

Utilisation des bactéries pour la protection d'objets archéologiques en fer

Comment la bactérie *Shewanella loihica* réduit-elle le fer à différentes concentrations d'ions chlorures ?

QUENTIN HUMAIR

LAURA VORPE

DORIANE TANNER

CORALIE MONTAVON

LAURIANE DANI

Semestre 6, 2015

Table des matières

INTRODUCTION.....	5
LA CORROSION DU FER ET SON IMPACT SUR LES OBJETS ARCHEOLOGIQUES.....	5
LES METHODES DE TRAITEMENT CLASSIQUES ET LEURS INCONVENIENTS	5
LES METHODES ALTERNATIVES A L'AIDE D'ORGANISMES VIVANTS.....	6
SHEWANELLA LOIHICA, SON METABOLISME ET SON UTILITE	6
DEROULEMENT DE L'EXPERIENCE	7
MATERIEL ET METHODE.....	7
SOUCHE BACTERIENNE	7
DETERMINATION DU MILIEU DE CROISSANCE LE PLUS FAVORABLE A LA CROISSANCE DE <i>S. LOIHICA</i>	7
REALISATION DU MILIEU MD ANOXIQUE POUR LA REDUCTION DU FER(III) EN FER(II)	8
EVALUATION DE LA CROISSANCE BACTERIENNE.....	8
EVALUATION DE LA REDUCTION DU FER(III) EN FER(II).....	9
ANALYSE DE LA COMPOSITION DES CLOUS	9
METHODES STATISTIQUES	9
RESULTATS ET DISCUSSION.....	9
MESURE DE LA TURBIDITÉ DES MILIEUX DE CROISSANCE LB ET MD ET CHOIX DU MILIEU LE PLUS FAVORABLE	9
EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE FER(II) DANS LES MILIEUX CONTENANT DU FER(III)-CITRATE.....	11
<i>Mesure de la croissance bactérienne</i>	13
<i>Mesure du pH</i>	13
EVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE FER(II) DANS LES MILIEUX CONTENANT DES CLOUS.....	14
<i>Mesure du pH</i>	16
<i>Mesure de la croissance bactérienne</i>	17
RESULTATS DES ANALYSES DE LA COMPOSITION DE LA SURFACE DES CLOUS.....	18
CONCLUSION.....	19
REMERCIEMENTS	19
BIBLIOGRAPHIE	20
ANNEXES.....	21
ANNEXE 1 : PROTOCOLE POUR LA MESURE DU FER AVEC LA FERROZINE	21
ANNEXE 2 : DONNEES BRUTES DE L'EXPERIENCE DE REDUCTION DU FER(III)-CITRATE	22
ANNEXE 3 : GRAPHIQUES REPRESENTANT LES CONCENTRATIONS DE FER(II), DE FER(III) ET DE FER TOTAL DANS LES MILIEUX A UNE CONCENTRATION DE 2% D'IONS CL ⁻	23
ANNEXE 4 : GRAPHIQUES REPRESENTANT LA CROISSANCE BACTERIENNE DANS LES MILIEUX CONTROLES CONTENANT DU FER(III)-CITRATE	24
ANNEXE 5 : COMPARAISON DE LA COLORATION DU MILIEU ATTENDUE LORS DE LA REDUCTION DU FER(III)-CITRATE	24
ANNEXE 6 : DONNEES BRUTES DE L'EXPERIENCE DE REDUCTION DU FER(III) DU CLOU.....	25
ANNEXE 7 : COMPARAISON VISUELLE DE LA DENSITE BACTERIENNE ENTRE LES MILIEUX A DES CONCENTRATIONS DE 1% ET 2% D'IONS CL ⁻ A T ₀	25
ANNEXE 8 : ELEMENTS PRESENTS SUR LES CLOUS INCUBES DANS LES MILIEUX A UNE CONCENTRATION DE 2% DE CL ⁻	26
ANNEXE 9 : DONNEES CHIFFREES DE LA COMPOSITION DE LA SURFACE DES CLOUS	26

Introduction

La corrosion du fer et son impact sur les objets archéologiques

La corrosion est le résultat d'une réaction chimique provoquée par un oxydant comme le dioxygène ou le ion H^+ sur un matériau. Elle a pour conséquence l'altération de ce dernier. La rouille du fer en est l'exemple le plus connu, le vert-de-gris du cuivre en est un autre.¹

Le fer, en fonction des conditions physico-chimiques du milieu, peut être oxydé en oxydes ou en hydroxydes, qui peuvent alors servir à le protéger plus ou moins efficacement. Par exemple, la rouille ($Fe(OH)_3 \cdot nH_2O$), qui est un hydroxyde poreux, ne permet pas de protéger le fer. En revanche, la magnétite (Fe_3O_4), résultat de l'oxydation du fer par l'eau dans un milieu aux conditions anaérobies, neutre ou faiblement basique, est modérément protectrice.²

Ainsi, qu'ils soient immergés ou sous terre, une couche de corrosion, comme la magnétite, se forme à la surface des objets archéologiques en fer. C'est une barrière protectrice évitant l'oxydation interne de l'objet. Selon un article écrit par S. Turgoose (1993) et cité par Selwyn (2004), ces objets accumulent des ions chlorures qui sont d'autant plus adsorbés que le pH environnant est acide. En effet, l'accumulation de ions H^+ à la surface de l'objet attire les ions Cl^- . Selon des articles de Turgoose (1993) et C. Costain (1984) cités par Selwyn (2004), une fois l'objet sorti de l'eau salée ou déterrée, l'augmentation de la concentration en oxygène et la baisse du taux d'humidité ont pour conséquence l'initiation d'un nouveau processus d'oxydation qui se propage alors jusqu'au cœur de l'objet, le corrode et le détériore.

En présence d'une concentration suffisamment élevée d'ions chlorures, c'est généralement un oxyhydroxyde de fer appelé akaganéite, de formule $Fe^{3+}O(OH,Cl)$ qui est formé par l'oxydation de l'hydroxyde de fer(II). (Selwyn, 2004)

Ce minéral est une forme de corrosion active à cause de l'oxygène et des chlorures qu'il contient. Il détériore les objets de deux manières différentes. Premièrement, la formation d'acide chlorhydrique (HCl) à partir des ions chlorures stockés dans l'akaganéite va causer des dommages chimiques à l'objet. Secondement, l'akaganéite, étant un minéral beaucoup plus volumineux que le fer, va causer des dommages physiques à l'objet en le faisant éclater. (Selwyn, 2004)

Les méthodes de traitement classiques et leurs inconvénients

Les méthodes classiques de traitement de la corrosion des objets archéologiques sont en majorité abiotiques et ont pour but d'éliminer un maximum d'ions chlorures, responsables en partie de l'oxydation et de la déformation définitive des objets en fer.

Le plus souvent, on immerge l'objet dans une solution aqueuse, neutre ou alcaline. Par simple diffusion, les ions chlorure vont sortir de l'objet en fer. En solution alcaline, les charges négatives dues aux nombreux ions OH^- à la surface de l'objet vont chasser les ions Cl^- plus efficacement qu'en solution neutre, de plus, le milieu basique va permettre la passivation de la surface de l'objet. La formation d'un film composé d'oxydes va permettre de le protéger de l'oxygène présent dans la solution et stopper ainsi le processus de corrosion. Augmenter la porosité de l'objet en fer, en chauffant la solution alcaline par exemple, peut augmenter la capacité de diffusion des ions Cl^- . (Selwyn, 2004) D'après un autre article de Selwyn (2001) cité dans son article de 2004, à de hautes concentrations d'ions Cl^- , la passivation semble impossible. Cette dernière est plus lente quand elle est réalisée à l'aide de traitements peu alcalins. Cela peut inciter à utiliser des solutions très basiques, plus polluantes.

¹ (<http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Corrosion&action=history>, 2015)

² (http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Cytochrome_C&action=history, 2015)

Une autre méthode permettant l'arrêt de la corrosion ou de rendre les traitements alcalins plus efficaces est l'élimination de l'oxygène dissoute dans le traitement, par le biais par exemple de l'ébullition. (Selwyn, 2004) D'après un article d'Al-Zahrani (1999) cité par Selwyn (2004), la migration des ions Cl⁻ en dehors du clou sera alors plus efficace en absence d'oxygène et l'oxydation causée par l'oxygène ne sera plus possible.

Une autre méthode pour enlever les ions chlorure est d'utiliser la dessalaison électrolytique. Sous l'influence du champ électrique, les ions Cl⁻ vont être extraits de l'objet en fer et être attiré vers l'anode. (Bertholon, 1989) Cependant, d'après Selwyn (2004), la réelle efficacité de cette méthode est contestée dans des articles de North et Pearson (1978a) et de North (1978).

La dernière méthode généralement appliquée utilise des inhibiteurs de corrosion.

Le fait qu'il existe plusieurs méthodes différentes de conservation prouve qu'aucune d'elles n'apporte des résultats parfaits. Ces traitements peuvent être insuffisants, ils peuvent modifier la structure métallographique du fer ou encore présenter des dangers d'exfoliation. (Anne Rinuy, 1981)

Les méthodes alternatives à l'aide d'organismes vivants

Les microorganismes sont de plus en plus utilisés dans divers domaines comme la bioremédiation, l'industrie ou l'agriculture. Dans cette suite logique, des méthodes biologiques pour lutter contre la corrosion et la dégradation des objets archéologiques commencent à se développer et constituent une alternative possible aux traitements classiques. Ces méthodes fonctionnent à l'aide de microorganismes, comme des champignons ou des bactéries, qui par leur métabolisme, créent une barrière protectrice à la surface des objets ou permettent l'élimination des éléments responsables de détériorations. Même si ces procédés ne sont encore que très peu utilisés et sont en phase de recherches et de développement, ils sont une avancée importante pour remédier aux problèmes liés aux traitements actuels.

En premier lieu, ces applications biotechnologiques permettent d'éviter les dégâts sur l'environnement causés par la pollution émanant des produits chimiques généralement utilisés. Ils sont ainsi plus durables et écologiques. La rapidité d'exécution potentielle de ces techniques, liée à la capacité de croissance exponentielle de la plupart des microorganismes, ainsi que leur coût peu élevé sont d'autres arguments de taille en faveur de ces nouvelles méthodes.

Une étude récente a notamment démontré qu'un champignon, *Beauveria bassiana*, avait la capacité de précipiter des oxalates de cuivre à partir de produits de corrosion, à la surface des objets métalliques. Ces oxalates de cuivre forment alors une couche protectrice car ce sont des composés plus stables et moins solubles. Cette recherche a prouvé que cette technique biologique pourrait être utilisée dans la restauration et la conservation des objets métalliques archéologiques et modernes. L'expérience s'est poursuivie sur des objets en fer et en argent. Il en résulte que cette technique n'est pas encore immédiatement applicable pour d'autres métaux que le cuivre, mais ce champignon semble offrir de grandes possibilités en matière de méthodes de conservation biologiques. (Joseph, 2012)

Shewanella loihica, son métabolisme et son utilité

Shewanella loihica a été découverte dans l'océan pacifique au niveau d'une faille volcanique près d'Hawaï. Elle est caractérisée par une couleur orangée lorsqu'elle se développe en milieu aérobie. Elle est psychrotolérante et chimioorganotrophe. Ses conditions optimales de croissance sont les suivantes : 18°C, 2% de NaCl et pH situé entre 6-8.

Etant un organisme anaérobie facultatif, elle peut user de plusieurs stratégies respiratoires puisqu'elle peut utiliser différents accepteurs d'électrons finaux comme l'oxygène, le nitrate ou

certaines métaux, dont le fer. (Gao, 2006) En effet, elle est capable de réduire le fer(III) en fer(II) en conditions anaérobies.

Il semblerait que ce processus soit réalisé par l'intermédiaire du cytochrome C. Ce phénomène est cependant toujours mal compris (Weber, 2006; Bretschger, 2007). Les cytochromes C jouent un rôle important dans la chaîne respiratoire. Ce sont, tout comme l'hémoglobine, des hémoprotéines solubles possédant un groupe hème au centre duquel se trouve un atome de fer. (http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Cytochrome_C&action=history, 2015). Ils sont responsables d'une coloration rose pâle du milieu de culture lorsqu'une bactérie, comme *S. loihica*, les utilise pour réduire le fer. Ils sont ainsi un bon indicateur de ce phénomène.

De par sa capacité à réduire le fer(III) en fer(II), *S. loihica* pourrait permettre d'éviter la formation d'akaganéite sur les objets archéologiques, limitant ainsi leur détérioration. Le fer(III) étant réduit, les ions chlorures ne pourraient plus s'y lier et diffuseraient alors dans le milieu où baignerait l'objet. Il se pourrait donc que *S. loihica* soit une alternative écologique et rapide aux méthodes traditionnelles de conservation du fer.

Déroulement de l'expérience

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'impact de la concentration d'ions Cl⁻ sur la capacité de *S. loihica* à réduire le fer(III). Ce point est important car *S. loihica* est une bactérie halophile, or la cause principale de détérioration des objets archéologiques en fer est l'attaque des ions chlorures. Elaborer un milieu de culture favorable à *S. loihica*, mais qui préserve également les objets en fer est donc un point crucial dans l'élaboration d'une nouvelle technique de conservation du fer.

La première étape de cette étude consiste à déterminer un milieu de culture permettant une croissance optimale de la souche bactérienne afin d'en obtenir une quantité suffisante pour l'inoculation dans les milieux servant à la suite de l'étude. Cette étape permet également de trouver un milieu de culture à utiliser pour l'étude de la réduction du fer.

La deuxième étape consiste à mesurer la capacité de *S. loihica* à réduire une source de fer(III) soluble à différentes concentrations d'ions Cl⁻ ainsi que le bon développement de la souche bactérienne.

Cette étape est répétée avec, cette fois, un clou archéologique comme source de fer(III).

Matériel et méthode

Souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée lors de nos recherches est *Shewanella loihica* PV-4, isolée à partir d'un tapis bactérien situé sur le mont hydrothermal sous-marin Loihi dans l'océan pacifique. (Gao, 2006)

Détermination du milieu de croissance le plus favorable à la croissance de *S. loihica*

Deux milieux de croissance ont été réalisés afin d'évaluer lequel convient le mieux au développement de *S. loihica*. Le premier milieu est un milieu nutritif complexe Luria-Bertani (LB) composé de (par litre) : 10g de tryptone ; 10g de NaCl et 6g d'extraits de levures. Le second milieu est un milieu nutritif défini (MD) composé de (par litre) : 5g de lactate ; 2.5g de NaHCO₃ ; 0.08g de CaCl₂*2H₂O ; 1g de NH₄Cl ; 1g de NaCl ; 0.2g de MgCl₂*6H₂O ; 7.2g d'HEPES ; 1ml de

vitamines et 10ml de solution de métaux traces (Roh, 2006). Contrairement au milieu cité dans l'article de référence, le milieu MD que nous avons utilisé ne contient pas d'extraits de levure afin qu'il reste défini. Les deux milieux ont été ajustés à pH neutre avec une solution de NaOH 1M. Les pH ont été mesurés avec un pH mètre *ΩMetrohm®*.

Les milieux ont été autoclavés et stockés au frais avant d'être inoculés de manière stérile avec une micropipette et incubés toute nuit à température ambiante. Afin d'évaluer la croissance dans les deux milieux, la turbidité a été mesurée à 600nm au spectrophotomètre *Genesys 10S UV-Vis®*. Les mesures ont été réalisées 19 fois pour le milieu MD et 20 fois pour le milieu LB, sur une durée totale de 26 heures, à des intervalles de 30 minutes à 1 heure. Le milieu LB a été choisi pour faire croître une souche préexistante de *S. loihica*, qui sera utilisée pour la suite de l'expérience. Le milieu MD, après modifications, a été choisi comme milieu anaérobie pour la réduction du fer(III) en fer(II) par *S. loihica* pour la suite de l'expérience.

Réalisation du milieu MD anoxique pour la réduction du fer(III) en fer(II)

Le milieu anaérobie MD a été réalisé en concentrations 0.17M (1%) et 0.34 M (2%) de Cl⁻. Ces milieux sont composés de (par litre) : 5g de lactate ; 0.08g de CaCl₂*2H₂O ; 1g de NH₄Cl ; 0.2g de MgCl₂*6H₂O ; 7.2g d'HEPES ; 1ml de vitamines ; 9.23 g de NaCl pour la solution à une concentration de 1% d'ions Cl⁻ et 19.23g de NaCl pour la solution à une concentration de 2% d'ions Cl⁻. Les métaux traces n'ont pas été ajoutés, afin qu'ils ne soient pas utilisés par *S. loihica* à la place du ion Fe³⁺ comme accepteurs d'électrons.

Afin que ces milieux soient en conditions anoxiques, ils ont été bouillis et un flux de N₂ a chassé l'O₂. Ces deux milieux ont été répartis dans 24 bouteilles; 12 bouteilles ont servi pour l'expérience de réduction du fer soluble (6 bouteilles à une concentration de 1% d'ions Cl⁻ dont 3 contrôles et 3 bouteilles inoculées et 6 bouteilles à une concentration de 2% d'ions Cl⁻ dont 3 contrôles et 3 bouteilles inoculées) et 12 bouteilles ont servi pour l'expérience de réduction du fer(III) du clou (6 bouteilles à une concentration de 1% d'ions Cl⁻ dont 3 contrôles et 3 bouteilles inoculées et 6 bouteilles à une concentration de 2% d'ions Cl⁻ dont 3 contrôles et 3 bouteilles inoculées). Au préalable ces bouteilles ont subi trois cycles vide/N₂ afin de les rendre anoxiques. Une solution stock de fer(III)-citrate 1M et une solution stock de NaHCO₃ 1M ont été réalisées et ajoutées au milieu après l'autoclavage afin d'obtenir des concentrations finales respectives de 5mM et 0.03M. Elles ont été ajoutées ultérieurement car ces solutions peuvent réagir avec le milieu lors du chauffage et de l'autoclavage.

Le fer(III)-citrate n'a été ajouté que dans les bouteilles utilisées pour l'expérience de réduction du fer soluble, car c'est la source de fer de cette expérience.

Dans les bouteilles destinées à l'expérience de réduction du fer(III) du clou, l'inoculation du clou s'est faite dans une boîte à gant afin de préserver les conditions anoxiques des milieux. Au préalable, les clous ont été sablés et stérilisés sous UVs durant 1 heure.

Les 24 bouteilles ont été inoculées de manière stérile, avec des seringues d'une contenance d'1ml, à partir de la souche bactérienne produite dans le milieu de croissance LB. Cette souche a été au préalable centrifugée à 4000rpm durant 10 minutes et le surnageant a été éliminé. Après chaque prélèvement, ces bouteilles ont été remises en incubation à température ambiante sous agitateur.

Le pH des 24 bouteilles a été mesuré avec des bandes pour pH acide (0-6) *Acilit®MERCK* et intermédiaire (5-10) *Neutralit®MERCK*.

Evaluation de la croissance bactérienne

Dans les milieux destinés à la réduction du fer(III)-citrate en fer(II), la croissance bactérienne a été évaluée par des mesures de la turbidité à 600nm au spectrophotomètre *Genesys 10S UV-Vis®*, 11 fois à des intervalles de 1 à 2 heures sur une durée totale de 120 heures.

Dans les milieux destinés à la réduction du clou, la croissance bactérienne n'a pas été mesurée de manière quantitative mais une comparaison visuelle de l'abondance des bactéries présentes dans chaque milieu a été effectuée par microscopie optique, 6 fois à des intervalles de 2 heures sur une durée totale de 26 heures, grâce au microscope *Leica DMR®* et au logiciel *Nikon ACT-1®*.

Evaluation de la réduction du fer(III) en fer(II)

Le fer(II) a été quantifié au spectrophotomètre *Genesys 10S UV-Vis®* à 562nm par la méthode de la ferrozine.³ (Stookey, 1970) La courbe étalon a été réalisée pour mesurer des concentrations de fer(II) de 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 et 0 mM. La ferrozine ($C_{20}H_{12}N_4Na_2O_6S_2 \cdot nH_2O$) est un colorant qui devient violet en se fixant au fer(II). Ainsi le fer total ($Fe^{2+} + Fe^{3+} = \text{Fer total}$) a été quantifié avec la même méthode mais après ajout d'une solution d'hydroxylamine (NH_2OH) 1.5M, permettant de réduire tout le fer(III) en fer(II).

Pour que les absorbances mesurées dans les cuvettes contenant nos échantillons ne dépassent pas celles de la courbe étalon, nos prélèvements de milieux ont été dilués.

Analyse de la composition des clous

La composition des clous a été analysée par la technique de microscopie électronique ESEM-EDS (Environmental Scanning Electron Microscope - Energy Dispersive System)⁴.

Méthodes statistiques

Les graphiques et tableaux présentant les résultats de ces expériences ont été réalisés sur le logiciel *Microsoft® Excel® pour Mac 2011*.

Le test de Student a été utilisé pour déterminer une différence significative entre deux moyennes sur des échantillons indépendants.

Les outliers, ont été identifiés grâce au test de Grubbs (GraphPad, 2015).

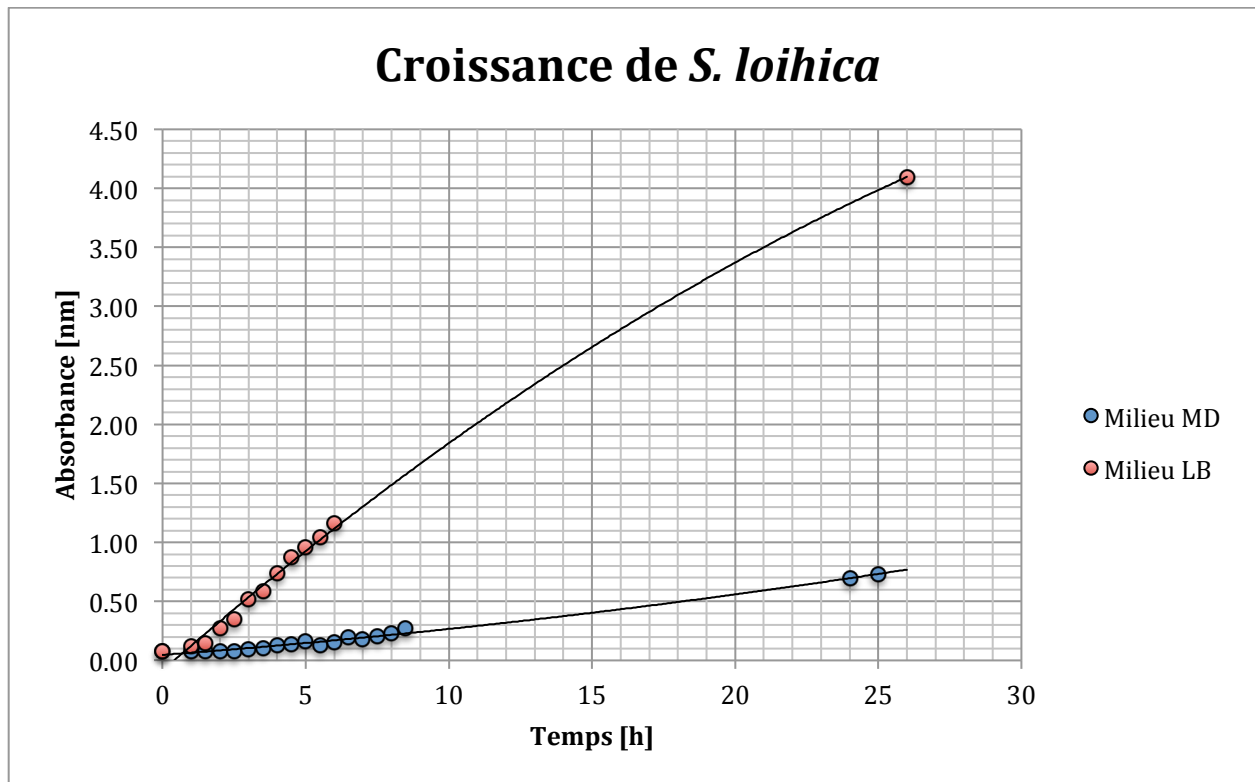
Résultats et discussion

Mesure de la turbidité des milieux de croissance LB et MD et choix du milieu le plus favorable

Nous avons voulu tester deux milieux de croissance différents afin de déterminer lequel serait le plus favorable à la croissance de *S. loihica*. En effet, un milieu de croissance efficace est nécessaire afin d'avoir suffisamment de bactéries pour l'inoculation des milieux servant à la suite de l'expérience, sans quoi des résultats visibles ne seraient pas observables dans les délais impartis.

³ Cf : Annexe 1 : Protocole pour la mesure du fer avec la ferrozine

⁴ Manipulations effectuées par Monica Albini et Wafa Kooli

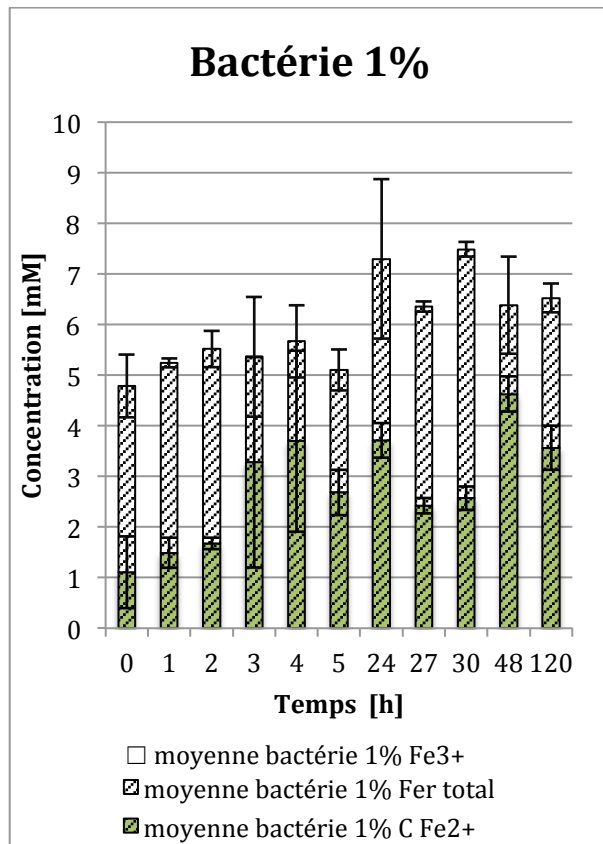


Graphique 1: croissance de *S. loihica* dans les milieux MD et LB

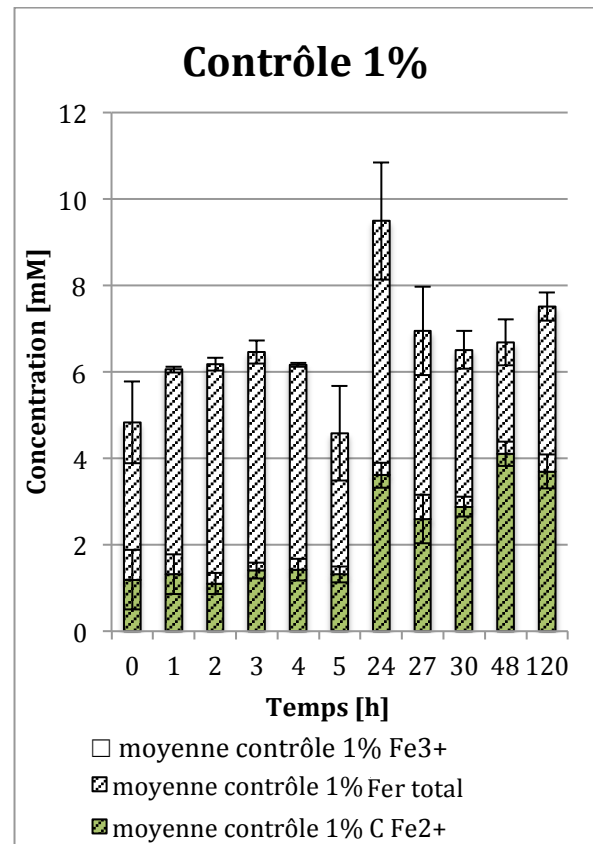
Lors des mesures de la croissance des bactéries du milieu LB, les données prélevées entre $T_{6.5}$ et T_{25} ont dépassé le seuil d'absorbance de 1.2 nm au delà duquel les mesures du spectrophotomètre ne sont plus précises. Ces données n'ont ainsi pas pu être utilisées. Une mesure supplémentaire a alors été effectuée à T_{26} après dilution de l'échantillon.

Le milieu LB présente une croissance plus rapide, c'est pourquoi nous l'avons choisi comme milieu de croissance pour la suite de l'expérience. Nous avons toutefois gardé le milieu MD pour l'expérience de réduction du fer, car il était important de connaître les concentrations de chaque élément afin qu'il n'y ait pas d'interactions entre le fer et des éléments inconnus et pour que la bactérie n'utilise pas un autre métal comme accepteur d'électron. De plus, la concentration exacte d'ions Cl^- devait être connue afin de comparer l'activité bactérienne dans des conditions plus favorables au clou (1%) et dans des conditions plus favorables à *S. loihica* (2%).

Evolution de la concentration de fer(II) dans les milieux contenant du fer(III)-citrate



Graphique 2: Proportions de fer(II), de fer(III) et de fer total dans les milieux à une concentration de 1% d'ions Cl⁻ contenant des bactéries



Graphique 3: Proportions de fer(II), de fer(III) et de fer total dans les milieux contrôles à une concentration de 1% d'ions Cl⁻

D'après les graphiques 2 et 3, nous pouvons déduire qu'il n'y a pas d'augmentation de la concentration de fer(II). La concentration de fer total est relativement stable, tout comme la concentration de fer(III).⁵

Les mesures à T₃ et T₄ qui montrent une augmentation de fer(II) sont démenties par l'amplitude de leurs barres d'erreur. Ces moyennes possèdent des valeurs improbables, car beaucoup trop élevées par rapports aux valeurs obtenues avant et après. Le test de Grubbs ne nous a pas permis de les éliminer car il compare les valeurs obtenues entre les réplicats et ne tient pas compte de l'évolution de ces valeurs au court du temps. Ces valeurs aberrantes sont certainement dues à des problèmes lors du prélèvement des échantillons, à des erreurs de pipetage et à un manque d'agitation du contenu des cuvettes avant le passage au spectrophotomètre. Cela peut provoquer des variations notables dans les résultats car les échantillons ont été très dilués afin de ne pas dépasser les valeurs d'absorbance que la courbe étalon permet de mesurer.

L'accroissement des valeurs à partir de T₂₄ peut être expliqué par des erreurs de méthodologie. En effet, la préparation des cuvettes des échantillons de T₂₄ à T₁₂₀ a été réalisée à l'aide d'une pipette automatique plus précise. De plus, il est possible que lors des mesures précédentes, les cuvettes n'aient pas été suffisamment mélangées, ou que le volume de l'échantillon prélevé dans le milieu aie été moins précis.

Cette hausse des valeurs se retrouve dans toutes nos données, y compris les contrôles, ce qui confirme qu'elle n'est pas due à l'activité bactérienne⁶.

⁵ Cf : Annexe 2 : Données brutes de l'expérience de réduction du fer(III)-citrate

Le graphique 3 montre que nos contrôles possèdent du fer(II). Cependant, le fer(III)-citrate que nous avons utilisé est supposé ne contenir que du fer(III). De plus, il n'y a pas de bactéries dans nos contrôles comme l'ont démontré les mesures de la turbidité de ces milieux⁷. Ces dernières ne sont donc pas responsables de la présence de fer(II) dans les contrôles. Nous avons donc supposé que le de fer(II) provient de nos milieux. Ce fer(II) peut provenir des bouteilles contenant les milieux qui n'ont pas été préalablement nettoyées à l'HCl, de l'eau milli Q, de la poudre de fer(III)-citrate ou de toute autre solution utilisée lors des manipulations.

Après investigations, nous avons identifié que la source de fer(II) provient de la poudre de fer(III)-citrate utilisée comme source de fer soluble dans nos milieux. La concentration de fer(II) contenue dans la solution de fer(III)-citrate 5mM utilisée dans nos échantillons a été mesurée et établie à 0.17mM. Après déduction de cette concentration à nos mesures, la quantité moyenne de fer(II) dans nos contrôles a diminué, mais n'a pas été totalement éliminée. Ce problème n'a pas été résolu malgré le test à la ferrozine aux résultats négatifs réalisés sur les diverses sources de contaminations possibles. Les milieux destinés à l'expérience de réduction du fer(III) du clou ont également été testés avant l'introduction du clou et ne contenaient pas de fer(II)⁸. Ce problème n'est donc présent que dans les bouteilles utilisées pour l'expérience de réduction du fer(III)-citrate.

Les résultats obtenus ne coïncident pas avec les hypothèses de départs postulant que les milieux contrôles ne devraient pas contenir de fer(II) et que la concentration de fer(II) devrait croître au fil du temps grâce à la réduction du fer(III) opérée par *S. loihica*. Si le fer(II) n'a pas augmenté c'est certainement car une quantité trop faible de bactéries a été inoculée. Dans le milieu MD, la croissance est très lente et peut durer jusqu'à une 70aine de jours avant d'obtenir une colonie suffisamment importante pour obtenir des résultats notables (Moon, 2007). Comme expliqué précédemment, un milieu où la réduction du fer(III) se produit adopte généralement une coloration rose pâle. Cela n'a pas été observé dans nos milieux⁹.

La concentration en fer total du milieu devrait être stable ou alors diminuer si *S. loihica* l'utilise dans son métabolisme assimilatif. Nos résultats laissent penser que cette deuxième hypothèse n'est pas vérifiée, car la concentration de fer total reste relativement stable. La concentration de fer(III) devrait diminuer avec le temps, car il devrait être réduit en fer(II). Ce phénomène n'a pas été observé d'après nos résultats, pour les mêmes raisons qui ont empêché la concentration de fer(II) de croître.

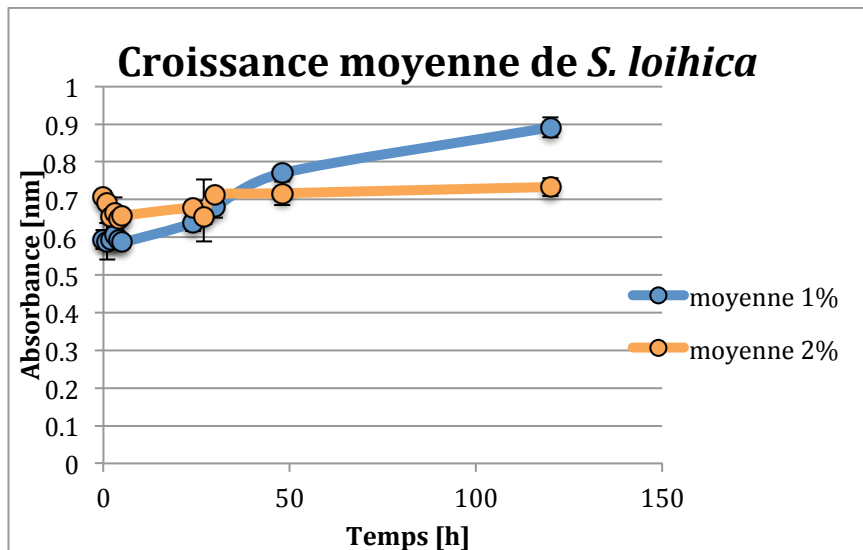
⁶ Cf : Annexe 3 : Graphiques représentant les concentrations de fer(II), de fer(III) et de fer total dans les milieux à une concentration de 2% d'ions Cl⁻

⁷ Cf : Annexe 4 : Graphiques représentant la croissance bactérienne dans les milieux contrôles contenant du fer(III)-citrate

⁸ Cf : Figure 6 : Graphique représentant la concentration moyenne de fer(II) dans les milieux contenant les bactéries et dans les contrôles, à des concentrations de 1% et 2% d'ions Cl⁻

⁹ Cf : Annexe 5 : Comparaison de la coloration du milieu attendue lors de la réduction de fer(III)-citrate

Mesure de la croissance bactérienne



Graphique 4: Croissance moyenne de *S. loihica* dans les milieux à des concentrations de 1% et 2% d'ions Cl⁻

Dans les échantillons contenant des bactéries, nous avons constaté une légère augmentation de la turbidité dans le milieu à 1% d'ions Cl⁻ et aucune augmentation dans le milieu à 2% d'ions Cl⁻. Comme expliqué précédemment, ceci s'explique par le fait que la croissance de *S. loihica* se fait très lentement dans le milieu MD.

Malgré un optimum de croissance à une concentration de 2% d'ions Cl⁻, nos résultats indiquent que la croissance bactérienne est plus rapide dans le milieu à 1% d'ions Cl⁻. La différence reste cependant minime. Il est possible que les bactéries aient un temps de latence plus important dans un milieu avec une concentration plus élevée en ions Cl⁻.

Les contrôles n'ont montré aucune augmentation de la turbidité, ce qui était attendu puisqu'ils ne contiennent pas de bactéries¹⁰.

Mesure du pH



Figure 1: Différence de couleur entre les milieux à une concentration de 1% ou 2% d'ions Cl⁻

Une différence de couleur entre les bouteilles ayant une concentration de 1% et de 2% d'ions Cl⁻ a été observée. Cela nous a semblé inhabituel. Nous avons supposé qu'elle était causée par une différence de pH. Un test de pH a donc été réalisé.

¹⁰ Cf : Annexe 4 : Graphiques représentant la croissance bactérienne dans les milieux contrôles contenant du fer(III)-citrate

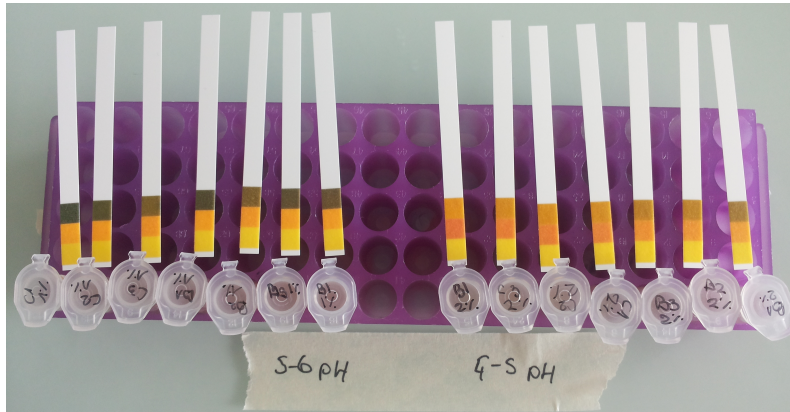


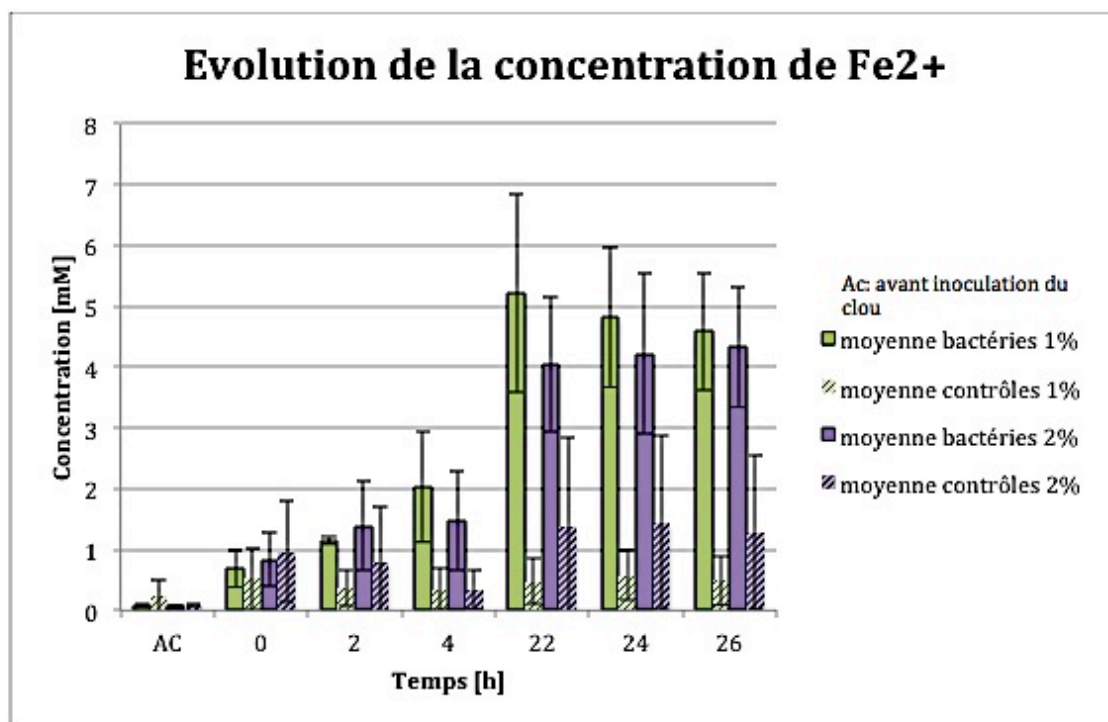
Figure 2: Résultats des tests de pH effectués sur les échantillons de milieu à des concentrations de 1% et 2% d'ions Cl⁻

Le test de pH nous révèle une différence importante entre les bouteilles contenant un milieu à une concentration de 1% d'ions Cl⁻ et celles à 2%. Pour les échantillons à 1%, nous observons un pH allant de 5 à 6 et pour les échantillons à 2%, nous observons un pH allant de 4 à 5. Cela confirme notre hypothèse. Il est possible que les tampons HEPES et NaHCO₃ aient mal fonctionné.

Comme le pH optimal pour les bactéries est compris entre 6 et 8 (Gao, 2006), nous pouvons penser que le pH acide des milieux a pu provoquer un ralentissement de la croissance bactérienne et donc diminuer encore leur activité réductrice sur le fer(III)-citrate.

Evolution de la concentration de fer(II) dans les milieux contenant des clous

Aux vues des résultats obtenus lors de l'expérience de réduction du fer(III)-citrate, certainement dus à l'inoculation d'une concentration trop faible de bactéries, une culture bactérienne deux fois plus concentrée a été utilisée pour l'inoculation des milieux de l'expérience de réduction du fer(II) du clou.



Graphique 5: Concentration moyenne de fer(II) dans les milieux contenant les bactéries et dans les contrôles, à des concentrations de 1% et 2% d'ions Cl⁻

Le graphique 5 montre une nette augmentation de la concentration moyenne de fer(II) dans les milieux contenant des bactéries contrairement aux milieux contrôles.

L'augmentation de la concentration de fer(II) est tout à fait conforme aux résultats attendus. En absence d'O₂, Les bactéries ont utilisé le fer(III) comme accepteur d'électron, ce qui explique une augmentation progressive du fer(II). Le test des outliers de Grubbs a permis d'éliminer la donnée du 3^{ème} réplica de la mesure réalisée à T₂, car elle était trop élevée par rapport aux autres résultats.

Les résultats pourraient laisser présager une réduction du fer(III) plus importante dans les milieux à 1% d'ions Cl⁻, cependant, un test de Student réalisé sur les deux valeurs les plus éloignées (à T₂₂) indique que cette différence n'est pas significative (P-value = 0.80434556210466). On peut donc considérer que les concentrations en fer(II) obtenues dans les milieux à une concentration de 1% d'ions Cl⁻ sont égales à celles obtenues dans les milieux à une concentration de 2% d'ions Cl⁻.¹¹

Cela contredit les hypothèses issues du fait que la croissance est favorisée dans les milieux contenant plus d'ions Cl⁻ (Gao, 2006) ce qui devrait également impliquer une réduction de fer(III) plus importante dans ces milieux étant donné que la croissance et la respiration anaérobie sont deux processus liés. Il est possible que les clous présents dans les milieux à 2% d'ions Cl⁻ aient libéré moins de fer(III). Cela expliquerait pourquoi on y trouve moins de fer(II) en dépit du fait que le milieu est plus favorable.

Ce graphique montre également que la concentration moyenne de fer(II) dans les milieux contrôles est stable sur toute la durée de l'expérience. Une légère augmentation s'est produite après l'inoculation du clou ce qui signifie que le clou a apporté une faible quantité de fer(II) dans le milieu.

Cela est conforme aux résultats attendus et confirme ce qui a été dit précédemment ; en absence de bactéries, le fer(III) amené par le clou n'a pas pu être réduit en fer(II).

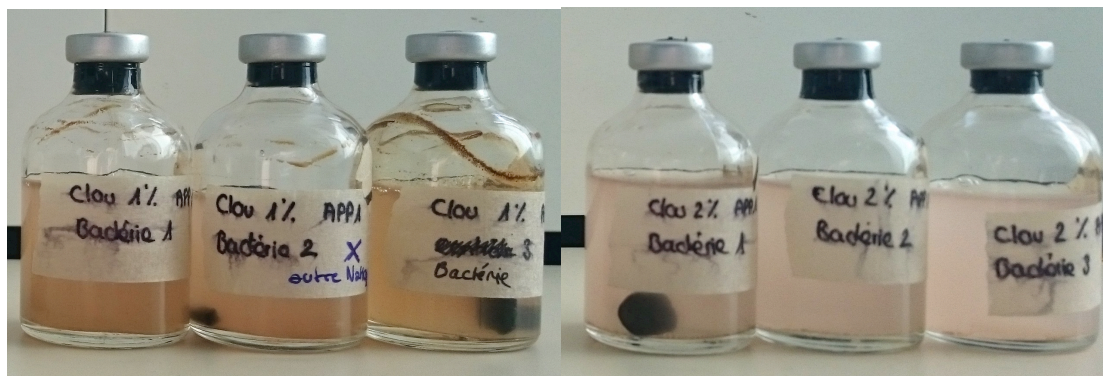


Figure 3: Comparaison des milieux contenant les bactéries à des concentrations de 1% et 2% d'ions Cl⁻ à T₂₄

Les bouteilles de milieu contenant des bactéries ont évolué vers une coloration rose pâle après de 24 heures d'incubation. La comparaison visuelle des bouteilles à une concentration de 1% et 2% d'ions Cl⁻ de la figure 8 montre une coloration plus rose dans les bouteilles à une concentration de 2% d'ions Cl⁻ et plus rose-orange dans les bouteilles à une concentration de 1% d'ions Cl⁻.

L'optimum de croissance de *S. loihica* se situant à une concentration de 2% d'ions Cl⁻ (Gao, 2006), le fait que la coloration des bouteilles à 2% soit plus rose que celles à 1% peut résulter du fait que les bactéries parviennent mieux à s'y développer et réduisent donc plus de fer(III). En effet, pour que la croissance ait lieu, les bactéries doivent réduire le fer durant la respiration anaérobie ; une grande croissance est donc synonyme d'une réduction de fer(III) accrue. Cela est toutefois contesté par les résultats présentés sur le graphique 5 qui indiquent que les milieux à

¹¹ Cf : Annexe 6 : Données brutes de l'expérience de réduction du fer(III) du clou

une concentration de 1% d'ions Cl^- contiennent une concentration plus grande ou égale de fer(II) que ceux à 2%.

Mesure du pH

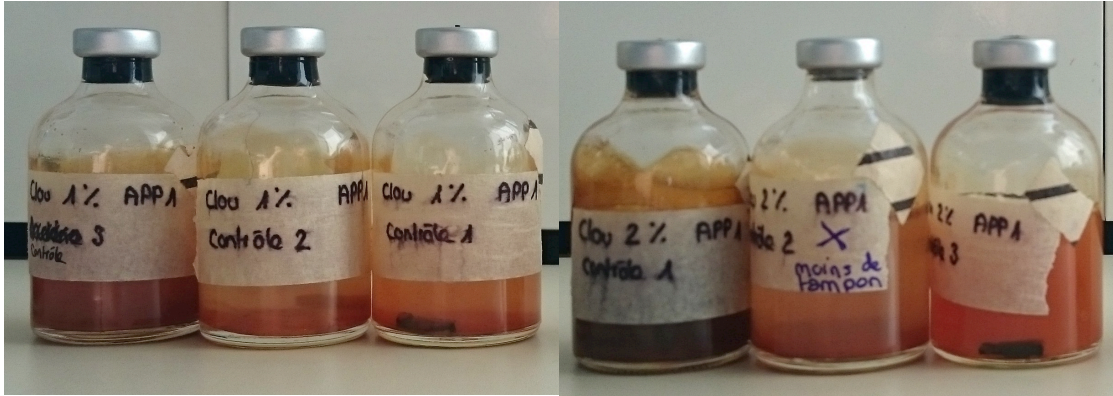


Figure 4: Comparaison des milieux contrôles à des concentrations de 1% et 2% d'ions Cl^- - à T_{24}

Une différence de coloration a été observée dans les bouteilles contrôles contenant 1% et 2% d'ions Cl^- . Un test de pH a été effectué afin de vérifier que cette différence n'est pas due à une différence d'acidité comme lors de l'expérience de réduction du fer soluble. Le pH se situe dans toutes les bouteilles entre 6.5 et 7, comme attendu en présence des tampons HEPES et NaHCO_3 . Nous avons conclu que la différence de couleur dans les bouteilles est due à la taille du clou présent dans chacune d'elles et pas à une différence de pH.

Cette coloration orange témoigne de la présence de rouille et indique donc une présence d' O_2 . Cela s'est probablement produit lors de l'introduction des clous dans la boîte à gant ou lors des prélèvements avec la seringue. Il est ainsi possible que les milieux contenant des bactéries possédaient également une faible quantité d' O_2 , cependant ce n'est pas un problème car la grande densité de bactéries inoculées dans nos milieux a rapidement utilisé l' O_2 et a alors consommé le fer(III).

Mesure de la croissance bactérienne

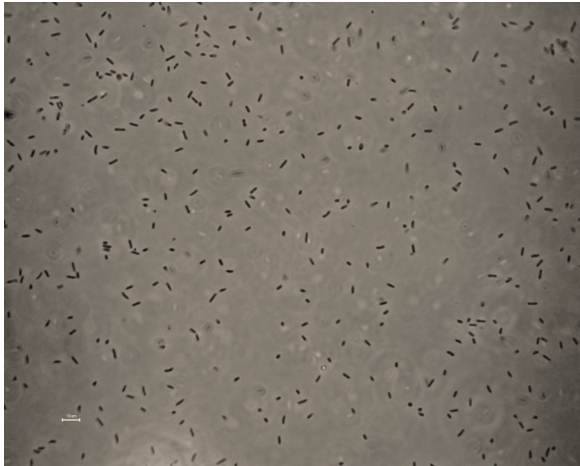


Figure 5: Densité bactérienne dans le milieu inoculé à 1% d'ions Cl⁻ à T₂₆ (microscope optique x100)

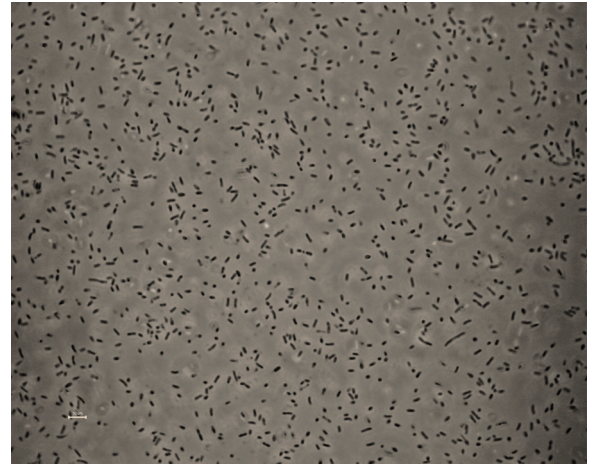


Figure 6: Densité bactérienne dans le milieu inoculé à 2% d'ions Cl⁻ à T₂₆ (microscope optique x100)

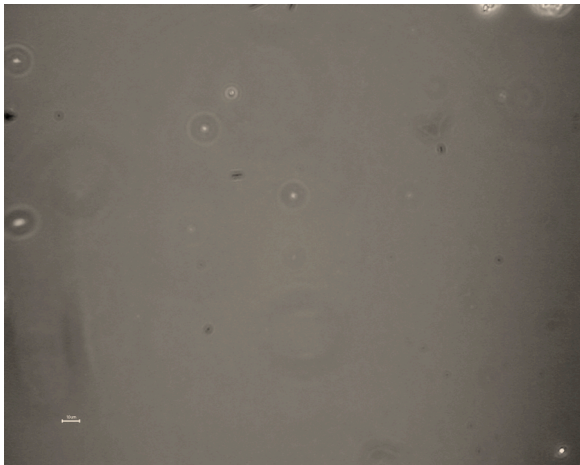


Figure 7: Densité bactérienne dans le milieu contrôle à 1% d'ions Cl⁻ à T₂₆ (microscope optique x100)

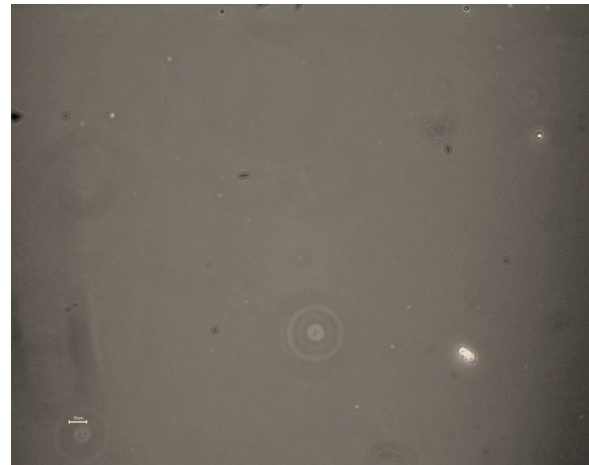


Figure 8: Densité bactérienne dans le milieu contrôle à 2% d'ions Cl⁻ à T₂₆ (microscope optique x100)

Malgré l'inoculation d'une concentration similaire de bactéries dans les milieux à 1% et 2% d'ions Cl⁻¹², une densité bactérienne différente est distinctement observable entre ces deux milieux après 26 heures d'inoculation. Le milieu à 2% est plus favorable à la croissance bactérienne.

Cela confirme l'hypothèse énoncée précédemment, qui suppose que la coloration plus rose dans les bouteilles à 2% d'ions Cl⁻ que dans celles à 1% est due au fait que la croissance bactérienne et la réduction du fer(III) sont favorisées quand la concentration d'ions Cl⁻ est de 2%. En revanche, cela n'est pas en adéquation avec les résultats présentés sur le graphique 5 qui indiquent que les milieux à une concentration de 1% d'ions Cl⁻ contiennent une concentration plus grande ou égale de fer(II) que ceux à 2%.

¹² Cf : Annexe 7 : Comparaison visuelle de la densité bactérienne entre les milieux à des concentration de 1% et 2% d'ions Cl⁻ à T₀

Résultats des analyses de la composition de la surface des clous

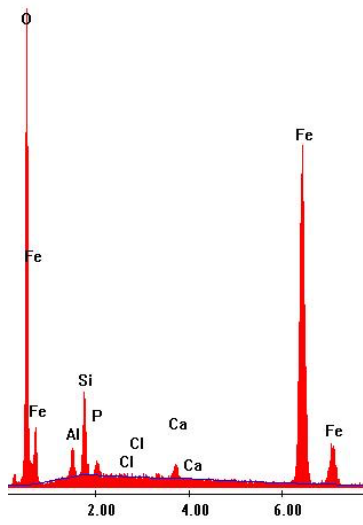


Figure 9: Eléments présents sur le clou non traité

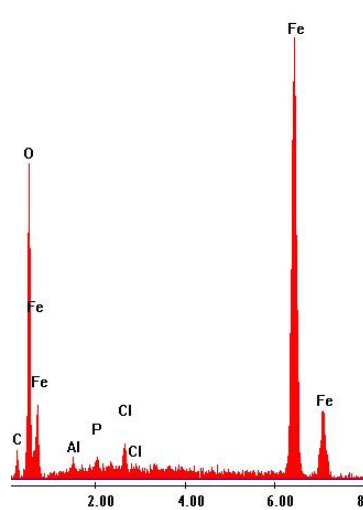


Figure 10: Eléments présents sur le clou incubé dans le milieu contrôlé à 1% d'ions Cl⁻

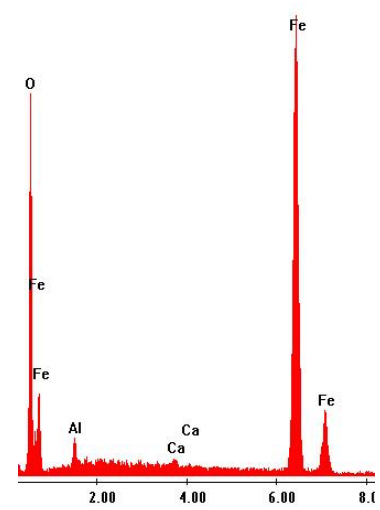


Figure 11: Eléments présent sur le clou incubé avec des bactéries dans le milieu à 1% d'ions Cl⁻

Les résultats des analyses effectuées par microscopie électronique indiquent que les clous testés étaient fortement recouverts d'oxyde de fer. Ceci est déduit d'après le pourcentage élevé de fer et d'oxygène. Nous pouvons constater la présence de chlorures sur le clou non traité ainsi que sur le clou contrôle incubé dans le milieu à une concentration de 1% d'ions Cl⁻. En revanche on peut remarquer leur absence sur le clou ayant été incubé avec des bactéries dans le milieu à 1% d'ions Cl⁻. Ces observations sont identiques pour les clous incubés dans les milieux à 2% d'ions Cl⁻¹³. Il y a une quantité plus importante d'ions Cl⁻ sur le clou incubé dans le milieu contrôle.¹⁴ Cela pourrait être dû à l'ajout d'ions Cl⁻ dans le milieu de culture, cependant cela devrait se remarquer également sur le clou incubé dans le milieu avec les bactéries, ce qui n'est pas le cas. Dans les milieux traités par la bactérie, les ions fer(III) ayant été réduits en ions fer(II), les ions chlorures ne peuvent plus se lier au fer(III) et former de l'akaganéite. Ainsi ces ions chlorures ont diffusé hors du clou.

Ces résultats sont cependant à prendre avec prudence, car le microscope électronique n'analyse que la surface du clou. Il aurait été plus judicieux de couper les clous en deux et de scanner la surface de la coupe avant et après traitement. En effet, les chlorures sont généralement accumulés entre la couche de rouille et l'objet. Il est tout à fait possible que le clou ou la surface scannés ne possédaient pas de chlorures, leur absence ne résulteraient ainsi pas de l'action des bactéries.

¹³ Cf : Annexe 8 : Eléments présents sur les clous incubés dans les milieux à 2% d'ions Cl⁻

¹⁴ Cf : Annexe 9 : Données chiffrées de la composition de la surface des clous

Conclusion

Cette étude nous a permis de vérifier l'hypothèse selon laquelle *S. loihica* est capable de réduire le fer(III) d'un clou en conditions anoxiques, à différentes concentrations d'ions chlorures, même si l'expérience de réduction du fer(III)-citrate n'a pas donné les résultats attendus. Il s'est avéré que les milieux aux concentrations de 1% et 2% d'ions Cl⁻ sont tous deux favorables à la réduction du fer(III). Les données chiffrées indiquent que les milieux avec une concentration de 1% d'ions Cl⁻ donnent des concentrations plus élevées de fer(II), mais les observations visuelles sur la densité bactérienne et la coloration finale des milieux indiquent que la réduction semble être favorisée dans les milieux à des concentrations de 2% d'ions Cl⁻. Dans tout les cas, la réduction du fer(III) s'est tout de même bien déroulée dans le milieu à 1%. Etant donné que les ions chlorures sont néfastes pour les objets archéologiques, il serait préférable d'utiliser le milieu le moins concentré pour traiter ces derniers. Une étude supplémentaire pourrait tenter de déterminer la concentration minimale d'ions Cl⁻ nécessaires à la survie de *S. loihica*, ainsi le processus serait peut-être plus lent, mais l'objet archéologique s'en verrait préservé.

Les résultats de l'expérience de réduction du fer(III) du clou ont été observés après une courte incubation sur un petit objet. *S. loihica* pourrait donc être envisagée comme solution biologique et écologique pour la conservation des objets archéologiques. Cependant, il est possible que l'application à grande échelle pose des contraintes matérielles importantes comme la nécessité de produire d'énormes quantités de cultures bactériennes.

De plus, l'application de ce traitement à des objets archéologiques reste problématique, car *S. loihica* nécessite la présence d'ions chlorures pour croître. Or, pour les conservateurs d'art, il est inconcevable d'ajouter des objets archéologiques dont on veut extraire les chlorures dans un milieu où il y en a.

Il a été constaté qu'une grande concentration de bactéries est nécessaire pour que la réduction du fer(III) se produise rapidement, c'est d'ailleurs la raison pour laquelle l'expérience de réduction du fer(III)-citrate n'a pas répondu à nos attentes.

Les conditions anoxiques nécessaires à la réduction du fer(III) entraînent des complications matérielles importantes, et ne permettent pas de travailler avec des volumes précis. Cela a pour conséquences de grandes marges d'erreur dans les résultats obtenus.

Il est également important de vérifier la pureté des réactifs utilisés et quantifiés comme le fer(III)-citrate dans lequel la présence de fer(II) a posé des problèmes conséquents et a faussé les résultats.

Remerciements

Merci à nos assistantes et superviseuses Wafa Kooli, Monica Albini, Pilar Junier et Edith Joseph, pour leur temps, leur implication, leur gentillesse et leur générosité.

Merci également à toutes les personnes du laboratoire de microbiologie de l'université de Neuchâtel qui ont permis de près ou de loin la réalisation de cette étude.

Bibliographie

- Anne Rinuy, F. S. (1981). Methodes de conservation d'objets de fouilles en fer. Etude quantitative comparee de l'élimination des chlorures. *Studies in Conservation* , 29-41 .
- Bertholon, R. (1989). Le traitement par électrolyse des outils en fer découverts à Jerash . *Syria* , 169-175.
- Bretschger, O. (2007). *Applied and environmental microbiology* , 7003-7012.
- Gao, H. (2006). *Shewanella loihica* sp. nov., isolated from iron-rich microbial mats in the Pacific Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 1911-1916.
- GraphPad, ©. (2015, mars 19). *GraphPad QuickCalcs: outlier calculator* . Retrieved mars 19, 2015 from GraphPad: <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>
- Guillminot, E. (2012). Influence of crucial parameters on the dechlorination treatments of ferrous objects from seawater . *Studies in Conservation* , 227-236 .
<http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Corrosion&action=history>. (2015, février 19). *Corrosion*. (Wikipédia, Editor) Retrieved mars 22, 2015 from Wikipédia, l'encyclopédie libre:
<http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Corrosion&oldid=111990207>
- http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Cytochrome_C&action=history. (2015, mars 12). *Cytochrome C*. (Wikipedia, Editor) Retrieved mars 20, 2015 from Wikipédia, l'encyclopédie libre: http://fr.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_C
- Joseph, E. (2012). Protection of Metal Artifacts with the Formation of Metal–Oxalates Complexes by *Beauveria bassiana*. *Frontiers in Microbiology* .
- Kergourlay, F. (2011). Mechanisms of the dechlorination of iron archaeological artefacts extracted from seawater. 2474–2483.
- Moon, J.-W. (2007, April). Microbial preparation of metal-substituted magnetite nanoparticles. *journal of microbiological methods* , 150-158.
- Ottow, J. M. (2010). *Réduction bactérienne des oxydes ferriques amorphes et cristallisés*. Stuttgart: Association Française pour l'Etude du sol.
- Roh, Y. (2006). Metal Reduction and Iron Biomineralization by a Psychrotolerant Fe(III)-Reducing Bacterium, *Shewanella* sp. Strain PV-4. *Applied and environmental microbiology* , 3236-3237.
- Roh, Y. (2006). Metal Reduction and Iron Biomineralization by a Psychrotolerant Fe(III)-Reducing Bacterium, *Shewanella* sp. Strain PV-4. *Applied and environmental microbiology* , 3236-3244.
- Selwyn, L. (2004). *Overview of archaeological iron: the corrosion problem, key factors affecting treatment, and gaps in current knowledge*. Ottawa: The National Museum of Australia.
- Selwyn, L. (1999). The corrosion of excavated archaeological iron with detail on weeping and akaganéite. *Studies in Conservation* , 217-232.
- Stookey, L. L. (1970). Ferrozine-A New Spectrophotometric Reagent for Iron. *analytical chemistry* , 779-781.
- Weber, K. A. (2006). Microbes Pumping Iron: Anaerobic Microbial Iron Oxidation and Reduction. *Nature Reviews Microbiology* , 752-764.

Annexes

Annexe 1 : Protocole pour la mesure du fer avec la ferrozine

Réactifs à préparer

- Solution de ferrozine à 100mM d'HEPES
- HCl à 5M
- Solution d'Hydroxylamine 1.5M
- Solution stock de fer (II) à 1mM
- Solution stock de fer (III) à 1mM

Préparation

Solution de HCl 5M

- Nettoyer une bouteille graduée de 0.6L avec de l'HCl
- Laver avec de l'eau Milli Q
- Remplir en partie d'eau Milli Q
- Ajouter 415,5ml de HCl 37% (S-20)
- Compléter avec l'eau Milli Q

Solution de ferrozine (1g/L) à 100mM d'HEPES

- Nettoyer un ballon gradué d'1L avec HCl (5M)
- Laver avec l'eau Milli Q
- Remplir en partie avec l'eau Milli Q
- Ajouter 23.83g de HEPES (O-390) (tampon)
- Nettoyer les parois du ballon avec l'eau Milli Q
- Ajouter 1g de ferrozine (O-348)
- Compléter à 1L avec l'eau Milli Q
- Ajuster le pH avec une solution de NaOH

Solution d'hydroxylamine 1.5M

- Nettoyer un ballon gradué de 250ml avec HCl (5M)
- Laver avec l'eau Milli Q
- Remplir en partie avec HCl 0.25M
- Ajouter 26.1g d'hydroxylamine (M-191)
- Laver les parois du ballon avec HCl 0.25M et compléter à 250ml

Solution stock de fer (II) (1mM)

- Nettoyer un ballon gradué d'100ml avec HCl (5M)
- Laver avec l'eau Milli Q
- Remplir en partie avec l'eau Milli Q
- Ajouter 4.155ml de HCl 37% (S-20)
- Ajouter 39.214mg de fer (II) et de sulfate d'ammonium (M-60) et le laisser se dissoudre

- Compléter à 100ml avec l'eau Milli Q

Solution stock de fer (III) (1mM)

- Nettoyer un ballon gradué d'100ml avec HCl (5M)
- Laver avec l'eau Milli Q
- Remplir en partie avec l'eau Milli Q
- Ajouter 4.155ml de HCl 37% (S-20)
- Ajouter 52.68mg de fer (III) et de sulfate d'ammonium (M-61) et le laisser se dissoudre
- Compléter à 100ml avec l'eau Milli Q

Préparation de la courbe étalon

- Décider des concentrations de la courbe d'étalon
- Fer (II) : 100µl de solution stock (à la concentration décidée) + 900µl de ferrozine
- Fer (III) : 100µl de solution stock (à la concentration décidée) + 150µl d'Hydroxylamine + 900µl de ferrozine

Traitement des échantillons avant mesure

- Prendre 100µl de HCl 5M
- Ajouter 900µl d'échantillon
- Stocker dans le noir

Mesures

Fer (II) : (mesure de l'absorbance à 562nm)

- Prendre 100 µl de la solution précédente
- Ajouter 900 µl de ferrozine
- Faire la mesure dans les 2minutes suivantes
- Blanc : 100 µl de HCl 0.5M + 900 µl de ferrozine

Fer (III) : (mesure de l'absorbance à 562nm)

- Prendre 100 µl de la solution précédente
- Ajouter 150 µl d'Hydroxylamine + 900 µl de ferrozine
- Faire la mesure dans les 2minutes suivantes
- Blanc : 100 µl de HCl 0.5M + 150 µl d'Hydroxylamine + 900 µl de ferrozine

Annexe 2 : Données brutes de l'expérience de réduction du fer(III)-citrate

Tableau 1 : Données brutes de l'expérience de réduction du fer(III)-citrate

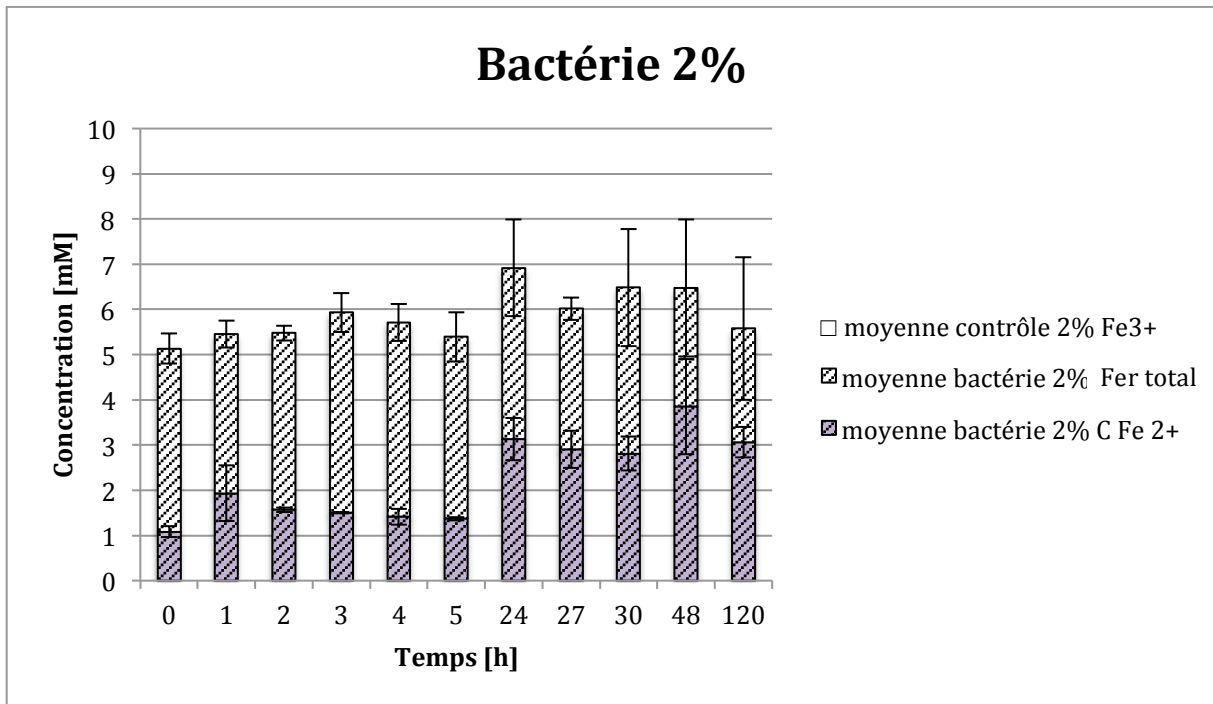
Fe2+	b1 1% A	b1 1% C	b2 1% A	b2 1% C	b3 1% A	b3 1% C	c1 1% A	c1 1% C	c2 1% A	c2 1% C	c3 1% A	c3 1% C
0	0.014	0.46677602	0.052	1.72475395	0.05	1.65854459	0.065	2.15511482	0.034	1.12886967	0.025	0.83092753
1	0.056	1.85717268	0.055	1.824068	0.04	1.32749776	0.061	2.02269609	0.036	1.19507903	0.038	1.2612884
2	0.06	1.98959141	0.054	1.79096332	0.054	1.79096332	0.044	1.45991649	0.042	1.39370713	0.03	0.99645094
3	0.172	5.69731584	0.093	3.08204593	0.048	1.59233522	0.054	1.79096332	0.045	1.49302118	0.044	1.45991649
4	0.068	2.25442887	0.108	3.57861616	0.175	5.79662988	0.057	1.89027736	0.045	1.49302118	0.043	1.42681181
5	0.1	3.31377871	0.086	2.85031315	0.073	2.41995228	0.05	1.65854459	0.046	1.52612586	0.039	1.29439308
24	0.107	3.49523528	0.124	4.05368452	0.126	4.11938443	0.119	3.88943474	0.106	3.46238532	0.123	4.02083457
27	0.077	2.50973661	0.077	2.50973661	0.085	2.77253625	0.102	3.3309855	0.085	2.77253625	0.068	2.21408701
30	0.078	2.54258656	0.092	3.00248594	0.083	2.70683634	0.093	3.0353359	0.101	3.29813554	0.087	2.83823616
48	0.155	5.07203315	0.135	4.41503403	0.151	4.94063332	0.13	4.25078426	0.123	4.02083457	0.14	4.57928381
120	0.127	4.19795009	0.101	3.32076649	0.113	3.71648841	0.126	4.14518717	0.123	4.04625668	0.104	3.41969697

Fe2+	b1 2% A	b1 2% C	b2 2% A	b2 2% C	b3 2% A	b3 2% C	c1 2% A	c1 2% C	c2 2% A	c3 2% C	c3 2% A	c3 2% C
0	0.035	1.16197435	0.037	1.22818372	0.042	1.39370713	0.035	1.16197435	0.038	1.2612884	0.028	0.93024157
1	0.085	2.81720847	0.054	1.79096332	0.052	1.72475395	0.035	1.16197435	0.037	1.22818372	0.031	1.02955562
2	0.053	1.75785863	0.051	1.69164927	0.054	1.79096332	0.035	1.16197435	0.043	1.42681181	0.045	1.49302118
3	0.051	1.69164927	0.051	1.69164927	0.05	1.65854459	0.033	1.09576499	0.035	1.16197435	0.026	0.86403221
4	0.052	1.72475395	0.042	1.39370713	0.05	1.65854459	0.037	1.22818372	0.033	1.09576499	0.028	0.93024157
5	0.048	1.59233522	0.046	1.52612586	0.046	1.52612586	0.033	1.09576499	0.035	1.16197435	0.027	0.89713689
24	0.086	2.80538621	0.114	3.72518497	0.104	3.39668541	0.075	2.4440367	0.073	2.37833679	0.073	2.37833679
27	0.082	2.67398639	0.107	3.49523528	0.094	3.06818585	0.067	2.18123705	0.064	2.08268719	0.068	2.21408701
30	0.08	2.60828648	0.092	3.00248594	0.103	3.36383545	0.065	2.11553714	0.064	2.08268719	0.077	2.50973661
48	0.1	3.26528559	0.16	5.23628292	0.11	3.59378514	0.066	2.1483871	0.066	2.1483871	0.072	2.34548683
120	0.11	3.61755793	0.09	2.95802139	0.096	3.15588235	0.096	3.15588235	0.087	2.85909091	0.097	3.18885918

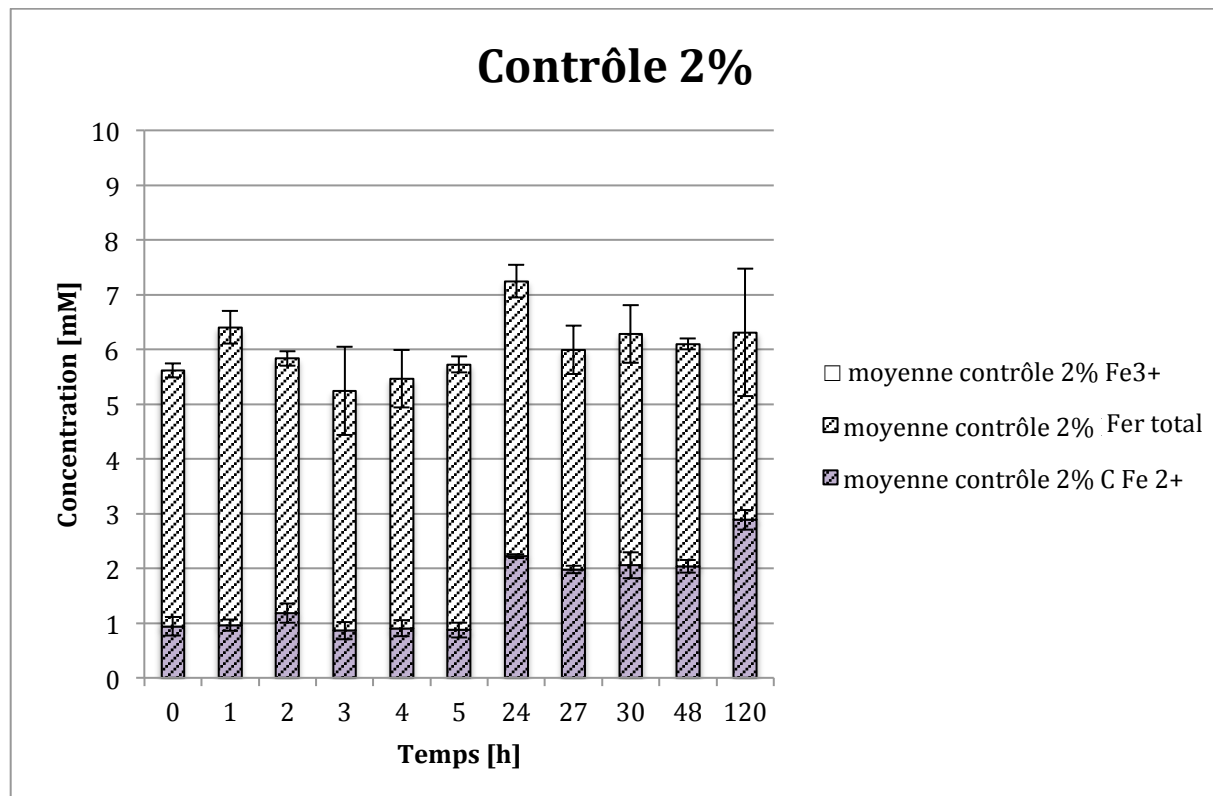
Fer total	b1 1% A	b1 1% C	b2 1% A	b2 1% C	b3 1% A	b3 1% C	c1 1% A	c1 1% C	c2 1% A	c2 1% C	c3 1% A	c3 1% C
0	0.138	5.57272051	0.108	4.33342017	0.124	4.99438035	0.137	5.53141049	0.098	3.92032006	0.138	5.57272051
1	0.132	5.32486044	0.135	5.44879047	0.136	5.49010048	0.156	6.31630071	0.153	6.19237067	0.153	6.19237067
2	0.146	5.9032006	0.146	5.9032006	0.131	5.28355043	0.158	6.39892073	0.16	6.48154075	0.153	6.19237067
3	0.107	4.29211016	0.141	5.69665054	0.164	6.6467808	0.161	6.52285076	0.171	6.93595087	0.159	6.44023074
4	0.148	5.98582062	0.126	5.07700037	0.16	6.48154075	0.158	6.39892073	0.156	6.31630071	0.156	6.31630071
5	0.12	4.82914031	0.139	5.61403052	0.134	5.40748046	0.13	5.24224042	0.137	5.53141049	0.088	3.50721995
24	0.149	6.22433726	0.223	9.2486377	0.167	6.95997791	0.253	10.4747054	0.195	8.10430781	0.252	10.4338365
27	0.157	6.55128866	0.154	6.42868189	0.159	6.63302651	0.145	6.06086156	0.195	8.10430781	0.173	7.20519146
30	0.184	7.65474963	0.181	7.53214286	0.188	7.81822533	0.148	6.18346834	0.167	6.95997791	0.166	6.91910898
48	0.157	6.55128866	0.181	7.53214286	0.134	5.61130339	0.169	7.04171576	0.175	7.28692931	0.15	6.26520619
120	0.156	6.44764513	0.17	7.01500548	0.161	6.65027382	0.188	7.74446878	0.194	7.98762322	0.178	7.33921139

Fer total	b1 2% A	b1 2% C	b2 2% A	b2 2% C	b3 2% A	b3 2% C	c1 2% A	c1 2% C	c2 2% A	c3 2% C	c3 2% A	c3 2% C
0	0.123	4.95307034	0.139	5.61403052	0.133	5.36617045	0.146	5.9032006	0.14	5.65534053	0.144	5.82058057
1	0.131	5.28355043	0.144	5.82058057	0.143	5.77927056	0.154	6.23368068	0.166	6.72940082	0.167	6.77071083
2	0.136	5.49010048	0.14	5.65534053	0.144	5.82058057	0.145	5.86189058	0.151	6.10975065	0.15	6.06844064
3	0.146	5.9032006	0.163	6.60547079	0.144	5.82058057	0.148	5.98582062	0.112	4.49866022	0.143	5.77927056
4	0.139	5.61403052	0.141	5.69665054	0.157	6.35761072	0.126	5.07700037	0.151	6.10975065	0.142	5.73796055
5	0.148	5.98582062	0.143	5.77927056	0.123	4.95307034	0.143	5.77927056	0.145	5.86189058	0.15	6.06844064
24	0.173	7.20519146	0.195	8.10430781	0.143	5.97912371	0.183	7.61388071	0.17	7.08258468	0.182	7.57301178
27	0.147	6.14259941	0.155	6.46955081	0.143	5.97912371	0.14	5.85651694	0.16	6.67389543	0.143	5.97912371
30	0.13	5.44782769	0.156	6.51041973	0.193	8.02256996	0.14	5.85651694	0.16	6.67389543	0.164	6.83737113
48	0.141	5.89738586	0.202	8.39039028	0.135	5.65217231	0.148	6.18346834	0.153	6.38781296	0.15	6.26520619
120	0.16	6.60974808	0.163	6.7313253	0.094	3.93504929	0.171	7.05553122	0.176	7.25815991	0.124	5.15082147

Annexe 3 : Graphiques représentant les concentrations de fer(II), de fer(III) et de fer total dans les milieux à une concentration de 2% d'ions Cl-

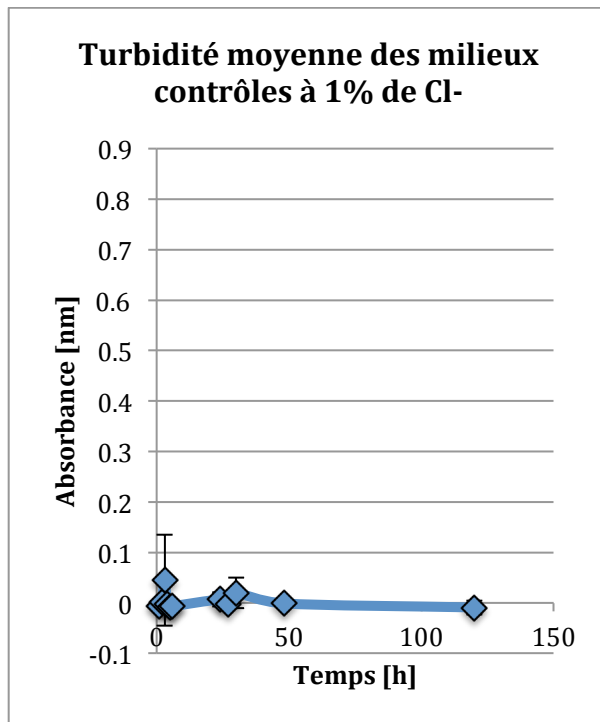


Graphique 6: Proportions de fer(II), de fer(III) et de fer total dans les milieux à une concentration de 2% d'ions Cl- contenant des bactéries

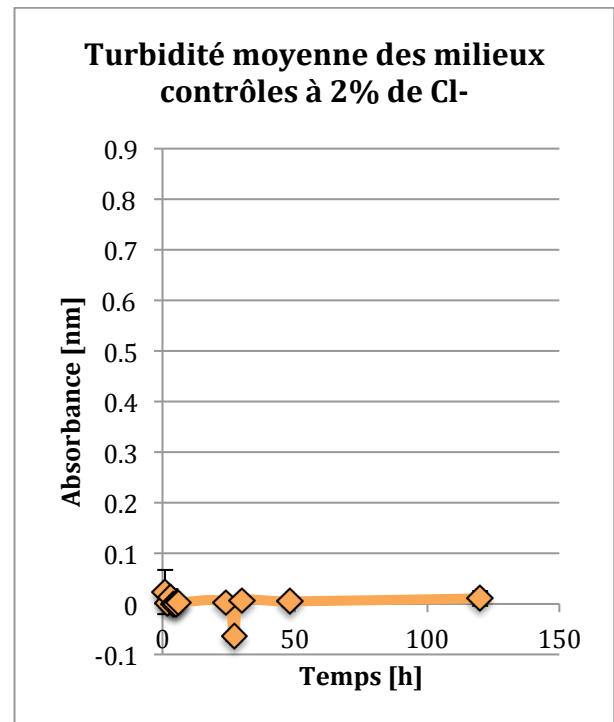


Graphique 7: Proportions de fer(II), de fer(III) et de fer total dans les milieux contrôles à une concentration de 2% d'ions Cl-

Annexe 4 : Graphiques représentant la croissance bactérienne dans les milieux contrôles contenant du fer(III)-citrate



Graphique 8: mesure de la turbidité dans les milieux contrôles à 2% d'ions Cl⁻



Graphique 9: mesure de la turbidité dans les milieux contrôles à 2% d'ions Cl⁻

Annexe 5 : Comparaison de la coloration du milieu attendue lors de la réduction du fer(III)-citrate



Figure 12: Comparaison de la coloration du milieu attendue lors de la réduction du fer(III) à gauche, de la coloration obtenue à T₁₂₀ au centre et de la coloration d'un contrôle à droite

Annexe 6 : Données brutes de l'expérience de réduction du fer(III) du clou

Tableau 2: Données brutes de l'expérience de réduction du fer(III) du clou

Fe2+	b1 1% A	b1 1% C	b2 1% A	b2 1% C	b3 1% A	b3 1% C	c1 1% A	c1 1% C	c2 1% A	c2 1% C	c3 1% A	c3 1% C
AC		0.002 0.09197988	0.001 0.05912992	0.002 0.09197988	0.002 0.09197988	0.002 0.09197988	0.002 0.09197988	0.002 0.09197988	0.002 0.09197988	0.002 0.09197988	0.016 0.55187925	0.016 0.55187925
0		0.018 0.61757917	0.012 0.42047943	0.012 0.42047943	0.03 1.01177863	0.03 1.01177863	0.014 0.48617934	0.014 0.48617934	0 0.02627996	0 0.02627996	0.031 1.04462859	0.031 1.04462859
2		0.036 1.20887837	0.033 1.1103285	0.033 1.1103285	0.224 7.38467002	0.224 7.38467002	0.013 0.45332939	0.013 0.45332939	0 0.02627996	0 0.02627996	0.017 0.58472921	0.017 0.58472921
4		0.058 1.93157739	0.035 1.17602841	0.035 1.17602841	0.09 2.98277597	0.09 2.98277597	0.014 0.48617934	0.014 0.48617934	-0.002 -0.0394199	-0.002 -0.0394199	0.017 0.58472921	0.017 0.58472921
22		0.149 4.88905142	0.115 3.77380319	0.115 3.77380319	0.213 6.9883422	0.213 6.9883422	0.016 0.52646277	0.016 0.52646277	0.002 0.06724291	0.002 0.06724291	0.025 0.82167553	0.025 0.82167553
24		0.141 4.62664007	0.115 3.77380319	0.115 3.77380319	0.184 6.03710106	0.184 6.03710106	0.02 0.65766844	0.02 0.65766844	0.004 0.13284574	0.004 0.13284574	0.028 0.92007979	0.028 0.92007979
26		0.129 4.23802305	0.117 3.83940603	0.117 3.83940603	0.173 5.67628546	0.173 5.67628546	0.016 0.52646277	0.016 0.52646277	0.002 0.06724291	0.002 0.06724291	0.026 0.85447695	0.026 0.85447695

Fe2+	b1 2% A	b1 2% C	b2 2% A	b2 2% C	b3 2% A	b3 2% C	c1 2% A	c1 2% C	c2 2% A	c3 2% C	c3 2% A	c3 2% C
AC		0.001 0.05912992	0.001 0.05912992	0.001 0.05912992	0.001 0.05912992	0.001 0.05912992	0.002 0.09197988	0.002 0.09197988	0.002 0.09197988	0.002 0.09197988	0.001 0.05912992	0.001 0.05912992
0		0.04 1.34027819	0.018 0.61757917	0.018 0.61757917	0.016 0.55187925	0.016 0.55187925	0.058 1.93157739	0.058 1.93157739	0.015 0.5190293	0.015 0.5190293	0.013 0.45332939	0.013 0.45332939
2		0.067 2.22722699	0.028 0.94607872	0.028 0.94607872	0.029 0.97892868	0.029 0.97892868	0.055 1.83302752	0.055 1.83302752	0.01 0.35477952	0.01 0.35477952	0.005 0.19052974	0.005 0.19052974
4		0.071 2.35862681	0.037 1.24172832	0.037 1.24172832	0.023 0.78182894	0.023 0.78182894	0.02 0.68327908	0.02 0.68327908	0.007 0.25622965	0.007 0.25622965	0.001 0.05912992	0.001 0.05912992
22		0.162 5.31546986	0.106 3.47859043	0.106 3.47859043	0.101 3.31458333	0.101 3.31458333	0.093 3.05217199	0.093 3.05217199	0.021 0.69046986	0.021 0.69046986	0.011 0.36245567	0.011 0.36245567
24		0.174 5.70908688	0.112 3.67539894	0.112 3.67539894	0.099 3.2489805	0.099 3.2489805	0.094 3.0849734	0.094 3.0849734	0.022 0.72327128	0.022 0.72327128	0.015 0.49366135	0.015 0.49366135
26		0.164 4.53810727	0.128 4.20022163	0.128 4.20022163	0.104 3.41298759	0.104 3.41298759	0.084 2.75695922	0.084 2.75695922	0.019 0.62486702	0.019 0.62486702	0.014 0.46085993	0.014 0.46085993

Fer total	b1 1% A	b1 1% C	b2 1% A	b2 1% C	b3 1% A	b3 1% C	c1 1% A	c1 1% C	c2 1% A	c2 1% C	c3 1% A	c3 1% C
AC		0.002 0.13486745	0.002 0.13486745	0.002 0.13486745	0.002 0.13486745	0.002 0.13486745	0.002 0.13486745	0.002 0.13486745	0.002 0.13486745	0.002 0.13486745	0.037 1.56527982	0.037 1.56527982
0		0.026 1.11572165	0.009 0.42094993	0.009 0.42094993	0.044 1.8513623	0.044 1.8513623	0.012 0.5435567	0.012 0.5435567	0.007 0.33921208	0.007 0.33921208	0.034 1.44267305	0.034 1.44267305
2		0.031 1.32006627	0.01 0.46181885	0.01 0.46181885	0.001 0.09399853	0.001 0.09399853	0.026 1.11572165	0.026 1.11572165	0.004 0.2166053	0.004 0.2166053	0.033 1.40180412	0.033 1.40180412
4		0.033 1.40180412	0.023 0.99311487	0.023 0.99311487	0.057 2.38265832	0.057 2.38265832	0.032 1.3609352	0.032 1.3609352	0.015 0.66616348	0.015 0.66616348	0.002 0.13486745	0.002 0.13486745
22		0.101 4.18089102	0.104 4.30349779	0.104 4.30349779	0.193 7.94083211	0.193 7.94083211	0.07 2.91395434	0.07 2.91395434	0.021 0.91137703	0.021 0.91137703	0.078 3.24090574	0.078 3.24090574
24		0.131 5.40695876	0.103 4.26262887	0.103 4.26262887	0.17 7.00084683	0.17 7.00084683	0.083 3.44525037	0.083 3.44525037	0.029 1.23832842	0.029 1.23832842	0.043 1.81049337	0.043 1.81049337
26		0.11 4.54871134	0.084 3.48611929	0.084 3.48611929	0.132 5.44782769	0.132 5.44782769	0.066 2.75047865	0.066 2.75047865	0.028 1.19745895	0.028 1.19745895	0.058 2.42352725	0.058 2.42352725

Fer total	b1 2% A	b1 2% C	b2 2% A	b2 2% C	b3 2% A	b3 2% C	c1 2% A	c1 2% C	c2 2% A	c3 2% C	c3 2% A	c3 2% C
AC		0.002 0.13486745	0.001 0.09399853	0.001 0.09399853	0.003 0.17573638	0.003 0.17573638	0.005 0.25747423	0.005 0.25747423	0.002 0.13486745	0.002 0.13486745	0.003 0.17573638	0.003 0.17573638
0		0.027 1.15659057	0.01 0.46181885	0.01 0.46181885	0.011 0.50268778	0.011 0.50268778	0.054 2.26005155	0.054 2.26005155	0.017 0.74790133	0.017 0.74790133	0.018 0.78877025	0.018 0.78877025
2		0 0.0531296	0.026 1.11572165	0.026 1.11572165	0.193 7.94083211	0.193 7.94083211	0.068 2.83221649	0.068 2.83221649	0.007 0.33921208	0.007 0.33921208	0.017 0.74790133	0.017 0.74790133
4		0.055 2.30092047	0.037 1.56527982	0.037 1.56527982	0.018 0.78877025	0.018 0.78877025	0.094 3.89480854	0.094 3.89480854	0.044 1.8513623	0.044 1.8513623	0.048 2.014838	0.048 2.014838
22		0.14 5.77477909	0.094 3.89480854	0.094 3.89480854	0.091 3.77220177	0.091 3.77220177	0.147 6.06086156	0.147 6.06086156	0.098 4.05828424	0.098 4.05828424	0.083 3.44525037	0.083 3.44525037
24		0.149 6.14259941	0.107 4.42610457	0.107 4.42610457	0.086 3.56785714	0.086 3.56785714	0.116 4.79392489	0.116 4.79392489	0.066 2.75047865	0.066 2.75047865	0.049 2.05570692	0.049 2.05570692
26		0.122 5.03913844	0.083 3.44525037	0.083 3.44525037	0.085 3.52698822	0.085 3.52698822	0.086 3.56785714	0.086 3.56785714	0.106 4.38523564	0.106 4.38523564	0.049 2.05570692	0.049 2.05570692

Annexe 7 : Comparaison visuelle de la densité bactérienne entre les milieux à des concentrations de 1% et 2% d'ions Cl⁻ à T₀

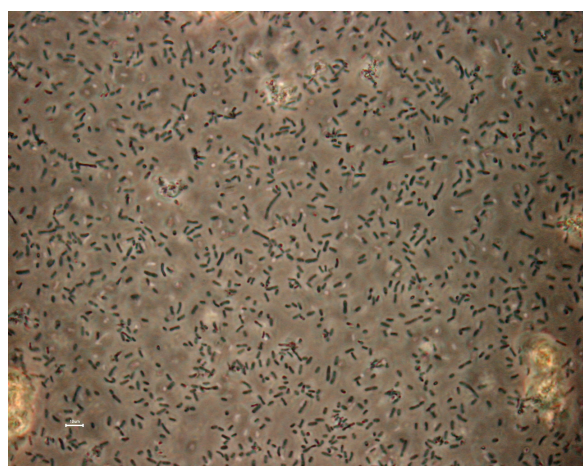


Figure 13: Densité bactérienne dans le milieu inoculé par des bactéries à une concentration de 1% d'ions Cl⁻ à T₀ (microscope optique x100)

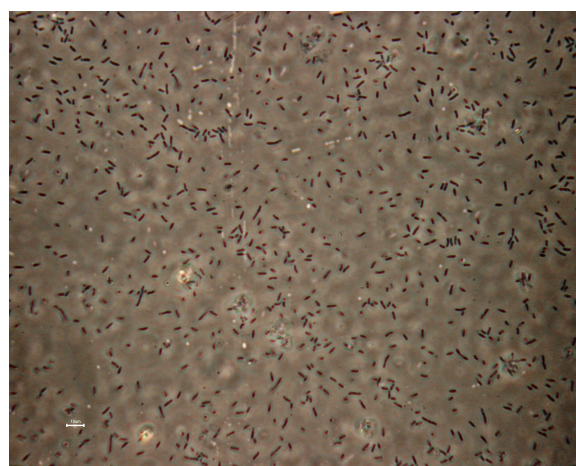


Figure 14: Densité bactérienne dans le milieu inoculé par des bactéries à une concentration de 2% d'ions Cl⁻ à T₀ (microscope optique x100)

Annexe 8 : Eléments présents sur les clous incubés dans les milieux à une concentration de 2% de Cl⁻

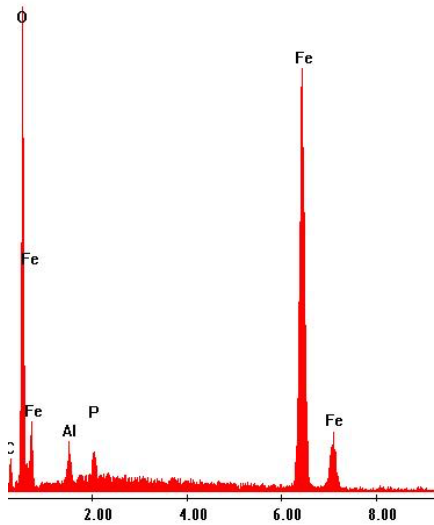


Figure 15: Eléments présents sur le clou incubé avec des bactéries dans le milieu à une concentration de 2% d'ions Cl⁻

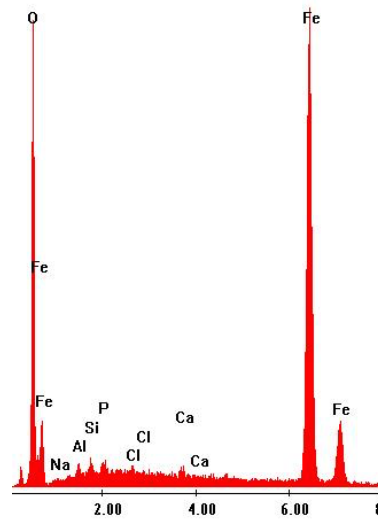


Figure 16: Eléments présents sur le clou incubé dans le milieu contrôle à une concentration de 2% d'ions Cl⁻

Annexe 9 : Données chiffrées de la composition de la surface des clous

Tableau 3: Composition de la surface du clou incubé avec des bactéries dans le milieu à une concentration de 1% d'ions Cl⁻

EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
O K	20.42	46.59	0.1043	1.1223	0.4535	1.0032
AlK	1.83	2.47	0.0067	1.0437	0.3490	1.0006
CaK	0.44	0.40	0.0045	1.0495	0.9343	1.0425
FeK	77.31	50.53	0.7436	0.9582	1.0038	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
O K	171.71	1.70	0.93	100.92
AlK	15.78	7.93	4.30	1.99
CaK	6.18	9.19	9.67	0.67
FeK	470.97	5.64	0.56	83.47

Tableau 4 : Composition de la surface du clou contrôle incubé dans le milieu à une concentration de 1% de ions Cl⁻

EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	5.96	16.54	0.0132	1.1343	0.1956	1.0006
O K	17.63	36.73	0.0810	1.1149	0.4110	1.0031
AlK	0.60	0.74	0.0024	1.0370	0.3880	1.0009
P K	0.70	0.75	0.0046	1.0372	0.6326	1.0028
ClK	1.14	1.07	0.0095	1.0173	0.8116	1.0083
FeK	73.97	44.16	0.7066	0.9513	1.0041	1.0000
Total	100.00	100.00				

Tableau 5: Composition de la surface du clou incubé avec des bactéries dans le milieu à une concentration de 2% de ions Cl⁻

EDAX ZAF Quantification (Standardless)
 Element Normalized
 SEC Table : Default

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	7.47	17.88	0.0173	1.1151	0.2072	1.0006
O K	25.65	46.11	0.1161	1.0961	0.4120	1.0023
AlK	1.78	1.90	0.0072	1.0198	0.3958	1.0008
P K	1.41	1.31	0.0092	1.0181	0.6360	1.0021
FeK	63.69	32.80	0.5986	0.9336	1.0068	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
C K	7.87	0.54	4.44	14.45
O K	138.56	0.97	1.00	143.28
AlK	12.16	5.15	4.55	2.36
P K	13.10	6.48	4.55	2.02
FeK	269.32	3.47	0.72	77.54

Tableau 6 : Composition de la surface du clou contrôle incubé dans le milieu à une concentration de 2% de ions Cl⁻

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
O K	22.02	48.64	0.1136	1.1179	0.4599	1.0030
NaK	0.43	0.67	0.0008	1.0455	0.1753	1.0001
AlK	0.90	1.18	0.0035	1.0397	0.3711	1.0009
SiK	0.73	0.92	0.0038	1.0697	0.4920	1.0015
P K	0.65	0.74	0.0041	1.0401	0.6094	1.0025
ClK	0.25	0.25	0.0021	1.0203	0.7958	1.0083
CaK	0.55	0.48	0.0056	1.0452	0.9382	1.0421
FeK	74.47	47.12	0.7128	0.9540	1.0034	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
O K	87.05	0.56	0.94	154.41
NaK	0.85	1.57	20.39	0.54
AlK	3.74	3.15	7.35	1.19
SiK	3.84	4.26	7.94	0.90
P K	3.76	4.73	8.39	0.79
ClK	1.68	5.39	18.25	0.31
CaK	3.47	4.43	8.77	0.78
FeK	202.64	2.78	0.62	72.86

Tableau 7: Composition de la surface du clou non traité

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
O K	27.57	54.43	0.1365	1.1013	0.4486	1.0024
AlK	2.03	2.38	0.0085	1.0245	0.4079	1.0018
SiK	4.82	5.42	0.0267	1.0541	0.5255	1.0015
P K	0.89	0.91	0.0056	1.0234	0.6162	1.0022
ClK	0.23	0.21	0.0019	1.0033	0.7987	1.0074
CaK	0.91	0.72	0.0091	1.0289	0.9391	1.0361
FeK	63.54	35.94	0.5981	0.9384	1.0030	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
O K	73.36	0.52	0.73	141.32
AlK	6.36	2.67	3.36	2.38
SiK	18.60	3.48	1.70	5.35
P K	3.56	3.44	5.68	1.03
ClK	1.05	3.45	16.79	0.30
CaK	3.92	3.03	5.03	1.29
FeK	117.76	1.71	0.58	68.89

