, X., Wang, Y., Zhu, Q., Liu, S., Liu, N., Su, X., 2015. Geochemical impact of aquifer storage for impure CO<sub>2</sub> containing O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>: Tongliao field experiment. *Applied Energy* 145, 198–210. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.017>
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697–703. <https://doi.org/10.1128/JB.173.2.697-703.1991>
- Wellinger, Murphy, Baxter, 2013. *The biogas handbook, Science, Production and Applications*.
- Whitman, W.B., Bowen, T., Boone, D., 2006. *The methanogenic bacteria. The prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, eds M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, H. Schleifer and E. Stackebrandt (New York: Springer).
- WIDDEL, F., 1988. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. 469–585.
- Widdel, F., Bak, F., 1992. Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria, in: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp. 3352–3378. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1_21)
- Wilson, J.T., Adair, C., White, H., Howard, R.L., 2016. Effect of Biofuels on Biodegradation of Benzene and Toluene at Gasoline Spill Sites: J. T. Wilson et al. *Groundwater Monitoring & Remediation* XX, no. XX: XX-XX. *Groundwater Monitoring & Remediation* 36, 50–61. <https://doi.org/10.1111/gwmr.12187>
- Wilson, L.P., Bouwer, E.J., 1997. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18, 116–130. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900288>
- Winograd, I.J., Robertson, F.N., 1982. Deep Oxygenated Ground Water: Anomaly or Common Occurrence? *Science* 216, 1227–1230. <https://doi.org/10.1126/science.216.4551.1227>

- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *PNAS* 87, 4576–4579.
- Worman, S.L., Pratson, L.F., Karson, J.A., Klein, E.M., 2016. Global rate and distribution of H<sub>2</sub> gas produced by serpentinization within oceanic lithosphere: H<sub>2</sub> FORMATION IN OCEAN LITHOSPHERE. *Geophysical Research Letters* 43, 6435–6443.  
<https://doi.org/10.1002/2016GL069066>
- Wu, W.-M., Jain, M.K., de Macario, E.C., Thiele, J.H., Zeikus, J.G., 1992. Microbial composition and characterization of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 282–290.  
<https://doi.org/10.1007/BF00174484>
- Yekta, A.E., Pichavant, M., Audigane, P., 2018. Evaluation of geochemical reactivity of hydrogen in sandstone: Application to geological storage. *Applied Geochemistry* 95, 182–194.  
<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2018.05.021>
- Yu, G., Fadrosch, D., Goedert, J.J., Ravel, J., Goldstein, A.M., 2015. Nested PCR Biases in Interpreting Microbial Community Structure in 16S rRNA Gene Sequence Datasets. *PLOS ONE* 10, e0132253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132253>
- Yuan, Y., Conrad, R., Lu, Y., 2009. Responses of methanogenic archaeal community to oxygen exposure in rice field soil: Response of methanogens to aeration in rice soil. *Environmental Microbiology Reports* 1, 347–354. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00036.x>
- Zettlitzer, M., Moeller, F., Morozova, D., Lokay, P., Würdemann, H., 2010. Re-establishment of the proper injectivity of the CO<sub>2</sub>-injection well Ktzi 201 in Ketzin, Germany. *International Journal of Greenhouse Gas Control* 4, 952–959.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2010.05.006>
- Zhang, X., 2015. Bacteria in the injection water differently impacts the bacterial communities of production wells in high-temperature petroleum reservoirs. *Frontiers in Microbiology* 6, 8.

## *Annexe*

---





---

Draft paper

# **Deep continental aquifer downhole sampler for microbiological studies**

**Magali Ranchou-Peyruse<sup>1,2,3</sup>, Marion Guignard<sup>1</sup>, Perla G. Haddad<sup>2</sup>, Sylvain Robin<sup>4</sup>,  
Fabrice Boesch<sup>4</sup>, Maud Lanot<sup>4</sup>, Hervé Carrier<sup>5</sup>, David Dequidt<sup>6</sup>, Pierre Chiquet<sup>7</sup>,  
Guilhem Caumette<sup>7</sup>, Pierre Cézac<sup>2,3</sup> et Anthony Ranchou-Peyruse<sup>1,3</sup>.**

<sup>1</sup> Université de Pau & Pays Adour/ E2S-UPPA, CNRS, IPREM, Pau, France.

<sup>2</sup> Université de Pau & Pays Adour/ E2S-UPPA, LaTEP, Pau, France.

<sup>3</sup> Joint Laboratory SEnGA, UPPA-E2S-Teréga, Pau, 64000, Pau, France.

<sup>4</sup> Modis, Pau, France.

<sup>5</sup> Université de Pau & Pays Adour/ E2S-UPPA, CNRS, TOTAL, LFCR, Pau, France.

<sup>6</sup> STORENGY – Geosciences Department, Bois-Colombes, France.

<sup>7</sup> Teréga – 40 Avenue de l'Europe, CS 20 522, 64010 Pau, France.

\*Correspondence : [anthony.ranchou-peyruse@univ-pau.fr](mailto:anthony.ranchou-peyruse@univ-pau.fr)

Phone : +33 540 145 164

## I- Abstract

In order to be effective, microbiological studies of deep aquifers must be free from surface contaminants (soil) and infrastructures allowing access to formation water (wells, wellheads). Many microbiological studies are based on water samples obtained after more or less rinsing of the pipe without guaranteeing the absence of contaminants (biofilms). The protocol described in this paper presents the adaptation for microbiological studies of deep aquifers of a commercial downhole sampler (Positive Displacement Sampler, PDSshort, Leutert, Germany) used until now for physicochemical and analytical chemistry studies (determination of dissolved gases, isotopy, etc.). Analyzes of taxonomic diversity based on high-throughput sequencing of the bacterial *16S rRNA* gene were compared and discussed for different water samples taken at the surface at the wellhead (WHS) or at depth using the downhole sampler (DS). Here, the results show even after extensive rinsing, the water collected is not free of contaminants and the downhole sampler procedure is the only way to ensure the purity of the sampled water samples.

**Keywords :** deep aquifer, downhole sampler, UGS

## II- Introduction

The latest estimates of the volume represented by all the world's aquifers included in the first two kilometers of the crust reach 22.6 million km<sup>3</sup>, while the total volume of fresh surface water is estimated at only 100,000 km<sup>3</sup> (Gleeson et al., 2015). Beyond the deep aquifers, the deep continental environments are assumed to harbor an important (given the size of the compartment) and diversified microbial life. In 2018, Magnabosco and her collaborators published a review compiling microbial concentration and diversity data from 3,800 continental subsurface studies, a third of which came from groundwaters. The authors estimated that this deep continental biomass could represent 23 to 31 Pg of carbon C, hundreds of times more than humanity as a whole.

Unlike surface ecosystems, the study of continental aquifers in general, and especially those several hundred meters deep, is complicated (access difficulties, safety, rare sampling sites) and often involves water sampling via a drilled well (steel pipe that can exceed one kilometer in depth). In order to limit the contamination inherent in the well, most standard sampling protocols involve at least a purge of 1 (Garvis and Stuermer, 1980), 2 (Pionke and Urban, 1987), or even 3 to 5 bore volumes (Sundaram et al., 2009; Smith et al., 2012). In 2005, Basso and her co-authors published a study on the procedure for cleaning an 800-meter-deep well before sampling the formation water to study microbial biodiversity. This work has shown that purging alone, however long it may be, could not guarantee the non-contamination of the samples by microorganisms developing in biofilm colonizing the surfaces of the well. The proposed procedure involved a very large purge throughout the various stages (more than 25 times the volume of the tubing), mechanical cleaning in order to tear off the biofilms, as well as three injections of chlorine (4 liter with 9.6% active chlorine solution ) to the bottom of the well before being eliminated by the purged water thus avoiding its injection into the aquifer. During our studies, this procedure was applied on 11 different sites and gave rise to several published research works (Basso et al., 2005; Basso et al., 2009; Klouche et al., 2009; Berlendis et al. , 2010; Aullo et al., 2016; Ranchou-Peyruse et al., 2017; Ranchou-Peyruse et al., 2021). Although this procedure is very effective, it remains very technical and involves around ten people for ten days, as well as the setting up of a site (Wireline Combi Unit, evacuation of purged water, etc.) which requires a very close collaboration with the manager of the well and a substantial but necessary financial investment when an industrialist intends to create a gas storage for several decades or to assess its evolution.

Here, the new sampling procedure that we present uses a commercial downhole sampler (Positive Displacement Sampler, PDSshort, Leutert, Germany) which has already been used to sample and maintain fluids at background pressure in order to study the isotopic compositions of saline formation waters and dissolved gases (Regenspurg et al., 2010; Kietäväinen et al. 2012; Kampman et al., 2013; Feldbusch et al., 2018). In the context of a microbiological study, the only example we have in the context of deep continental aquifers used another older model of sampler (Sampler Model 60', Leutert) in order to study the community microbial evolving in the water of formation of an aquifer used for the storage of town gas in Lobodice (Czech Republic) in the early 1990s' (Šmigán et al., 1990). We will present the procedure for preparing and using a sampler in order to take a sample of formation water that meets microbiological criteria via a control well of a deep aquifer (-597 m) used for the storage of natural gas. Bacterial taxonomic diversity was monitored at the wellhead throughout the procedure, as well as from the water collected using two samplers sent successively to the bottom of the well.

### III- Materials and Methods

#### III.1- Sampling site

The sample was taken from the AB\_L\_1 control well of an aquifer used for the storage of natural gas in the Aquitaine basin (southwest of France) in January 2019. This well has already been the subject of a study published as part of a diversity analysis of sulfato-reducing and methanogenic microorganisms from several French natural gas storage facilities in deep aquifers (Ranchou-Peyruse et al., 2019). The well descends to a depth of 597 m and the pipeline has an estimated volume of 7.6 m<sup>3</sup>. The formation water evolves in a geological level dating from the Eocene-Lutetian which consists of infra-molassic sands with a sandy detrital facies (Sandstone to Nummulites). The pressure at the bottom was estimated at around 69 bar and fluctuates depending on the storage activity, which can rise to 3 GNm<sup>3</sup> of stored gas. At the time of sampling, the well was artesian and was located approximately 250 meters from the stored natural gas. Throughout the sampling procedure, a purged water flow rate of 10 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> was maintained in order to guarantee the non-contamination of the sample by pieces of biofilm torn from the surface of the pipe during the descent of the sampler.

#### III.2- Description of the downhole sampler

In order to avoid contamination by biofilms developing on the surfaces of the well, a LEUTERT One Phase Sampler OPS sampler was used during a one day sampling campaign (Figure 1A). With a length of 4.63m and a diameter of 43mm, the sampler is made of stainless steel according to NACE MR-01-75 and bronze alloy. It operates up to 1034bar and 180 °C.

Among its advantages, this sampler has a steam-sterilizable sampling chamber which opens and closes only at the depth to be sampled, thus making it possible to obtain a representative sample of the target environment. On the other hand, in our study context, it makes it possible to work in an ATEX zone. Indeed, it is completely mechanical and without any source that can generate a spark or energy that can cause an explosion. Practically, the sampler is composed of three compartments:

The upper compartment is filled with nitrogen and it is mechanically isolated from the other compartments of the tool until the piston, at the end of its stroke (at the end of sampling), activates a set of linkages allowing: the closure of the compartment of the sample, sealing the connection between the air compartment and the sample compartment, connecting the nitrogen compartment with the sample compartment via the working piston. This connection allows the fluid in the nitrogen compartment to exert a pressure force on the downstream face of the piston once the sample has been taken. This force ensures that the sample is maintained under a minimum pressure close to the pressure imposed on the nitrogen compartment at the surface. The middle compartment keeps the piston in its low position until the opening of the channel connecting the sample compartment and the air compartment. This connection is done mechanically at the end of the countdown programmed on the clock/mechanical actuator. Finally, the lower compartment, 600 cm<sup>3</sup>, collects the water sample.

#### IV- Preparation of the sample to collect the microorganisms

In laboratory, classic assembly procedure with cleaning and degreasing of all parts in contact with the sample and disinfection with alcohol at 70°. Each operation that may lead to contamination from the external environment will be the subject of cleaning with alcohol and precautions to avoid any contact until it is introduced into the well. Then everything is rinsed with sterile water. After inserting a few tens of milliliters of distilled water, the water collection chamber is then sterilized for 2 hours at 125°C using an enveloping jacket with a heating resistance. (Supplementary Figure S1). Finally, the timer releases a mechanical system allowing the piston to go up. The latter, coming to a stop, triggers the opening of the pressurized gas responsible for maintaining the pressure of the collected sample and at the same time closing the inlet orifices of the sampling chamber. The operating ranges with different time steps can be from 15min to 5h for this model but also go up to 10h or 24h.

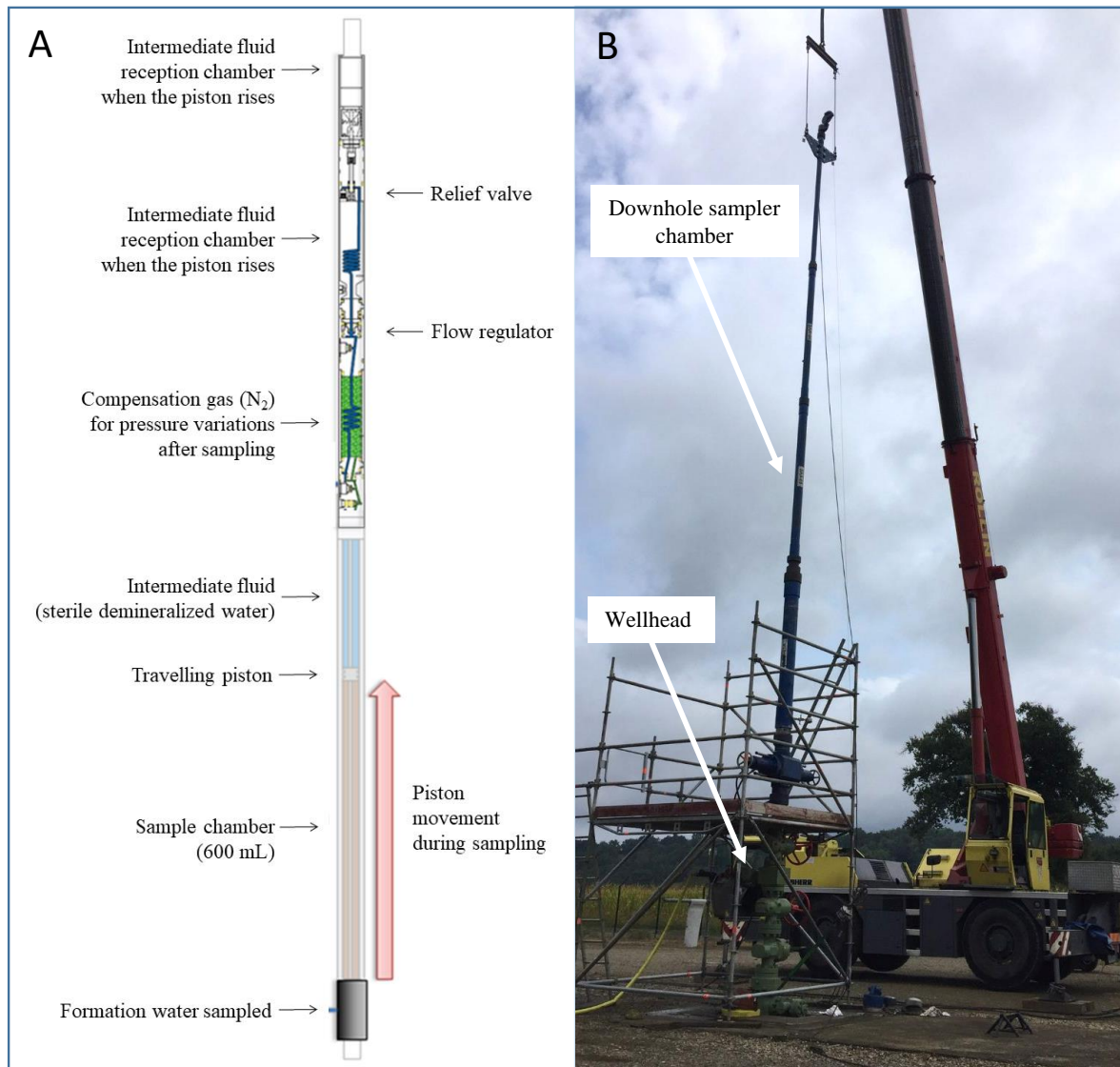


Figure 1 : Use of the LEUTERT OPS down hole sampler to collect microorganisms from a deep aquifer. A) Descriptive diagram of the downhole sampler; B) Deployment of the sampler on site: the sampler is inserted into a chamber. Then, the chamber is connected to the well head before it is opened and the sampler descends into the well.

#### IV.1- Performing on-site sampling

In order to allow the descent of the sampler with a crane along the control well, the downhole is previously inserted into a chamber (Figure 1B). Once the sampler has been lowered to the desired depth, the fluid to be sampled exerts a pressure force on the upstream surface of the piston. This pressure is then transmitted to the intermediate fluid. When the connection between the air compartments and the sample is opened, the intermediate fluid is then "pushed" towards the air compartment. A flow regulator adds a calibrated pressure drop to control the transfer rate and therefore the speed of sample collection. When the fluid to be sampled occupies the entire dedicated compartment, *i.e.* 600 cm<sup>3</sup>, the nitrogen compartment then

containing the nitrogen and the intermediate fluid is mechanically isolated from the other components of the tool. During the ascent and once at the surface, the bottom pressure is maintained inside the sampler with a slight modification linked to the change in temperature. During this sampling campaign, two down hole samplers were used approximately two hours apart. Back to the laboratory, the water sample can then be transferred under pressure in a reactor or in a pressurized-cell until use; or be depressurized in order to be analyzed.

#### IV.2- Depressurization of the sample

It is necessary that the rate of depressurization be controlled so as not to lyse the microbial cells. To this end, it is necessary to install a pressure sensor on the filling opening of the nitrogen chamber. All connections, tubes and flasks which are in contact with the water collection chamber and with the collected water must have been sterilized beforehand via steam-sterilization, high temperature overnight or cleaning with ethanol 70°. Because deep aquifers are anoxic environments, the flasks used to collect water and microorganisms must be anoxic, here the air has been replaced by nitrogen before sterilization. The valve of the outlet of the sampling chamber is slowly open in order to balance the two upstream/downstream pressure taps without creating a depressurization shock that could lead to the death of bacteria contained in the sample. A gradual purging of nitrogen must be carried out from the transfer cylinder pressure compensation chamber, ideally within one to two hours. When the sample has dropped to about 5 bar, harvest in sterile glass bottles fitted with an overpressure escape filter.

#### IV.3- Biomass filtration and nucleic acids extraction

One hundred milliliters of the formation waters sampled using the two down hole samplers and four 1L flasks of the wellhead waters were filtered with 0.22 µm porosity filters (Cellulose nitrate filter, Sartorius Stedim) for the diversity analyzes. Subsequently, the eluate was filtered a second time with filters of porosity 0.1 µm (Polyethersulfone filter, Sartorius Stedim). Each filter was stored at -80°C until use to conserve nucleic acids. The filters were then ground in a mortar with liquid nitrogen. All of the nucleic acids were extracted with the Fast RNA Pro-Soil (MP Bio) kit following the manufacturer's instructions until the nucleic acids elute. Then the DNA and RNA extracted were separated with the All Prep DNA / RNA kit (QIAGEN). For this study, we were only interested in the DNA study. DNA concentrations were quantified with the Qubit fluorometer (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA).



#### IV.4- Nested PCR and high throughput sequencing

For each sample, the V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified by nested PCR (Yu et al., 2015) with the PCR CORE kit (Roche). The primers used to target this region were 8F/1489R (Weisburg et al., 1991) then 344F\_5'-ACGGRAGGCAGCAG-3' and 801R\_3'-TACCAGGGTATCTAATCCT-5'. The 344F/801R primers contain the adapters 5'-CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' and 3'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-5' to achieve high throughput sequencing. High-throughput sequencing was performed by the GenoToul genomic platform (Toulouse, France) which uses Miseq Illumina 2 x 250 bp technology, according to the manufacturer's protocol. The sequencing data were then processed via the FROGS analysis pipeline (version) developed by the GenoToul genomic platform in the Galaxy interface (Escudié et al., 2018) using Flash to merge paired-end reads (Magoc and Salzberg, 2011), Swarm for sequence clustering (Mahé et al., 2014), VSEARCH with *de novo* UCHIME method to eliminate chimeras (Edgar et al., 2011; Rognes et al., 2016).

#### IV.5- Cell counts and microscopy

Proportions of living and dead cells were determined by epifluorescence microscopy with the LIVE/DEAD BacLight Bacterial viability kit (ThermoFisher Scientific), as described by the supplier. Briefly, 10 ml of formation water was spiked with 150µL of SYTO9 and 25µL of Propidium Iodide. After incubation in the dark for 15 minutes, the water was filtered through 0.2µm pore-size black polycarbonate (Millipore) under vacuum. To our knowledge, there are no such filters with a porosity of 0.1µm, which explains the absence of this analysis. The microscope used was Zeiss Observer.Z1c epifluorescence microscope equipped with a mercury light source.

### V- Results and Discussion

Surface or deep aquifers represent sites of great value for territories both for water resources (potability, irrigation) and for participating in the energy transition (energy storage, geothermal energy) or carbon sequestration in a greenhouse gas reduction approach (CCUS). However, these environments contain a microflora in equilibrium with the liquid, solid and even gaseous phases, as in the case of our study. The microorganisms present, whether native or non-native, can be involved in natural or stimulated bioattenuation processes (hydrocarbons, pesticides, chlorinated solvents...) or can be used to reduce the concentration of contaminants such as nitrate (Lueders, 2017; Aldas-Vargas et al., 2021; Matteucci et al., 2015; Calderer et al., 2010). More fundamentally, deep environments, especially deep aquifers, represent one of

the last frontiers on Earth. The latest studies carried out as part of the Deep Carbon Observatory program (<https://deepcarbon.net/>) have clearly shown that a detailed and exhaustive understanding of the carbon cycle requires taking these environments into account (Magnabosco et al., 2018). It is obvious that the next years will see a proliferation of studies of the impact of climate change on these ecosystems, even the deepest: decrease in water reserves and their quality, bio-attenuation and facilitated biodegradation, recharging process artificially facilitated, etc. Sampling is the starting point for all microbiological studies and therefore a key step. The difficulty of access to aquifers, in particular the deepest, means the vast majority of their studies involve the withdrawal of formation water *via* surface installations, or wellheads, control or operating wells. The conditions in these pipes are different from the aquifer: open system rather than microporous, metal alloys, oxygen, grease for pipe maintenance, contamination by surface ecosystems, etc. Microbiologists therefore go through rinsing steps with the intensity, duration and volume of which remain quite empirical and fluctuate according to the studies without sampling preparation or with different purge volume (Garvis and Stuermer, 1980; Pionke and Urban, 1987; Sundaram et al., 2009; Smith et al., 2012; Gründger et al., 2015; Frank et al., 2016).

In 2005, Magot and his collaborators developed a very strict sampling protocol to reduce the risk of contamination to a minimum and to guarantee the microbiological quality of the formation water taken from several hundred meters deep. This protocol was subsequently applied several times and was the basis of several studies published in recent years (Basso et al., 2009; Berlendis et al., 2010; Aüllo et al., 2016; Ranchou-Peyruse et al. ., 2018; Ranchou-Peyruse et al., 2021). In addition to the quality of the sample, this technique has the advantage of having no restrictions on the volume of water to be withdrawn after the well cleaning protocol is completed. However, the technical difficulty of setting it up and the costs involved mean that few microbiological studies have used it for obvious reasons. At the same time, molecular and cultural approaches have undergone numerous developments, leading researchers to be able to work on increasingly reduced sample volumes, or even in single cells. We can cite for example the approaches Single-cell metagenomics, laser microdissection microscopy & single-cell PCR, or single-cell cultivation techniques. (Ishii et al., 2010; Labonté et al., 2015; Pisapia et al., 2017; Hershey et al., 2018).

Today, down hole-sampling approaches appear to be the most relevant for ensuring the purity of water samples and their microbial communities. The use of a downhole sampler is common in the field of geosciences in the broad sense to collect samples of fluids such as water, dissolved or not gas, oils, etc. in order to analyze their physicochemical or isotopic composition (Rivard et al., 2018; Struchkov & Rogachev, 2018; Banks et al., 2019; Osselin et al., 2019). It is less in the context in the field of continental deep microbiology. We present in this work our experience with a bottom sampler model developed by LETERT (PDS<sup>short</sup>, Leutert, Germany).

In January 2019, two down hole samplers were deployed consecutively on the Ab\_L\_1 control well of a storage aquifer located in southwest France. The well was 582 meters deep and drained a formation water circulating in an Eocene (Lutetian) layer composed mainly of sands and a little calcite at 60bar and 36°C. Prior to the sampling campaign, the sampler, as well as all the stainless steel connections and the dishes, were sterilized by heat in the laboratory. When installing the sampler in the well chamber (Figure 1B), centralizers were also positioned to prevent the sampler from coming into contact with the walls of the chamber and the well at all times during descent. The design of the sampler without any electronics (opening and closing of the sampler *via* a mechanical clock) makes it possible to work in complete safety while respecting ATEX standards (Explosive Atmospheres), sinequanone conditions for working on sites close to methane storage.

Throughout the procedure, the well was in artesian conditions with a water flow rate maintained at  $10 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  allowing the evacuation of any piece of biofilm or any particle possibly torn off during the descent of the sampler. Taking into account the flow rate as well as the volume of the well, the rise of 582 meters by a microbial cell from the deep aquifer represents a depressurization of 60bar at atmospheric pressure in 46 minutes, or  $1.3 \text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$ . It is still difficult to assess the impact of this depressurization on the physiological state of microorganisms. We estimate that this depressurization could explain the high percentages of dead cells ranging from 28% to 54% of the community for samples WHS1, 2, 3 and 4 (Figure 2). The two samplers experienced different depressurization speeds with  $1 \text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$  and  $\approx 0.2 \text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$  for DS1 and DS2, respectively. The higher cell mortality in the case of the DS1 sampler confirms this first hypothesis and the comparison with the results obtained in the case of DS2 validates a depressurization rate of around  $0.2 \text{ bar} \cdot \text{min}^{-1}$ . Likewise, the lowest apparent cellular concentrations for water taken directly from the wellhead (between  $1.63 \cdot 10^4 \pm 4.4 \cdot 10^3 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $4.36 \cdot 10^4 \pm 2.05 \cdot 10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) compared to those taken with the sampler (DS1:  $2.33 \cdot 10^5 \pm 7.19 \cdot 10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$  and DS2:  $6.34 \cdot 10^5 \pm 2.05 \cdot 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), could find an explanation in the lysis of the cell membrane more sensitive to depressurization which has led

to the dispersion of genomic material outside the cell and making it impossible to count these cells by cells by fluorescent nucleic acid stains (Syto9 and Propidium Iodide). Regarding the water samples sampled at the wellhead, the bore volumes debited before sampling corresponded to more than 1 ( $1 \times 7.6 \text{ m}^3$  of well volume  $< 11.3 \text{ m}^3$  of water discharged), 3 ( $22.8 \text{ m}^3 < 27.7 \text{ m}^3$ ), 5 ( $38 \text{ m}^3 < 39 \text{ m}^3$ ) and 7 ( $53.6 \text{ m}^3 < 57.3 \text{ m}^3$ ) for WHS1, WHS2, WHS3 and WHS4, respectively (Figure 2). Despite the volumes of water discharged throughout the sampling day, the betadiversity analysis clearly shows a difference between the microbial communities sampled at the wellhead and those sampled using the downhole sampler (Figure 3A and B) and this even after 7 bore volumes discharged.

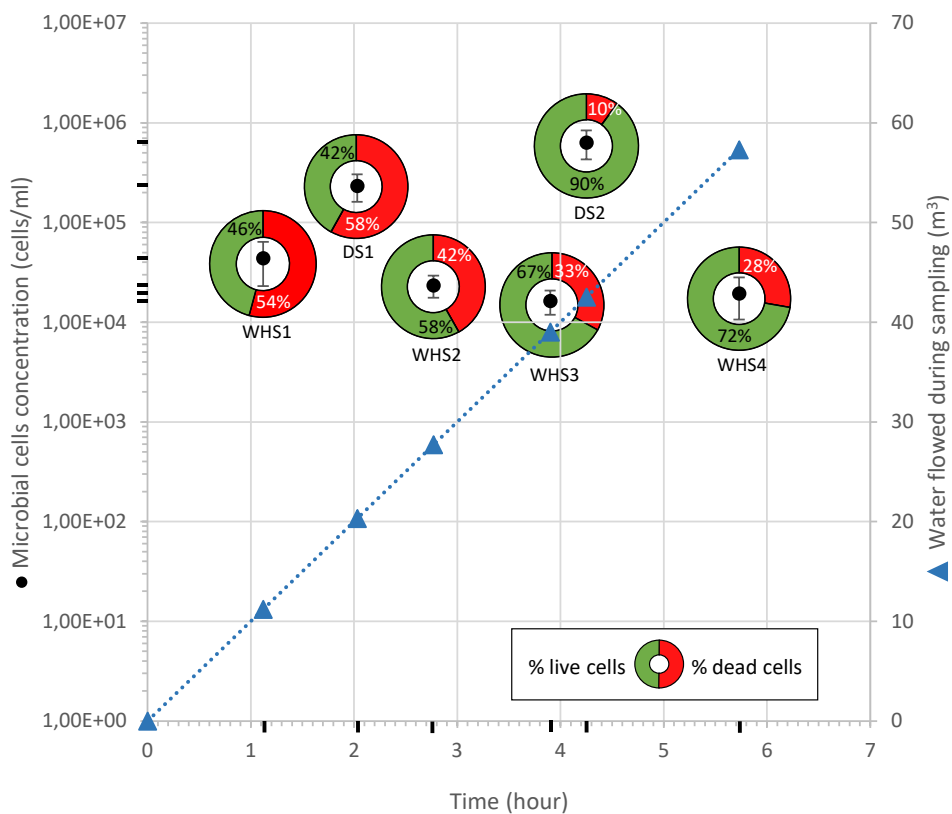


Figure 2 : Enumeration and cell survival during the sampling campaign. Black circles represent total cell counts. For each of these counts, the proportion of cells with intact membranes, qualified as living cells, are represented in green; while the part of cells with lysed membranes, qualified as dead cells, are shown in red. As the well is artesian throughout the procedure, the volume of water purged is also represented with the blue triangles. DS: Down hole Sampling; WHS: Well Head Sampling.

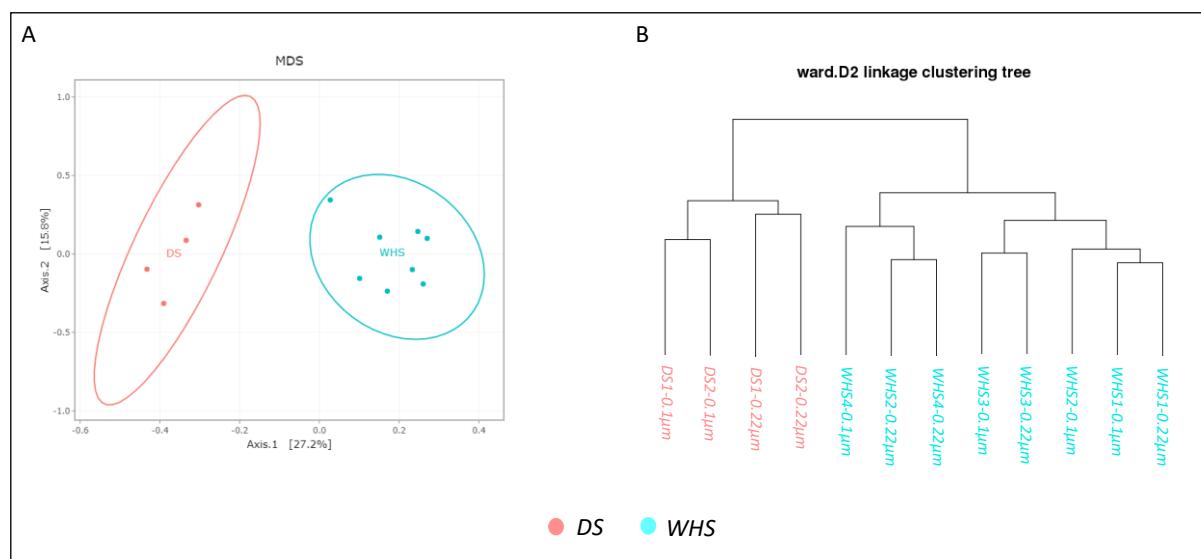
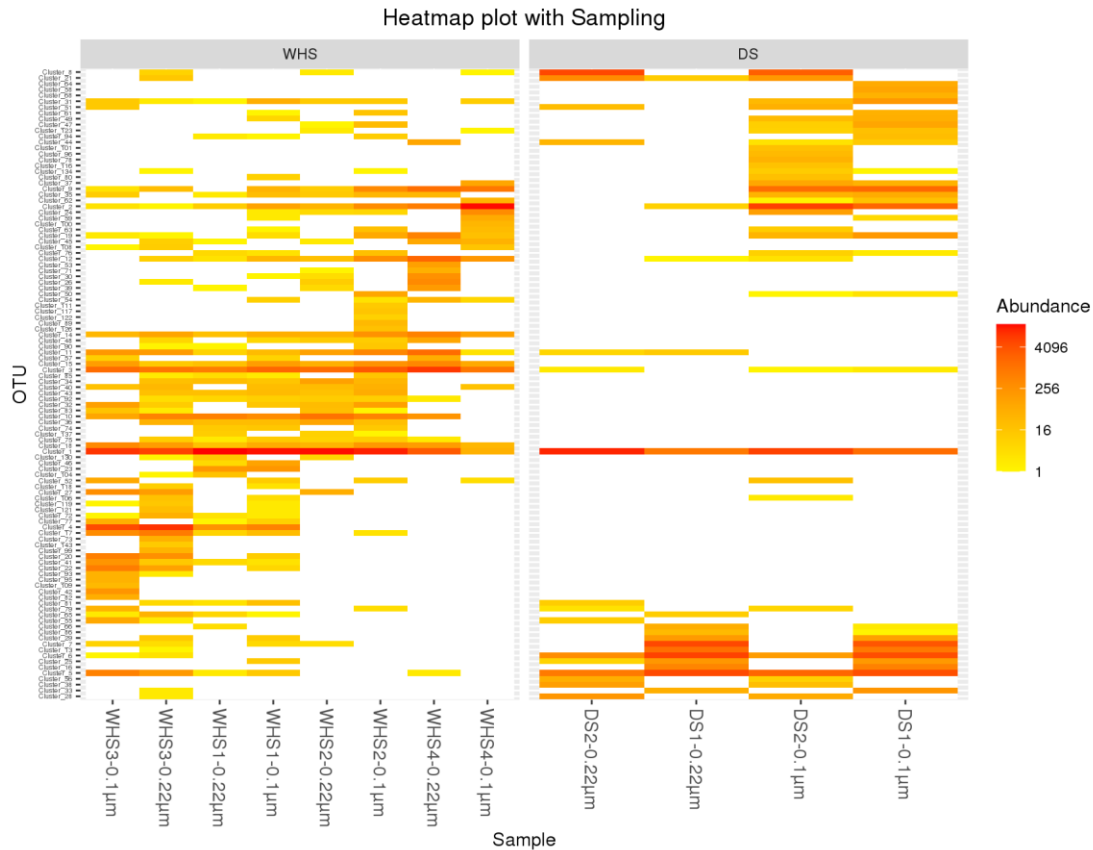


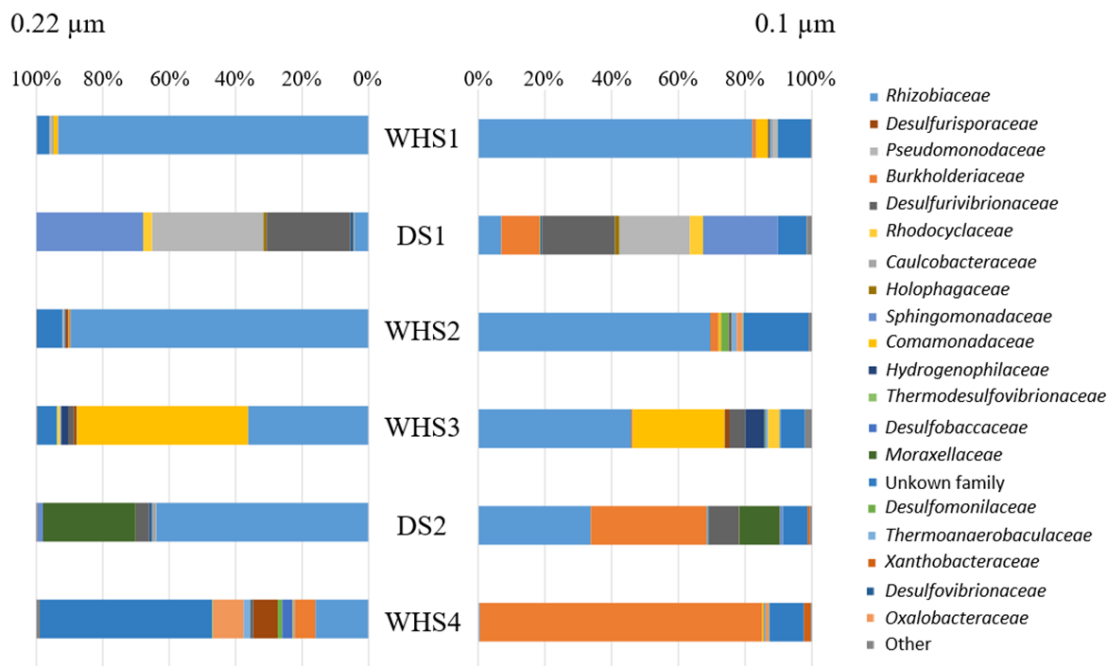
Figure 3: Jaccard's analysis of beta-diversity of the bacterial communities between different formation water samples from the downhole sampler (DS, in red) and the wellhead sampler (WHS, in blue). The deep aquifer bacterial community was obtained by « 0.22µm filtration » or « 0.1µm filtration from 0.22µm-eluate ».

The low concentrations often encountered in these environments make it necessary to filter the biomass in order to concentrate it for molecular or even cultural approaches (Basso et al., 2005; Trias et al., 2017; Guðmundsdóttir et al., 2019). It is known that living in a deep environment promotes cell shrinkage in order to reduce the metabolisms and the needs of microorganisms in an environmental context of extreme oligotrophy (Miyoshi et al., 2005; Luef et al., 2015; Wu et al., 2016). At the same time, the use of filters with a porosity of 0.1 µm as recommended in this work is not necessarily easy when filtering water that may be loaded with mineral particles, in particular metal sulfides. Continuing to rely on betadiversity, there is no difference between the microbial communities according to the filtration porosity on the water collected at the wellhead. On the other hand, an effect seems to be noted in the case of the bacterial communities coming from the water sampled *via* the down hole samplers, suggesting an effect of the pipe masking a possible effect of cell size. Regarding the microbial communities, the analysis of the different taxonomic diversities based on the 16S rRNA gene (V3-V4) by the heatmap representation (Figure 4) and the comparison representation of the dominant bacteria families (Figure 5) show a variability between the different water sampled at the wellhead (WHS) or in the samplers (DS) which could be explained by an expected heterogeneity of the microbial community throughout the sampling. The aquifer, which is homogeneous in its overall constitution and characterized as infra-molassic sands, presents a certain heterogeneity on a more local scale with in particular the presence of calcite, clay and iron sulphides (Haddad et al., submitted). Obviously, the longer the sampling, and the volume

discharged, the further the populations sampled are from the well. With a flow rate of  $10 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ , the formation water circulating in the sands of the aquifer with a porosity between 25 and 35% (Ranchou-Peyruse et al., 2019) can come from several meters around the well, approximately 3 to 4 m by imagining a sphere of influence centered on the strainers at the bottom of the well. However, it appears that there were 53 OTUs which were only found in the water sampled at the wellhead and not in the samplers, but some were affiliated with microbial families found in the bottom samplers. Among these OTUs, only 22 were specific to the water taken at the wellhead. Some of these OTUs are affiliated with microorganisms found in biofilms growing on the surface of drinking water pipes, such as the *Comamonadaceae* families (*Aquabacterium* spp. and *Acidovorax* spp.), *Nitrospiraceae*, *Geobacteraceae*, etc. These OTUs are affiliated in particular with the families of *Rhizobiaceae*, *Burkholderiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Acidobacteriaceae* which are families regularly found in soils but which also appear in the taxonomic census of studies on deep environments. For example, members belonging to the *Comamonadaceae* family were identified in the waters of Outokumpu Deep Drill Hole (eastern Finland) or the sulphidic waters of Poland (Purkamo et al., 2016; Deja-Sikora et al., 2019). The *Comamonadaceae* family, as well as the *Desulfobulbaceae*, *Thermodesulfovibrionaceae*, *Syntrophaceae* (*Desulfomonile* spp. and *Desulfobacca* spp.), *Rhodocyclaceae* and *Thiobacillaceae* families are involved at different levels of the sulfur cycle and participate in sulfo-oxidation or sulfate-reduction. Several OTUs have been affiliated with sequences of uncultivated microorganisms found in ecosystems rich in hydrocarbons: *Clostridiaceae* and *Thiobacillaceae*. Finally, it is interesting to observe that certain families represent a not insignificant part of the bacterial communities of the aquifer and are found in a lesser proportion in the water taken at the wellhead: the families of *Sphingomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Desulfurivibrionaceae* and the *Moraxellaceae*. Several of these families are often considered as contaminants during surface samples from deep aquifers. This study shows that there is nothing of it and that these microorganisms can adapt and survive in anoxic oligotrophic conditions and without terminal electron acceptors such as nitrate.



**Figure 4 :** Heat map showing the distribution of bacterial OTUs between the formation water collected at the wellhead (WHS) or with the down hole samplers (DS), after a biomass concentration with filters with a porosity of “0.22µm” and “0.1µm from 0.22µm-eluate”.



**Figure 5 :** Comparison representation of the dominant bacteria families based on the 16S rRNA gene (V3-V4) in the four water sampled at the Well Head (WHS) and with the two Down Hole sampler (DS). To the left, taxonomic diversity results obtained from the biomass 0.22µm-filtered ; To the right, taxonomic diversity results obtained from the biomass 0.1µm-filtered from the 0.22µm-eluate.

## VI- Conclusions

The last few years have shown a significant increase in microbiological studies of the continental subsurface. In 2018, the study published by Magnabosco and her co-authors had a worldwide impact well beyond the community of microbiologists, and even scientists. This study was based in particular on numerous results acquired over the years on these deep environments. The quality of the samples and the guarantee that the results expressed represent the diversity of the deep subsurface and not the contamination of the well from the surface is essential. Doubt, when it exists, can classify certain microorganisms when they are found as contaminants, such as *Pseudomonadaceae*, and prevents microbiologists from looking for possible new metabolic pathways allowing them to be maintained in these environments. In this sense, the use of a downhole sampler, common in the study of deep oceanic microbial environments, must be democratized in the study of deep aquifers when wells represent the access. Here, a downhole sampler commonly used for geoscience studies has been successfully prepared to meet the specifics of a microbiological study. Just like in surface ecosystems, deep aquifers are also shaped by the living organisms that develop there. Ecosystem by nature oligotrophic and therefore poor in energy, their operations for the storage of energy or CO<sub>2</sub> modify their physicochemical conditions and can be the source of new nutrients and/or energy from increase the activity of anaerobic heterotrophs (sulfate-reducers), fermenters, or even hydrogenotrophs.

---



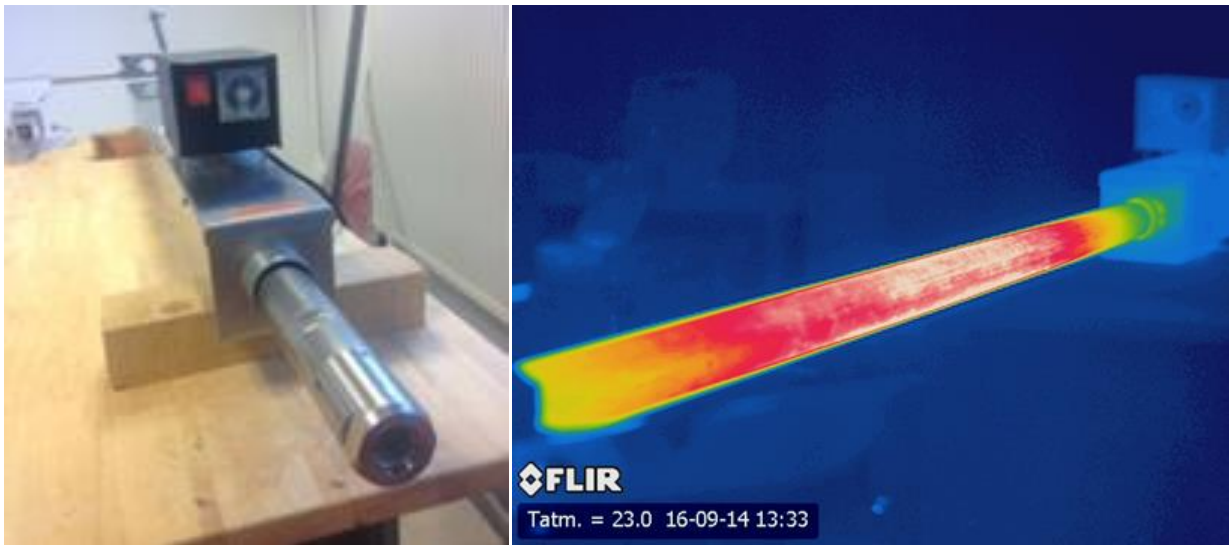
## Bibliography

- Aldas-Vargas A, van der Vooren T, Rijnaarts HHM, Sutton NB. *Biostimulation is a valuable tool to assess pesticide biodegradation capacity of groundwater microorganisms. Chemosphere. 2021 Oct;280:130793. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130793.*
- Aüllo T, Berlendis S, Lascourrèges JF, Dessort D, Duclerc D, Saint-Laurent S, Schraauwers B, Mas J, Patriarche D, Boesinger C, Magot M, Ranchou-Peyruse A. *New Bio-Indicators for Long Term Natural Attenuation of Monoaromatic Compounds in Deep Terrestrial Aquifers. Front Microbiol. 2016 Feb 9;7:122. doi: 10.3389/fmicb.2016.00122.*
- Banks, E. W., Hatch, M., Smith, S., Underschultz, J., Lamontagne, S., Suckow, A., & Mallants, D. (2019). *Multi-tracer and hydrogeophysical investigation of the hydraulic connectivity between coal seam gas formations, shallow groundwater and stream network in a faulted sedimentary basin. Journal of Hydrology, 578, 124132. doi :10.1016/j.jhydrol.2019.124132*
- Basso O, Lascourrèges JF, Jarry M, Magot M. *The effect of cleaning and disinfecting the sampling well on the microbial communities of deep subsurface water samples. Environ Microbiol. 2005 Jan;7(1):13-21. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00660.x.*
- Basso O, Lascourreges JF, Le Borgne F, Le Goff C, Magot M. *Characterization by culture and molecular analysis of the microbial diversity of a deep subsurface gas storage aquifer. Res Microbiol. 2009 Mar;160(2):107-16. doi: 10.1016/j.resmic.2008.10.010.*
- Berlendis S, Lascourreges JF, Schraauwers B, Sivadon P, Magot M. *Anaerobic biodegradation of BTEX by original bacterial communities from an underground gas storage aquifer. Environ Sci Technol. 2010 May 1;44(9):3621-8. doi: 10.1021/es100123b.*
- Calderer M, Gibert O, Martí V, Rovira M, de Pablo J, Jordana S, Duro L, Guimerà J, Bruno J. *Denitrification in presence of acetate and glucose for bioremediation of nitrate-contaminated groundwater. Environ Technol. 2010 Jun;31(7):799-814. doi: 10.1080/09593331003667741.*
- Deja-Sikora E, Gołębiewski M, Kalwasińska A, Krawiec A, Kosobucki P, Walczak M. 2019. *Comamonadaceae OTU as a remnant of an ancient microbial community in sulfidic waters. Microb Ecol 78:85–101.*
- Edgar, R.C. et al. (2011) *UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics, 27, 2194–2200.*
- Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. *FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinformatics. 2018 Apr 15;34(8):1287-1294. doi: 10.1093/bioinformatics/btx791.*
- E. Feldbusch, T. Wiersberg, M. Zimmer, S. Regenspurg *Origin of gases from the geothermal reservoir Groß Schönebeck (North German Basin) Geothermics, 71 (2018), pp. 357-368. doi.org/10.1016/j.geothermics.2017.09.007*
- Frank YA, Kadnikov VV, Gavrilov SN, Banks D, Gerasimchuk AL, Podosokorskaya OA, Merkel AY, Chernyh NA, Mardanov AV, Ravin NV, Karnachuk OV, Bonch-Osmolovskaya EA. *Stable and Variable Parts of Microbial Community in Siberian Deep Subsurface Thermal Aquifer System Revealed in a Long-Term Monitoring Study. Front Microbiol. 2016 Dec 27;7:2101. doi: 10.3389/fmicb.2016.02101.*

- Garvis, D.G., and D.H. Stuermer. 1980. A well-head instrument package for multi-parameter measurements during well water sampling. *Water Research* 14, no. 10: 1525–1527.
- Gleeson, T., Befus, K.M., Jasechko, S., Luijendijk, E., and Bayani Cardenas, M. (2015). The global volume and distribution of modern groundwater. *Nat. Geosci.* 9: 161–167. doi: 10.1038/ngeo2590
- Gründger F, Jiménez N, Thielemann T, Straaten N, Lüders T, Richnow HH, Krüger M. Microbial methane formation in deep aquifers of a coal-bearing sedimentary basin, Germany. *Front Microbiol.* 2015 Mar 20;6:200. doi: 10.3389/fmicb.2015.00200.
- Guðmundsdóttir R, Kreiling AK, Kristjánsson BK, Marteinsson VP, Pálsson S. Bacterial diversity in Icelandic cold spring sources and in relation to the groundwater amphipod *Crangonyx islandicus*. *PLoS One.* 2019 Oct 2;14(10):e0222527. doi: 10.1371/journal.pone.0222527.
- Haddad PG, Mura J, Casteran F, Guignard M, Ranchou-Peyruse M, Sénéchal P, Larregieu M, Isaure M-P, Svahn I, Moonen P, Le Hécho I, Hoareau G, Chiquet P, Dequidt D, Cézac P, Ranchou-Peyruse A. Biological, Geological and Chemical effects of oxygen injection in underground gas storage aquifers in the setting of biomethane deployment. Submitted in *Science of the Total Environment*.
- Hershey OS, Kallmeyer J, Wallace A, Barton MD, Barton HA. High Microbial Diversity Despite Extremely Low Biomass in a Deep Karst Aquifer. *Front Microbiol.* 2018 Nov 26;9:2823. doi: 10.3389/fmicb.2018.02823.
- Ishii S, Tago K, Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 May;86(5):1281-92. doi: 10.1007/s00253-010-2524-4.
- Kampman, N., Maskell, A., Bickle, M.J., Evans, J.P., Schaller, M., Purser, G., Zhou, Z., Gattacceca, J., Peitire, E.S., Rochelle, C.A., Ballentine, C.J., Busch, A., scientists of the GRDP, 2013a. Scientific drilling and downhole fluid sampling of a natural CO2 reservoir, Green River, Utah. *Sci. Drill.* 1 (1), 1–11.
- Kietäväinen, R., Ahonen, L., Kukkonen, I.T., Hendriksson, N., Nyysönen, M., Itävaara, M., Characterisation and isotopic evolution of saline waters of the Outokumpu Deep Drill Hole, Finland – implications for water origin and deep terrestrial biosphere, *Applied Geochemistry* (2012), doi:10.1016/j.apgeochem.2012.10.013
- Klouche N, Basso O, Lascourrèges JF, Cayol JL, Thomas P, Fauque G, Fardeau ML, Magot M. *Desulfocurvus vexinensis* gen. nov., sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from a deep subsurface aquifer. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009 Dec;59(Pt 12):3100-4. doi: 10.1099/ijs.0.010363-0.
- Lueders T. The ecology of anaerobic degraders of BTEX hydrocarbons in aquifers. *FEMS Microbiol Ecol.* 2017 Jan;93(1):fiw220. doi: 10.1093/femsec/fiw220.
- Labonté JM, Field EK, Lau M, Chivian D, Van Heerden E, Wommack KE, Kieft TL, Onstott TC, Stepanauskas R. Single cell genomics indicates horizontal gene transfer and viral infections in a deep subsurface Firmicutes population. *Front Microbiol.* 2015 Apr 22;6:349. doi: 10.3389/fmicb.2015.00349.

- Luef B, Frischkorn KR, Wrighton KC, Holman HY, Birarda G, Thomas BC, Singh A, Williams KH, Siegerist CE, Tringe SG, Downing KH, Comolli LR, Banfield JF. Diverse uncultivated ultra-small bacterial cells in groundwater. *Nat Commun.* 2015 Feb 27;6:6372. doi: 10.1038/ncomms7372.
- Magnobosco, C., Lin, L-H., Dong, H., Bomberg, M., Ghiorse, W., Stan-Lotter, H., Pedersen, K., Kieft, T.L., van Heerden, E., and Onstott, T.C. (2018). The biomass and biodiversity of the continental subsurface. *Nat. Geosci.* 11: 707-717. doi: 10.1038/s41561-018-0221-6
- Mahe',F. et al. (2014) Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *Peer J.*, 2, e593.
- Magoc,T. and Salzberg,S.L. (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27, 2957–2963.
- Matteucci F, Ercole C, Del Gallo M. A study of chlorinated solvent contamination of the aquifers of an industrial area in central Italy: a possibility of bioremediation. *Front Microbiol.* 2015 Sep 2;6:924. doi: 10.3389/fmicb.2015.00924.
- Miyoshi T, Iwatsuki T, Naganuma T. Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Feb;71(2):1084-8. doi: 10.1128/AEM.71.2.1084-1088.2005.
- Osselin F, Saad S, Nightingale M, Hearn G, Desaulty AM, Gaucher EC, Clarkson CR, Kloppmann W, Mayer B. Geochemical and sulfate isotopic evolution of flowback and produced waters reveals water-rock interactions following hydraulic fracturing of a tight hydrocarbon reservoir. *Sci Total Environ.* 2019 Oct 15;687:1389-1400. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.066.
- Pionke, H.B., and J.B. Urban. 1987. Sampling the chemistry of shallow aquifer systems – A case study. *Ground Water Monitoring & Remediation* 7, no. 2: 79–88.
- Pisapia C, Gérard E, Gérard M, Lecourt L, Lang SQ, Pelletier B, Payri CE, Monnin C, Guentas L, Postec A, Quéméneur M, Erauso G, Ménez B. Mineralizing Filamentous Bacteria from the Prony Bay Hydrothermal Field Give New Insights into the Functioning of Serpentinization-Based Subseafloor Ecosystems. *Front Microbiol.* 2017 Jan 31;8:57. doi: 10.3389/fmicb.2017.00057.
- Purkamo L, Bomberg M, Kietäväinen R, Salavirta H, Nyysönen M, Nuppunen-Puputti M, Ahonen L, Kukkonen I, Itävaara M (2016) Microbial co-occurrence patterns in deep Precambrian bedrock fracture fluids. *Biogeosciences* 13:3091–3108
- Ranchou-Peyruse M, Auguet JC, Mazière C, Restrepo-Ortiz CX, Guignard M, Dequidt D, Chiquet P, Cézac P, Ranchou-Peyruse A. Geological gas-storage shapes deep life. *Environ Microbiol.* 2019 Oct;21(10):3953-3964. doi: 10.1111/1462-2920.14745.
- Ranchou-Peyruse M, Gasc C, Guignard M, Aüllo T, Dequidt D, Peyret P, Ranchou-Peyruse A. The sequence capture by hybridization: a new approach for revealing the potential of mono-aromatic hydrocarbons bioattenuation in a deep oligotrophic aquifer. *Microb Biotechnol.* 2017 Mar;10(2):469-479. doi: 10.1111/1751-7915.12426.

- Regenspurg, S., Wiersberg, T., Brandt, W., Huenges, E., Saadat, A., Schmidt, K., and Zimmermann, G.: Geochemical properties of saline geothermal fluids from the in-situ geothermal laboratory Groß Schönebeck (Germany), *Chemie der Erde – Geochemistry*, 70, Suppl. 3, 3–12, 2010.
- Rivard, C.; Bordeleau, G.; Lavoie, D.; Lefebvre, R.; Malet, X. Temporal Variations of Methane Concentration and Isotopic Composition in Groundwater of the St. Lawrence Lowlands, Eastern Canada. *Hydrogeol. J.* 2018, 26 (2), 533–551.
- Rognes, T. et al. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *Peer J.*, 4, e2584.
- Smigan, P, Greksak, M., Kozankova, J., Buzek, F., Onderka, V., Wolf, I.: Methanogenic bacteria as a key factor involved in changes of town gas in an underground reservoir. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 221–224 (1990)
- Smith, R. J. et al. Metagenomic comparison of microbial communities inhabiting confined and unconfined aquifer ecosystems. *Environmental Microbiology* 14, 240–253 (2012).
- Struchkov, I.A., Rogachev, M.K. (2018). The challenges of waxy oil production in a Russian oil field and laboratory investigations. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 163, pp. 91-99.
- Sundaram, B, Feitz A, de Caritat, P, Plazinska, A, Brodie, R, Coram, J & Ransley, T 2009, *Groundwater Sampling and Analysis – A Field Guide*, Geoscience Australia, Record 2009/27.
- Trias R, Ménez B, le Campion P, Zivanovic Y, Lecourt L, Lecoivre A, Schmitt-Kopplin P, Uhl J, Gislason SR, Alfreðsson HA, Mesfin KG, Snæbjörnsdóttir SÓ, Aradóttir ES, Gunnarsson I, Matter JM, Stute M, Oelkers EH, Gérard E. High reactivity of deep biota under anthropogenic CO<sub>2</sub> injection into basalt. *Nat Commun.* 2017 Oct 20;8(1):1063. doi: 10.1038/s41467-017-01288-8.
- Weisburg, WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703
- Wu X, Holmfeldt K, Hubalek V, Lundin D, Åström M, Bertilsson S, Dopson M. Microbial metagenomes from three aquifers in the Fennoscandian shield terrestrial deep biosphere reveal metabolic partitioning among populations. *ISME J.* 2016 May;10(5):1192-203. doi: 10.1038/ismej.2015.185.
- Yu G, Fadrosh D, Goedert JJ, Ravel J, Goldstein AM (2015) Nested PCR Biases in Interpreting Microbial Community Structure in 16S rRNA Gene Sequence Datasets. *PLoS ONE* 10(7):e0132253. doi:10.1371/journal.pone.0132253

*Supplementary material*

**Figure S1 : Sterilization of the sampler using a heating cell.** On the left, photograph of the heating cell. Right, thermal imaging during the sterilization step at 125 °C for two hours in the presence of distilled water.



## CONTACT

Université de Pau et des Pays de l'Adour

Avenue de l'Université

BP 576

64012 Pau Cedex

Tél : 05 59 40 70 00