



(51) Classification internationale des brevets :

E21B 43/22 (2006.01) C09K 8/582 (2006.01)
E21B 43/25 (2006.01) C12P 39/00 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01)
C09K 8/60 (2006.01) C12N 1/28 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2011/050680

(22) Date de dépôt international :

19 janvier 2011 (19.01.2011)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

FR 10 50309 19 janvier 2010 (19.01.2010) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :

ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON
[FR/FR]; 15 Parvis René Descartes, F-69007 Lyon (FR).
UNIVERSITE LYON 1 CLAUDE BERNARD
[FR/FR]; 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69100
Villeurbanne (FR). CENTRE NATIONAL DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS [FR/FR]; 3
rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :

DROMART, Gilles [FR/FR]; 16 Chemin de
Chantegrillet, F-69110 Sainte Foy Les Lyon (FR).

OGER, Philippe [FR/FR]; 47 Avenue Georges
Pompidou, F-69003 Lyon (FR).

(74) Mandataire : BOURGAREL, Denis; Cabinet

PLASSERAUD, 235 cours Lafayette, F-69006 Lyon
(FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre

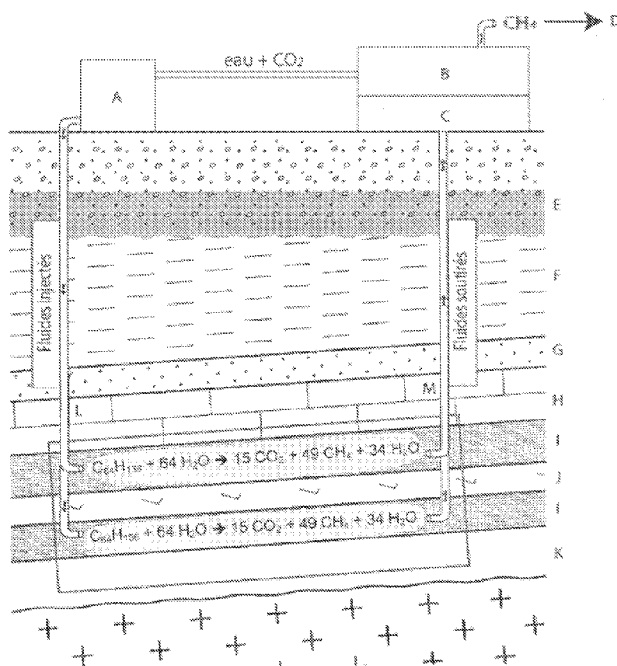
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : METHOD FOR PRODUCING METHANE GAS

(54) Titre : PROCEDE DE PRODUCTION DE GAZ METHANE

Figure 2



(57) Abstract : The invention relates to a novel method for producing methane gas *in situ*, wherein: at least one natural kerogen-rich layer is selected from the superficial geological subsoil up to a depth of 1,500 m, the growth and activity of the indigenous microorganisms naturally contained in said kerogens are stimulated in order to increase methane production, and the methane product is extracted. The invention also relates to a fluid composition to be injected according to the method of the invention in order to increase the production of methane in the kerogens, which includes at least water, nutrients for the syntroph and methanogenic microorganisms, and at least one additive. The invention also relates to a nutrient composition consisting in part of said fluids of the invention as well as compositions of trace elements, a vitamin solution, and inhibitors of indigenous microbiological populations, each of which comprises a portion of said nutrient composition. The invention also relates to a device for producing methane, including at least means for injecting fluids, for metabolically forcing the indigenous microorganisms, for pumping the fluids, for collecting, compressing and storing and/or distributing the methane produced. The invention finally relates to a method for producing methane including a preliminary prospecting phase for selecting at least one layer having a high gas potential at a given geological site.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]



SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) **États désignés** (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))

L'invention concerne un nouveau procédé de production in situ de gaz méthane dans lequel : - on choisit au moins une couche riche en kérogènes naturels dans le sous-sol géologique superficiel allant jusqu'à 1500 m de profondeur, - on stimule la croissance et l'activité des microorganismes indigènes contenus naturellement dans lesdits kérogènes pour augmenter la production de méthane, - on extrait le méthane produit. L'invention concerne également une composition de fluides, à injecter selon le procédé de l'invention pour augmenter la production de méthane dans les kérogènes, comprenant au moins de l'eau, des nutriments pour les microorganismes syntrophes et méthanogènes, au moins un adjuvant. L'invention concerne également une composition de nutriments constituant en partie lesdits fluides de l'invention ainsi que des compositions d'oligoéléments, de solution vitaminique, d'inhibiteurs de populations microbiologiques indigènes, chacune d'elles constituant en partie ladite composition de nutriments. L'invention concerne également un dispositif de production de méthane comprenant au moins des moyens d'injection de fluides, de forçage métabolique des microorganismes indigènes, de pompage des fluides, de recueil, de compression et de stockage et/ou distribution du méthane produit. L'invention concerne enfin un procédé de production de méthane comprenant une phase préalable de prospection pour sélectionner au moins une couche à fort potentiel gazier dans un site géologique donné.

PROCEDE DE PRODUCTION DE GAZ METHANE

DOMAINE DE L'INVENTION

5

L'invention appartient au domaine des procédés de production de méthane et en particulier des procédés de production de méthane dans les sous-sols géologiques grâce à la stimulation de microorganismes.

10 ETAT DE LA TECHNIQUE ET PROBLEME TECHNIQUE

Les sous-sols géologiques recèlent un potentiel immense en énergie. Après le pétrole, le gaz naturel est une des sources d'énergie fossile la plus utilisée en raison de sa grande disponibilité dans de nombreuses régions du globe et du fait qu'il constitue une source
15 d'énergie de combustion propre en comparaison aux autres hydrocarbures communs (pétroles, charbons).

Actuellement, l'essentiel du gaz méthane utilisé est extrait de réservoirs du sous-sol géologique profond. Les réserves de ce gaz conventionnel de gisements sont considérables
20 de part le monde mais sont localisées dans des secteurs géographiques souvent très éloignées des zones de consommation. Ce divorce géographique entre zones de production et zones de consommation implique pour le transport de ce produit une certaine autoconsommation énergétique et le développement d'infrastructures industrielles considérables et coûteuses. Au-delà de la construction des vecteurs de transport que
25 peuvent être les méthaniers et les gazoducs, des infrastructures sont nécessaires au conditionnement préalable et postérieur au transport proprement dit : liquéfaction par cryogénie pour le transport par voie maritime ; compressions répétées pour l'acheminement par gazoduc, stockage temporaire en aquifères et cavités souterrains.

30 Un besoin certain se fait sentir pour sécuriser, diversifier et domestiquer (production locale et contrôlée) la ressource en gaz méthane, ainsi que pour réduire les coûts et les impacts sur l'environnement de l'exploration, production et transport du gaz méthane.

Les ressources conventionnelles de gaz sont celles exploitées via des méthodes de
35 récupération qualifiées de primaires. Ces gisements sont exploités par l'utilisation de techniques standards de forage jusqu'aux réservoirs pour conduire ou pomper le gaz jusqu'en surface. Classiquement, les réservoirs gazeux sont situés à une assez grande profondeur (quelques kilomètres) dans le sous-sol géologique et sont constitués de roches

poreuses et perméables dans lesquelles le gaz s'est accumulé et a été piégé au cours de l'histoire géologique. Ce gaz méthane a été formé pour l'essentiel des gisements par des procédés thermogéniques de segmentation des chaînes et radicaux carbonés des molécules organiques contenues originellement dans les couches sédimentaires (roches-mères) à partir desquelles il a migré vers les réservoirs (roches-magasins). Les processus thermogéniques sont la conséquence d'un enfouissement plus ou moins progressif des roches-mères dans le sous-sol géologique. Ils se déroulent à des profondeurs conséquentes, à partir de 2 à 3 kilomètres, à des températures de l'ordre de 120°Celsius, sous des pressions de l'ordre de 80 MégaPascal (MPa).

10

En raison d'un accès aux ressources conventionnelles de plus en plus difficiles d'un point de vue géologique, géographique et géopolitique et d'un amenuisement des réservoirs classiques, les ressources dites non-conventionnelles de gaz font l'objet d'une attention grandissante et concernent des réservoirs atypiques, et totalement différents des précédents.

15

Le « shale gas » ou gaz de schistes est du gaz naturel présent de manière plus ou moins diffuse dans des « shales » qui sont des roches sédimentaires à grains très fins, argileuses, et qui constituent en fait les roches-mères du gaz à partir desquelles celui-ci s'est formé mais n'a pas migré vers un réservoir conventionnel. Ce gaz, d'origine thermogénique essentiellement (et microbiologique dans certains cas), est resté adsorbé sur la matière

20

organique, ou est contenu dans la microporosité intergranulaire et dans des fractures traversant la roche. Suite aux progrès techniques récents et conséquents réalisés sur le forage horizontal et la fracturation hydraulique dans les puits, le « shale gas » est devenu une source de gaz naturel importante. Cependant, le frein principal à l'exploitation de cette source réside dans le coût considérable des opérations de forage et de fracturation dans ces réservoirs qui sont situés à des profondeurs importantes ainsi que dans l'enrichissement progressif du contenu gazeux produit en dioxyde de carbone au cours du temps pour chaque puits de production.

25

Le gaz de couche de houille est devenu une source importante de gaz naturel. Ce gaz de houille présente plusieurs intérêts en termes de coûts : d'une part, il est produit localement, ce qui réduit la nécessité de transport, et, d'autre part, la géologie des couches de houille est bien connue des géologues, ce qui limite les coûts d'une exploration intensive. Cependant, les modes d'extraction du gaz de houille présentent de nombreux désavantages : ils engendrent une production d'énormes quantités d'eaux salées qui vont inonder certains écosystèmes, détériorer la qualité des eaux de surface et diminuer les ressources phréatiques.

35

De manière alternative, les schistes bitumineux ou les schistes noirs représentent une source très conséquente d'hydrocarbures. Les gisements de schistes bitumineux sont bien circonscrits par les géologues ce qui rend leur exploration potentielle aisée et peu coûteuse. Les schistes bitumineux ont fait l'objet d'une longue exploitation industrielle en France au
5 siècle dernier et ont été utilisés comme combustibles et brûlés dans des fours après excavation minière à ciel ouvert mais il est évident que le procédé d'extraction a un impact environnemental très négatif et que le bénéfice énergétique net de l'ensemble du traitement reste relativement faible. Par ailleurs, les schistes bitumineux peuvent fournir en particulier de l'huile (hydrocarbure liquide) par des procédés in situ de distillation destructive
10 (« retorting »). Ce procédé donne lieu à des essais de production d'huile par chauffage à 500-600 °C des couches de schistes du sous-sol par injection de vapeur d'eau ou par l'installation de résistances électriques. Cependant, les résultats obtenus sont peu fiables et peu probants et les quantités d'eau nécessaires pour la mise en œuvre de ce procédé sont très importantes.

15 Dans le but de trouver de nouveaux moyens de production et/ou d'exploitation du gaz ou de nouveaux substrats permettant de produire du méthane, depuis quelques années, la majorité des efforts se sont tournés vers la bioconversion en méthane in situ ou ex situ des réserves naturellement contenues dans les sous-sols géologiques et ce, dans la majeure
20 partie des cas, en stimulant uniquement les processus microbiologiques souterrains naturellement lents.

Le document WO 2005/115649 décrit un procédé pour stimuler la production microbienne de méthane dans un sous-sol comportant du pétrole, un hydrocarbure liquide résiduel. Ce
25 procédé consiste à analyser l'environnement du sous-sol comportant du pétrole, à y détecter la présence d'un consortium microbien comprenant des microorganismes méthanogènes et/ou méthanotrophes et à le(s) comparer à des microorganismes connus ayant des caractéristiques physiologiques écologiques connues, à utiliser les informations obtenues pour déterminer un environnement écologique qui promeut la dégradation du
30 pétrole et la génération de méthane par au moins un microorganisme méthanogène du consortium et à modifier l'environnement du sous-sol en question pour stimuler la conversion du pétrole en méthane et minimiser la destruction du méthane par des procédés contraires.

35 Le document WO 01/68904 décrit un procédé similaire au procédé décrit dans WO 2005/115649 permettant de stimuler l'activité microbienne dans une formation souterraine comprenant des hydrocarbures.

Ces deux procédés ne décrivent que de façon très succincte les conditions et compositions permettant de modifier l'environnement du sous-sol pour stimuler la production de méthane par les microorganismes du consortium. En outre, ces deux procédés ne précisent en rien les conditions empêchant la transformation du méthane produit ou encore
5 favorisant sa récupération en surface.

Le document WO 2007/022122 décrit des systèmes de renforcement de la production biogénique de méthane à partir de formations comportant des hydrocarbures. Ces systèmes consistent à introduire des amendements dans la formation souterraine visée en vue de
10 stimuler les populations microbiennes autochtones et accroître voire sélectionner les populations microbiennes par carence induite avec une composition injectée spécifique. Les populations une fois stimulées, par exemple avec ajout de matière organique, produisent du méthane. Cependant, bien que les systèmes décrits dans ce document concernent des substrats rocheux solides et impliquent la fracturation desdits substrats pour
15 atteindre les populations microbiennes, ces systèmes sont difficiles à mettre en œuvre et donnent des résultats de production de méthane très faibles (quelques milligrammes de méthane produit par kilogramme de substrat rocheux). En outre, l'introduction d'une source externe de carbone engendre un biais majeur dans ce type d'expériences puisque in fine on ignore la provenance du méthane produit. Enfin, les conditions d'application de ces
20 méthodes aux terrains géologiques ne sont pas précisées :

- 1) les types de charbons (sapropéliques versus humiques) ou les types de schistes bitumineux visés ne sont pas mentionnés ;
- 2) les profondeurs ciblées dans le sous-sol ne sont pas mentionnées;
- 3) les modalités d'injection des fluides et les systèmes de récupération des gaz ne
25 sont pas énoncés.

Le document WO 2007/136716 décrit un procédé d'accroissement de la production et la libération de méthane à partir de charbons. Cet accroissement est obtenu grâce à la stimulation des microorganismes méthanogènes in situ par ajout de quantités efficaces
30 d'acides aminés, inférieures à 30 kg d'acides aminés par tonne de charbon contenu dans la formation géologique visée. Les microorganismes ciblés ne subissent aucun prélèvement et réintroduction dans leur environnement. Bien qu'un tel procédé soit intéressant, le document WO 2007/136716 reste cependant silencieux sur la profondeur des couches géologiques ciblées, les modalités d'injection des fluides de stimulation des
35 microorganismes, contenant lesdits acides aminés. Par ailleurs, les résultats de production de méthane obtenus avec un tel procédé restent très faibles.

OBJECTIFS DE L'INVENTION

Les conditions d'exploitation et/ou de production de méthane de l'art antérieur présentant les nombreux inconvénients susmentionnés, il serait donc souhaitable d'avoir un procédé
5 de production de méthane simple, efficace et peu coûteux à mettre en œuvre.

L'invention vise également à satisfaire au moins l'un des objectifs suivants :

- proposer un procédé de production de méthane ne nécessitant pas un recours à la distillation thermique ex situ ou in situ,
- 10 - proposer un procédé de production de méthane à partir de substrats souterrains non exploités à ce jour,
- proposer un procédé de production de méthane utilisant les microorganismes in situ sans nécessiter de sélection ex situ et/ou de réinjection de consortium de microorganismes,
- proposer un procédé de production de méthane in situ et permettant d'obtenir des
15 rendements supérieurs à ceux de l'art antérieur,
- proposer un procédé de production de méthane utilisable immédiatement ou presque,
- proposer un procédé réduisant les coûts de stockage du méthane par une production contrôlée et flexible,
- proposer un procédé utilisé sur des sites géologiques proches des points de consommation
20 du méthane réduisant les coûts d'acheminement du méthane produit.

Après de longues recherches et investigations, les demandeurs ont centré leurs efforts sur des matériaux sédimentaires peu exploités, riches en carbone organique ayant subi une évolution thermique limitée par défaut d'enfouissement naturel ainsi que sur la stimulation
25 adéquate de microorganismes naturellement présents in situ dans ces matériaux. Ces matériaux sont les schistes bitumineux et contiennent des traces d'hydrocarbures gazeux (par exemple le méthane) en quantité inexploitable et des kérogènes, source potentiellement très favorable à la bioconversion car riches en hydrogène. Ces schistes bitumineux sont d'âges géologiques variés et leurs gisements sont bien circonscrits par les
30 géologues, ce qui rend leur exploration potentielle aisée et peu coûteuse.

Forts de ces avancées, les inventeurs ont ainsi mis au point un procédé satisfaisant tout ou partie des objectifs évoqués ci-dessus, et d'autres.

35 DESCRIPTION SUCCINCTE DE L'INVENTION

Les objectifs susvisés, parmi d'autres, sont ainsi atteints par la présente invention qui concerne un procédé de production in situ de gaz méthane caractérisé en ce que :

- on choisit une ou plusieurs couches riches en kérogènes naturels, de préférence en kérogènes ayant un rapport H:C supérieur ou égal à 1, dans le sous-sol géologique superficiel allant de 0m jusqu'à 1500 m de profondeur, de préférence jusqu'à 1000m, plus préférentiellement encore jusqu'à 500 m, par exemple entre 50m et 500m de profondeur ;
- on stimule la croissance et l'activité des microorganismes indigènes contenus naturellement et localement dans lesdits kérogènes naturels pour augmenter la dégradation desdits kérogènes et la production de méthane dans lesdits kérogènes,
- on extrait le méthane produit, de préférence au fur et à mesure de sa production.

10

Suivant un autre de ses aspects, la présente invention concerne un procédé de production de méthane comprenant les étapes suivantes visant :

- à injecter des fluides par des pompes hydrauliques, de préférence sous pression, éventuellement après forage, dans une ou plusieurs couches riches en kérogènes naturels,
- à induire le forçage métabolique des microorganismes indigènes pour accroître la dégradation desdits kérogènes et la production de méthane dans lesdits kérogènes,
- à pomper les fluides ayant percolé au travers desdits kérogènes et contenant le méthane produit,
- à recueillir ledit méthane produit, puis
- à stocker et/ou distribuer le méthane produit et recueilli.

15

20

Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé de production de méthane comprend en outre l'étape visant à :

- fracturer le sous-sol géologique pour permettre la diffusion de fluides d'injection dans des couches superficielles riches en kérogènes, allant de 0m à 1500m de profondeur, par exemple, de 0m à 1000m ou 0m à 500m, de préférence dans des couches riches en kérogènes dont le rapport H :C est supérieur ou égal à 1.

25

- La présente invention concerne également un procédé de production de méthane dans lequel la stimulation des microorganismes se fait par injection in situ de fluides comprenant au moins de l'eau, des nutriments pour les organismes syntrophes et méthanogènes, au moins un adjuvant et éventuellement du dioxyde de carbone et/ou de l'hydrogène.

30

La présente invention concerne également la composition de fluides injectés pour le forçage métabolique, la composition de nutriments utilisés dans lesdits fluides.

35

Suivant un autre de ses aspects, la présente invention concerne un procédé de production de méthane par stimulation in situ de microorganismes indigènes comprenant au moins des bactéries et/ou des archées.

- 5 La présente invention concerne également un dispositif de production de méthane comprenant au moins :
- des moyens d'injection de fluides, de préférence par pompes hydrauliques, dans une ou plusieurs couches riches en kérogènes naturels au travers desquels les fluides percolent,
 - 10 - des moyens de forçage métabolique des microorganismes indigènes par lesdits fluides injectés par lesdits moyens d'injection,
 - des moyens de pompage des fluides ayant percolé au travers desdits kérogènes et contenant le méthane produit,
 - des moyens de recueil du méthane produit, par exemple des moyens de séparation,
 - 15 - des moyens de compression du méthane recueilli,
 - des moyens de stockage et/ou de distribution du méthane recueilli et comprimé.

- Suivant un autre de ses aspects, la présente invention concerne un procédé de production de méthane comportant une phase préalable d'exploration et de prospection en vue de
- 20 sélectionner une ou des couches à fort potentiel gazier, de préférence riches en kérogènes, dans un site géologique donné.

DEFINITIONS

- 25 Afin de mieux comprendre l'invention, il convient tout d'abord de rappeler ou de donner, à titre d'exemple, quelques définitions. Au sens de la présente demande :
- Par couche, on entend une épaisseur de roche sédimentaire comprise entre 0,1 mm et 100m, de préférence entre 1cm et 10m, plus préférentiellement encore entre environ 0,1m et 1m. Par extension, le terme « couche » englobe les termes « formation » et « lamines »
 - 30 qui correspondent respectivement à un groupement de couches et à des couches alternantes très fines (de l'ordre du mm) de matière organique (carbone organique total supérieur à 1% en masse) et de minéraux.
 - Par riche, on entend une teneur supérieure ou égale à 1% en masse de carbone organique sur la masse de la roche totale.
 - 35 - Par roche-mère, on entend toute roche du sous-sol géologique qui a pu ou peut produire, naturellement ou non, des quantités significatives d'hydrocarbures combustibles solides, liquides ou gazeux.

- Par schistes bitumineux ou schistes à huile, on entend des roches sédimentaires finement laminées et à grains fins (argile à silt de quelques microns à dizaines de microns) et dont la phase minérale comprend des minéraux argileux, des carbonates, de la silice et dont la matière organique est constituée pour l'essentiel de kérogène et en quantité minoritaire de bitume ou autre hydrocarbure libre.

Les schistes noirs sont des schistes contenant des kérogènes mais ne refermant peu ou pas de bitume. Schistes bitumineux et schistes noirs peuvent fournir par distillation destructive de l'huile et du gaz combustible.

- Par kérogène, on entend un matériau solide macromoléculaire, insoluble dans les solvants organiques, composé de noyaux polyaromatiques reliés entre eux par de longues chaînes aliphatiques et des liaisons hétéroatomiques. Par extension, par kérogène on désigne une ou plusieurs couches riches en kérogènes, selon la définition supra.

- Par bitume, on entend la matière organique soluble dans les solvants organiques (par ex. le chloroforme) et incluant les résines et les asphaltènes.

- Par nature ou naturellement, on entend placé sans intervention de l'homme, spontanément.

- Par sous-sol géologique superficiel, on entend l'ensemble des formations souterraines situées entre environ 1500m de profondeur et la surface terrestre.

- Par localement, on entend in situ au sein de la ou des couches exploitées.

- Par microorganisme, on entend sensu stricto un organisme de taille microscopique et comprend tous les organismes, procaryotes ou eucaryotes dont la taille est de l'ordre de quelques micromètres ou inférieure. De ce fait, ce terme inclut de facto toutes les bactéries, les archées et les microeucaryotes. Dans la présente demande, on utilisera sans distinction microorganismes et populations.

- Par bactérie, on entend un organisme vivant unicellulaire procaryote (caractérisé par une absence de noyau et d'organites). Une bactérie mesure quelques micromètres de long et peut présenter différentes formes : des formes sphériques (coques), des formes allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées.

- Par archée (anciennement *archéobactéries* ou bien encore *archéobactéries*), on entend un micro-organisme unicellulaire. Les archées forment un groupe majeur de procaryotes et ne présentent donc, comme les bactéries, ni noyau, ni organites intracellulaires. En dépit des similitudes morphologiques et structurelles avec les bactéries, les archées s'en distinguent par certains caractères biochimiques, comme la constitution de la membrane cellulaire. Les archées sont subdivisées en quatre phyla, dont les deux groupes des Crenarchaeota et des Euryarchaeota sont les plus étudiés.

- Par microorganismes indigènes, on entend l'ensemble de la flore microbienne contenue naturellement dans la formation souterraine visée et ceci sans y avoir été importée. Dans la

présente demande, il s'agit essentiellement de l'ensemble des microorganismes vivants présents dans au moins l'une des couches riches en kérogènes.

- Par microorganismes syntrophes, on entend une association entre un microorganisme dont le métabolisme énergétique produit des composés résiduels utilisés par une deuxième population microbienne (association syntrophique), et dont le métabolisme ne pourrait s'effectuer sans l'épuisement de ces composés résiduels. Une telle association syntrophique existe par exemple entre les bactéries du genre *Syntrophus* qui dégradent les hydrocarbures (alcanes) pour produire de l'acide acétique et de l'hydrogène et les archées méthanogènes du genre *Methanosarcina* qui utilisent l'hydrogène et éventuellement l'acide acétique pour produire le méthane.
- Par consortium, on entend une association de microorganismes permettant de réaliser une fonction métabolique en synergie, par exemple la dégradation des kérogènes. Au sein d'un consortium les relations ne sont pas nécessairement syntrophiques, mais des organismes syntrophes peuvent y participer.
- Par microorganisme hétérotrophe, on entend un microorganisme contraint à se développer au moyen de la matière organique produite par d'autres organismes, soit vivants, soit morts, ou sur les restes d'autres êtres vivants.
- Par microorganisme méthanogène, on entend tout microorganisme apte à produire du méthane par n'importe quel procédé. Par extension, on pourra utiliser le terme « méthanogène(s) » uniquement.
- Par forçage métabolique, on entend la stimulation de la croissance et de l'activité des microorganismes présents dans la formation visée par la mise en conditions adaptées, à savoir par l'apport, en conditions suffisantes, des éléments présents en conditions limitantes (par exemple, la chaleur, les nutriments adéquats, l'eau...) et/ou par la suppression des effets délétères de manière à privilégier un métabolisme aux dépens des autres, par exemple dans le but de stimuler la production d'acétate et d'hydrogène à partir d'hydrocarbure par les microorganismes syntrophes, et/ou la production de méthane par les microorganismes méthanogènes.

DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

- Un objet principal de la présente invention était de trouver un procédé de production de méthane impliquant un faible coût de mise en œuvre et un fort rendement.
- C'est pourquoi les inventeurs ont mis au point au procédé de production de méthane à partir de couches géologiques contenant une forte proportion de kérogènes, et en particulier les schistes noirs et/ou les schistes bitumineux.

Le procédé de production de méthane

La présente invention vise donc en premier lieu un procédé de production in situ de gaz méthane caractérisé en ce que :

- on choisit une ou plusieurs couches riches en kérogènes naturels, de préférence en kérogènes riches en hydrogène et ayant un rapport H:C supérieur ou égal à 1, dans le sous-sol géologique superficiel allant de 0m jusqu'à 1500 m de profondeur, de préférence jusqu'à 1000 m, plus préférentiellement encore de 0m jusqu'à 500 m, et par exemple de 50m jusqu'à 500m,
- on stimule la croissance et l'activité des microorganismes indigènes contenus naturellement dans lesdits kérogènes naturels,
- on extrait le méthane, de préférence au fur et à mesure de sa production.

Le sous-sol géologique

Les schistes bitumineux montrent une large gamme dans leur composition organique et minérale :

- 1) kérogène de type I ($1,7 \geq \text{H:C} > 1,5$) avec une matière organique amorphe largement dominante dérivant d'organismes planctoniques (algues, copépodes, ostracodes) et microbiens vivant dans le sédiment / marnes et calcaires, tuffs volcaniques, minéraux évaporitiques ;
- 2) kérogène de type II ($1 \leq \text{H:C} \leq 1,5$) avec une matière organique mixte (figurée et amorphe dérivant des algues *Tasmanites*) / silice et minéraux argileux ;
- 3) charbons sapropéliques (kérogène de type I dérivant d'algues d'eaux douces ou de spores), en alternance avec des dépôts à kérogène de type III (charbons humiques caractérisés par une matière organique ayant un rapport atomique $\text{H:C} < 1$ et une très grande proportion de débris de végétaux supérieurs).

La spectrophotométrie infrarouge suggère que les kérogènes de type I contiennent une grande proportion de longues chaînes aliphatiques et peu de composés polyaromatiques. Au contraire, les kérogènes de types II renferment plus de matériel cyclique, aromatique et naphtéinique.

- Pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention, on choisit donc une, ou un groupement de 5 à 10 couches, riche(s) en kérogènes de type I et/ou II.

Dans la présente invention, on choisira de préférence des kérogènes qui sont riches en hydrogène, c'est-à-dire avec un rapport Hydrogène:Carbone H:C élevé, de préférence, on choisira des kérogènes présentant un rapport Hydrogène : Carbone supérieur ou égal à 1 ($\text{H:C} \geq 1$). C'est le cas pour tous les kérogènes des schistes bitumineux ou des schistes noirs. Plus préférentiellement, on choisira des kérogènes dont le rapport Hydrogène:Carbone est supérieur à 1,5.

Les kérogènes riches en hydrogène proviennent de la transformation de matériaux organiques originellement riches en lipides et en molécules voisines des lipides comme les terpénoïdes, les stéroïdes, et certains phospholipides. Les lipides sont très abondants chez les algues. Une forte teneur en lipides des algues résulte en particulier d'une croissance en
5 eaux froides dans des conditions déficitaires en azote.

La structure finement laminée commune à tous les schistes bitumineux suggère un dépôt par décantation dans un environnement calme, marquée par une succession d'événements saisonniers ou d'autres événements périodiques. La préservation de la lamination démontre
10 aussi l'absence de bioturbation et de vie méso- à macrobenthique dans les sédiments. De telles conditions sont réunies dans un environnement physico-chimique confiné, sans brassage des eaux, où l'anoxie des fonds est renforcée par la décomposition précoce d'une fraction de la matière organique accumulée.

15 La richesse en hydrogène des kérogènes résulte également du faible enfouissement dans le sous-sol géologique qu'ont subi ces composés et corrélativement de leur faible degré d'évolution thermique.

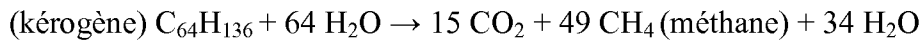
La mise en œuvre du procédé selon la présente invention ne nécessite pas de chauffage de
20 la formation souterraine ciblée mais comprend la stimulation microbiologique in situ.

Le procédé de production de méthane peut être mis en œuvre dans un réacteur après excavation du substrat au niveau d'un affleurement, ou bien directement dans une mine ou dans un forage.

25 Le fait de cibler les schistes bitumineux ou les schistes noirs pour produire du méthane in situ présente plusieurs avantages. En effet, ces formations souterraines peuvent être peu profondes et par conséquent le forage et l'exploitation représentent un coût plus faible que la mise en œuvre de procédé d'extraction de méthane à partir de formations souterraines
30 différentes ou plus profondes. De plus, les inventeurs ont mis en évidence que ces schistes, lorsqu'ils sont sélectionnés dans les couches peu profondes, par exemple de 0m à 1500m, de préférence de 0m à 1000m et mieux encore de 0m à 500m, contiennent une plus forte quantité de kérogène permettant d'obtenir des rendements de production de méthane après forçage métabolique particulièrement élevés.

35 Le procédé général selon l'invention repose sur la combinaison d'un procédé biotechnologique (1) à trois procédés industriels (2, 3 et 4) dans le cas d'une exploitation directe souterraine :

1) le forçage métabolique des microbes présents dans les roches-mères pour accélérer la dégradation du kérogène et sa transformation en méthane selon la réaction générale suivante :



5 2) l'injection de fluides, de préférence sous pression, dans la roche-mère grâce à une unité d'injection,

3) le pompage des fluides ayant percolé au travers de la roche-mère grâce à une unité de pompage,

10 4) la séparation des gaz produits ($\text{CO}_2 + \text{CH}_4$) afin de récupérer, d'une part, le méthane et le diriger vers un circuit de distribution et, d'autre part, le dioxyde de carbone pour éventuellement le réinjecter, via l'unité d'injection de fluides, au niveau des roches-mères à exploiter.

Ainsi, la présente invention concerne un procédé de production in situ de méthane tel que
15 défini ci-dessus et comprenant les étapes suivantes :

- 1- l'injection de fluides, de préférence sous pression, dans une ou plusieurs couches riches en kérogènes naturels au travers desquels ces fluides percolent,
- 2- le forçage métabolique des microorganismes indigènes par lesdits fluides pour augmenter la dégradation desdits kérogènes et la production de méthane dans lesdits
20 kérogènes,
- 3- le pompage des fluides ayant percolé au travers desdits kérogènes et contenant le méthane produit,
- 4- le recueil du méthane produit, de préférence au fur et à mesure de sa production,
- 5- la compression du méthane recueilli,
- 25 6- le stockage et/ou la distribution du méthane recueilli et comprimé.

En outre, le procédé selon l'invention peut avantageusement comprendre une étape de fracturation hydraulique des couches riches en kérogènes, la fracturation conduisant avantageusement à des fissures dans l'orientation horizontale ou sub-horizontale dans les
30 couches superficielles, en particulier jusqu'à 500 mètres de profondeur (McLellan, P., Understanding and Modelling Hydraulic Fracturing at Shallow Depth. Petroleum Technology Alliance Canada Water Innovation Conference, Calgary, 2006). Les méthodes de fracturation hydraulique sont connues de l'état de la technique et sont par exemple décrites dans WO 2004009956.

35

L'injection (1)

L'injection de fluides peut se faire à partir d'une unité d'injection mobile ou fixe utilisant des pompes hydrauliques. Cette injection de fluides se fait de préférence sous pression et

en particulier à une pression allant de 50 à 500 bars en fonction de la profondeur de la (les) couche(s) ciblées. On utilise de préférence une pression de 180 bars pour une cible située à 500 mètres de profondeur. L'injection de fluides peut participer ou non à la fracturation hydraulique des roches cibles. L'injection sous pression est optimisée pour favoriser une

5 fracturation hydraulique de la ou les couches riches en kérogènes, une répartition homogène des fluides, un maintien de la fracturation ouverte ainsi engendrée peut être assuré par l'injection conjointe, ou ultérieure et répétée, d'agents de soutènement.

La ou les injections peuvent se faire suite à une étape préalable P1 de forage dans le sous-

10 sol géologique pour faire l'injection de fluides dans une ou plusieurs couches riches en kérogènes naturels, de préférence en kérogènes ayant un rapport H:C supérieur ou égal à 1. Ce forage se fait à une profondeur maximale d'environ entre 1500 m afin de cibler la formation géologique voulue à savoir une roche-mère, de préférence un schiste contenant des kérogènes ou au moins une couche géologique riche en kérogènes, par exemple, dans

15 une profondeur située entre 0m et 1000m et mieux encore, entre 0m et 500m, par exemple entre 50m et 500m.

Le forçage métabolique (2)

L'injection de fluides via l'unité d'injection comprend au moins de l'eau, des nutriments

20 pour microorganismes, de préférence pour microorganismes syntrophes et méthanogènes, au moins un adjuvant, et éventuellement du dioxyde de carbone, de préférence le dioxyde de carbone issu du recyclage, et, éventuellement de l'hydrogène.

Ces fluides vont percoler dans une ou plusieurs couches riches en kérogènes naturels et via

25 ces fluides, les microorganismes contenus in situ sont alors stimulés ou forcés sur le plan métabolique. Avant cette injection de fluides, les microorganismes indigènes situés localement in situ peuvent être en dormance ou bioconvertir spontanément les matières organiques locales en méthane mais ceci à des rendements faibles et des cinétiques lentes par manque de nutriments et d'eau in situ. Les fluides injectés présentent alors un apport en

30 eau, en nutriment, en adjuvant et/ou en CO₂, et/ou en H₂, en quantité adaptée pour permettre aux microbes ou microorganismes présents dans les roches-mères ou dans au moins une couche visée riche en kérogènes d'accélérer la cinétique de dégradation du kérogène et sa transformation en méthane.

35 Grâce aux fluides injectés, la réaction de transformation de la matière organique fossile suivante est accélérée :



Cette réaction aboutit donc à la production de méthane (CH_4) par les microorganismes méthanogènes mais également à une production de CO_2 principalement par les bactéries syntrophes. Le méthane produit par dégradation de la matière organique des kérogènes ainsi que le CO_2 engendré lors de cette dégradation vont percoler dans ladite (ou lesdites) 5 couche(s) riche(s) en kérogènes.

Le pompage (3), le recueil (4), la compression (5), le stockage et/ou la distribution (6)

Les fluides percolant à travers la roche-mère fracturée, la ou les couches riches en kérogène, et contenant le CO_2 et le CH_4 produits sont ensuite soutirés par des pompes 10 hydrauliques jusqu'à la surface terrestre puis là ils sont séparés sur colonnes d'adsorption, ou encore par absorption dans une phase liquide, ou encore par lavage à l'eau, ou encore par cryocondensation, de préférence par filtration membranaire qui est une méthode simple et une technologie compacte et propre, ceci afin de récupérer :

- 1) une première phase constituée du méthane produit qui sera comprimé grâce à 15 une unité de compression et orienté vers un circuit de distribution et éventuellement utilisé directement ou rapidement à proximité, et,
- 2) une deuxième phase constituée d'eau et de CO_2 résiduel qui pourra alors être réinjectée en sous-sol par recyclage avec les fluides injectés dans l'étape visant à stimuler les microorganismes indigènes. Cette deuxième phase pourra servir de 20 fluide de fracturation hydraulique et de forage permettant d'augmenter la surface d'action des fluides vis-à-vis des microorganismes locaux et ainsi d'augmenter la capacité à stimuler la production de méthane.

Le soutirage peut être réalisé soit au niveau d'un puits de soutirage/pompage effectué à 25 distance du puits d'injection, soit au niveau du puits d'injection par un fonctionnement alterné de la pompe hydraulique entre injection et soutirage.

Les unités d'injection, de pompage sont celles classiquement utilisées par les spécialistes du forage. Par ailleurs, les unités de séparation et de compression sont celles également 30 utilisées de façon habituelles par les spécialistes de l'extraction de gaz. Plus spécifiquement, l'injection de fluides, et ainsi la fracturation hydraulique des couches cibles qu'elle provoque, peut être réalisée selon la méthode décrite dans le brevet WO 2004009956. La séparation du gaz méthane et du dioxyde de carbone peut être basée sur la méthode décrite dans le brevet EP 0110858, ou encore sur l'utilisation de 35 membranes polymères, procédé proposé par MEDAL, société du groupe Air Liquide. La compression du gaz peut être réalisée par l'utilisation d'une station ou unité de compression de gaz (Pro2 Environnement), ou encore en utilisant un compresseur à vis lubrifiée par exemple un compresseur à vis lubrifiée de Air Liquide.

Les fluides

Comme énoncé ci-dessus, la présente invention nécessite la stimulation de la croissance et de l'activité des microorganismes indigènes contenus dans les kérogènes naturels. Les fluides injectés vont représenter le milieu de culture des microorganismes indigènes pour la stimulation de la méthanogenèse in situ. La base minérale du milieu de culture utilisé pour stimuler la production naturelle de méthane par les populations indigènes est dérivée des milieux de culture pour les méthanogènes marins de la famille de Méthanosarcinales (Milieu 141 de la DSMZ, collection Allemande de Cultures Types de Microorganismes).

Le milieu a été modifié pour :

- 1) refléter la différence de cible (eau douce vs. eau de mer; baisse de la concentration de NaCl),
- 2) contre-sélectionner les bactéries réductrices des sulfates et des nitrates dont l'activité est potentiellement antagoniste de la syntrophie, et donc par extension de la méthanogenèse (addition au moins de nitrites NO_2^- ; de sulfites ; de molybdate MoO_4^{2-} ; d'oxydes ferriques Fe_2O_3),
- 3) apporter un complément de vitamines et de sels minéraux adaptés. Cette formulation est basée sur les formulations de Wolfe et sa composition est donnée dans les exemples ci-après.

20

Cette stimulation microbiologique s'opère par l'injection ciblée de fluides qui comprennent au moins de l'eau, des nutriments adaptés aux microorganismes visés pour accroître la production de méthane, au moins un adjuvant, et éventuellement du CO_2 et/ou de l' H_2 .

- L'eau est un élément essentiel à la croissance des microorganismes contenus dans la ou les couches riches en kérogènes qui sont fortement déshydratées. Cette étape d'apport d'eau est le premier volet de l'étape de forçage métabolique. Le choix des nutriments apportés permet de cibler les microorganismes que l'on souhaite stimuler et/ou inhiber. Ainsi, la composition des fluides injectés constitue le deuxième volet du forçage métabolique. La composition est ajustée pour apporter aux microorganismes présents dans la roche-mère, à savoir la ou les couches ciblées riches en kérogènes, les compléments alimentaires nécessaires, d'une part, pour stimuler la croissance et l'activité des microorganismes syntrophes et des microorganismes méthanogènes responsables de la dégradation méthanogénique des kérogènes, et d'autre part, pour limiter la multiplication des microorganismes sulfato-réducteurs, en particulier les bactéries sulfato-réductrices responsables de la production d'hydrogène sulfuré (H_2S), inhibiteur des méthanogènes.

35

La présente invention concerne des fluides, en particulier à injecter selon le procédé de la présente invention afin d'augmenter la production de méthane dans une ou plusieurs couches de kérogènes, lesdits fluides comprenant :

- de l'eau,
- 5 - des nutriments pour les microorganismes syntrophes et méthanogènes,
- au moins un adjuvant, de préférence à une concentration comprise entre 10^{-9} et 5g/l de fluides,
- éventuellement le CO_2 , de préférence issu d'un recyclage, et
- éventuellement de l'hydrogène H_2 .

10

Parmi le ou les adjuvant(s) contenu(s) dans les fluides susmentionnés et en particulier injectés selon le procédé de la présente invention, on peut citer, de préférence, l'acide nitrilotriacétique, qui est un agent chélateur des métaux mis en solution et qui va stabiliser la solution des fluides injectés.

15

Dans les fluides, de préférence injectés selon le procédé, objet de la présente invention, la concentration en acide nitrilotriacétique est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,015 g/l,

- 20 Par ailleurs, la présente invention porte également sur la composition de nutriments constituant en partie les fluides mentionnés ci-dessus et en particulier à injecter selon le procédé de l'invention, ladite composition de nutriments comprenant :

- des oligoéléments,
- une solution vitaminique complète,
- 25 - des éléments traces organiques,
- des inhibiteurs de populations microbiologiques indigènes entrant en compétition avec les populations microbiologiques méthanogènes indigènes, de préférence des inhibiteurs des bactéries hétérotrophes, et plus particulièrement des bactéries dénitrifiantes et sulfato-réductrices indigènes,
- 30 - une source d'azote, de préférence NH_4Cl ,
- une source de phosphate, de préférence K_2HPO_4 ,
- une source d'ions acétate, de préférence de l'acétate de Na, CH_3COONa ,
- une source d'ions hydrogénocarbonate, de préférence NaHCO_3 ,
- une source de peptides, de préférence de la trypticase (dénommée également tryptone ou
- 35 peptone de caséine).

La présente invention concerne également un procédé de production de méthane tel que décrit ci-dessus et dans lequel lesdits nutriments apportés, lors de l'injection de fluides, comprennent :

- des oligoéléments,
- 5 - une solution vitaminique complète,
- des éléments traces organiques,
- des inhibiteurs de populations microbiologiques indigènes entrant en compétition avec les populations microbiologiques méthanogènes indigènes, de préférence des inhibiteurs des bactéries hétérotrophes, et plus préférentiellement des bactéries dénitrifiantes et sulfato-
- 10 réductrices indigènes,
- une source d'azote, de préférence NH_4Cl ,
- une source de phosphate, de préférence K_2HPO_4 ,
- une source d'ions acétate, de préférence de l'acétate de Na, CH_3COONa ,
- une source d'ions hydrogénocarbonate, de préférence NaHCO_3 ,
- 15 - une source de peptides, de préférence de la trypticase (dénommée également tryptone ou peptone de caséine).

De plus, la présente invention concerne une composition d'oligoéléments constituant en partie la composition de nutriments telle que définie ci-dessus utilisés dans les fluides

20 injectés et en particulier à injecter selon le procédé de la présente invention, et comprenant au moins :

- le bore, de préférence sous sa forme borate BO_3^{3-} ,
- le vanadium sous sa forme vanadate VO_4^{2-} ,
- le Cu, de préférence sous sa forme chlorure,
- 25 - le Fe, de préférence sous sa forme chlorure,
- le Mg, de préférence sous sa forme chlorure,
- le Zn, de préférence sous sa forme chlorure,
- le Ni, de préférence sous sa forme chlorure,
- le Co, de préférence sous sa forme chlorure,
- 30 - le Li, de préférence sous sa forme chlorure,
- le K, de préférence sous sa forme chlorure,
- le Mn, de préférence sous sa forme chlorure,
- éventuellement le Na, de préférence sous leur forme chlorure Cl^- ,
- l'aluminium sous sa forme aluminopotassique, AlKOH ,
- 35 - le Ca, de préférence sous sa forme chlorure,
- éventuellement le Se, sous sa forme de sélénite de sodium (Na_2SeO_3).

Dans une variante de réalisation, il pourra être ajouté du sélénium Se, sous sa forme de sélénite de sodium (Na_2SeO_3) à une concentration comprise entre 0 et 10mM.

La solution vitaminique complète utilisée dans les fluides injectés, en particulier selon le
5 procédé de l'invention, fait également partie de la présente invention et elle peut être dérivée des formulations de Wolfe. Elle comprend au moins l'acide thioctique (ou acide α -lipoïque), la biotine, l'acide folique, la pyridoxine et/ou le chlorhydrate de pyridoxine, la thiamine avec ou sans HCl, la riboflavine, l'acide nicotinique, le pantothénate de calcium, l'acide p-aminobenzoïque, la cobalamine (ou vitamine B_{12}) et éventuellement l'acide
10 ascorbique.

Par ailleurs, les fluides injectés comprennent au moins des éléments traces organiques. Ces derniers sont des dérivés d'extraits de cellules de culture, de préférence de cellules de bactérie ou de levure, de préférence levure de boulangerie, de préférence extraits par
15 extraction hydroalcoolique.

Ces éléments traces organiques correspondent à un complément en traces organiques permettant de fournir aux cultures un apport de molécules organiques vitales à l'état d'ultratraces.
20

Parmi les fluides injectés dans le procédé selon l'invention, figurent les inhibiteurs des populations microbiologiques indigènes entrant en compétition avec les populations microbiologiques méthanogènes indigènes. De préférence, on utilise des inhibiteurs des bactéries hétérotrophes, et plus particulièrement des bactéries dénitrifiantes indigènes,
25 et/ou des bactéries sulfato-réductrices indigènes.

Ces inhibiteurs, objet de la présente invention, sont sélectionnés parmi les nitrites NO_2^- , les sulfites, le molybdate MoO_4^{2-} , les oxydes ferriques Fe_2O_3 , et leurs mélanges. Ils sont mis en œuvre dans le procédé objet de l'invention lors de l'injection des fluides
30 dont ils font partie.

Les bactéries dénitrifiantes indigènes visées dans le procédé selon l'invention sont de préférence choisies dans la liste suivante :

Acidiphilium cryptum, *Acidothermus cellulolyticus*, *Acidovorax citrulli*, *Aeropyrum pernix*,
35 *Alcanivorax borkumensis*, *Alkalilimnicola ehrlichii*, *Alteromonas macleodii*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Aromatoleum aromaticum*, *Arthrobacter sp.*, *Azorhizobium caulinodans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*,

Bacillus thuringiensis, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bordetella petrii*, *Brucella abortus*,
Brucella canis, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Brucella suis*, *Burkholderia ambifaria*,
Burkholderia mallei, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia phymatum*, *Burkholderia*
pseudomallei, *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Candidatus*
5 *vesicomysocius*, *Caulobacter caulinodans*, *Chromobacterium violaceum*,
Chromohalobacter salexigens, *Citrobacter koseri*, *Corynebacterium diphtheriae*,
Corynebacterium efficiens, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium glutamicum*,
Cronobacter sakazakii, *Cupriavidus taiwanensis*, *Dechloromonas aromatica*, *Delftia*
acidovorans, *Desulfitobacterium hafniense*, *Desulfobacterium autotrophicum*,
10 *Diaphorobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*,
Geobacillus thermodenitrificans, *Geobacter lovleyi*, *Geobacter metallireducens*,
salmonella typhi, *Hahella chejuensis*, *Haloarcula marismortui*, *Halorubrum*
lacusprofundi, *Herminiimonas arsenicoxydans*, *Hyphomonas neptunium*, *Klebsiella*
pneumoniae, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*,
15 *Lactobacillus reuteri*, *Macrococcus caseolyticus*, *Maricaulis maris*, *Marinobacter*
aquaeolei, *Methylibium petroleiphilum*, *Methylobacterium nodulans*, *Methylobacterium*
radiotolerans, *Methylobacterium* sp., *Methylocella silvestris*, *Mycobacterium avium*,
Mycobacterium bovis, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium*
tuberculosis, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter*
20 *winogradskyi*, *Nocardia farcinica*, *Ochrobactrum anthropi*, *Oligotropha carboxidovorans*,
Paracoccus denitrificans, *Pectobacterium atrosepticum*, *Phenylobacterium zucineum*,
Polaromonas naphthalenivorans, *Populus trichocarpa*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus*
mirabilis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Psychrobacter arcticus*,
Pyrobaculum aerophilum, *Pyrobaculum arsenaticum*, *Pyrobaculum calidifontis*, *Ralstonia*
25 *eutropha*, *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia metallidurans*, *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia*
solanacearum, *Rhodococcus opacus*, *Rhodoferrax ferrireducens*, *Roseobacter denitrificans*,
Rubrobacter xylanophilus dsm 9941, *Saccharopolyspora erythraea* nrsl 2338, *Salinispora*
arenicola cns-205, *Salinispora tropica* cnb-440, *Salmonella enterica*, *Serratia*
proteamaculans, *Shewanella halifaxensis*, *Shewanella sediminis*, *Shewanella woodyi*,
30 *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus*
carnosus, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus*
haemolyticus, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas maltophilia*,
Streptomyces coelicolor, *Sulfolobus islandicus*, *Sulfolobus islandicus*, *Thiobacillus*
denitrificans.

35

Les microorganismes (bactéries et archées) sulfato-réducteurs indigènes visés dans le procédé selon l'invention sont de préférence choisis dans la liste suivante :

- Bactéries : *Algorimarina butyrica*, *Desulfatibacillum aliphaticivorans*, *Desulfatibacillum alkenivorans*, *Desulfatiferula olefinivorans*, *Desulfatirhabdium butyrativorans*, *Desulfobacter curvatus*, *Desulfobacter halotolerans*, *Desulfobacter hydrogenophilus*, *Desulfobacter latus*, *Desulfobacter postgatei*, *Desulfobacter psychrotolerans*,
5 *Desulfobacter vibrioformis*, *Desulfobacterium aniline*, *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfobacterium corrodens*, *Desulfobacterium indolicum*, *Desulfobacterium vacuolatum*, *Desulfobacterium zeppelinii*, *Desulfococcus niacini*, *Desulfobacula phenolica*, *Desulfobacula toluolica*, *Desulfobotulus sapovorans*, *Desulfocella halophila*, *Desulfococcus biacutus*, *Desulfococcus multivorans*, *Desulfococcus oleovorans*,
10 *Desulfoluna spongiiphila*, *Desulfofaba fastidiosa*, *Desulfofaba gelida*, *Desulfofaba hansenii*, *Desulfofrigus fragile*, *Desulfofrigus oceanense*, *Desulfoluna butyratoxydans*, *Desulfonema ishimotonii*, *Desulfonema limicola*, *Desulfonema magnum*, *Desulforegula conservatrix*, *Desulfosalina propionicus*, *Desulfosarcina cetonica*, *Desulfosarcina ovata*, *Desulfospira joergensenii*, *Desulfotignum balticum*, *Desulfotignum phosphitoxidans*,
15 *Desulfotignum toluenicum*, *Desulfobulbus elongates*, *Desulfobulbus japonicus*, *Desulfobulbus marinus*, *Desulfobulbus mediterraneus*, *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfobulbus rhabdoformis*, *Desulfocapsa sulfexigens*, *Desulfocapsa thiozymogenes*, *Desulfofustis glycolicus*, *Desulfopila aestuarii*, *Desulforhopalus singaporensis*, *Desulforhopalus vacuolatus*, *Desulfotalea arctica*, *Desulfotalea psychrophila*,
20 *Desulfurivibrio alkaliphilus*, *Desulfobacterium catecholicum*, *Nitrospina gracilis*, *Desulfohalobium retbaense*, *Desulfohalobium utahense*, *Desulfonatronospira delicate*, *Desulfonatronospira thiodismutans*, *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans*, *Desulfonauticus autotrophicus*, *Desulfonauticus submarinus*, *Desulfothermus naphthae*, *Desulfothermus okinawensis*, *Desulfovermiculus halophilus*, uncultured
25 *Desulfohalobiaceae bacterium*, *Desulfomicrobium apsheronum*, *Desulfomicrobium baculatum*, *Desulfomicrobium escambiense*, *Desulfomicrobium hypogeium*, *Desulfomicrobium macestii*, *Desulfomicrobium norvegicum*, *Desulfomicrobium orale*, *Desulfomicrobium thermophilum*, *Desulfonatronum cooperativum*, *Desulfonatronum lacustre*, *Desulfonatronum thiodismutans*, *Bilophila wadsworthia*, *Desulfocurvus*
30 *vexinensis*, *Desulfomonas oviles*, *Desulfovibrio acrylicus*, *Desulfovibrio aerotolerans*, *Desulfovibrio aespoeensis*, *Desulfovibrio africanus*, *Desulfovibrio alaskensis*, *Desulfovibrio alcoholovorans*, *Desulfovibrio alkalitolerans*, *Desulfovibrio aminophilus*, *Desulfovibrio arcticus*, *Desulfovibrio bastinii*, *Desulfovibrio bizertensis*, *Desulfovibrio brasiliensis*, *Desulfovibrio burkinensis*, *Desulfovibrio caledoniensis*, *Desulfovibrio*
35 *capillatus*, *Desulfovibrio carbinolicus*, *Desulfovibrio carbinoliphilus*, *Desulfovibrio cavernae*, *Desulfovibrio cuneatus*, *Desulfovibrio dechloracetivorans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio fairfieldensis*, *Desulfovibrio ferrireducens*, *Desulfovibrio ferrophilus*, *Desulfovibrio frigidus*, *Desulfovibrio fructosovorans*, *Desulfovibrio*

gabonensis, *Desulfovibrio giganteus*, *Desulfovibrio gigas*, *Desulfovibrio gracilis*,
Desulfovibrio halophilus, *Desulfovibrio hydrothermalis*, *Desulfovibrio idahonensis*,
Desulfovibrio indonesiensis, *Desulfovibrio inopinatus*, *Desulfovibrio intestinalis*,
Desulfovibrio litoralis, *Desulfovibrio longreachensis*, *Desulfovibrio longus*, *Desulfovibrio*
5 *magneticus*, *Desulfovibrio marinisediminis*, *Desulfovibrio marinus*, *Desulfovibrio*
marrakechensis, *Desulfovibrio mexicanus*, *Desulfovibrio multispicans*, *Desulfovibrio*
oliviopondense, *Desulfovibrio oryzae*, *Desulfovibrio oxamicus*, *Desulfovibrio oxyclinae*,
Desulfovibrio paquesii, *Desulfovibrio piger*, *Desulfovibrio portus*, *Desulfovibrio*
profundus, *Desulfovibrio psychrotolerans*, *Desulfovibrio putealis*, *Desulfovibrio*
10 *salexigens*, *Desulfovibrio senexii*, *Desulfovibrio simplex*, *Desulfovibrio singaporenus*,
Desulfovibrio sulfodismutans, *Desulfovibrio termitidis*, *Desulfovibrio tunisiensis*,
Desulfovibrio vietnamensis, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio zosterae*, *Lawsonia*
intracellularis, *Desulfobacca acetoxidans*, *Desulfomonile limimaris*, *Desulfomonile tiedjei*,
Smithella propionica, *Syntrophus aciditrophicus*, *Syntrophus buswellii*, *Syntrophus*
15 *gentianae*, *Desulfacinum hydrothermale*, *Desulfacinum infernum*, *Desulfacinum*
subterraneum, *Desulfatimicrobium mahresensis*, *Desulfoglaeba alkanexedens*,
Desulforhabdus amnigena, *Desulfovirga adipica*, *Syntrophobacter fumaroxidans*,
Syntrophobacter pfennigii, *Syntrophobacter sulfatireducens*, *Syntrophobacter wolinii*,
Thermodesulforhabdus norvegica, *Thermodesulfovibrio aggregans*, *Thermodesulfovibrio*
20 *hydrogeniphilus*, *Thermodesulfovibrio islandicus*, *Thermodesulfovibrio thiophilus*,
Thermodesulfovibrio yellowstonii, *Candidatus Desulforudis*, *Cryptanaerobacter*
phenolicus, *Dehalobacter restrictus*, *Desulfotobacterium chlororespirans*,
Desulfotobacterium dehalogenans, *Desulfotobacterium dichloroeliminans*,
Desulfotobacterium hafniense, *Desulfotobacterium hafniense DCB-2*, *Desulfotobacterium*
25 *hafniense DSM 13498*, *Desulfotobacterium hafniense Y51*, *Desulfotobacterium*
metallireducens, *Desulfonispora thiosulfatigenes*, *Desulfosporosinus auripigmenti*,
Desulfosporosinus hippei, *Desulfosporosinus lacus*, *Desulfosporosinus meridiei*,
Desulfosporosinus orientis, *Desulfosporosinus youngii*, *Desulfotomaculum acetoxidans*,
Desulfotomaculum aeronauticum, *Desulfotomaculum alcoholivorax*, *Desulfotomaculum*
30 *alkaliphilum*, *Desulfotomaculum arcticum*, *Desulfotomaculum australicum*,
Desulfotomaculum carboxydivorans, *Desulfotomaculum geothermicum*, *Desulfotomaculum*
gibsoniae, *Desulfotomaculum halophilum*, *Desulfotomaculum hydrothermale*,
Desulfotomaculum indicum, *Desulfotomaculum kuznetsovii*, *Desulfotomaculum luciae*,
Desulfotomaculum nigrificans, *Desulfotomaculum putei*, *Desulfotomaculum reducens*,
35 *Desulfotomaculum ruminis*, *Desulfotomaculum salinum*, *Desulfotomaculum sapomandens*,
Desulfotomaculum solfataricum, *Desulfotomaculum thermoacetoxidans*,
Desulfotomaculum thermobenzoicum, *Desulfotomaculum thermocisternum*,
Desulfotomaculum thermosapovorans, *Desulfotomaculum thermosubterraneum*,

Desulfurispora thermophila, *Pelotomaculum isophthalicum*, *Pelotomaculum propionicicum*, *Pelotomaculum schinkii*, *Pelotomaculum terephthalicum*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Pelotomaculum thermopropionicum* SI, *Pelotomaculum* sp. FP, *Peptococcus niger*, *Sporotomaculum hydroxybenzoicum*, *Sporotomaculum syntrophicum*,
 5 *Syntrophobotulus glycolicus*, *Thermincola carboxydiphila*, *Thermincola ferriacetica*, *Desulfuromonas acetexigens*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Desulfuromonas alkaliphilus*, *Desulfuromonas chloroethenica*, *Desulfuromonas michiganensis*, *Desulfuromonas palmitatis*, *Desulfuromonas svalbardensis*, *Desulfuromonas thiophila*, *Desulfuromusa bakii*, *Desulfuromusa ferrireducens*, *Desulfuromusa kysingii*, *Desulfuromusa*
 10 *succinoxidans*, *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, *Geoalkalibacter subterraneus*, *Geopsychrobacter electrodiphilus*, *Geothermobacter ehrlichii*, *Malonomonas rubra*, *Pelobacter acetylenicus*, *Pelobacter acidigallici*, *Pelobacter carbinolicus*, *Pelobacter masseliensis*, *Pelobacter propionicus*, *Pelobacter seleniigenes*, *Pelobacter venetianus* ;
 - Archées : *Archaeoglobus fulgidus*, *Archaeoglobus infectus*, *Archaeoglobus*
 15 *lithotrophicus*, *Archaeoglobus profundus*, *Archaeoglobus veneficus*.

Parmi les fluides selon la présente invention et en particulier injectés selon le procédé de l'invention, on trouve au moins une source d'azote. De préférence, on utilise le NH_4Cl , le NH_4HCO_3 , le $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, le NH_4Br , le NH_4 -acétate, le NH_4Br , le NH_4 -citrate, ou tout autre
 20 ammonium associé à un élément de même nature, ou un mélange de ceux-ci.

Parmi les fluides selon la présente invention et en particulier injectés selon le procédé de l'invention, on trouve au moins une source de phosphate. De préférence, on utilise le K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 ou tout autre phosphate associé à un autre élément
 25 de la même manière, ou un mélange de ceux-ci.

Parmi les fluides selon la présente invention et en particulier injectés selon le procédé de l'invention, on trouve au moins une source d'ions acétate. De préférence, on utilise l'acétate de Na, l'acétate de potassium, l'acétate d'ammonium, ou tout autre acétate associé
 30 à un élément de même nature, ou un mélange de ceux-ci.

Parmi les fluides selon la présente invention et en particulier injectés selon le procédé de l'invention, on trouve au moins une source d'ions hydrogénocarbonate. De préférence, on utilise le NaHCO_3 , le KHCO_3 ou tout autre ion HCO_3^- associé à un autre élément de la
 35 même manière, ou un mélange de ceux-ci.

Parmi les fluides selon la présente invention et en particulier injectés selon le procédé de l'invention, on trouve au moins une source de peptides. De préférence, on utilise de la

trypticase[®] (dénommée également tryptone[®] ou peptone[®] de caséine), casamino acids[®], SoyCase[®], ou tout autre hydrolysats de protéine, ou un mélange de ceux-ci.

5 Dans une variante de réalisation du procédé, il peut être souhaitable d'ajouter une source de carbone minéral, telle que du CO₂ pour favoriser la croissance des archées méthanogènes.

Dans une variante de réalisation, lorsque les milieux de culture utilisés contiennent de l'oxygène, il est souhaitable d'ajouter de la cystéine-HCl et du Na₂S.

10 Eventuellement, on peut ajouter également au milieu de culture un colorant tel que la Résazurine, indicateur d'oxydo-réduction.

D'autres constituants peuvent facultativement être ajoutés aux fluides injectés tels que décrits ci-dessus. Il pourrait s'agir par exemple de l'hydrogène, de silts quartzes comme agent de soutènement.

20 Il est à noter que les fluides injectés dans la matière organique fossile ne contiennent pas de source de carbone en quantité significative hormis l'éventuel CO₂, ainsi la seule source de carbone permettant la transformation et la production de méthane provient de la roche cible, à savoir une roche riche en kérogène.

La concentration utilisable de CO₂ dans les fluides selon l'invention peut être comprise entre 0 et 10 % v/v en solution.

25 La concentration utilisable d'H₂ dans les fluides selon l'invention peut être comprise entre 0 et 10 % v/v en solution.

30 La nature des composés formant les fluides injectés est importante mais leur concentration respective joue également un rôle majeur. Ainsi, la composition de nutriments constituant en partie lesdits fluides, de préférence à injecter selon le procédé de l'invention, est caractérisée en ce que :

- a. la concentration en NaCl est comprise entre 0 et 35 g/l, de préférence à 1 g par litre,
- b. la concentration en nitrite (NaNO₂) est comprise entre 2 et 10mM, de préférence à 5 mM,
- 35 c. la concentration en sulfite (Na₂SO₃) est comprise entre 2 et 10mM, de préférence à 5 mM,

- d. la concentration en molybdate (Na_2MoO_4) est comprise entre 2 et 10mM, de préférence à 3 mM,
- e. la concentration en oxyde ferrique (Fe_2O_3) est comprise entre 2 et 10mM, de préférence à 5mM,
- 5 f. la concentration en chlorure de Potassium (KCl) est comprise entre 10^{-9} et 10g/l, de préférence à 0,335 g/l,
- g. la concentration en chlorure de Magnésium (MgCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 35g/l, de préférence à 3,45 g/l,
- h. la concentration en chlorure de Manganèse (MnCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 35g/l, de préférence à 4 g/l,
- 10 i. la concentration en chlorure d'Ammonium (NH_4Cl) est comprise entre 10^{-9} et 15g/l, de préférence à 0,25 g/l,
- j. la concentration en chlorure de Calcium (CaCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 35g/l, de préférence à 0,14 g/l,
- 15 k. la concentration en Phosphate de Potassium (K_2HPO_4) est comprise entre 10^{-9} et 12g/l, de préférence à 0,14 g/l,
- l. la concentration en chlorure de fer (FeCl_3) est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 2 mg/l,
- m. la concentration en acétate de sodium est comprise entre 10^{-9} et 150g/l, de préférence à 1 g/l,
- 20 n. la concentration en extrait de levure est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 2 g/l,
- o. la concentration en Trypticase est comprise entre 10^{-9} et 50g/l, de préférence à 2 g/l,
- p. la concentration en hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) est comprise entre 10^{-9} et 50g/l, de préférence à 5 g/l,
- 25 q. la concentration en chlorure de cobalt (CoCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 1 mg/l,
- r. la concentration en chlorure de nickel (NiCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 1 mg/l,
- 30 s. la concentration en chlorure de zinc (ZnCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 1 mg/l,
- t. la concentration en chlorure de cuivre (CuCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,1 mg/l,
- u. la concentration en vanadate de sodium (Na_2VO_3) est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,1 mg/l,
- 35 v. la concentration en aluminium potassique ($\text{AlK}(\text{OH})_2$) est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,1 mg/l,

- w. la concentration en acide borique (H_3BO_3) est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,1 mg/l,
- x. la concentration en chlorure de Lithium (LiCl) est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,01 mg/l,
- 5 y. la concentration en biotine est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,02 mg/l,
- z. la concentration en acide folique est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,02 mg/l,
- aa. la concentration en Pyridoxine ou en chlorhydrate de pyridoxine est comprise entre
- 10 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,1 mg/l,
- bb. la concentration en Thiamine ou en Thiamine-HCl est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- cc. la concentration en Riboflavine est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- 15 dd. la concentration en Acide Nicotinique est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- ee. la concentration en Penthoténate de Calcium est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- ff. la concentration en Vitamine B12 est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à
- 20 0,001 mg/l,
- gg. la concentration en Acide p-Aminobenzoïque est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- hh. la concentration en Acide Thioctique est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- 25 ii. la concentration en Acide Ascorbique est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- jj. la concentration éventuelle en Cystéine-HCl est comprise entre 10^{-9} et 50g/l, de préférence à 0,5 g/l,
- kk. la concentration éventuelle en Na_2S est comprise entre 10^{-9} et 50g/l, de préférence à
- 30 0,5 g/l.

Les microorganismes

Comme évoqué largement ci-dessus, le procédé de production de méthane selon l'invention est basé en partie sur la stimulation des microorganismes indigènes localisés

35 naturellement dans la ou les couches riches en kérogènes ciblées.

Ces microorganismes indigènes comprennent au moins des bactéries et des archées.

De préférence, les microorganismes indigènes mis en œuvre dans le procédé selon l'invention constituent un consortium actif de bactéries syntrophes et d'archées

méthanogènes. Plus préférentiellement, les archées indigènes stimulées sont de la famille des Crenarchaeota.

Les bactéries syntrophes mises en œuvre dans le procédé ou le dispositif selon l'invention seront de préférence choisies parmi les bactéries suivantes :

- 5 *Syntrophus buswellii*, *Syntrophus massiliense*, *Syntrophus gentianae*, *Acetobacterium bakii*, *Acetobacterium dehalogenans*, *Acetobacter acetigenum*, *Acetobacter acetosum*, *Acetobacter cerevisiae*, *Acetobacter cibinongensis*, *Acetobacter estunensis*, *Acetobacter indonesiensis*, *Acetobacter kuetzingianus*, *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter malorum*, *Acetobacter melanogenus*, *Acetobacter orientalis*, *Acetobacter orleanensis*, *Acetobacter oxydans*, *Acetobacter pomorum*, *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter tropicalis*, *Acetobacterium bakii*, *Acetobacterium carbinolicum*, *Acetobacterium fimetarium*, *Acetobacterium malicum*, *Acetobacterium paludosum*, *Acetobacterium tundrae*, *Acetobacterium wieringae*, *Acetobacter fabarum*, *Acetobacter senegalensis*, *Acetobacter ghanensis*, *Acetobacter rancens*, *Acetobacter suboxydans*, *Acetobacterium woodii*,
- 10 *Acetobacter peroxydans*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter aurantium*, *Acetobacter aurantius*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinus*, *Acetobacter intermedius*, *Acetobacter liquefaciens*, *Acetobacter oboediens*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Acetobacter europaeus*, *Acetobacter hansenii*, *Acetobacter methanolicus*, *Desulfobacca acetoxidans*, *Desulfomonile limimaris*, *Desulfomonile tiedjei*, *Smithella propionica*, *Syntrophus aciditrophicus*, *Syntrophus buswellii*, *Syntrophus gentianae*, *Desulfacinum hydrothermale*, *Desulfacinum infernum*, *Desulfacinum subterraneum*, *Desulfatimicrobium mahresensis*, *Desulfoglaeba alkanexedens*, *Desulforhabdus amnigena*, *Desulfovirga adipica*, *Syntrophobacter fumaroxidans*, *Syntrophobacter pfennigii*, *Syntrophobacter sulfatireducens*, *Syntrophobacter wolinii*, *Thermodesulforhabdus*
- 15 *norvegica*, *Syntrophomonas bryantii*, *Syntrophomonas cellicola*, *Syntrophomonas curvata*, *Syntrophomonas erecta*, *Syntrophomonas palmitatica*, *Syntrophomonas sapovorans*, *Syntrophomonas sporosyntrophas*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophomonas zehnderi*, *Syntripsa flavichela*, *Syntripsa matannensis*, *Acetobacter calcoaceticus*, *Acetobacter cerevisiae*, *Acetobacter cibinongensis*, *Acetobacter estunensis*, *Acetobacter fabarum*,
- 20 *Acetobacter ghanensis*, *Acetobacter indonesiensis*, *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter malorum*, *Acetobacter nitrogenifigens*, *Acetobacter oeni*, *Acetobacter orientalis*, *Acetobacter orleanensis*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter peroxydans*, *Acetobacter pomorum*, *Acetobacter senegalensis*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter syzygii*, *Acetobacter tropicalis*, *Acetobacterium bakii*, *Acetobacterium carbinolicum*, *Acetobacterium carbinolicum subsp. Kysingense*, *Acetobacterium dehalogenans*, *Acetobacterium fimetarium*, *Acetobacterium malicum*, *Acetobacterium paludosum*, *Acetobacterium psammolithicum*, *Acetobacterium submarinus*, *Acetobacterium tundrae*, *Acetobacterium wieringae*, *Acetobacterium woodii*.
- 25
- 30
- 35

Les archées méthanogènes mises en œuvre dans le procédé ou le dispositif selon l'invention seront de préférence choisies parmi les suivantes :

Methanocorpusculum aggregans, *Methanocorpusculum bavaricum*, *Methanocorpusculum labreanum*, *Methanocorpusculum parvum*, *Methanocorpusculum sinense*, *Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus chikugoensis*, *Methanoculleus marisnigri*, *Methanoculleus palmolei*, *Methanoculleus receptaculi*, *Methanoculleus submarinus*, *Methanoculleus thermophilus*, *Methanofollis aquaemaris*, *Methanofollis ethanolicus*, *Methanofollis formosanus*, *Methanofollis liminatans*, *Methanofollis tationis*, *Methanogenium boonei*,
 10 *Methanogenium cariaci*, *Methanogenium frigidum*, *Methanogenium marinum*, *Methanogenium organophilum*, *Methanolacinia paynteri*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanoplanus endosymbiosus*, *Methanoplanus limicola*, *Methanoplanus petrolearius*, *Methanosaeta concilii*, *Methanosaeta harundinacea*, *Methanosaeta thermophila*, *Methanimicrococcus blatticola*, *Methanococcoides alaskense*, *Methanococcoides burtonii*,
 15 *Methanococcoides methylutens*, *Methanohalobium evestigatum*, *Methanohalophilus euhalobius*, *Methanohalophilus halophilus*, *Methanohalophilus mahii*, *Methanohalophilus portucalensis*, *Methanolobus bombayensis*, *Methanolobus oregonensis*, *Methanolobus profundus*, *Methanolobus psychrophilus*, *Methanolobus taylorii*, *Methanolobus tindarius*, *Methanolobus vulcani*, *Methanolobus zinderi*, *Methanomethylovorans hollandica*,
 20 *Methanomethylovorans thermophila*, *Methanomethylovorans victoriae*, *Methanosalsum zhilinae*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina baltica*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina lacustris*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina semesiae*, *Methanosarcina siciliae*, *Methanosarcina thermophila*, *Methanosarcina vacuolata*, *Methermicrococcus shengliensis*.

25

L'un des avantages majeurs de la présente invention vient du fait qu'aucun consortium n'est ajouté ou injecté dans la ou les couches riches en kérogènes ciblées. Ainsi, aucune modification de la nature des microorganismes indigènes n'est effectuée. Ceci afin de ne pas « polluer » les roches-mères mais également dans un souci de facilité de mise en œuvre
 30 du procédé et de réduction des coûts. D'autre part, l'utilisation des consortia indigènes évite tous les problèmes liés à l'utilisation de consortia introduits, tels que les difficultés d'implantation, la dégénérescence des consortia introduits au court du temps et les problèmes de faible efficacité et de baisse d'efficacité induits.

35 Par ailleurs, un autre avantage indéniable de la présente invention vient du fait que le procédé de production de méthane selon l'invention offre un rendement en méthane produit très intéressant et ce avec une nette augmentation de la rapidité de conversion des kérogènes riches en hydrogène et thermiquement immatures en méthane par rapport à l'art

antérieur. En effet, le taux de production de méthane selon le procédé de l'invention est nettement supérieur aux taux de production obtenus, bien évidemment, avec des processus naturels mais également supérieur aux taux de production décrits dans l'art antérieur avec des méthodes différentes et/ou des cibles géologiques différentes. On peut particulièrement
5 noter que les productions de méthane dans les différentes conditions expérimentales de Jin et al. (WO 2007022122) sont extrêmement faibles, avec au mieux un rendement de quelques milligrammes de méthane (CH₄) par kilogramme de substrat rocheux, soit quelques parties par million, soit quelques 1/10000 de % (en pourcentage pondéral). La mise en œuvre du procédé selon la présente invention permet une conversion rapide et
10 importante en méthane d'une masse de kérogènes riches en hydrogène et thermiquement immatures et offre ainsi un taux de conversion avantageusement de l'ordre de 25% après quelque dizaine de jours d'incubation après injection des fluides, par exemple 80 jours.

Phase préalable P0 d'exploration et de prospection

15 Pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention, il peut être nécessaire de mettre en œuvre une phase préalable P0 d'exploration et de prospection, de préférence par carottage(s), pour sélectionner une ou des couches à fort potentiel gazier, de préférence riches en kérogènes dans un site géologique donné.

Cette exploration et prospection est effectuée par forage(s), carottage(s), et /ou mesure(s)
20 diagraphe(s) de puits. Le forage et le carottage peuvent être réalisés à l'aide de fluides, à conditions que ces fluides ne soient rien d'autres que de l'eau afin de ne pas fausser les résultats ultérieurs de bioconversion. Le carottage concerne les couches cibles riches en kérogènes et leurs épontes à des profondeurs situées entre 20 et 1500m dans le sous-sol géologique. En complément et postérieurement au carottage, des mesures diagraphiques
25 peuvent être acquises au niveau des couches cibles riches en kérogènes et de leurs épontes, de préférences des mesures in situ de résistivité haute résolution (e.g. outil HRALS de Schlumberger) et de spectrométrie de rayonnement gamma (e.g. outil NGS de Schlumberger).

30 Dans une variante de réalisation de l'invention, la phase P0 d'exploration et de prospection comprend :

- l'identification qualitative et/ou quantitative des microorganismes indigènes, contenus dans lesdits kérogènes du(des) carottage(s) par des méthodes de biologie moléculaire, telles que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), le clonage et le
35 séquençage,
- et si des microorganismes méthanogènes sont identifiés dans lesdits kérogènes susvisés du(des) carottage(s), le suivi de la production de méthane par lesdits

microorganismes indigènes identifiés préalablement dans les kérogènes du(des) carottage(s), ledit suivi comprenant :

- la mesure de la production du méthane dans les kérogènes cibles du(des) carottage(s) après injection des fluides comprenant de l'eau, des nutriments, d'au moins un adjuvant et éventuellement du CO₂ et/ou de l'hydrogène H₂, la composition desdits fluides étant telle que définie précédemment,
- la comparaison de la concentration de méthane avec des prélèvements témoins,
- la quantification prédictive de la production *in situ* de méthane pour la(les) couche(s) géologique(s) étudiées.

Les roches obtenues par carottages sont mises en culture afin de réaliser des expériences de bioconversion des roches-mères et d'observer la capacité des roches prélevées à produire du méthane. Les cultures sont réalisées grâce à un milieu de culture correspondant au milieu de culture tel que défini ci-dessus et comportant au moins de l'eau, des nutriments pour les microorganismes syntrophes et méthanogènes, au moins un adjuvant et éventuellement du CO₂ et/ou de l'H₂. Les nutriments utilisés correspondent à ceux décrits ci-dessus, à savoir des oligoéléments, une solution vitaminique complète, des éléments traces organiques et des inhibiteurs de populations microbiologiques indigènes entrant en compétition avec les populations microbiologiques méthanogènes indigènes. Chacun de ces constituants étant eux-mêmes tels que définis précédemment. Les échantillons de roches prélevées par carottage ont été mis en culture à température constante comprise entre 5°C et 45°C, de préférence à environ 25°C, une température qui correspond à un enfouissement moyen d'environ 500m et à la profondeur de la cible envisagée. Les résultats préliminaires obtenus montrent que la surface de contact entre la solution aqueuse injectée dans la fracturation et les hydrocarbures contenus dans la ou les roches ciblées est un des éléments clés pour une bonne dégradation des hydrocarbures. En conséquence, afin d'augmenter la surface de contact entre le fluide injecté ou solution aqueuse injectée, les échantillons de roches-mères prélevées par carottage sont de préférence broyés finement (taille 50µm), de préférence sous atmosphère anoxique afin d'éviter un choc oxydant aux populations microbiennes autochtones, avant d'être ajoutés comme seule source de carbone et d'énergie aux milieux de culture susmentionnés. L'identification qualitative et/ou quantitative des microorganismes indigènes (populations bactériennes et archéennes) des roches riches en kérogène prélevées par carottage et testées est suivie par des techniques de biologie moléculaire, comme la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), le clonage et le séquençage. On choisit de préférence la technique de PCR/clonage/séquençage d'un gène permettant de réaliser une identification des microorganismes. On choisit de préférence le gène ribosomal 16S, un gène de référence pour la réalisation d'identification

moléculaire de toutes les formes de vie sur terre, après extraction de l'ADN total des cultures de roches toutes les deux semaines.

5 *A – Identification qualitative des populations cibles (archées et bactéries) par PCR/clonage/séquençage.*

L'identification qualitative des microorganismes ou populations indigènes se fait par la procédure suivante :

10 1) Extraction des acides nucléiques (ADN) à partir de la matrice minérale, la roche prélevée par carottage(s) et testée

L'extraction de l'ADN total d'une roche est réalisée d'après *Porteous L.A., Seidler R.J. and Watrud L.S. (1997) « An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications ». Mol Ecol 6: 787-791.*

15 2) Amplification des ADN cibles des populations par PCR (polymerase chain reaction) à l'aide de séquences d'amorçages spécifiques des gènes d'intérêt

Pour un positionnement taxonomique (identification) des différentes populations, on choisira de préférence le gène le plus couramment utilisé qui est le gène codant pour la petite sous-unité du ribosome ou ARNr 16S. Les séquences d'amorçage utilisées permettent d'amplifier de manière spécifique ou non spécifique un groupe particulier de microorganisme, comme par exemple les méthanogènes. (cf tableau 1 ci-dessous)

20 Les séquences des amorces utilisées afin d'identifier les populations microbiologiques contenues dans les échantillons prélevés sont données dans le tableau récapitulatif 1 ci-dessous.

couple d'amorce	Méthode utilisée		
	clonage/ séquençage pour identifier les microorga- nismes des échantillons	qPCR pour quantifier les microorganismes des échantillons	Electrophorèse en gradient de densité (DGGE) pour suivre les microorganismes cibles des échantillons
gène 16S : Cible : populations bactériennes totales Séquence des amorces pA (5'-AGAGT'IT'GATCCTGGCTCAG-3') pH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')	oui	oui	oui
gène 16S : Cible : populations archéennes totales Séquence des amorces pH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') M910R (5'-GCTCCCCCGCCAATTC-3')	oui	oui	oui
gène 16S : Cible : populations méthanogènes	oui	oui	oui

Séquence des amorces M344F (5'-ACGGGGCGCAGCAGGCGCGA-3') M910R (5'-GCTCCCCGCCAATTC-3')			
gène <i>mcrA</i> Cible : populations méthanogènes actives Séquence des amorces McrAF (5'-ACGGGTGGCCAGGCGCGA-3') McrAR (5'-GCTCCCGGCTACCDATTC-3')	possible mais non privilegiée	oui	oui

Tableau 1

Le tableau 1 ci-dessus donne par exemple des couples d'amorces et leur domaine
5 d'utilisation pour le suivi, la quantification et l'identification des populations microbiennes dans les roches-mères riches en matière organique fossile, de préférence riches en kérogènes.

Les conditions d'amplification par PCR seront adaptées aux microorganismes testés. Ainsi
10 pour l'amplification de l'ADN de l'ARNr 16S des populations de microorganismes présents dans les roches testées riches en kérogènes, on utilisera de préférence les conditions suivantes :

Etape	température	durée	
Dénaturation initiale	95°C	5 min	
Dénaturation (cycle PCR)	94°C	30 sec	
Hybridation (cycle PCR)	56°C	45 sec	31 cycles
Elongation (cycle PCR)	72°C	2 min	
Elongation terminale	72°C	10 min	

Tableau 2

D'autres gènes peuvent aussi être utilisés pour une identification spécifique des groupes
fonctionnels des différentes populations des échantillons. Dans le cas des méthanogènes,
de préférence on utilise le gène *mcrA*, qui code pour une enzyme conservée au sein des
20 différentes méthanogènes, et essentielle pour la méthanogenèse.

3) Clonage des séquences amplifiées dans un vecteur de propagation approprié

Le vecteur de propagation approprié peut être par exemple un vecteur de
clonage/séquençage pour la bactérie *E. coli*. On choisit de préférence des vecteurs adaptés
25 pour le clonage de produits de PCR tels que pGEM-T[®] ou pGEM-T easy[®]

4) Détermination des séquences (séquençage) des gènes amplifiés

Cette détermination se fait par des méthodes classiques largement connues de l'homme du métier comme par exemple par la méthode Sanger ou les méthodes de séquençage de nouvelle génération (454 ou Solexa). On choisit de préférence la méthode de Sanger.

La méthode par clonage 3) suivie du séquençage 4) des gènes amplifiés par PCR (étape 2) est une méthode qualitative permettant de connaître de manière précise et robuste les groupes taxonomiques et les espèces microbiennes présentes ou non dans les échantillons testés. Elle permet donc de déterminer quelle espèce de méthanogène est présente dans la roche testée, ce qui est important pour connaître le potentiel de conversion de la matière organique en méthane. Cette méthode est cependant assez lourde et longue à mettre en œuvre. Elle n'est donc pas adaptée pour le suivi de colonisation de sites, de roches-mères ou de cultures. Pour le suivi, d'autres méthodes basées sur une analyse plus superficielle des ADN amplifiés sont utilisées et seront détaillées plus bas (DGGE et PCR-RFLP).

5) Identification des cibles par analyse phylogénétique des séquences des gènes amplifiés contre les bases de données existantes du même gène cible (ARNr 16S ou *mcrA*)

Cette identification se fait grâce aux bases de données de gènes d'ARNr16S alignées disponibles auprès de différents instituts, tels que le Ribosomal Database Project (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu/>, Michigan State University), ou dans des programmes spécifiques de taxonomie, tels que le programme Arb (<http://www.arb-home.de/>, Université technique de Munich, Allemagne). On utilise de préférence une identification par la fonction de classification du RDP.

B – Identification quantitative des populations cibles (archées et bactéries) par qPCR.

L'identification quantitative des populations indigènes d'intérêt se fait par une procédure dérivée de la précédente :

1) Extraction des acides nucléiques (ADN) à partir de la matrice minérale, la roche prélevée par carottage(s) et testée

Cette extraction est identique à celle exposée pour l'identification qualitative des populations cibles.

30

2) Amplification des ADN cibles des populations par PCR (polymerase chain reaction) à l'aide de séquences d'amorçages spécifiques des gènes d'intérêt

Les séquences d'amorçage utilisées possèdent un marqueur fluorescent qui permet à tout moment lors de la réaction d'amplification de l'ADN par PCR de mesurer la fluorescence présente, d'en déduire la quantité d'ADN amplifié à partir de la cible, et par comparaison avec des témoins, d'établir la concentration de la cible dans l'échantillon amplifié.

35

Les séquences d'amorces sont données dans le tableau 1 ci-dessus.

Comme marqueur fluorescent, on peut utiliser les fluorochromes classiques de la biologie moléculaire tels que cy3, cy5, rhodamine, fluorescéine, etc. ou un marquage radioactif au ³²P. De préférence, on utilisera un marquage à la rhodamine. On peut alternativement
5 utiliser un marquage externe de l'ADN lors de la réalisation de la quantification des ADN par qPCR, avec des agents intercalant de l'ADN, tels que le Bromure d'éthidium (BET), le SYBR Green[®], le SYBR Gold[®], de préférence des agents non cytotoxiques, non carcinogènes, tels que le SYBR Green[®].

- 10 Les témoins utilisés sont constitués d'une gamme des suspensions de cellules de bactéries ou d'archées méthanogènes en culture pure, dénombrées par cytométrie en flux et en concentration connue, sur une gamme couvrant les concentrations cellulaires attendues dans les échantillons, de préférence on utilisera *Methanosarcina mazei* souche DSM 7222 comme témoin pour les archées et *Pseudomonas fluorescens* souche 15344 comme témoin
15 pour les bactéries.

- La méthode d'identification quantitative de deux groupes bactériens présentent un intérêt primordial: la quantification des populations bactériennes totales permet d'avoir une estimation totale de la capacité du milieu à supporter la croissance des bactéries, et donc la
20 dégradation des kérogènes; et la quantification des populations méthanogènes totales permet d'avoir une estimation du ratio méthanogènes/bactéries.

De préférence, cette méthode d'identification quantitative est complétée par une estimation de la concentration de trois groupes microbiens :

- 25 - les microorganismes possédant le gène *mcrA*, et donc réalisant effectivement la méthanogenèse dans la culture, pour confirmer l'estimation de la proportion de méthanogènes basée sur le gène ARNr 16S, de préférence on utilisera *Methanosarcina mazei* souche DSM 7222 comme témoin ;
- les microorganismes réducteurs des sulfates et des nitrates, dont les activités sont
30 antagonistes de la méthanogenèse, de préférence on utilisera *Geobacter hydrogenophilus* souche DSM 13691 comme témoin.

Les séquences utilisées pour chaque groupe sont données ci-dessus dans le tableau récapitulatif 1.

35

Un suivi quantitatif peut être avantageusement effectué dans la phase préalable P0 d'exploration et de prospection selon l'invention. Ce suivi quantitatif peut se faire par qPCR et il est essentiel pour déterminer les concentrations des différentes populations

cibles dans l'échantillon testé. Cette méthode est cependant assez lourde et coûteuse à mettre en œuvre. Elle n'est donc pas adaptée pour le suivi de colonisation de sites, de roches-mères ou de cultures. Pour ce suivi quantitatif, d'autres méthodes basées sur une analyse plus superficielle des ADN amplifiés sont utilisées et détaillées ci-dessous (DGGE et PCR-RFLP).

Dans une variante de réalisation, il est avantageux d'effectuer un suivi des populations cibles (archées et bactéries) par électrophorèse en gradient de densité (DGGE). Cette quantification des populations indigènes d'intérêt se fait par une procédure dérivée de la méthode d'identification quantitative précédente et se déroule comme suit :

1) Extraction des acides nucléiques (ADN) à partir de la matrice minérale, la roche prélevée par carottage(s) et testée

Cette extraction est identique à celle exposée ci-dessus pour l'identification qualitative des populations cibles.

2) Amplification des ADN cibles des populations par PCR (polymerase chain reaction) à l'aide de séquences d'amorçages spécifiques des gènes d'intérêt ciblés

Les séquences d'amorces sont données dans le tableau 1 ci-dessus. Cette amplification de fait de la même façon que décrite précédemment dans l'identification qualitative (A) ou quantitative (B) des populations cibles.

3) Séparation des ADN amplifiés en fonction de la taille et de leur composition en bases azotées par électrophorèse en gradient de densité (DGGE)

L'électrophorèse se fait dans des conditions standard, à savoir en gel d'agarose 0,8% dans un gradient de SDS de 0 à 10% pour un voltage compris entre 40 et 150V.

Cette séparation par gradient de concentration d'agent dénaturant permet de séparer physiquement et ainsi de distinguer, dans un mélange de molécules d'ADN amplifié par PCR, dont les tailles et par conséquent les mobilités électrophorétiques sont très proches, les molécules dont les séquences nucléiques diffèrent.

4) Analyse des profils de migration des fragments d'ADN

Cette analyse se fait automatiquement à l'aide des outils logiciels appropriés tels que le logiciel DCode[®] de Biorad[™].

5) Identification des fragments de gènes amplifiés par comparaison avec des témoins d'identité connus

De préférence, l'identification des bandes est réalisée par reconstruction de la proximité cladistique entre les différents profils, la création d'arbres de proximité par la méthode du neighbour-joining, et par le test de la stabilité des arbres obtenus par un test de bootstrap.

- 5 Grâce à cette méthode de suivi et en particulier grâce à l'identification des fragments de gènes amplifiés, il est possible de déterminer de façon semi quantitative la présence de chaque fragment d'ADN individualisé sur le gel d'électrophorèse et ce parmi un pool d'amplifiât de départ. Par conséquent, si il existe une corrélation directe entre ce pool d'amplifiât et les populations microbiennes dans les roches-mères/cultures, il est possible
- 10 alors de donner une estimation de la proportion relative des groupes d'intérêt dans les échantillons prélevés et testés.

- De plus, cette méthode de suivi semi-quantitatif des populations cibles dans l'échantillon testé permet de déterminer si la proportion d'un groupe d'intérêt donné varie, de manière
- 15 relative, au cours du temps ou en fonction des traitements. Ceci permet d'autant plus d'optimiser la composition des fluides injectés in situ afin de cibler au mieux en fonction du temps les besoins des populations cibles. En revanche, cette méthode de DGGE ne donne pas une identification très précise des différents groupes microbiens. Il est nécessaire de lui adjoindre une autre méthode de suivi, tel que le suivi par
- 20 clonage/séquençage.

C - Suivi de la production de méthane par les populations cibles

- Si des microorganismes méthanogènes ont été identifiés dans les roches riches en matières
- 25 organiques, de préférence à fort potentiel gazier, telles que les roches riches en kérogènes issus des carottage(s), il est alors intéressant d'effectuer un suivi de la production de méthane par ces dits microorganismes identifiés.

- Le suivi de la production de méthane peut être effectué par les techniques adéquates telles
- 30 que la chromatographie. De préférence, on choisit la chromatographie en phase gaz (GC-FID) après séparation sur une colonne. Dans cette méthode de quantification du méthane par chromatographie en phase gaz, la production de méthane par les microorganismes indigènes est mesurée par quantification directe du méthane présent dans les ciels de culture par la méthode suivante :

- 35 1) une quantité fixée de ciel, par exemple 50µl, est prélevée de manière régulière, de préférence bihebdomadaire dans chaque échantillon testé, de préférence dans des fioles d'expérimentation,

- 2) la fraction de ciel est injectée dans un chromatographe à phase gaz, de préférence un chromatographe Agilent 7820,
- 3) la fraction de ciel est séparée par chromatographie sur une colonne ad hoc, telle qu'une colonne capillaire, de préférence une colonne poraplot Q[®] (Varian, Inc, USA),
- 5 4) le méthane est détecté par un détecteur ad hoc, tel qu'un détecteur à induction de flamme (FID) ou un détecteur de conductivité thermique (TCD), de préférence un détecteur à induction de flamme FID,
- 5) la concentration de méthane dans les ciels est quantifiée par comparaison avec des témoins de méthane de concentrations connues. Ces témoins sont préparés à partir d'un gaz
- 10 pur témoin commercial (Alphagaz[®]) afin de couvrir la gamme de concentration attendue lors du procédé (0 à 25%, v/v),
- 6) la présence d'impuretés, tels que d'autres gaz tels que des alcanes en C2 (éthane) ou C3 (propane), des alcools en C1 (méthanol), C2 (éthanol) et C3 (propanol) peut être détectée de manière concomitante avec le même détecteur qu'à l'étape 4) ci-dessus, de préférence
- 15 un détecteur à induction de flamme FID. Cette étape de détection des impuretés est réalisée systématiquement.

Une quantification prédictive de la production *in situ* de méthane est alors estimée. Celle-ci repose sur l'utilisation de marqueurs pétrologiques (qualité et quantité de la matière

20 organique fossile, taille et composition des couches géologiques), de marqueurs biologiques (identification et quantification des populations cibles) et des estimations de vitesse de conversion de la matière organique fossile par les consortia indigènes. De cette quantification prédictive découlera la prise de décision de la mise en œuvre ou non *in situ*, sur les sites géologiques appropriés, du procédé de production de méthane selon la présente

25 invention. Il est à noter que cette phase préalable P0 d'exploration et de prospection sert uniquement à déterminer s'il est intéressant ou non de poursuivre *in situ* et de prédire le potentiel de production de méthane d'un site donné. Il est clair que cette phase ne sert nullement à sélectionner des bactéries prélevées *in situ* pour ensuite les réinjecter via une unité d'injection dans une ou des couches riches en kérogènes en vue d'augmenter la

30 production de méthane à partir desdits kérogènes.

DESCRIPTION DES FIGURES

La figure 1 est un diagramme montrant les quantités d'hydrocarbures libres (gaz et huile)

35 mesurées par pyrolyse Rock Eval[®] à l'*Institut Français du Pétrole Energies Nouvelles* dans des échantillons de roches prélevées entre 0 et 2500 m de profondeur pour des gisements de schistes noirs.

La figure 2 est une représentation schématique du procédé selon l'invention.

Sur cette figure 2, on observe que les fluides injectés (eau, nutriments, adjuvant(s) et/ou CO₂ et/ou H₂) sont injectés par un puits d'injection L, via une unité d'injection A, à deux profondeurs de roche-mère I (roches riches en kérogènes). Après percolation et dégradation des kérogènes in situ, les fluides ayant percolés au travers des roches (eau, CO₂, CH₄) dont le méthane produit sont soutirés, extraits par pompage au travers d'un puits de soutirage M et sont recueillis via une station de pompage C puis séparés dans l'unité de séparation B. Le méthane produit et recueilli est alors comprimé et stocké et/ou acheminé vers le circuit de distribution D. L'eau et le CO₂ sont orientés vers la station d'injection A où ils pourront être réutilisés lors d'une nouvelle injection de fluides. Les roches traversées par les puits d'injection L et de soutirage M sur la figure 2 sont une nappe phréatique E, des argilites F et K, des grès G, du calcaire H, des roches-mères I et des évaporites J. La réaction qui se produit lors de la dégradation du kérogène est la suivante :



La figure 3 est une représentation schématique des structures types des molécules présentes dans les roches riches en matière organique fossile non maturées thermiquement, ledit schiste bitumineux.

Ainsi, dans le schiste bitumineux, on trouve :

- 80% de kérogène de type I qui correspond à un assemblage de chaînes aliphatiques et de composés polycycliques tels que la structure type le montre en A de la figure 3, et
- 20% de bitume B composé lui-même de 73% de résines dont les structures types sont représentées en B1 de la figure 3, 22% d'hydrocarbures saturés dont les structures types sont représentées en B2 de la figure 3 et 5% d'hydrocarbures aromatiques dont les structures types sont représentées en B3 de la figure 3.

La figure 4 est une représentation de la production de méthane (en µg) obtenue dans différents échantillons mis en cultures (pour 4g de roche prélevée).

Ainsi, sur la figure 4 :

- l'échantillon A correspond au milieu de culture seul (voir ci-dessous composition du milieu de culture),
- l'échantillon B correspond au milieu de culture avec 4g de poudre de Schistes carton du Toarcien (commune d'Entrange, 57), préalablement stérilisée par chauffage à l'autoclave,
- l'échantillon C correspond à de l'eau distillée stérile avec 4g de poudre de Schistes carton du Toarcien,

- l'échantillon E1 correspond au milieu de culture (cf. ci-dessous composition du milieu de culture) avec 4g de poudre de Schistes carton du Toarcien, niveau 1, prélevé à 12m de profondeur,
 - l'échantillon E2 correspond au milieu de culture (cf. ci-dessous composition du milieu de culture) avec 4g de poudre de Schistes carton du Toarcien, niveau 2, prélevé à 8m de profondeur,
 - l'échantillon F correspond au milieu de culture (cf. ci-dessous composition du milieu de culture) avec 4g de poudre de schistes bitumineux du bassin de l'Aumance (03), niveau 1, prélevé à 4,5m de profondeur.
- On observe donc qu'une production de méthane est obtenue dans les échantillons C, E1, E2 et F, c'est-à-dire dans les échantillons ayant du Schiste carton du Toarcien dont les microorganismes sont encore vivants. On observe de plus que dans les échantillons E1, E2 et F, la production de méthane est nettement plus importante que la production de l'échantillon C, traduisant un rendement très élevé. Ceci est du à la combinaison du milieu de culture utilisé, objet de l'invention, et la variabilité des cibles géologiques choisies.

L'invention va maintenant être illustrée par les exemples suivants.

EXEMPLES

20

Exemple 1 – Etude de distribution des gaz et huiles biogéniques en fonction de la profondeur des roches

Le diagramme présenté à la figure 1 montre les quantités d'hydrocarbures libres dans les échantillons d'une même couche en fonction de sa profondeur d'enfouissement (diagramme réalisé à partir des données de mesures par pyrolyse Roch Eval® effectuées à l'*Institut Français du Pétrole Energies Nouvelles* . Le diagramme révèle que les gaz et huiles présents entre 0 et 1300/1400m sont essentiellement d'origine microbiologique. Au-delà de 1500m de profondeur, les gaz et huiles sont d'origine thermogénique

30

Exemple 2 - Prélèvement in situ (exploration et prospection)

Des prélèvements dans les schistes bitumineux permien du bassin de l'Aumance sur la commune de Franchesse (Allier) ont été réalisés. Plusieurs kilogrammes de roche prélevés entre 50 cm et 1m50 de profondeur ont été récupérés par carottage dans des conditions d'asepsie les meilleures possibles, conservés en conditions anoxiques dans des fioles anaérobies jusqu'à leur mise en culture en laboratoire dans des milieux adaptés à la culture des archées méthanogènes.

Une deuxième série de prélèvement par forage à 15m a été réalisée dans les formations de Schistes cartons toarciens du bassin parisien (commune d'Entringe, Moselle) et de nouveau dans les schistes bitumineux du bassin de l'Aumance. Le cœur de la carotte est prélevé. Une fraction de cet échantillon, environ 1g, est utilisée pour une analyse chimique exhaustive de la matière organique présente. Une deuxième fraction, de 4g environ, est broyée en conditions anoxiques afin de limiter la mortalité des organismes anaérobies et principalement les méthanogènes qui sont hypersensibles à l'oxygène, et mise en culture pour stimuler les populations de méthanogènes. Les expériences de bioconversion des roches-mères ont été réalisées, à température constante de 25°C, dans des microcosmes de 55ml contenant chacun 4g de roche mère pour 20ml de milieu de culture dont la composition est donnée ci-après (cf. composition des milieux de culture) avec un volume de ciel d'environ 40ml. Le ciel est composé d'un mélange d'azote et de dioxyde de carbone en proportions 80:20.

Les cultures sont incubées à la température *in situ* de la roche mère ciblée (500m, 25°C) pendant une période de 4 mois.

La détection et l'identification des méthanogènes et de la cohorte des syntrophes est réalisée à trois dates : à l'inoculation, après 3 semaines d'incubation et après 7 semaines d'incubation.

20 Exemple 3 – Identification qualitative des microorganismes des échantillons prélevés.

L'identification des populations indigènes se fait par la procédure suivante :

1) Extraction des acides nucléiques (ADN) à partir de la matrice minérale ou roche prélevée par carottage

Pour 0,05 g de sol, on ajoute 95,3 µl de tampon de lyse (1% SDS, Tris HCL (pH=8) 0,1M, Na₂EDTA (pH=8) 0,1M et NaCl 0,1M) et 7,5 µl de Guanidine isothiocyanate 5M. On agite au vortex 5 min, puis on incube 3 min à 60°C. On répète cette étape d'agitation et d'incubation puis on incube 1h à 68°C. On agite au vortex 1 min. Une centrifugation à 13000g pendant 15 min est effectuée. Le surnageant (environ 90 µl) est récolté dans un tube de 1,5 ml auquel on ajoute 11,25 µl d'Acétate de Potassium 5M et 37,5 µl de Polyéthylène Glycol 8000 à 40% (PEG). On effectue une précipitation à -20°C au moins 1h. On laisse décongeler à température ambiante. On centrifuge à 13000g pendant 15 min et on laisse décanter et on garde le culot.

2) Amplification des ADN cibles des populations par PCR (polymerase chain reaction) à l'aide de séquences d'amorçages spécifiques des gènes d'intérêt

Les séquences d'amorçage du gène ARNr 16S sont utilisées et sont décrites dans le tableau 1 ci-dessus. Les méthodes de PCR classiques sont utilisées et sont décrites dans le tableau 2

ci-dessus. Elles permettent ainsi d'amplifier de manière spécifique ou non spécifique un groupe particulier de microorganisme, comme par exemple les méthanogènes. Ont été utilisées les couples d'amorces permettant l'amplification des populations bactériennes totales (pA, pH), des populations archéennes totales (pH, M910R) et des populations de
5 méthanogènes (M344F, M910R) (cf. tableau 1 ci-dessus).

3) Clonage des séquences amplifiées dans un vecteur de propagation approprié

Les produits de PCR sont purifiés sur colonne d'affinité (Qiaprep, Qiagen, Allemagne) selon le protocole du fournisseur. La concentration des produits de PCR purifiés est
10 estimée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% après migration à 100V en présence d'une échelle de poids moléculaire permettant de réaliser cette quantification, telle que l'échelle 1kb-ladder[®] de Fermentas (Lettonie). Les produits de PCR purifiés sont ensuite clonés dans le vecteur pGEM-T easy[®] (Promega France) selon les instructions du fabricant.

15 4) Détermination des séquences (séquençage) des gènes amplifiés

Les fragments d'ADN clonés sont amplifiés par les bactéries hôtes (*E. coli*) par culture en milieu Gibco[®] LBroth (Invitrogen, France), purifiés par chromatographie sur colonne d'affinité à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen (Allemagne) en suivant les
20 recommandations du fabricant, et utilisés comme cibles pour le séquençage par la méthode de Sanger telle que décrite dans (Maniatis, A laboratory Manual, 1989), sur un séquenceur automatique de type ABI 3730 ou équivalent.

5) Identification des cibles par analyse phylogénétique des séquences des gènes amplifiés contre les bases de données existantes du même gène cible (ARNr 16S ou *mcrA*)

25 Les séquences d'ADN obtenues ont été envoyées au serveur du Ribosomal Database Project pour identification, en utilisant la fonction "Classifier" afin d'obtenir la position taxonomique.

6) L'évolution des populations bactériennes et archéennes a été suivie par
30 clonage/séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S après extraction de l'ADN total des cultures toute les deux semaines. La production de méthane en fin de cycle a été faite par chromatographie en phase gaz (GC-FID) après séparation sur une colonne PoraPlot Q (Varian, Inc) en utilisant une température de four variable de 40 à 200°C et une rampe en température de 10°C/mn, une pression d'injection de 10 PSI, une température de détecteur
35 de 300°C, une vitesse de gaz porteur, de préférence l'He, de 30ml/mn, et un flux d'hydrogène de 30ml pour un flux d'air de 300ml pour la flamme du détecteur.

Exemple 4 – Quantification des populations cibles (archées et bactéries) par qPCR

1) Extraction des acides nucléiques (ADN) à partir de la matrice minérale, la roche prélevée par carottage(s) et testée

Cette extraction est identique à celle exposée dans l'exemple 2.

5

2) Amplification des ADN cibles des populations par PCR (polymerase chain reaction) à l'aide de séquences d'amorçages spécifiques des gènes d'intérêt

Pour une meilleure quantification il est conseillé de refroidir le rotor à -20 °C avant de procéder à la qPCR.

10 Préparer le mélange qPCR sur glace*.

En cas d'utilisation d'un couple d'amorces non marquées :

H ₂ O	2,6µl
Amorces (10 µM chaque)**	0,4µl
cDNA	2µl

15 2 x Qiagen QuantiTect SYBR Premix 2µl

En cas d'utilisation d'un couple d'amorces marquées avec le fluorochrome cy2 :

H ₂ O	2,6µl
Amorces (10 µM chaque)**	0,4µl

20 cDNA 2µl

2 x Roche FastStartplus DNA Master Premix 2µl

* Il convient de protéger le mélange de la lumière jusqu'à utilisation.

** Il s'agit ici des deux amorces nécessaires à l'amplification, par exemple pA et pH si l'on souhaite amplifier le gène ribosomique 16S de toutes les bactéries. Il convient d'utiliser une concentration identique de chacune des 2 amorces.

Pour chaque échantillon, utiliser 8µl du mélange PCR et 2µl de la cible à analyser dans les capillaires d'électrophorèse ad hoc pour la machine de PCR en temps réel.

30

Les PCR sont réalisées sous le paramétrage suivant :

Dénaturation initiale 95°C, 10s

Cyclage:

Denaturation 95°C, 5s

35 Hybridation/Extension 60°C, 20s

Lecture de l'absorbance (à 560 nm)

- Un ensemble de témoins sont utilisés pour la quantification : Un témoin sans ADN; une gamme de concentration d'une cible connue (gène 16S ou gène mcrA), d'une souche connue (Methanosarcina mazei souche DSM 7222 pour les archées, et Pseudomonas fluorescens souche 15344 pour les bactéries), de concentrations connues et couvrant les concentrations attendues pour les échantillons à analyser. Typiquement la gamme recouvre de 10^{10} à 10^3 cibles par millilitre.

Exemple 5 – Suivi de la production de méthane (chromatographie en phase gaz)

- Le suivi de la production de méthane des échantillons prélevés selon l'exemple 1 et testés selon les exemples 2 et/ou 3 est effectué par la technique de chromatographie en phase gaz (GC-FID) après séparation sur une colonne. Dans cette méthode de quantification du méthane par chromatographie en phase gaz, la production de méthane par les microorganismes indigènes est mesurée par quantification directe du méthane présent dans les ciels de culture par la méthode suivante :
- 1) 50 μ l de ciel est prélevée de manière bihebdomadaire dans chaque échantillon testé dans des fioles d'expérimentation,
 - 2) la fraction de ciel est injectée dans un chromatographe à phase gaz Agilent 7820 équipé d'un injecteur split/splitless et de deux détecteurs en série (TCD/FID),
 - 3) la fraction de ciel est séparée par chromatographie sur une colonne Chrompak Poraplot Q column (e.g. 0.32 mm i.d. x 25 m),
 - 4) le méthane est détecté avec un temps de rétention d'environ 1mn50sec dans cette configuration par un détecteur à induction de flamme (FID),
 - 5) la concentration de méthane dans les ciels est quantifiée par comparaison avec des témoins de méthane de concentrations connues. Ces témoins sont obtenus par dilution successive d'une source de gaz méthane pure (Alphagaz[®]) dans l'azote pur (Alphagaz[®]) afin de couvrir la zone de concentration adaptée (0 à 25% méthane dans l'azote, v/v),
 - 6) la présence d'impuretés, qui apparaissent sur le spectre avec un temps d'élution supérieur au méthane (1mn50sec) est testée de manière concomitante avec le même détecteur (FID) en réalisant des séparations longues (17mn) qui excèdent largement les temps de rétention des contaminations principales attendues ($Tr_{\text{propane}} \sim 8\text{mn}$).

Exemple 6 – Procédé de production de méthane selon l'invention

- Sur le site du bassin stéphano-permien du Bas-Dauphiné (i.e. plaine de l'Est lyonnais), 75 000 l de fluides tels que définis ci-dessous (cf. composition des milieux de culture) auxquels ont été ajoutés 5% de CO₂, et 5% (v/v) de silts quartzeux comme agent de soutènement ont été injectés initialement grâce à une pompe hydraulique de type Udor GK,

à la pression minimale de 180 bars au fond d'un puits, entre packer (système annulaire gonflable permettant d'obturer et d'étanchéifier le conduit du puits), par un forage subhorizontal en profondeur au sein d'une couche riche en kérogène d'une épaisseur de 9m et située à 500m de profondeur. Après cette injection initiale, un flux stationnaire de fluides tels que définis ci-dessus vers la couche riche en kérogènes est assuré, à une pression de 180 bars. Ce flux correspond aux quantités de fluides conjointement extraits.

Après 25 jours, les fluides ayant percolé au travers des roches riches en kérogènes ciblées commencent à être soutirés/pompés par une unité de pompage hydraulique de type Udor GK localisée en tête d'un puits secondaire de récupération situé en amont-pendage du puits d'injection, à une distance linéaire en surface de 500 mètres pour créer un flux continu de fluides au travers de la couche riche en kérogènes (voir figure 2).

De ces fluides pompés, le CO₂ et le méthane sont séparés par filtration membranaire (selon le procédé proposé par MEDAL, société du groupe Air Liquide) dans l'unité de séparation. Le méthane produit est comprimé par une unité de compression de gaz (Pro2 Environnement), ou encore en utilisant un compresseur à vis lubrifiée par exemple un compresseur à vis lubrifiée de Air Liquide, à une pression située entre 25 et 80 bars et orienté vers le réseau de transport.

La phase issue de l'unité de séparation contenant le CO₂ résiduel est alors réorientée vers l'unité d'injection et sera réutilisée lors d'une nouvelle injection de fluides telle que mentionnée ci-dessus.

Composition des milieux de culture

Milieu de croissance CP141 "base" pour la stimulation de la croissance des méthanogènes

Milieu basé sur le « Methanogenium Medium DSMZ 141, mais la concentration en NaCl est de préférence de 1g/l au lieu de 18g/l et les solutions « éléments trace » et « solution vitaminique » ont été remplacées par les solutions « minérales » et « vitamines de Wolfe » détaillées ci-dessous.

KCl	0,335	g
MnCl ₂ x 6 H ₂ O	4,000	g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	3,450	g
NH ₄ Cl	0,250	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,140	g
K ₂ HPO ₄	0,140	g
NaCl	1,000	g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 7H ₂ O	2,000	mg

	Na-acetate	1,000	g	
	Extrait de levure (Difco)	2,000	g	
	Trypticase (BBL)	2,000	g	
	Résazurine	1,000	mg	(1ml de solution stock 0.1%)
5	NaHCO ₃	5,000	g	(à rajouter en dernier)
	Eau distillée (qsp)	1000,000	ml	

10 *Milieu à préparer en conditions anaérobies (sous atmosphère H₂+CO₂). Ajuster le pH à 7 avec HCl. Milieu à autoclaver à 121°C pendant 20 minutes. Et Au dernier (30 minutes avant « utilisation » du milieu on rajoute :*

	Solution minérale de Wolfe modifiée	10	ml	(voir ci-après)
	Solution vitaminique de Wolfe modifiée	10	ml	(voir ci-après)
	NaNO ₂	5	mM	(solution stock à 100X)
15	Na ₂ SO ₃	5	mM	(solution stock à 100X)
	Na ₂ MO ₄ . 2H ₂ O	3	mM	(solution stock à 100X)
	Fe ₂ O ₃	5	mM	(solution stock à 100X)
	Cysteine-HCl x H ₂ O	0,500	g	(solution stock à 100X)
	Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,500	g	(solution stock à 5%)

20

Solution minérale de Wolfe modifiée:

Disponible à partir de ATCC en tant que liquide stérile prêt à l'emploi (Trace Mineral Supplement, catalog no. MD-TMS.)

	Acide Nitrilotriacétique	1,5	g
25	MgCl ₂ . 6H ₂ O	3,0	g
	MnCl ₂ . xH ₂ O	0,5	g
	NaCl	1,0	g
	FeCl ₃	0,1	g
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,1	g
30	CaCl ₂	0,1	g
	NiCl ₂	0,1	g
	ZnCl ₂	0,1	g
	CuCl ₂ . 10H ₂ O	0,01	g
	NaVO ₃	0,01	g
35	AlK(OH) ₂	0,01	g
	H ₃ BO ₃	0,01	g

45

Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,01	g
LiCl	0,01	g
Eau distillée (qsp)	1,0	L

- 5 *Ajouter de l'acide nitrilotriacétique à environ 500 ml d'eau et ajuster au pH 6.5 avec du KOH pour dissoudre le composé. Amener au volume d'1,0 L avec l'eau restante et ajouter les composés restants un à un.*

Solution vitaminique de Wolfe modifiée :

- 10 *Disponible à partir de ATCC en tant que liquide stérile prêt à l'emploi (Vitamin Supplement, catalog no. MD-VS).*

	Biotine	2,0	mg
	Acide Folique	2,0	mg
	Chlorhydrate de Pyridoxine	10,0	mg
	Thiamine . HCl	5,0	mg
15	Riboflavine	5,0	mg
	Acide Nicotinique	5,0	mg
	Calcium D-(+)-pantothenate	5,0	mg
	Vitamine B12	0,1	mg
	Acide p-Aminobenzoïque	5,0	mg
20	Acide Thiocétique	5,0	mg
	Acide ascorbique	5,0	mg
	Eau distillée (qsp)	1,0	L

Stériliser par filtration.

REVENDICATIONS

- 1- Procédé de production in situ de gaz méthane caractérisé en ce que :
- on choisit une ou plusieurs couches riches en kérogènes naturels, de préférence en kérogènes ayant un rapport H:C supérieur ou égal à 1, dans le sous-sol géologique superficiel allant de 0 m jusqu'à 1500 m de profondeur, de préférence de 0m jusqu'à 1000m, plus préférentiellement encore de 0m jusqu'à 500 m,
 - on stimule la croissance et l'activité des microorganismes indigènes contenus naturellement et localement dans lesdits kérogènes naturels pour augmenter la dégradation desdits kérogènes et la production de méthane dans lesdits kérogènes,
 - on extrait le méthane produit, de préférence au fur et à mesure de sa production.
- 2- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 1- l'injection de fluides, de préférence sous pression, dans une ou plusieurs couches riches en kérogènes naturels au travers desquels ces fluides percolent,
 - 2- le forçage métabolique des microorganismes indigènes par lesdits fluides pour augmenter la dégradation desdits kérogènes et la production de méthane dans lesdits kérogènes,
 - 3- le pompage des fluides ayant percolé au travers desdits kérogènes et contenant le méthane produit,
 - 4- le recueil du méthane, de préférence au fur et à mesure de sa production,
 - 5- la compression du méthane recueilli,
 - 6- le stockage et/ou la distribution du méthane recueilli et comprimé.
- 3- Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend une étape préalable de fracturation hydraulique du sous-sol géologique dans une ou plusieurs couches riches en kérogènes naturels, de préférence en kérogènes ayant un rapport H:C supérieur ou égal à 1.
- 4- Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comprend une étape préalable de forage du sous-géologique pour faire l'injection de fluides dans une ou plusieurs couches riches en kérogènes naturels, de préférence en kérogènes ayant un rapport H:C supérieur ou égal à 1.
- 5- Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il ne comprend pas de chauffage des fluides d'injection.

6- Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les microorganismes indigènes comprennent au moins des bactéries, des archées, de préférence un consortium actif de bactéries syntrophes et d'archées méthanogènes.

- 5 7- Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les fluides à injecter pour augmenter la production de méthane dans une ou plusieurs couches de kérogènes, comprennent :
- de l'eau,
 - des nutriments pour les microorganismes syntrophes et méthanogènes,
 - au moins un adjuvant, de préférence à une concentration comprise entre 10^{-9} et 5g/l de
- 10 fluides,
- éventuellement le CO_2 , de préférence issu d'un recyclage, et
 - éventuellement de l'hydrogène H_2 .

- 8- Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les fluides à injecter pour
- 15 augmenter la production de méthane dans une ou plusieurs couches de kérogènes, ne comprennent pas de CO_2 , ni d' H_2 .

- 9- Procédé selon les revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que les fluides comprennent en outre :
- 20 - des oligoéléments,
- une solution vitaminique complète,
 - des éléments traces organiques, de préférence tels que définis dans la revendication 4,
 - des inhibiteurs de populations microbiologiques indigènes entrant en compétition avec les
- 25 populations microbiologiques méthanogènes indigènes, de préférence des inhibiteurs des bactéries hétérotrophes, et plus particulièrement des bactéries dénitrifiantes et sulfato-réductrices indigènes, de préférence tels que définis dans la revendication 11,
- une source d'azote, de préférence NH_4Cl ,
 - une source de phosphate, de préférence K_2HPO_4 ,
 - une source d'ions acétate, de préférence de l'acétate de Na, CH_3COONa ,
- 30 - une source d'ions hydrogénocarbonate, de préférence NaHCO_3 ,
- une source de peptides, de préférence de la trypticase (dénommée également tryptone ou peptone de caséine).

- 10- Procédé selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que les fluides
- 35 comprennent en outre une composition d'oligoéléments comprenant au moins :
- le bore, de préférence sous sa forme borate BO_3^{3-} ,
 - le vanadium sous sa forme vanadate VO_4^{2-} ,
 - le Cu, de préférence sous sa forme chlorure,

- le Fe, de préférence sous sa forme chlorure,
- le Mg, de préférence sous sa forme chlorure,
- le Zn, de préférence sous sa forme chlorure,
- le Ni, de préférence sous sa forme chlorure,
- 5 - le Co, de préférence sous sa forme chlorure,
- le Li, de préférence sous sa forme chlorure,
- le K, de préférence sous sa forme chlorure,
- le Mn, de préférence sous sa forme chlorure,
- éventuellement le Na, de préférence sous leur forme chlorure,
- 10 - l'aluminium sous sa forme aluminopotassique, $AlK(OH)_2$,
- le Ca, de préférence sous sa forme chlorure,
- éventuellement le Se, sous sa forme de sélénite de sodium (Na_2SeO_3).

11- Procédé selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que les fluides
15 comprennent en outre une composition vitaminique comprenant au moins :

- l'acide thioctique (ou acide α -lipoïque),
- la biotine,
- l'acide folique,
- la pyridoxine et/ou le chlorhydrate de pyridoxine,
- 20 - la thiamine avec ou sans HCl,
- la riboflavine,
- l'acide nicotinique,
- le pantothénate de calcium,
- l'acide p-aminobenzoïque,
- 25 - la cobalamine, et
- éventuellement l'acide ascorbique.

12- Procédé selon la revendication 7 à 11, caractérisé en ce que les fluides comprennent en
30 outre une composition d'inhibiteurs des populations microbiologiques indigènes entrant en
compétition avec les populations microbiologiques méthanogènes indigènes, et
comprenant des nitrites NO_2^- , des sulfites, du molybdate MoO_4^{2-} , des oxydes ferriques
 Fe_2O_3 , ou leurs mélanges.

13- Procédé selon la revendication 7 à 12, caractérisé en ce que les fluides comprennent en
35 outre une composition de nutriments dans laquelle :

- a. la concentration en NaCl est comprise entre 0 et 35 g/l, de préférence à 1 g par litre,
- b. la concentration en nitrite ($NaNO_2$) est comprise entre 2 et 10 mM, de préférence à 5 mM,

- c. la concentration en sulfite (Na_2SO_3) est comprise entre 2 et 10mM, de préférence à 5 mM,
- d. la concentration en molybdate (Na_2MoO_4) est comprise entre 2 et 10mM, de préférence à 3 mM,
- 5 e. la concentration en oxyde ferrique (Fe_2O_3) est comprise entre 2 et 10mM, de préférence à 5 mM,
- f. la concentration en chlorure de Potassium (KCl) est comprise entre 10^{-9} et 10g/l, de préférence à 0,335 g/l,
- 10 g. la concentration en chlorure de Magnésium (MgCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 35 g/l, de préférence à 3,45 g/l,
- h. la concentration en chlorure de Manganèse (MnCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 35 g/l, de préférence à 4 g/l,
- i. la concentration en chlorure d'Ammonium (NH_4Cl) est comprise entre 10^{-9} et 15 g/l, de préférence à 0,25 g/l,
- 15 j. la concentration en chlorure de Calcium (CaCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 35g/l, de préférence à 0,14 g/l,
- k. la concentration en Phosphate de Potassium (K_2HPO_4) est comprise entre 10^{-9} et 12 g/l, de préférence à 0,14 g/l,
- 20 l. la concentration en chlorure de fer (FeCl_3) est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 2 mg/l,
- m. la concentration en acétate de sodium est comprise entre 10^{-9} et 150g/l, de préférence à 1 g/l,
- n. la concentration en extrait de levure est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 2 g/l,
- 25 o. la concentration en Trypticase est comprise entre 10^{-9} et 50g/l, de préférence à 2 g/l,
- p. la concentration en hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) est comprise entre 10^{-9} et 50 g/l, de préférence à 5 g/l,
- 30 r. la concentration en chlorure de cobalt (CoCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 1 mg/l,
- s. la concentration en chlorure de nickel (NiCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 1 mg/l,
- t. la concentration en chlorure de zinc (ZnCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 1 mg/l,
- 35 u. la concentration en chlorure de cuivre (CuCl_2) est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,1 mg/l,
- v. la concentration en vanadate de sodium (Na_2VO_3) est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,1 mg/l,

- w. la concentration en aluminium potassique ($\text{AlK}(\text{OH})_2$) est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,1 mg/l,
- x. la concentration en acide borique (H_3BO_3) est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,1 mg/l,
- 5 y. la concentration en chlorure de Lithium (LiCl) est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,01 mg/l ,
- z. la concentration en biotine est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,02 mg/l,
- aa. la concentration en acide folique est comprise entre 10^{-9} et 5g/l, de préférence à 0,02 mg/l,
- 10 bb. la concentration en Pyridoxine ou en chlorhydrate de pyridoxine est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,1 mg/l,
- cc. la concentration en Thiamine ou en Thiamine-HCl est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- 15 dd. la concentration en Riboflavine est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- ee. la concentration en Acide Nicotinique est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- ff. la concentration en Penthotenate de Calcium est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- 20 gg. la concentration en Vitamine B12 est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,001 mg/l,
- hh. la concentration en Acide p-Aminobenzoïque est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- 25 ii. la concentration en Acide Thioctique est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- jj. la concentration en Acide Ascorbique est comprise entre 10^{-9} et 5 g/l, de préférence à 0,05 mg/l,
- kk. la concentration éventuelle en Cystéine-HCl est comprise entre 10^{-9} et 50 g/l, de préférence à 0,5 g/l,
- 30 ll. la concentration éventuelle en Na_2S est comprise entre 10^{-9} et 50 g/l, de préférence à 0,5 g/l.

- 13-Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend une phase préalable P0 d'exploration et de prospection, de préférence par carottage(s), pour sélectionner une ou des couches à fort potentiel gazier, de préférence riches en kérogènes, dans un site géologique donné.

14- Procédé selon la revendication précédente caractérisé en ce que la phase P0 comprend :

- l'identification qualitative et/ou quantitative des microorganismes indigènes, contenus dans lesdits kérogènes du(des) carottage(s) par des méthodes de biologie moléculaire, telles que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), le clonage et le séquençage,

5 - et si des microorganismes méthanogènes sont identifiés dans lesdits kérogènes susvisés du(des) carottage(s), le suivi de la production de méthane par lesdits microorganismes indigènes identifiés préalablement dans les kérogènes du(des) carottage(s), ledit suivi comprenant :

- 10 • la mesure de la production du méthane dans les kérogènes cibles du(des) carottage(s) après injection des fluides comprenant de l'eau, des nutriments, au moins un adjuvant et éventuellement du CO₂ et/ou de l'hydrogène H₂, la composition desdits fluides étant telle que définie dans la revendication 7,
- la comparaison de la concentration de méthane avec des prélèvements témoins,
- 15 • la quantification prédictive de la production *in situ* de méthane pour la(les) couche(s) géologique(s) étudiées.

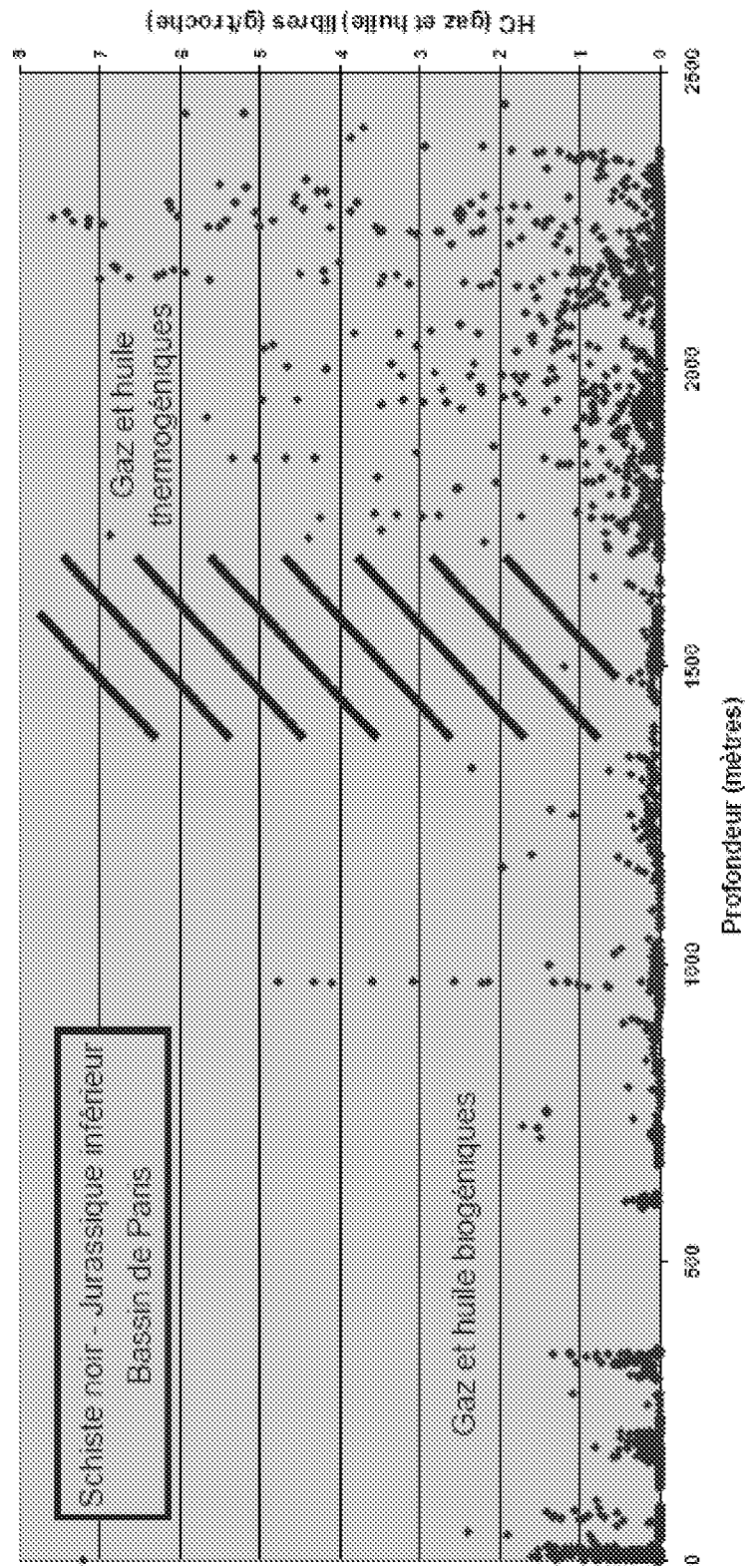


Figure 1 :

Figure 2

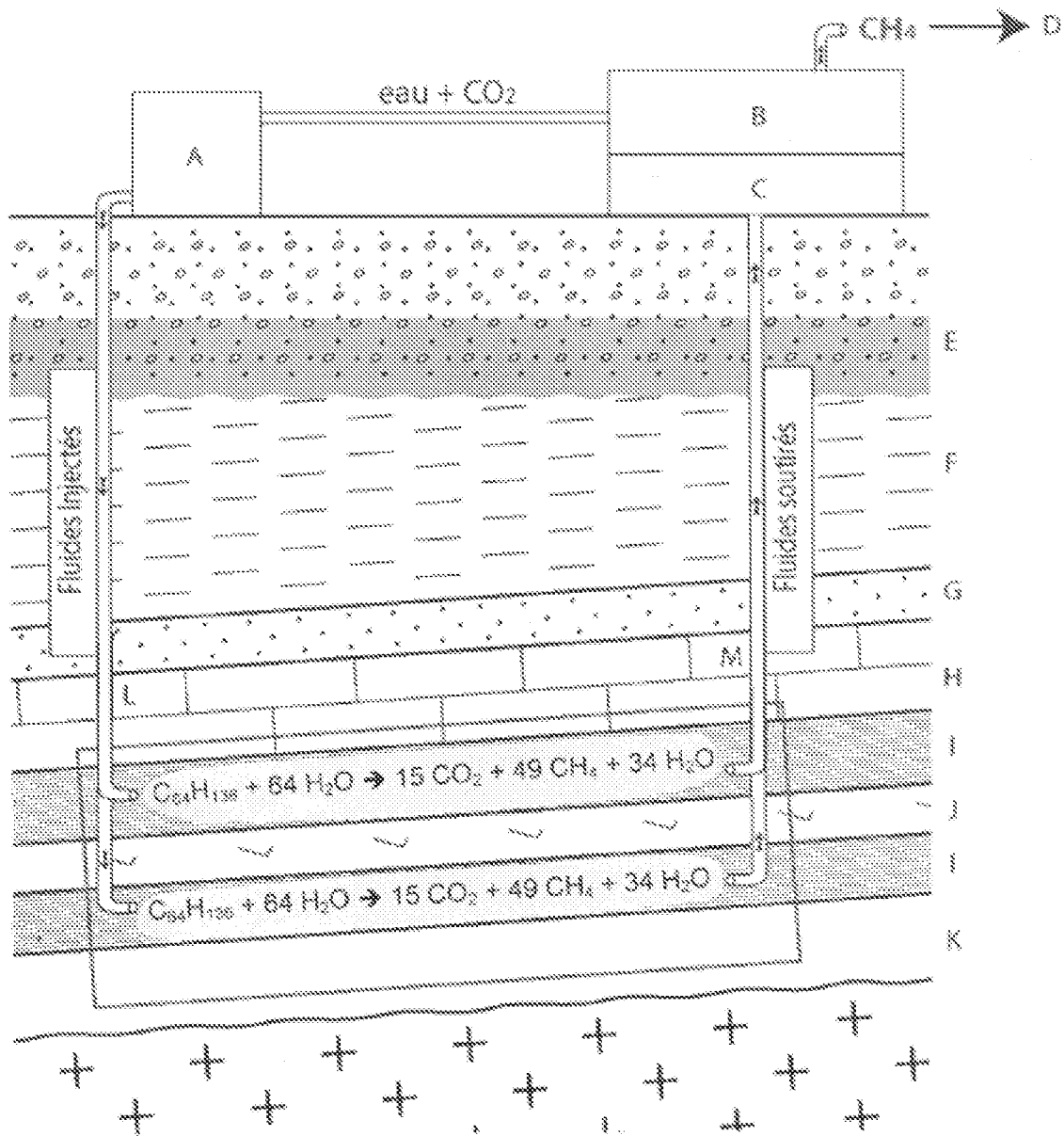


Figure 3

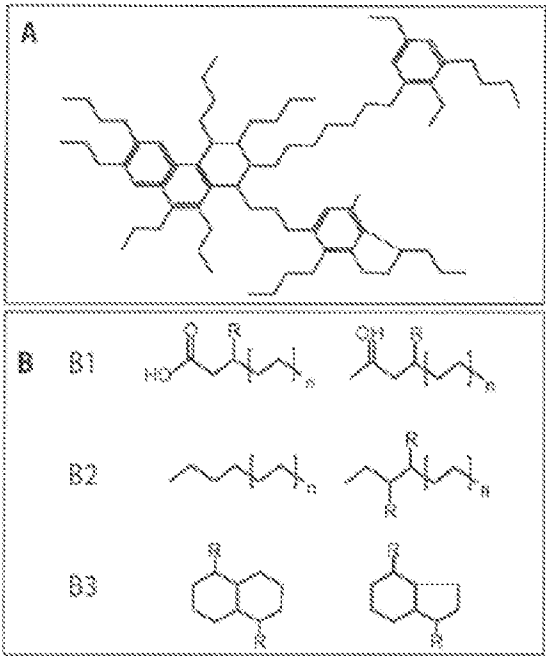


Figure 4

